

STRESZCZENIE

Rola czerwonych krwinek (*ang. red blood cells, RBCs*), zarówno w procesach fizjologicznych jak i patologicznych, znacznie wykracza poza ich podstawową funkcję transportera gazów oddechowych. RBCs są częścią wielu mechanizmów, takich jak regulacja przepływu krwi, co jest istotne zwłaszcza w mikrokrążeniu. Uznanie roli RBCs jako regulatorów mikronaczyniowego przepływu krwi sugeruje, że komórki te mogłyby stać się celem terapeutycznym, otwierając drogę do opracowania nowatorskich strategii leczenia niektórych chorób. Z tego punktu widzenia znaczenie charakteryzacji właściwości RBCs i badania ich zmian w różnych procesach patologicznych jest niezwykle istotne. Różne choroby wywołują zmiany i upośledzenie funkcji erytrocytów. Zmodyfikowany skład i struktura błony komórkowej, obniżony poziom wewnątrzkomórkowego trifosforanu adenozy (ATP), zmieniona struktura hemoglobiny (Hb), upośledzone mechanizmy uwalniania ATP, itp. mogą przyczyniać się do powstania zmian chorobowych, a nawet nasilać zmiany wywołane niektórymi czynnikami chorobowymi. Dlatego też nadrzędnym wyzwaniem niniejszej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie i zrozumienie wpływu hipercholesterolemii i miażdżycy na właściwości krwinek czerwonych z uwzględnieniem płci i wieku, w celu utorowania drogi dalszym badaniom, które mogą prowadzić do opracowania nowych metod leczenia miażdżycy.

Miażdżyca tętnic związana jest z akumulacją lipidów w błonie wewnętrznej naczyń krwionośnych i charakteryzuje się tworzeniem tzw. blaszek miażdżycowych. W rozwoju blaszek miażdżycowych istotną rolę odgrywają takie komórki, takie jak: makrofagi, komórki mięśni gładkich, leukocyty, erytrocyty, itp. Rola RBCs została zdefiniowana jako opierająca się głównie o ich udział w akumulacji lipidów poprzez wynaczynienie RBCs i ich hemolizę w obrębie blaszki. Jednak ich inne możliwe role, a także wpływ miażdżycy na same RBCs nadal wymagają poświęcenia uwagi. Z tego powodu niniejsza rozprawa koncentruje się na analizie zmian mechanicznych, biochemicznych i metabolicznych krwinek czerwonych w mysim modelu miażdżycy, w porównaniu z kontrolą typu dzikiego, z uwzględnieniem tak wieku, jak i płci zwierząt.

Plan badawczy rozprawy doktorskiej oraz realizacja badań została podzielona na cztery etapy i pozwoliła autorowi zweryfikować cztery następujące hipotezy główne:

1) *Podstawowe wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe poziomy ATP są skorelowane ze specyficznymi zmianami RBCs obserwowanymi u samców i samic myszy ApoE/LDLR^{-/-} w różnych etapach progresji miażdżycy.*

2) *Nieodwracalne zmiany struktury drugorzędowej białek w cytozolu RBCs u myszy ApoE/LDLR^{-/-} mają wpływ na zmiany poziomu 2,3-DPG oraz zmiany profilu ATP.*

3) *Zmiany cytozolu i błon komórkowych RBCs mają wpływ na uwalnianie ATP i dlatego oba te czynniki zależą od stadium progresji miażdżycy.*

4) *Indukowane niedotlenieniem uwalnianie ATP z krwinek czerwonych u myszy ApoE/LDLR^{-/-} nie jest osłabione, a może nawet wzrastać i przyczyniać się do mechanizmu, który skutkowało opisaną wcześniej wyższą zdolnością wysiłkową.*

Aby osiągnąć nadrzędny cel pracy i potwierdzić postawione hipotezy badawcze, na początku badań skoncentrowano się na charakterystyce wybranych właściwości biochemicznych, mechanicznych i funkcjonalnych RBCs. W tym celu zbadano morfologię i odkształcalność RBCs, profil lipidowy osocza, ekspresję fosfatydyloseryny (PS) na powierzchni błony komórkowej RBCs, zmiany biochemiczne w błonach oraz zmiany w drugorzędowej strukturze białek cytozolu RBCs, profilu ATP dla RBCs (podstawowy wewnątrzkomórkowy, podstawowy zewnątrzkomórkowy i uwolnione ATP), itp. Wszystkie parametry scharakteryzowano zarówno u samic, jak i samców myszy ApoE/LDLR^{-/-} w wieku 8 i 24 tygodni i porównano z parametrami zwierząt kontrolnych, stosując zarówno klasyczne techniki pomiarowe, w tym pomiary ektacytometryczne, pomiary morfologii krwi, pomiary biochemiczne, analizę gazometryczną, itp. oraz techniki spektroskopii oscylacyjnej, takie jak spektroskopia rozpraszania ramanowskiego (RS) i spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni (FTIR). Spektroskopia oscylacyjna umożliwiła detekcję nowych zmian biochemicznych w błonach komórkowych oraz określenie zmian struktury drugorzędowej białek w badanych krwinkach czerwonych. W trakcie interpretacji wyników dla badanych parametrów RBCs uwzględniono poziom progresji choroby, płeć oraz wiek zwierząt.

