

## **Streszczenie Pracy Doktorskiej**

### **“Atherosclerotic tissues and cells analysis by means of vibrational spectroscopy imaging and chemometrics”**

Tomasz P. Wróbel

Praca wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod opieką prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej

Nowoczesne techniki spektroskopowe stanowią ważne narzędzie w rękach badacza i dają zdolność przestrzennego obserwowania składu chemicznego próbki. Szczególnie dwie metody obrazowania oferują dużą ilość informacji chemicznej, tj. spektroskopia ramanowska i absorpcyjna w podczerwieni (IR). Dlatego też korzystne wydaje się zastosowanie tych technik w systemie, w którym dystrybucja przestrzenna składników chemicznych ma znaczenie. Ponieważ dziedzina obrazowania spektroskopowego tkanek wciąż się rozwija, optymalizacja metodologii prowadzonych pomiarów jest bardzo potrzebna.

Miażdżycza została wybrana jako przedmiot badań ponieważ jest chorobą o dużym znaczeniu dla całego społeczeństwa. Skład lipidów w blaszkach miażdżycowych zmienia się radykalnie podczas rozwoju choroby, co można badać na dostępnych modelach zwierzęcych, a mianowicie na myszach transgenicznym ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>. W celu lepszego zrozumienia mechanizmu choroby wykorzystano też hodowle komórkowe, które są uznanym modelem badania zmian biochemicznych. Liczne doniesienia wskazują na znaczenie komórek śródbłonna w rozwoju miażdżycy tętnic, pożądane jest więc opracowanie metodyki badania hodowli komórek śródbłonna.

Dlatego celem niniejszej pracy doktorskiej było zastosowanie obrazowania FT-IR do badania tkanek miażdżycowych oraz hodowli komórkowych, do opracowania metodyki pomiaru i dodatkowo zbadania potencjalnych artefaktów optycznych wpływających na przeprowadzone pomiary. Następnie korzystając z opracowanej metodyki, kolejnym celem jest opisanie i poznanie zmian biochemicznych w blaszkach miażdżycowych.

Podstawę merytoryczną pracy doktorskiej stanowi 12 publikacji:

1. **T. P. Wrobel**, L. Mateuszuk, S. Chlopicki, K. Malek, M. Baranska, "Imaging of lipids in atherosclerotic lesions in aorta from ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> mice by FT-IR spectroscopy and Hierarchical Cluster Analysis", *Analyst*, 2011, 136(24), 5247-5255 (IF<sub>5-years</sub>=4.097)
2. **T. P. Wrobel**, M. Baranska, "Application of FT-IR imaging in studying atherosclerotic tissue", in "Na pograniczu biologii i chemii" Tom XXV, H. Koroniak (Ed.), Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2011, ISBN-978-83-232-2368-9, pp. 77-86
3. K. Majzner, **T. P. Wrobel**, A. Fedorowicz, S. Chlopicki, M. Baranska, "Secondary structure of proteins analyzed in situ in diabetic animals using FT-IR spectroscopy", *Analyst*, 2013, 138, 7400-7410 (IF<sub>5-years</sub>=4.097)
4. **T. P. Wrobel**, K. Majzner and M. Baranska, "Protein profile in vascular wall of atherosclerotic mice analyzed *ex vivo* using FT-IR spectroscopy" *Spectrochimica Acta A*, 2012, 96, 940-945 (IF<sub>5-years</sub>=2.163)
5. **T. P. Wrobel**, K. M. Marzec, K. Majzner, K. Kochan, M. Bartus, S. Chlopicki, M. Baranska, "Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy of a single endothelial cell", *Analyst*, 2012, 137(18), 4135-4139. Special Themed Issue: 'The Single' (IF<sub>5-years</sub>=4.097)
6. **T. P. Wrobel**, L. Mateuszuk, R. B. Kostogrys, S. Chlopicki, M. Baranska, "Quantification of plaque area and characterization of plaque biochemical composition along atherosclerosis progression in ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> mice by FT-IR imaging", *Analyst*, 2013, 138, 6645-6652 (IF<sub>5-years</sub>=4.097)
7. K.M. Marzec, **T.P. Wrobel**, A. Rygula, E. Maslak, A. Jaształ, A. Fedorowicz, S. Chlopicki, M. Baranska, "Visualization of the biochemical markers of atherosclerotic plaque with the use of Raman, IR and AFM", *Journal of Biophotonics*, 2014, 7(9), 744-756, okładka numeru 9/2014 (IF<sub>5-years</sub>=3.620)
8. **T. P. Wrobel**, T. Moszkowski, M. Baranska, "Zastosowanie metod chemometrycznych do analizy obrazów spektroskopowych FT-IR", w „Chemometria w rozwiązywaniu problemów nauki i praktyki.”, G. Zadora, D. Zuba, A. Parczewski (Eds.), Institute of Forensic Research in Krakow, 2014, ISBN 978-83-87425-04-3, pp. 79-84
9. **T. P. Wrobel**, A. Fedorowicz, L. Mateuszuk, E. Maslak, A. Jaształ, S. Chlopicki, K.M. Marzec, "Vibrational microspectroscopy for analysis of atherosclerotic arteries", w "Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine", M. Baranska (Ed.), Springer, 2014, ISBN 978-94-007-7831-3, pp. 505-535
10. **T. P. Wrobel**, B. Wajnchold, H. J. Byrne, M. Baranska, "Electric Field Standing Wave Effects in FT-IR Transflection Spectra of biological tissue sections: simulated models of experimental variability", *Vibrational Spectroscopy*, 2013, 69, 84–92 (IF<sub>5-years</sub>=1.791)
11. **T. P. Wrobel**, B. Wajnchold, H. J. Byrne, M. Baranska, Corrigendum: "Electric Field Standing Wave Effects in FT-IR Transflection Spectra of biological tissue sections: simulated models of experimental variability", *Vibrational Spectroscopy*, 2014, 71, 115–117 (IF<sub>5-years</sub>=1.791)

