



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Faculty of Chemistry

**Phenotypic and chemical changes in the adipose tissue in
atherosclerosis and obesity analyzed using Raman
techniques and complementary methods**

Zuzanna Majka

Supervisor: dr hab. Agnieszka Kaczor, prof. UJ

*Doctoral thesis done in the Chiroptical Spectroscopy Group,
Faculty of Chemistry, Jagiellonian University and Jagiellonian Centre for
Experimental Therapeutics, Jagiellonian University.*

Krakow, 2023

Tkanka tłuszczowa przez wiele lat była całkowicie pomijana w badaniach naukowych. Przed odkryciem jej parakrynych właściwości sądzono, iż jest zbyt niespójna, a jej główną funkcją jest magazynowanie tłuszczu oraz zapewnienie ochrony mechanicznej organom oraz naczyń krwionośnym. Od odkrycia w 1994 roku leptyny, hormonu wydzielanego głównie przez adipocyty (tj. komórki budujące tkankę tłuszczową), zainteresowanie tkanką tłuszczową znacznie wzrosło. Obecnie można rozróżnić kilka typów adipocytów: brunatne, białe, beżowe czy różowe. Białe adipocyty stanowią aż 20% masy ludzkiego ciała i występują głównie w jamie brzusznej, podskórnie oraz wokół gonad (eWAT – ang. *epididymal white adipose tissue*). Ich główną cechą jest magazynowanie lipidów. Brunatne adipocyty znajdują się głównie między łopatkami (iBAT – ang. *interscapular brown adipose tissue*) i zanikają z wiekiem. Brunatne adipocyty odpowiadają za termogenezę bezdrzeniową, na drodze której spalają kwasy tłuszczowe utrzymując stałą temperaturę ciała. Lokalizacją, w której można znaleźć zarówno białe, jak i brązowe adipocyty jest np. tkanka tłuszczowa okalająca aortę. W odcinku piersiowym (TA PVAT – ang. *thoracic aortic perivascular adipose tissue*) komórki są zbliżone morfologicznie do brunatnych adipocytów, natomiast w odcinku brzuszny (AA PVAT – ang. *abdominal aortic perivascular adipose tissue*) do białych adipocytów. Biorąc pod uwagę wydzielniczy charakter tkanki tłuszczowej, jej znaczną heterogeniczność i plastyczność, a także jej położenie wokół niemalże wszystkich organów i naczyń krwionośnych, kluczowym aspektem jest zrozumienie mechanizmów zachodzących w tkance tłuszczowej pod wpływem czynników chorobotwórczych i zapalnych, a także opracowanie szybkiej metody do diagnostyki zmian patologicznych tkanki tłuszczowej. Spektroskopia ramanowska, polegająca na detekcji nieelastycznego promieniowania rozproszonego powstałego w wyniku interakcji próbki z światłem, jest obiecującą metodą umożliwiającą szybką detekcję zmian chemicznych w tkance tłuszczowej.

Cele niniejszej rozprawy doktorskiej można podzielić na trzy kategorie: cel fizyko-chemiczny, cel chemiczny oraz cel aplikacyjny. Jednym ze stale podejmowanych tematów w dziedzinie fizyki chemicznej jest opracowywanie nowych metod diagnostycznych. Poszukiwane są szybkie i nieinwazyjne metody, niewymagające przygotowania, znakowania próbek oraz znajomości składu badanych tkanek (do doboru barwników czy przeciwciał). Odpowiadając na te potrzeby, sformułowano pierwszy cel rozprawy doktorskiej jako **adaptację spektroskopii ramanowskiej do charakterystyki tkanki tłuszczowej (cel fizyko-chemiczny)**. Mikroskopię oraz spektroskopię ramanowską z próbnikiem światłowodowym wykorzystano do charakterystyki tkanki tłuszczowej w wybranych modelach chorobowych. Mikroskopia

ramanowska oraz fluorescencyjna umożliwiły charakterystykę pojedynczych adipocytów (lokalnie), natomiast spektroskopia ocenę globalną tkanki tłuszczowej. Uwzględniając heterogeniczność odpowiedzi różnych typów tkanki tłuszczowej na czynniki chorobowe, drugim celem rozprawy doktorskiej było **określenie zmian chemicznych tkanki tłuszczowej w mysich modelach otyłości indukowanej dietą wysokotłuszczową (HFD – ang. *high-fat diet*) oraz genetycznie modyfikowanej miażdżycy (model ApoE/LDLR^{-/-}) (cel chemiczny)**. Dodatkowo w ramach tego celu, scharakteryzowano ścianę naczynia krwionośnego od śródbłonna, po przydanekę, aż do okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej, a także mikrobiom jelitowy, odpowiednio w mysim modelu miażdżycy i otyłości. Ostatnim, ale nie mniej ważnym celem pracy było przeprowadzenie **weryfikacji potencjału spektroskopii ramanowskiej z próbnikiem światłowodowym do diagnostyki śródoperacyjnej okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej (cel aplikacyjny)**. Ponieważ stosowane obecnie metody śródoperacyjne (np. histopatologia) są czasochłonne i zwykle wymagają doświadczenia osoby opisującej wynik, celem pracy doktorskiej było przeprowadzenie badań pilotażowych testujących możliwości światłowodowego próbnika ramanowskiego do oceny ludzkiej tkanki tłuszczowej okalającej naczynia krwionośne wykorzystywane w operacji pomostowania.

