



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Spektroskopia ramanowska w badaniu rozwoju niealkoholowego  
stłuszczenia wątroby z wykorzystaniem izolowanych komórek wątroby  
oraz modeli komórkowych w warunkach *in vitro***

Autor: Ewelina Matuszyk

Promotor: Prof. dr hab. Małgorzata Barańska

Praca doktorska wykonana w Zespole Obrazowania Ramanowskiego

w Zakładzie Fizyki Chemicznej Wydziału Chemii

Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Kraków 2020

Niniejsza praca doktorska obejmowała trzy etapy, w których wykorzystano różne podejścia do analizy niealkoholowego stłuszczenia wątroby (ang. *nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD). Na każdym etapie korzystano z innego modelu biologicznego oraz technik badawczych. Na początku pracy wykorzystano żywieniowy model zwierzęcy NAFLD i skupiono się na badaniu izolowanych komórek wątroby. Drugi etap oparty został o model komórkowy stłuszczenia w warunkach *in vitro* indukowany kwasami tłuszczowymi. Na ostatnim etapie wykorzystano próbki tkankowe pochodzące z żywieniowego modelu zwierzęcego NAFLD w celu opracowania metody do makroskopowej oceny poziomu stłuszczenia wątroby. W pracy wykorzystano techniki spektroskopowe i mikroskopowe, w szczególności spektroskopię ramanowską, mikroskopię spójnego antystokesowskiego rozpraszania ramanowskiego (CARS, ang. *coherent antistokes raman scattering*) oraz spektroskopię absorpcyjną w podczerwieni ATR FT-IR. Uzyskane wyniki uzupełniono barwieniem histochemicznym oraz testami biologicznymi. Technika wiodącą zastosowaną w niniejszej pracy było obrazowanie ramanowskie.

Wątroba stanowi centrum metaboliczne organizmu a jego dysfunkcja prowadzi do poważnych komplikacji zdrowotnych. Niealkoholowe stłuszczenie wątroby jest najczęstszym schorzeniem tego organu, ściśle związanym ze stylem życia. Jednakże brak specyficznych objawów, szczególnie na wczesnym stadium rozwoju sprawia, że jest ono trudne w diagnozie. Pomimo wysokiej zachorowalności, sięgającej 30% populacji krajów wysokorozwiniętych, patogeneza NAFLD wciąż nie jest jasna. Ponadto, mechanizmy rozwoju tej choroby są wciąż badane.

Wykorzystanie izolowanych komórek wątroby oraz obrazowania ramanowskiego stanowi obiecujące podejście badawcze. Dzięki specyficzności chemicznej oraz wysokiej zdolności rozdzielczej, technika ta pozwala na uzyskanie informacji molekularnej na temat składu chemicznego badanych komórek. Dodatkowo, możliwe jest połączenie informacji o przestrzennej lokalizacji danego składnika komórki i zmian chemicznych tam zachodzących. Natomiast wykorzystanie komórek izolowanych ze zwierzęcego modelu żywieniowego daje możliwość analizowania zmian chemicznych w komórkach będących wypadkową wszystkich procesów zachodzących w żywym organizmie związanych z rozwojem choroby. Podjęte badania skupiły się na śledzeniu zmian chemicznych związanych z dysfunkcją komórek śródbłonka zatok wątroby (LSEC, ang. *liver sinusoidal endothelial cells*), które to zdają się być powiązane z rozwojem NAFLD i mogą przyczyniać się do progresji tego schorzenia w kierunku zapalenia i marskości wątroby. Komórki LSEC (LSEC – takim skrótem będą oznaczane w całej

pracy komórki śródbłonka zatok wątroby w celu przejrzystości tekstu) reprezentują wysoko wyspecjalizowany typ śródbłonka o unikalnej morfologii i funkcjach.

Kluczowym aspektem pracy było znalezienie markerów spektroskopowych zmian chemicznych LSEC, które mogłyby być powiązane z rozwojem NAFLD. Kolejnym celem pracy było zgłębienie procesów wychwytu i metabolizmu lipidów w komórkach LSEC oraz hepatocytach. Ostatnim kierunkiem prowadzonych badań było wykorzystanie potencjału metod spektroskopowych do stworzenia szybkiej metody do oceny stopnia stłuszczenia wątroby, będącej alternatywą do obecnie stosowanego barwienia histochemicznego.