Zgłoszenia patentowe:

1. **T. P. Wrobel**, S. G. Kazarian, M. Baranska, Patent application for Poland no P.405822 „Apertura optyczna do wyboru kąta padania w obiektywach typu Cassegrain”, X.2013

W pracy, scharakteryzowano trzy grupy standardów lipidowych: wolne kwasy tłuszczowe, trójglicerydy, estry cholesterolu oraz cholesterol. Myszy kontrolne bez blaszki miażdżycowej porównano z transgenicznymi myszami ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>, które spontanicznie rozwijają miażdżycę. Zaobserwowano heterogeniczność w rozkładzie przestrzennym cholesterolu i estrów cholesterolu wewnątrz blaszki miażdżycowej oraz zmienny sygnał od związków nienasyconych w komórkach piankowatych.

Następnie, przeprowadzono analizę profilu białkowego i struktur drugorzędowych białek w aortach kontrolnych oraz miażdżycowych. Zastosowanie Hierarchicznej Analizy Skupień (HCA) w zakresie pasm amidowych pozwoliła na zidentyfikowanie klasy w blaszce o unikalnym profilu białkowym. Został stworzony model Liniowej Regresji Wielokrotnej (Multiple Linear Regression – MLR) pomiędzy widmami standardów białek a danymi dotyczącymi zawartości struktur drugorzędowych z bazy danych Protein Data Bank (PDB). Stosując MLR przeliczono obrazy FT-IR tkanek dając przestrzenny rozkład zawartości różnych struktur. Zaobserwowano wzrost zawartości  $\beta$ -krotek i spadek zawartości  $\alpha$ -helis w tkance miażdżycowej w porównaniu do kontroli.

Kolejnym etapem była analiza progresji choroby. W pierwszym kroku, opracowano metodę opartą na obrazach FT-IR do ilościowego określenia wielkości blaszki miażdżycowej i wyniki porównano z klasycznym barwieniem czerwienią oleistą (Oil Red O), uzyskując wysoki współczynnik korelację ( $R^2 = 0.935$ ). W drugim kroku, przy użyciu dwuetapowe podejścia HCA, stwierdzono, że zmiany związane z progresją choroby występują w regionach płytki, które nie zawierają najwyższej ilości cholesterolu a tylko średnią zawartość. Przeprowadzono wizualizację FT-IR zmian składu chemicznego w blaszce spowodowanych dietą wyskobiałkową (Low Carbohydrate High Protein – LCHP) i skorelowano z mapami uzyskanymi z obrazowania ramanowskiego i z mikroskopii sił atomowych (AFM), które dostarczają wiele parametrów do analizy potencjalnie niestabilnych blaszek miażdżycowych. Wstępne wyniki wskazują na znaczące zmiany chemiczne w tkankach myszy diecie LCHP, w odniesieniu do kontroli. Największa statystycznie istotna zmiana wiązała się ze wzrostem zawartości estrów cholesterolu i poziomu ich nienasyceń, tj. liczbą wiązań podwójnych.

Dokonano ulepszeń w technice pomiaru w metodzie osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR). Przeprowadzono badanie wpływu nacisku kryształu podczas pomiaru na stan pojedynczych komórek śródbłonna. Zaobserwowano spłaszczenie się komórek przy nawet najmniejszym stosowanym nacisku. Stopień tego efektu mierzono wzrostem średnicy

komórki, który wyniósł 18% w pierwszym kroku nacisku od momentu kontaktu. Zaprojektowano nowe apertury optyczne do obrazowania Ge ATR umożliwiające pomiary o zmiennej głębokości penetracji (dp), w zależności od kąta padania promieniowania. Wartości dp dla kątów, kryształu i długości fal stosowanych w FT-IR (2,5 - 10 mikrometrów) są w zakresie (zależnie od długości fali) ok. 200-1000 nm. Próbka trójwarstwowego polimeru oraz 3 różne apertury były wykorzystane do pokazania zmian dp i zaobserwowania granicy pomiędzy warstwami na głębokości 250 nm od powierzchni kryształu.

Przeprowadzono teoretyczne badania artefaktu związanego z falą stojącą pola elektrycznego (Electric Field Standing Wave – EFSW) na widma FT-IR tkanki biologicznej i stwierdzono wpływ trzech czynników na wielkość efektu. Dwa z nich, wykazały znaczący wpływ na zmniejszenie EFSW, tj. nierówności tkanki oraz koherencja promieniowania, przy czym ostatni efekt był silniejszy. Wyniki te mogą mieć duży wpływ na wiarygodność pomiarów próbek biologicznych wykonywanych w trybie transfleksji.

Podsumowując, przeprowadzono analizę tkanek miażdżycowych zarówno pod kątem lipidów jak i białek, co dało obraz składu chemicznego blaszki miażdżycowej i jego zmian podczas rozwoju choroby. Postępy w metodyce obejmują stworzenie ilościowego podejścia FT-IR do określenia rozmiaru blaszki, opis właściwego zaplanowania eksperymentu koniecznego do statystycznej analizy danych, zaprojektowanie nowych apertur do obrazowania FT-IR ATR i wreszcie teoretyczne badania artefaktów optycznych zaburzających mierzone widma w spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni.