



ROZPRAWA DOKTORSKA

**Diagnostyka dysfunkcji śródbłónka w chorobach
cywilizacyjnych oraz skuteczności innowacyjnych leków
o działaniu śródbłónkowym przy pomocy mikroskopii
i spektroskopii sił atomowych**

Agnieszka Kołodziejczyk

Praca doktorska napisana pod kierunkiem
profesora doktora habilitowanego Marka Szymońskiego
w Zakładzie Fizyki Nanostruktur i Nanotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kraków 2013

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytet Jagielloński

Oświadczenie

Ja niżej podpisana *Agnieszka Kołodziejczyk* (nr indeksu: 322/B) doktorantka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. „*Diagnostyka dysfunkcji śródbłonna w chorobach cywilizacyjnych oraz skuteczności innowacyjnych leków o działaniu śródbłonkowym przy pomocy mikroskopii i spektroskopii sił atomowych*” jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem prof. dr hab. *Marka Szymońskiego*. Pracę napisałam samodzielnie.

Oświadczam, że moja rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadoma, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie stopnia nabytego na podstawie tej rozprawy.

Kraków, dnia

.....

podpis doktorantki

*Mojemu Mężowi Łukaszowi
za wiele „naukowych podróży” i tych w nieznanie*

PODZIĘKOWANIA

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi prof. dr hab. Markowi Szymońskiemu za duże zaangażowanie, trafne uwagi oraz opiekę merytoryczną w trakcie pisania pracy i kilkuletniej opieki naukowej.

Szczególne podziękowania kieruję do Grupy „Bio” w składzie: dr Marta Targosz – Korecka, mgr Grzegorz Brzezinka, mgr Katarzyna Małek i mgr Jacek Szczerbiński za wsparcie, inspirujące dyskusje naukowe i miłą współpracę podczas realizacji badań śródbłonkowych.

Serdeczne podziękowania składam Panu dr Rafałowi Biedroniowi z Katedry Immunologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Panu dr Tomaszowi Wójcikowi z Jagiellońskiego Centrum Rozwoju Leków za owocną współpracę.

Uprzejmie dziękuję dr inż. Witoldowi Szymańskiemu za korektę i cenne uwagi merytoryczne do redagowanej pracy.

Pragnę podziękować także Pracownikom Zakładu Fizyki Nanostruktur i Nanotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego za przyjazną atmosferę podczas realizacji badań.

Serdecznie dziękuję mojej Rodzinie za wsparcie, życzliwość i ciepłe słowo każdego dnia.

Spis treści

ROZDZIAŁ 1. WSTĘP	9
ROZDZIAŁ 2. BIOLOGICZNE ASPEKTY PRACY	11
2.1 Pojęcie dysfunkcji śródbłonka w chorobach cywilizacyjnych	11
2.1.1 Śródbłonek ludzki.....	11
2.1.2 Dysfunkcja śródbłonka a czynnik martwicy nowotworów - TNF- α	14
2.1.3 Choroby cywilizacyjne w ujęciu statystycznym	15
2.2 Zarys wybranych farmaceutyków.....	16
2.2.1 Statyny	16
2.2.2 Wybrane antybiotyki antracyklinowe.....	18
2.2.3 Potencjalne leki śródbłonkowe.....	19
2.2.3.a Chlorek 1-metylonikotynamidu	19
2.2.3.b Chlorek 1,4 - dimetylopirydyniowy, Chlorek 1 - metylopirydyniowy	20
ROZDZIAŁ 3. METODY	22
3.1 Wprowadzenie.....	22
3.2 Pomiar elastyczności komórek	24
3.2.1 Zakresy odkształceń materiałów biologicznych.....	24
3.2.2 Schemat układu pomiarowego.....	25
3.2.3 Modyfikacja Sneddon'a do modelu Hertza	27
3.2.4 Krzywe siła - odległość	30
3.2.5 Przeprowadzenie eksperymentu	32
3.2.6 Optymalizacja pomiaru parametru elastyczności	33
3.2.7 Analiza danych	34
3.3 Metody uzupełniające	35
3.3.1 Spektrofotometryczna metoda Griessa	35
3.3.2 Pomiar wydzielanego PGI ₂	35
3.3.3 Mikroskopia fluorescencyjna	36
3.3.4 Cytometria przepływowa	37
3.4 Analiza statystyczna	39
ROZDZIAŁ 4. PRZEBIEG EKSPERYMENTU	40
4.1 Materiały.....	40
4.2 Hodowla komórek	40
4.3 Przygotowanie próbek.....	41
ROZDZIAŁ 5. ODCZYN ZAPALNY - MODEL DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA.....	45
5.1 Zmiany morfologii komórek po aplikacji TNF- α	45
5.2 Mikroskopia fluorescencyjna	47
5.3 Dwustopniowa zmiana elastyczności komórek śródbłonka po stymulacji TNF- α	49
5.4 Zależność pomiędzy parametrem elastyczności a produkcją NO.....	50
5.5 Odczyn zapalny po zastosowaniu TNF- α	51
5.6 Wnioski	53