Niniejsza rozprawa doktorska ma charakter hybrydowy, ponieważ jest zbiorem wyników opublikowanych w trzech artykułach naukowych oraz manuskrypcie będącego w trakcie recenzji, przedstawionego w formie opisowej. Dodatkowymi metodami używanymi do charakterystyki tkanki tłuszczowej, poza mikro- i spektroskopią ramanowską była mikroskopia fluorescencyjna oraz barwienie immunohistochemiczne umożliwiające detekcję jąder, kropli lipidowych oraz termogeniny – białka występującego w błonie mitochondriów. Zastosowanie takiej metodologii pozwoliło uzyskać pokaźny pakiet danych dotyczących adipocytów budujących tkanki tłuszczowe z różnych lokalizacji. Badania przeprowadzano głównie na tkankach tłuszczowych pobranych od myszy kontrolnych, karmionych wybranymi dietami lub genetycznie modyfikowanych. Ze względu na fenotypową i funkcjonalną heterogeniczność tkanki tłuszczowej, izolowano iBAT, eWAT, TA i AA PVAT, a także krezkową okołonaczyniową tkankę tłuszczową (mPVAT – ang. *mesenteric PVAT*) oraz podłopatkową BAT (uBAT – ang. *BAT under the shoulder blade*). Jedynie w badaniu tkanki tłuszczowej okalającej tętnicę piersiową wewnętrzną wykorzystano ludzkie tkanki tłuszczowe, pobrane od pacjentów z zaawansowaną miażdżycą. Do oceny zmian chemicznych wynikających z rozwoju miażdżycy oraz otyłości wykorzystano stopień nienasycenia lipidów będący stosunkiem intensywności integralnej pasm charakterystycznych w widmach

ramanowskich, przy 1660 i 1445 cm^{-1} , pochodzących od drgań rozciągających C=C i drgań deformacyjnych grup CH_2/CH_3 .

Badania wykorzystujące myszy model miażdżycy wykazały, że stopień nienasycenia lipidów istotnie wzrasta w AA PVAT, ale nie w TA PVAT, pod wpływem rozwoju choroby. Obserwacja ta wynika z predyspozycji odcinka brzusznego do szybszego rozwoju blaszek miażdżycowych niż odcinka piersiowego. Wyższy stopień nienasycenia obserwowano również u chorych z miażdżycą towarzyszącą silnie rozwiniętej dławicy piersiowej. Modelowanie widm ramanowskich umożliwiło identyfikację składu lipidowego tkanek tłuszczowych oraz ilościowe oszacowanie udziału poszczególnych lipidów. W skład widm ramanowskich ludzkiej tkanki tłuszczowej, charakteryzującej się wyższym stopniem nienasycenia, wchodził dodatkowo kwas arachidonowy, będący prekursorem eikozanoidów, pełniących istotną funkcję we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Aktywacja szlaku kwasu arachidonowego jest związana z rozwojem stanu zapalnego. Tym samym, najistotniejszym wnioskiem uzyskanym w badaniach nad miażdżycą było wykazanie, iż stopień nienasycenia lipidów można traktować jako marker stanu zapalnego w tkance tłuszczowej.

W mysim modelu otyłości uwzględniono zarówno wpływ długości stosowania HFD, jak i wiek osobników. Tkanką najbardziej podatną na rozwój otyłości indukowanej HFD jest eWAT. Już po dwóch tygodniach karmienia HFD zarówno osobniki młode, jak i starsze wykazywały drastyczny spadek stopnia nienasycenia lipidów w eWAT. Stwierdzono, iż pod wpływem HFD, nadmiar lipidów nasyconych jest akumulowany w eWAT obniżając jej stopień nienasycenia. W innych tkankach, z wyjątkiem iBAT, który pozostał odporny na HFD, zmiany chemiczne związane z gromadzeniem nienasyconych tłuszczów zachodziły u osobników starszych. Dwa tygodnie karmienia HFD prowadziły do znaczącej hipertrofii (wzrostu rozmiaru adipocytów) jedynie PVAT, ale nie iBAT, ani eWAT. Natomiast wydłużenie diety do czterech tygodni skutkowało zanikiem hipertrofii, nie była ona już obserwowana w żadnej z badanych tkanek tłuszczowych, nawet PVAT. Wyniki te wskazują, że na różnych etapach rozwoju otyłości indukowanej HFD, tkanka tłuszczowa aktywuje inne mechanizmy. We wczesnym rozwoju otyłości (po dwóch tygodniach stosowania HFD) wielkość adipocytów wzrastała bez zwiększania masy magazynu tkanki tłuszczowej, natomiast po czterech tygodniach następował wzrost masy tkanki, bez wzrostu wielkości adipocytów. Zmianom strukturalnym zależnym od fenotypu tkanki tłuszczowej towarzyszą zmiany składu lipidów już od wczesnego etapu rozwoju otyłości, które pogłębiają się wraz z wiekiem i wydłużeniem HFD (stopniowy spadek stopnia nienasycenia również w innych tkankach tłuszczowych za wyjątkiem iBAT). Badania