Dostępna literatura pokazuje, że poprzednio dokonano już opisu niektórych parametrów RBCs u samców myszy ApoE/LDLR^{-/-} badanych w niniejszej rozprawie. Podjęte badania dostarczyły jednak nowej wiedzy, rozszerzając analizę również o płeć zwierząt. Po raz pierwszy określono i

udokumentowano podstawowe wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe poziomy ATP w krwinkach czerwonych u myszy ApoE/LDLR^{-/-} oraz zbadano i przeanalizowano ich związek z przedstawionymi powyżej cechami mechanicznymi i biochemicznymi krwinek czerwonych. Uzyskane wyniki sugerują, że podstawowe wewnątrzkomórkowe poziomy ATP w krwinkach czerwonych odzwierciedlają trendy zmian obserwowanych dla: zewnątrzkomórkowych poziomów ATP, ekspresji PS na powierzchni błon komórkowych oraz średniej objętości erytrocytów MCV; ale nie wykazano bezpośredniego związku w trendach obserwowanych dla parametrów: HGB, MCH, MCHC i odkształcalności. Rola i znaczenie ATP we wszystkich wyżej wymienionych parametrach czynnościowych erytrocytów jest bezdyskusyjna, chociaż przedstawione wyniki nie wskazują na bezpośredni związek między wewnątrzkomórkowym poziomem ATP, a niektórymi z badanych właściwościami. Taki wynik może sugerować, że niektóre funkcje krwinek czerwonych wymagają mniejszej ilości ATP, dlatego nie można ich było zanalizować bez dodatkowych eksperymentów. Co więcej, wyniki rozprawy doktorskiej dowodzą, że zmiany były zależne od płci i są argumentem przemawiającym za potrzebą rozważania płci zwierząt laboratoryjnych jako zmiennej fizjologii RBCs.

Zmiany zależne od stadium choroby, płci i wieku w profilu lipidowym błon komórkowych RBCs oraz zmiany struktury drugorzędowej białek w cytozolu RBC obserwowane u myszy ApoE/LDLR^{-/-} w porównaniu z odpowiednią grupą kontrolną zostały kompleksowo scharakteryzowane dzięki zastosowaniu technik spektroskopii oscylacyjnej: RS i FTIR. Dodatkowo określono poziom 2,3-DPG w krwinkach czerwonych i przedstawiono jego możliwy związek ze zmianami struktury drugorzędowej Hb dla każdej z badanych grup. Wyniki wykazały silny związek między poziomem nienasyconych lipidów błon komórkowych RBCs, a jej płynnością, tj. odkształcalnością, co potwierdza poprzednie doniesienia literaturowe. Można jednak bezpiecznie założyć, że poziomy nienasyconych lipidów nie są jedyną zmienną wpływającą na odkształcalność RBCs. Znacznie wyższy całkowity poziom lipidów u samic i samców myszy ApoE/LDLR^{-/-} w porównaniu z grupą kontrolną w tym samym wieku najprawdopodobniej wynikał z akumulacji lipidów w błonach krwinek czerwonych ze względu na ich silną korelację z profilem lipidowym osocza. Opisane zmiany w profilu lipidowym błon komórkowych RBCs były głównie związane z hipercholesterolemią u myszy ApoE/LDLR^{-/-}, chociaż obserwacja ta nie wyjaśnia wszystkich

ustaleń. Dane te potwierdzają hipotezę, że profil lipidowy błon komórkowych RBCs zależy od wielu czynników.

