

Spectroscopic molecular probes of endothelial function and dysfunction in *in vitro* models and their potential in *ex vivo* applications

Spektroskopowe sondy molekularne do badania funkcji i dysfunkcji śródbłónka w modelach *in vitro* oraz potencjalnego zastosowania *ex vivo*

spektroskopia molekularna, mikroskopia ramanowska, analiza chemometryczna, lipidy, karotenoidy, komórki, tkanki, choroby cywilizacyjne

Komórki śródbłónka (ang. endothelial cells, EC) wyściełają wszystkie naczynia krwionośne od serca do kończyn, jako ciągła warstwa pojedynczych komórek. EC pełnią kilka funkcji regulacyjnych w kierunku utrzymania homeostazy sercowo-naczyniowej. Dzięki swoim licznym funkcjom autokrynnym, parakrynnym i hormonalnym, śródbłonek naczyniowy jest uważany za wyjątkowy narząd, który wykonuje ważne zadania w zakresie regulacji napięcia naczyniowego i przepływu krwi, przepuszczalności naczyń, proliferacji komórek mięśni gładkich, odpowiedzi immunologicznych i zapalnych, zakrzepicy i angiogenezy. Zaburzenie wykonywania którejkolwiek z podstawowych funkcji regulacyjnych EC charakteryzuje dysfunkcję śródbłónka (ang. endothelial dysfunction, ED). Zaburzenia funkcji EC są powiązane z rozwojem i progresją wielu chorób, zwłaszcza sercowo-naczyniowych, takich jak miażdżycy, nadciśnienie i udar mózgu, a także cukrzycy i insulinooporności, przewlekłej niewydolności nerek, chorób wątroby, nowotworów i ciężkich chorób zakaźnych, takich jak COVID-19. Dlatego badania fenotypu śródbłónka, zwłaszcza na poziomie subkomórkowym, mogą dostarczyć cennych informacji na temat zdrowia i chorób układu krążenia. Obrazowanie organelli komórkowych EC i badanie podstawowych mechanizmów związanych z zaburzeniami funkcji EC i rozwojem choroby ma

ogromny potencjał, aby poprawić naszą wiedzę na temat procesu chorobowego, poprawić diagnozę i rokowanie oraz ocenić nowe rozwiązania terapeutyczne. Obrazowanie spektroskopowe, wykorzystujące w sposób komplementarny wiele technik mikroskopowych, do badania modeli funkcji EC na poziomie subkomórkowym oraz rozwój nowych podejść do obrazowania EC, i badania zmian w procesach komórkowych może dostarczyć nowej wiedzy o mechanizmach komórkowych związanych z rozwojem choroby, pomagając w przyspieszeniu diagnostyki klinicznej i leczeniu śródbłonna. Mikroskopia fluorescencyjna jest uważana za standardową technikę badania EC i rozwoju ED, zaś obrazowanie ramanowskie ma potencjał w badaniu organeli komórkowych i zmian biochemicznych na poziomie subkomórkowym w sposób wolny od znaczników/sond. Niemniej jednak molekularne sondy ramanowskie mają ogromny potencjał poprawy czułości i selektywności technik mikroskopii ramanowskiej. Przedłużona aktywacja i stan zapalny EC jest jedną z najczęstszych przyczyn rozwoju zaburzeń funkcji EC i rozwoju chorób układu krążenia. EC w stanie zapalenia wpływają na zawartość wewnątrzkomórkowych lipidów obecnych w organelach komórkowych bogatych w lipidy, takich jak krople lipidowe (ang. lipid droplets, LD) i retikulum endoplazmatyczne (ang. ER). EC w stanie zapalenia wykazują również zwiększoną ekspresję cząsteczek adhezji powierzchniowej, takich jak ICAM-1. Fenotyp ED jest również często związany ze zmienionymi zdolnościami proliferacyjnymi i regeneracyjnymi EC, które ograniczają odwrócenie procesu dysfunkcji. Dlatego poszukiwanie markerów leżących u podstaw procesów komórkowych, takich jak zmiany w rozmieszczeniu wewnątrzkomórkowych lipidów w stanie zapalenia EC i badanie zmienionych zdolności proliferacyjnych i regeneracyjnych EC w modelach *in vitro* i *ex vivo* ED mają wielkie znaczenie. Prace eksperymentalne podjęte w tej rozprawie doktorskiej pozwoliły na opracowanie nowatorskich metod znakowanego obrazowania ramanowskiego do badania zmian w strukturach lipidowych EC, zwłaszcza w LD, ER i otoczce jądrowej związanej ze stanem zapalnym EC. Co więcej, zastosowano nowatorskie podejście znakowanego obrazowania ramanowskiego do oceny proliferacji i regeneracji EC w pojedynczych komórkach i izolowanych tkankach aorty. Przedstawiona metodologia modelowania funkcji EC obejmuje takie metody jak obrazowanie ramanowskie bez znaczników, mikroskopia fluorescencyjna i 2-fotonowa mikroskopia absorpcyjna. Ponadto, prezentowane ramanowskie sondy molekularne zostały ocenione w EC z różnych narządów, tj. z układu mikrokrążenia (HMEC-1), aorty (HAoEC), serca (HCAEC) i mózgu (HBEC-5i) pod kątem heterogeniczności komórek, które mają zwykle różne właściwości w zależności od ich odpowiednich łożysk naczyniowych.