w mysim modelu otyłości indukowanej HFD rozszerzono o ocenę mikrobiomu jelitowego (część rozprawy doktorskiej nieopublikowana w momencie jej składania). Maślan sodu i β -glukan podawano doustnie wraz z HFD. W ten sposób można było zaobserwować efekty krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA – ang. *short-chain fatty acids*) pośrednio przez produkcję SCFA z błonnika (β -glukan), jak i bezpośrednio przez doustnie podawanie jednego z SCFA (maślan sodu). W obu przypadkach myszy nie przybrały na wadze po karmieniu HFD. Dodatkowo, maślan sodu istotnie wpłynął na skład chemiczny AA PVAT i eWAT oraz masę eWAT, czego nie zaobserwowano dla β -glukanu. Z drugiej strony β -glukan umożliwił utrzymanie kontrolnego profilu bakteryjnego w grupie HFD+ β -glukan. W grupie HFD bez dodatków nastąpiło znaczne obniżenie obfitości *Feacalibaculum*, bakterii odpowiedzialnej za produkcję SCFA, ale w grupie HFD+ β -glukan względna obfitość tego rodzaju była na tym samym poziomie, co w grupie kontrolnej. Reasumując, działanie SCFA przeciw otyłości było zależne od sposobu podania. Doustna administracja maślanu sodu, który jest szybko wchłaniany w przewodzie pokarmowym i wymaga dodatkowej enkapsulacji, wpłynęła mimo wszystko na tkankę tłuszczową chroniąc ją przed negatywnym skutkiem HFD. Wyniki te podkreśliły potencjalną rolę SCFA w zindywidualizowanej terapii otyłości ukierunkowanej na konkretne ścieżki metaboliczne ze względu na ich zróżnicowane działanie w zależności od sposobu suplementacji.

Otrzymane wyniki zaowocowały trzema artykułami w czasopismach o średnim wskaźniku cytowań równym 6,02, wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej oraz kolejnym artykułem, obecnie w recenzji. Dodatkowo, powstały trzy publikacje naukowe dotyczące m.in. tkanki tłuszczowej oraz jeden artykuł przeglądowy, których nie uwzględniono w rozprawie doktorskiej ze względu na cząstkowy udział w powstanie powyższych publikacji. Wyniki uzyskane na podstawie analizy mysich modeli miażdżycy i otyłości dowiodły, że stopień nienasylenia lipidów jest czułym markerem do oceny zmian chemicznych w tkance tłuszczowej. Marker ten umożliwia zarówno detekcję stanu zapalnego spowodowaną aktywacją szlaku kwasu arachidonowego, jak i rozwój otyłości spowodowany nadmierną akumulacją nasyconych lipidów. Interesujące również okazały się wyniki badań pilotażowych wykorzystujących spektroskopię ramanowską z próbnikiem światłowodowym do oceny ludzkiej PVAT, które nie tylko dostarczyły informacji o korelacji stopnia nienasylenia ze rozwojem stanu zapalnego, ale również potwierdziły, że metoda ta może być z powodzeniem wykorzystywana do śródoperacyjnej oceny tkanki tłuszczowej. Przedstawione wyniki mogą zainteresować zarówno biofizyków, pokazując zastosowanie różnych technik ramanowskich

w badaniach biologicznych, jak i chemików ze względu na obserwowane zmiany chemiczne oraz biologów, biorąc pod uwagę opisaną odpowiedź tkanki tłuszczowej, ściany naczyń i mikrobiomu jelitowego w rozwoju miażdżycy i otyłości. Pomimo, iż prace naukowe w ramach doktoratu zostały zakończone, tematy badawcze w niej podjęte będą nadal realizowane w ramach grantu Preludium 20, a także są podstawą koncepcji nowego projektu, który zostanie złożony we wrześniu 2023 w ramach Marie Skłodowska-Curie Postdoctoral Fellowships.