W rozprawie doktorskiej wykazano, że RBCs izolowane od myszy ApoE/LDLR^{-/-} przejawiały znaczące zmiany w drugorzędowej strukturze cytozolu erytrocytów, związanego głównie ze zmianami w strukturze Hb, w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Nie zaobserwowano zmian ze względu na płeć w drugorzędowej strukturze Hb w krwinkach czerwonych izolowanych od młodych myszy kontrolnych i myszy ApoE/LDLR^{-/-}. W przeciwieństwie do tego, starsze grupy myszy wykazywały różnice związane z płcią, tj. 24-tygodniowe samce myszy ApoE/LDLR^{-/-} wykazywały statystycznie istotny wzrost zmian w drugorzędowej strukturze Hb w porównaniu z 24-tygodniowymi samicami ApoE/LDLR^{-/-}. Wskazuje to na wyższą oporność żeńskich krwinek czerwonych na wtórne zmiany strukturalne w Hb spowodowane miażdżycą u starszych zwierząt. Taka tendencja jest zgodna z poziomami 2,3-DPG, gdzie nie zaobserwowano żadnych różnic związanych z płcią dla młodych mysich RBCs zarówno u myszy kontrolnych, jak i ApoE/LDLR^{-/-}. Ponadto, podobnie do zmian struktury drugorzędowej Hb, zmiany związane z płcią w stężeniu 2,3-DPG zostały zidentyfikowane u 24-tygodniowych samców myszy ApoE/LDLR^{-/-}, które wykazały znacznie wyższy poziom w porównaniu z dopasowanymi wiekowo samicami ApoE/LDLR^{-/-}. Potwierdza to hipotezę, że istnieje korelacja między zmianami w drugorzędowej strukturze Hb, a poziomami 2,3-DPG w RBCs u myszy płci męskiej i żeńskiej (zarówno kontrolnych, jak i ApoE/LDLR^{-/-}). Im wyższy poziom 2,3-DPG w RBCs, tym większe zmiany struktury drugorzędowej ich białek cytozolu lub odwrotnie. RBCs myszy ApoE/LDLR^{-/-} przejawiały większą zdolność przenoszenia tlenu pomimo wyższych poziomów 2,3-DPG. Dodatkowo, ponieważ poprzednio wykazano, że opisane powyżej zmiany w drugorzędowej strukturze białka Hb u myszy ApoE/LDLR^{-/-} mogą być nieodwracalne, zasugerowano również, że poziom 2,3-DPG w krwinkach czerwonych są zwiększone w ramach mechanizmu kompensacyjnego w odpowiedzi na takie nieodwracalne zmiany struktury białkowej.

Po scharakteryzowaniu różnych cech biochemicznych i mechanicznych mysich krwinek czerwonych z zastosowaniem multimodalnych technik pomiarowych, zbadano i wyjaśniono inną ważną cechę krwinek czerwonych, tj. zdolność uwalniania ATP w odpowiedzi na różne bodźce. Uwalnianie ATP z krwinek czerwonych następuje w odpowiedzi na różnorakie bodźce fizjologiczne

i farmakologiczne. Wcześniejsze badania wykazały, że uwalnianie ATP z krwinek czerwonych jest upośledzone w różnych chorobach. Niemniej jednak, zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, nigdy nie opisano analizy uwalniania ATP z krwinek czerwonych w jakimkolwiek modelu miażdżycy. W związku z tym scharakteryzowano uwalnianie ATP z krwinek czerwonych w odpowiedzi na różne bodźce i kolejno skorelowano z wcześniej zbadanymi w pracy zmianami parametrów krwinek czerwonych. Ponadto zbadano ekspresję białek PANX1 i VDAC1 na powierzchni błon komórkowych RBCs.

Badania nad specyfiką uwalniania ATP z krwinek czerwonych rozpoczęto od sprawdzenia efektu iloprostu (ILO) przy zastosowaniu stężeń leku poniżej LD_{50} i w zakresie poziomów terapeutycznych. Rezultaty wskazują, że terapeutyczne stężenia ILO nie powodowały silnego uwalniania ATP z krwinek czerwonych w żadnej z badanych grup myszy. Ponadto stwierdzono, że ekspresja VDAC1 na powierzchni błon komórkowych RBCs jest na podobnym poziomie. Następnie zastosowano inny bodziec farmakologiczny - koktajl 3V (zawiera 10 μ M izoproterenolu, analogu receptora β -adrenergicznego, 30 μ M forskoliny, aktywatora cykazy adenylowej oraz 100 μ M papaweryny, inhibitora fosfodiesterazy), w celu oceny stabilności cAMP - zależnego uwalniania ATP z RBCs. Składniki koktajlu 3V miały spowodować zwiększenie stężenia cAMP w RBCs, co prowadziłoby do uwolnienia ATP za pośrednictwem kanałów PANX1. Wyniki badań wskazują, że indukowane 3V uwalnianie ATP z krwinek czerwonych nie jest osłabione w żadnej z badanych grup, jak również nie wykazano różnicy między poszczególnymi grupami. Pomimo iż po zastosowaniu koktajlu 3V nastąpiło uwalnianie ATP z krwinek czerwonych, dane te nie pozwoliły na indywidualną ocenę wpływu każdego ze składników koktajlu 3V. Można jednak wnioskować, że aktywność cykazy adenylowej i wcześniejszych elementów szlaku transdukcji sygnału jest nienaruszona oraz że wzrost cAMP stymuluje uwalnianie ATP z krwinek czerwonych we wszystkich badanych grupach zwierząt.

Kolejnym etapem było zastosowanie niedotlenienia jako bodźca fizjologicznego, aby przetestować hipotezę, że wywołane niedotlenieniem uwalnianie ATP z krwinek czerwonych u myszy ApoE/LDLR^{-/-} nie jest upośledzone i może być nawet większe u myszy ApoE/LDLR^{-/-}, jak i potwierdzić opisaną wcześniej obserwację świadczącą o wyższej wydolności wysiłkowej tych zwierząt w porównaniu z grupą kontrolną w tym samym wieku. Wyniki rozprawy, wskazujące, że

indukowane hipoksją uwalnianie ATP z krwinek czerwonych u myszy ApoE/LDLR^{-/-} było większe w porównaniu z kontrolą w tym samym wieku, dostarcza dowodów na poparcie proponowanej hipotezy. Dodatkowo, analiza Western Blot sugeruje wyższy poziom ekspresji białek PANX1 na błonie RBCs u myszy ApoE/LDLR^{-/-}, co jest zgodne z większym uwalnianiem ATP z RBCs indukowanym hipoksją u tych zwierząt w porównaniu z ich kontrolami w tym samym wieku. Co więcej, indukowane niskim pH uwalnianie ATP z RBCs wykazywało prawie identyczne tendencje, co uwalnianie ATP wywołane hipoksją. Ponadto, wyniki sugerują potencjalną rolę niskiego pH w zwiększeniu zdolności wysiłkowej u myszy ApoE/LDLR^{-/-}. Niemniej jednak potrzebne są dalsze badania, które nie mieszczą się w zakresie niniejszej rozprawy, aby wyjaśnić całą ścieżkę sygnałową. Warto zauważyć, że dogłębna analiza tych szlaków i ich elementów może sprawić, że RBCs będą wyjątkowym celem terapeutycznym dla opracowania nowych strategii leczenia miażdżycy, a także innych chorób naczyniowych.

Na końcu rozprawa zawiera również część aplikacyjną, która obejmuje prototypowanie innowacyjnego urządzenia do oceny indukowanego deformacją uwalniania ATP z krwinek czerwonych (DIAR). Zasadność niniejszego aspektu pracy wynikała z braku na rynku testu lub też standardowej metody do oceny poziomu uwalniania ATP z erytrocytów indukowanego odkształcaniem erytrocytów. Zaprojektowany prototyp DIAR wraz z opracowaną metodologią pomiarów został przedstawiony w zgłoszeniu patentowym.

Podsumowując, niniejsza rozprawa doktorska koncentruje się na wykorzystaniu multimodalnego podejścia pomiarowego, z zastosowaniem technik zarówno klasycznych jak i spektroskopowych do analizy i charakteryzowania różnych właściwości krwinek czerwonych w mysim modelu miażdżycy. Wykazano, że hipercholesterolemia i miażdżyca mają wpływ na wybrane cechy i funkcje RBCs. Ponadto dowiedziono, że płeć i wiek zwierząt to czynniki wpływające na niektóre z przedstawionych zmian biochemicznych i mechanicznych krwinek czerwonych. Wykorzystanie technik spektroskopii oscylacyjnej umożliwiło ocenę profilu lipidowego błon komórkowych RBCs, jak i drugorzędowej struktury hemoglobiny. Oprócz tego rozprawa doktorska pozwoliła na wielopoziomową analizę uwalniania ATP, przy zastosowaniu różnych bodźców fizjologicznych i farmakologicznych. Dodatkowo wybrane funkcje RBCs, tj.: odkształcalność RBCs, ekspresja PS na powierzchni błon komórkowych, profil lipidowy błon

komórkowych RBCs, zmiany w drugorzędowej strukturze białka, wewnątrzkomórkowy poziom ATP RBCs, uwalnianie ATP z RBCs, itp., badano dla RBCs izolowanych z myszy ApoE/LDLR^{-/-} w celu scharakteryzowania wpływu hipercholesterolemii i miażdżycy, jak również wpływu płci i wieku na te parametry. Nowatorska wiedza zdobyta podczas wykonywania przedłożonego doktoratu przyczyni się do poszerzenia wiedzy na temat charakterystyki erytrocytów w kontekście progresji miażdżycy. Odkrywając i rozumiejąc, w jaki sposób hipercholesterolemia i miażdżyca wpływają na funkcje RBCs, można z kolei opracować nowe strategie terapeutyczne ukierunkowane na RBCs, aby w przyszłości wypracować innowacyjne podejścia lecznicze.