



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

„Obrazowanie ramanowskie w analizie pierwotnych komórek śródbłonka w mysim modelu niewydolności serca”

mgr Szymon Andrzej Tott

Na przestrzeni ostatnich dwóch dekad spektroskopia ramanowska znalazła szerokie zastosowanie w badaniach próbek biologicznych, w tym w badaniach nad biochemią komórek. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie pierwotnych komórek śródbłonka z wykorzystaniem spektroskopii ramanowskiej, ze szczególnym uwzględnieniem zmian fenotypu spektroskopowego komórek wynikających z rozwijającej się niewydolności serca. Ze względu na wpływ tej choroby na funkcjonowanie śródbłonka w całym organizmie, za cel postawiono opracowanie protokołów izolacji i pomiarów ramanowskich izolatów z różnych organów. Komórki pochodzenia pierwotnego nie są powszechnie wykorzystywane w spektroskopowych badaniach laboratoryjnych, są jednak najlepszym modelem biologicznym w warunkach *ex vivo/in vitro* do badania zmian biochemicznych na poziomie komórkowym wywołanych patologiami.

W pierwszej części pracy skupiono się na scharakteryzowaniu izolatów komórek śródbłonka serca (CMEC) pochodzących z myszy młodych. Pomiarów spektroskopowe zostały wykonane zarówno na izolatach komórek CD31 pozytywnych, to jest komórek CMEC, jak i CD31 negatywnych stanowiących mieszaninę komórek nie śródbłonkowych. Komórki CMEC charakteryzowały się prostą budową morfologiczną i biochemiczną. Na obrazach ramanowskich

obserwowane są jako niewielkie, lekko wydłużone komórki o średnicy do 40 μm , z dużym jądrem o średnicy do 20 μm . Cechą charakterystyczną badanych komórek był brak kropli lipidowych, co stanowiła później podstawę do identyfikacji i rozróżnienia komórek CMEC od innych komórek w izolacie z tkanki serca. We frakcji CD31 negatywnej uzyskanej z immunomagnetycznego rozdzielania komórek CMEC zostały zidentyfikowane komórki posiadające krople lipidowych, w których skład wchodziły głównie wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Na podstawie analizy danych spektroskopowych oraz danych literaturowych można przypuszczać, że zbadane komórki CD31 negatywne są fibroblastami. Oba te typy komórek udało się z sukcesem zidentyfikować w mieszaninie komórek z tkanki serca przed rozdzieleniem komórek CMEC. Przeprowadzono także pomiary komórek linii H5V, czyli unieśmiertelnionych komórek śródbłonka pochodzących z serca myszy i porównano ich fenotyp z komórkami pierwotnymi. Wykazano różnice fenotypowe pomiędzy obiema populacjami komórek, a głównym czynnikiem różnicującym obie grupy były ponownie krople lipidowe, w których skład wchodziły przede wszystkim nasycone kwasy tłuszczowe.

W kolejnym kroku zbadano wpływ niewydolności serca na fenotyp komórek śródbłonka izolowanych z sześciu różnych organów: serca, aorty, wątroby, nerek, mózgu i płuc. Zarówno izolacja, pomiar oraz analiza uzyskanych wyników została przeprowadzona przy wykorzystaniu ujednoliconego dla wszystkich organów protokołu. Wykazano, że morfologia i fenotyp spektroskopowy śródbłonek różnych organów jest podobny. Następnie, bazując na tym protokole, zbadano wpływ niewydolności serca na fenotyp komórek śródbłonek serca, płuc i wątroby. Analiza danych spektroskopowych wykazała, że na widmach komórek śródbłonka serca następuje obniżenie intensywności pasm charakterystycznych dla kwasów tłuszczowych i kwasów nukleinowych. Odwrotne zjawisko zaobserwowano dla komórek śródbłonka płuc, to znaczy widma komórek pochodzących od zwierząt z rozwijającą się niewydolnością serca były zdominowane przez pasma pochodzące od kwasów tłuszczowych. W przypadku komórek z wątroby nie obserwowano wpływu choroby na fenotyp śródbłonka.

Badania spektroskopowe kontynuowano na komórkach CMEC wprowadzonych do hodowli komórkowej. Celem tej procedury było między innymi zwiększenie ilości dostępnego materiału do badań. Wykorzystując spektroskopię ramanowską badano zmiany fenotypu komórek w trakcie hodowli. Uzyskane wyniki wykazały aktywację procesów biogenezy kropli lipidowych w czasie pierwszych dwóch tygodni hodowli komórek. Zaobserwowano, że kontynuacja hodowli

proceeds to complete degradation of these droplets. The attempt to activate cells with a proinflammatory cytokine TNF- α led to a new biogenesis of lipid droplets, consistent with observations available in the literature related to stress induction in liver cells. The resulting droplets had a different phenotype than those observed earlier in culture. They showed higher homogeneity of composition, and the average degree of lipid unsaturation in the cells was higher (i.e. $2,23 \pm 0,07$) than previously observed (i.e. $1,85 \pm 0,18$), indicating a higher amount of polyunsaturated fatty acids. In parallel cultures of CMEC from mice with heart failure, no lipid droplet biogenesis was observed in the first two weeks. These results were confirmed by fluorescence methods using the ORO dye. The protocol presented in the paper was also used for aorta cells, and the results indicated a similar biogenesis of lipid droplets as in the case of CMEC.

In the final part of the work, the aim of the Raman measurements was to analyze material from mice in the advanced stage of heart failure (12 months). The observed liver cells were morphologically characterized by a significant hypertrophy associated with aging processes. In these cells, no lipid droplet biogenesis was observed during the culture. Additionally, to characterize the macroscopic changes in tissues occurring under the influence of advanced heart failure, measurements were performed using a probe. It was shown that there was a slight increase in the amount of lipids relative to proteins in lung and brain tissues, but the observed changes were not statistically significant.

The results obtained in the framework of this work made it possible to define spectroscopic markers of cell phenotypes from liver cells isolated from different organs, as well as to study changes in the chemical composition of liver cells induced by heart failure. A particular achievement was the development of a single protocol for isolation, Raman measurements, and analysis of suspensions of liver cells from different tissues. With its help, it was shown that there was a significant similarity in morphology and in the spectral profile of these cells. The analysis of spectroscopic data obtained from mice with heart failure made it possible to observe an exceptionally heterogeneous response of cells from different tissues. In summary, the results provide evidence for the influence of early heart failure on the functioning of liver cells in different organs and constitute a motivation to continue the research in order to better understand the mechanism of the development of this disease.