Astaksantyna (AXT) jest naturalnym czerwonym pigmentem o znanych właściwościach przeciwutleniających i przeciwzapalnych. Wykazano, że AXT jest wysoce lipofilowa i ma tendencję do gromadzenia się w lipidach. Co więcej, AXT wykazuje wzmocnione rezonansowo widmo ramanowskie po wzbudzeniu laserem 532nm. Te właściwości były motywacją do wybrania jej jako molekularnej sondy ramanowskiej do wykrywania struktur lipidowych w EC. AXT wykazała zależną od czasu akumulację w bogatych w lipidy organellach komórkowych w EC, tj. LD, ER i otoczce jądrowej, co było widoczne w widmach ramanowskich komórek po zaledwie 30 minutach inkubacji. Ponadto AXT umożliwiła obrazowanie ramanowskie subkomórkowych struktur lipidowych w EC przy użyciu stosunkowo niskiej mocy lasera w porównaniu z detekcją bez znaczników (3 mW zamiast 30 mW), podkreślając jej przydatność do wizualizacji lipidów w delikatnych próbkach, na które może mieć wpływ wysoka moc lasera, takich jak żywe EC. Przedstawione podejście do obrazowania ramanowskiego znakowanego AXT umożliwiło wizualizację otoczki jądrowej w EC, co nie było możliwe za pomocą obrazowania ramanowskiego bez znaczników.

AXT została przetestowana jako ramanowska sonda molekularna dla lipidów w EC różnego pochodzenia. Okazało się, że AXT jest podobnie wychwytywana przez różne EC i gromadzona w lipidowych organellach komórek, dlatego uznano, że jest to sonda uniwersalną do wizualizacji LD, ER i otoczki jądrowej w EC, nawet biorąc pod uwagę heterogeniczność komórek EC. Dystrybucja wewnątrzkomórkowych lipidów EC wykazała wyraźne zmiany, gdy EC zostały poddane działaniu prozapalnemu, takim czynnikiem jak prozapalna cytokina TNF- α . AXT umożliwiła wizualizację zmian w dystrybucji lipidów związanych z zapaleniem EC, a obrazowanie ramanowskie znakowane AXT umożliwiło wizualizację lipidów przy stosunkowo niskiej mocy lasera dostarczając informacji na temat morfologii otoczki jądrowej. Obrazowanie ramanowskie bez znaczników umożliwiło wykrycie zmian biochemicznych w strukturach lipidowych związanych z procesem zapalenia, takich jak zwiększone nienasycenie lipidów w LD. Mikroskopia ramanowska i mikroskopia fluorescencyjna ujawniły, że wychwyt AXT w EC można poprawić poprzez kapsułkowanie AXT w obojętnych liposomach lub dodatnio naładowanych lipopleksach. Co więcej, przeciwzapalne działanie AXT na EC w stanie zapalenia można również poprawić poprzez enkapsulację AXT. Wolna AXT wykazywała działanie przeciwzapalne, zmniejszając ekspresję ICAM-1, jednak w swojej wolnej postaci AXT nie powodowała znaczących zmian w dystrybucji lipidów. Gdy zastosowano liposomy lub lipopleksy obciążone AXT, zarówno nadekspresja ICAM-1, jak i liczba LD w EC objętych stanem zapalnym zostały znacznie zmniejszone.