Komórki śródbłonka pomimo posiadania wielu cech wspólnych, wykazują sporą heterogeniczność, mającą swoje odniesienie w fenotypie i funkcjach zależnych od ich lokalizacji w organizmie. Ponadto, ze względu na wykorzystanie w niniejszej pracy komórek izolowanych, jak i tych pochodzących z linii komórkowej, potrzebne było przeprowadzenie charakterystyki ramanowskiej kontrolnych komórek śródbłonka oraz zoptymalizowanie sposobu ich analizy. W tym celu wybrano trzy popularne linie komórkowe śródbłonka, EA.hy926, HAoEC oraz HMEC-1. Komórki te reprezentują śródbłonek pochodzący z różnych typów naczyń krwionośnych, a do ich uzyskania wykorzystuje się różny protokół wyprowadzania linii komórkowych. Analiza ramanowska pozwoliła wskazać różnice we wzajemnej zawartości lipidów, białek i kwasów nukleinowych pomiędzy badanymi liniami komórkowymi.

Do badań nad izolowanymi komórkami wątroby posłużono się modelem zwierzęcym opartym o dietę wysokotłuszczową, powodującą rozwój NAFLD u badanych zwierząt. Odpowiednie eksperymenty zostały wykonane na wczesnym (2 tygodnie żywienia dietą wysokotłuszczową) oraz późnym etapie (15 i 20-ty tydzień) rozwoju stłuszczenia wątroby. Obrazowanie ramanowskie pozwoliło stwierdzić subtelne zmiany chemiczne w poszczególnych organellach komórek LSEC. W pierwszej kolejności, wskazano tendencję wzrostu zawartości kwasów nukleinowych w toku rozwoju NAFLD, którym towarzyszył wzrost zawartości lipidów w cytoplazmie komórek. Analiza kropli lipidowych obserwowanych na każdym etapie choroby wykazała zmianę ich składu chemicznego związaną ze wzrostem stopnia nienasylenia lipidów tworzących te krople. Analogiczne zmiany zaobserwowano dla hepatocytów, jednakże w mniejszym stopniu niż w przypadku komórek LSEC. Zaobserwowaną tendencję zmian w składzie chemicznym, powiązano z istotnym wzrostem w ekspresji enzymu SCD-1, katalizującym syntezę nienasyconych kwasów tłuszczowych z ich nasyconych odpowiedników.

Uzyskane wyniki otworzyły niestudiowany dotąd rozdział w zrozumieniu funkcjonowania komórek LSEC w trakcie rozwoju NAFLD, stąd wychwyty i metabolizm kwasów tłuszczowych stał się przedmiotem kolejnych badań podjętych w niniejszej pracy. Polegały one na analizie składu i dystrybucji kropli lipidowych powstałych w komórkach LSEC oraz hepatocytach na skutek inkubacji z kwasem oleinowym i palmitynowym oraz ich równomolową mieszaniną. Badania wykonano z użyciem odpowiednich linii komórkowych TSEC oraz AML-12 oraz z wykorzystaniem mikroskopii ramanowskiej i mikroskopii CARS. Uzyskane wyniki wskazują, iż komórki LSEC podobnie jak hepatocyty mogą akumulować i metabolizować kwasy tłuszczowe, jednakże przebieg tego procesu jest różny w przypadku obu typów komórek.

Badania skupione wokół schorzeń wątroby, którym towarzyszy stłuszczenie, wymagają etapu poświęconego określeniu jak duży obszar tkanki jest zajęty przez lipidy. Złotym standardem w tego typu analizie jest barwienie histochemiczne ORO, któremu jest poddawana tkanka wątroby. Jednakże, metoda ta wymaga wielu kroków zarówno w przygotowaniu samej tkanki jak i analizie wyniku. Korzystając z potencjału technik spektroskopowych jakimi są szybkość pojedynczego pomiaru oraz łatwość w przygotowaniu próbki do badań, wykorzystano je do oceny stopnia stłuszczenia wątroby. W tym celu użyty został model żywieniowy oparty o dietę wysokotłuszczową wzbogaconą cholesterolem. Próbkę wątroby poddano liofilizacji, a następnie badaniu z wykorzystaniem spektroskopii oscylacyjnej (FT-ramanowskiej i ATR FT-IR) oraz metody referencyjnej w postaci barwienia lipidów barwnikiem ORO. Po przebadaniu próbek, skorelowano ze sobą widma FT-ramanowskie oraz ATR FT-IR ze stopniem stłuszczenia tkanki obliczonym na podstawie barwienia ORO, stosując regresję metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS, ang. *partial least squares*). Widma oscylacyjne wykazały bardzo dobrą korelację z wynikiem barwienia ORO, co pozwoliło na zbudowanie odpowiedniego modelu PLS. Wartości przewidziane przez model wykazały bardzo dobrą zgodność z wartościami rzeczywistymi stopnia stłuszczenia tkanki wątroby. Zatem, zaproponowana w niniejszej pracy procedura oceny stopnia stłuszczenia na podstawie widm oscylacyjnych może stanowić cenną alternatywę dla tradycyjnie stosowanych metod.