5-etynylo-2'-dezoksyurydyna (EdU) jest analogiem tymidyny ze znacznikiem alkilowym, który jest włączany do nowo zsintetyzowanego DNA. EdU zyskało dużą popularność jako sonda do badania proliferacji komórek ze względu na zaletę tego podejścia polegającego na braku przeciwciał oraz nie wymagającego denaturacji DNA. EdU można znakować fluorescencyjnie za pomocą katalizowanej miedzią reakcji cykloaddycji tzw. click chemisty („chemii kliknięć”) z fluorescencyjnym azydkiem. Ze względu na cytotoksyczne działanie związków miedzi na komórki i słabą przepuszczalność większości barwników azydkowych, detekcja fluorescencyjna EdU zwykle wymaga utrwalenia próbki i zwiększenia jej przepuszczalności. Z drugiej strony, ramanowska detekcja EdU jest możliwa do przeprowadzenia w sposób „bez kliknięć” dzięki znacznikowi alkilowemu EdU posiadającemu pasmo ramanowskie w obszarze spektroskopowo cichym, tj. ok. 2122 cm^{-1} , gdzie nie nakłada się ono z pasmami innych składników komórki. Dlatego ramanowską identyfikację EdU można prowadzić w żywych EC bez potrzeby stosowania jakichkolwiek dodatkowych barwników, z pominięciem niepożądanych efektów utrwalania i perforowania komórek. Obrazowanie ramanowskie jąder w EC znakowanych EdU było możliwe po inkubacji EC z EdU przez 3 godziny. Obrazowanie jąder w EC, oparte na wykrywaniu pasma ramanowskiego EdU w regionie cichym w porównaniu z obrazowaniem ramanowskim jąder bez znaczników na podstawie pasma ramanowskiego DNA przy ok. 788 cm^{-1} , uzyskano, gdy komórki poddano traktowaniu EdU przez 24 godziny. Znakowanie EdU poprawiło ramanowskie obrazowanie jąder w EC o różnym pochodzeniu. Ponadto przeprowadzono obrazowanie żywych komórek znakowanych EdU, wskazując przewagę tego podejścia nad metodami opartymi na „chemii kliknięć”. Przedstawiono nowe podejście do badania proliferacji ECs oparte na ramanowskiej detekcji EC znakowanych EdU. Pokazano, że EdU było wrażliwe na zmiany w EC wprowadzone dwoma lekami antyproliferacyjnymi. EC wstępnie potraktowano cykloheksamidem (CHX) lub doksorubicyną (DOX) wykorzystując to jako modele *in vitro* upośledzonej syntezy DNA i zahamowanej proliferacji komórek. Znakowanie EdU umożliwiło wykrycie tych zmian w EC, co objawiło się spadkiem intensywności pasma ramanowskiego znacznika EdU i znacznym spadkiem liczby proliferujących (EdU-dodatnich) komórek. Obrazowanie fluorescencyjne EC znakowanych EdU, barwionych barwnikami azydkowymi Alexa fluor w podobnych warunkach, potwierdziło przedstawione podejście oparte na obrazowaniu ramanowskim. Ponadto, podejście to zastosowano do badania regeneracji EC *ex vivo* po indukowanym urazie mechanicznym w izolowanych mysich aortach. Wykazano, że EC i komórki mięśni gładkich (ang. SMC) regenerują się w pierścieniach aorty, gdy inkubowano je *ex vivo* w obecności czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. VEGF). Wykrywanie zmian w zdolności regeneracyjnej EC w modelach funkcji EC *in vitro* i *ex vivo* było możliwe dzięki znakowaniu EdU, czego nie dało się osiągnąć przy użyciu technik

obrazowania ramanowskiego bez znaczników. Przedstawione tutaj spektroskopowe sondy molekularne do badania zmian zawartości i składu lipidów w organellach EC, i zdolności regeneracyjnych EC związanych z fenotypem ED, uzupełnione referencyjnymi technikami, takimi jak obrazowanie ramanowskie bez znaczników i mikroskopia fluorescencyjna, ujawniły potencjał obrazowania spektroskopowego *in vitro*. Pokazano też potencjał takiego podejścia w modelach *ex vivo* badania funkcji EC. Może to otworzyć drogę do opracowania nowych metod oceny rozwoju patologii EC, poprawy potencjału diagnostycznego i terapeutycznego oraz przyspieszenia diagnostyki i leczenia przy łóżku pacjenta.