ROZDZIAŁ 6. „LECZENIE” SIMWASTATYNĄ <i>IN VITRO</i>	54
6.1 Weryfikacja stężenia simwastatyny.....	54
6.2 Przeciwwzpalne działanie simwastatyny <i>in vitro</i>	58
6.3 Mechanizmy działania statyn.....	60
6.3.1 Proapoptotyczne działanie statyn	60
6.3.2 Przeciwwzpalne działanie statyn	62
6.4 Wnioski	64
ROZDZIAŁ 7. PORÓWNANIE DZIAŁANIA DOKSORUBICYNY I DAUNORUBICYNY	65
7.1 Elastyczność komórek po zastosowaniu DOX i DAU potwierdzona mikroskopią fluorescencyjną	65
7.2 Mechanizm działania DOX i DAU.....	68
7.3 Wnioski	69
ROZDZIAŁ 8. PRZECIWWZAPALNE DZIAŁANIE CHLORKU 1-METYLONIKOTYNOAMIDU <i>IN VITRO</i>	70
8.1 Charakterystyka działania 1-MNA.....	70
8.2 Badanie 1-MNA w konfiguracji „terapeutycznej”	72
8.3 Badanie 1-MNA w konfiguracji „prewencyjnej”	74
8.4 Pomiar wapnia wewnątrzkomórkowego oraz wydzielania prostacykliny	75
8.5 Znakowanie fluorescencyjne potwierdzające przeciwwzpalne działanie 1-MNA	77
8.6 Proponowany mechanizm działania 1-MNA	78
8.7 Wnioski	79
ROZDZIAŁ 9. WPŁYW WYBRANYCH SOLI PIRYDYNOWYCH NA KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKA	81
9.1 Cytotoksyczny efekt po aplikacji 1,4-DMP.....	81
9.2 Zwiększenie elastyczności komórek po zastosowaniu 1-MP	83
9.3 Porównanie 1-MP oraz 1,4-DMP.....	85
9.4 Zmiany elastyczności komórek jako biopskaźnik do oceny „terapeutycznego”/„prewencyjnego” działania 1-MP oraz 1,4-DMP.....	86
9.5 Mechanizm działania 1-MP w konfiguracji „prewencyjnej”	88
9.6 Wnioski	89
ROZDZIAŁ 10. PODSUMOWANIE	90
STRESZCZENIE	93
ABSTRACT	94
BIBLIOGRAFIA	95
SPIS RYCIN	103
SPIS TABEL	107
ZAŁĄCZNIK	108

Wykaz użytych skrótów

1,4-DMP	-	chlerek 1,4-dimetylopirydyny
1-MP	-	chlerek 1-metylopirydyny
AA	-	kwasy arachidonowe
AFM	-	mikroskopia sił atomowych
AFS	-	spektroskopia sił atomowych
AIF	-	czynniki indukowania apoptozy
Apaf	-	apoptotyczny czynnik aktywacji proteaz
Apo1	-	czynniki apoptotyczne-1
AST	-	aminotransferaza asparaginianowa
Bax	-	białko z rodziny Bcl-2 związane z X
Bcl-2	-	rodzina białek charakterystycznych w procesie apoptozy
BSA	-	surowicza albumina wołowa
Ca ²⁺	-	jony wapnia
Ca ²⁺ /CaM kompleks	-	kompleks kalmoduliny z czterema jonami Ca ²⁺
CaM	-	kalmodulina
COX	-	cyklooksygenaza
CVD	-	choroby układu krążenia
DAPI	-	4',6-diamidyno-2-fenylindol
DAU	-	daunorubicyna
DD	-	wewnątrzkomórkowe domeny śmierci
DMEM	-	medium hodowlane dla komórek linii EA.hy926
DOX	-	doksorubicyna
DR	-	błonowe receptory śmierci
EA.hy926	-	nieśmiertelna linia komórek śródbłonka z żyły pępowinowej
EC	-	siateczka sarkoplazmatyczna
EGF	-	śródbłonkowy czynnik wzrostowy
ELISA	-	test immunoenzymatyczny
ENaC	-	nabłonkowy kanał sodowy
eNOS	-	śródbłonkowa syntaza tlenu azotu
eNOS mRNA	-	potranskrypcyjny składnik śródbłonkowych syntaz tlenu azotu
ER	-	siateczka sarkoplazmatyczna
FasR	-	błonowy receptor śmierci zlokalizowany na chromosomie 10
FBS	-	surowica wołowa

FC	-	cytometria przepływowa
FMD	-	dylatacja tętnicy w odpowiedzi na niedokrwienie
HMEC	-	ludzkie komórki śródbłónka mikronaczyń
HMG-CoA	-	3-hydroksy-3-metylo-glutarylo-koenzym A
HUVEC	-	ludzkie komórki śródbłónka z żyły pępowinowej
ICAM	-	międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna
IG	-	wzmocnienie całkujące
IMT	-	grubość kompleksu błony środkowej i wewnętrznej
iNOS	-	indukowana syntaza tlenu azotu
L-NAME	-	ester metylowy nitroargininy
MCDB	-	medium hodowlane dla komórek linii HMEC
Mcl-1	-	białko indukujące różnicowanie komórek białaczki szpikowej
MF	-	mikrofilamenty
1-MNA	-	chlerek 1-metylonikotynoamidu
MT	-	mikrotubule
NA	-	nikotynamid
NNMT	-	nikotynometylotransferaza
nNOS	-	neuronalna syntaza tlenu azotu
NO	-	tlenek azotu
PBS	-	bufor fosforanowy
PG	-	wzmocnienie proporcjonalne
PGI ₂	-	prostacyklina
PLA ₂	-	fosfolipaza A ₂
PWA	-	analiza fali tętna
PWV	-	prędkość fali tętna
RhoA	-	homolog rodziny genów Ras, członek A
RH - PAT	-	tanometria tętnic obwodowych w warunkach reaktywnego przekrwienia
ROS	-	reaktywne formy tlenu
TNF- α	-	czynnik martwicy nowotworów α
VCAM	-	naczyniowa cząsteczka adhezyjna

Rozdział 1. Wstęp

Mimo rozległej wiedzy na temat chorób śródbłonkowych oraz farmaceutyków stosowanych w chorobach układu sercowo – naczyniowego istnieje ciągła potrzeba opracowywania nowych leków śródbłonkowych. Stąd też niezbędne jest ich testowanie różnymi metodami oraz rozwój nowych metod badawczych *in vivo* oraz *in vitro*. Jedną z niekonwencjonalnych metod badawczych jest spektroskopia sił atomowych (AFS), która jest głównym narzędziem badawczym wykorzystanym w niniejszej pracy doktorskiej. Metoda ta stanowi uzupełnienie mikroskopu sił atomowych i pozwala na ilościowe określenie właściwości mechanicznych na poziomie pojedynczej komórki [1-4]. Ocena właściwości mechanicznych, a przede wszystkim rejestracja ich zmian jest niezwykle ważnym aspektem w badaniach komórek śródbłonka. Śródbłonek – monowarstwa komórek wyściełająca naczynia krwionośne, ze względu na swoje umiejscowienie *in vivo*, podlega ciągłemu zwięzaniu i rozszerzaniu, stąd też elastyczność tych komórek pełni kluczową rolę w zrozumieniu fizjologicznych procesów międzykomórkowych związanych z przepływem krwi, endogenezą oraz regulacją ciśnienia tętniczego. W ostatniej dekadzie powstało wiele prac związanych z zastosowaniem AFM jako narzędzia do badania morfologii a także jako mechanicznego nanosensora do charakteryzacji dysfunkcji komórek śródbłonka [5-7]. Kusche-Vihrog i inni [5] za pomocą mikroskopii sił atomowych pokazali, że ludzkie komórki endotelialne z żyły pępowinowej (HUVEC) po zadziałaniu aldosteronem zwiększają objętość oraz pole powierzchni, co jest związane ze zwiększeniem ekspresji nabłonkowych kanałów sodu [ENaC] oraz zakłóceniami transportu sodu. Z drugiej strony, zastosowanie antagonistów aldosteronu – spironolaktonu oraz amiloridu odwraca efekt działania aldosteronu, powodując zmniejszenie powierzchni komórek oraz liczby kanałów ENaC. Grupa Profesora Oberleithnera w wielu pracach pokazuje zastosowanie spektroskopii sił do badania dysfunkcji śródbłonka, w tym na przykład do określenia wpływu hormonów steroidowych takich jak estradiol i aldosteron na objętość i elastyczność komórek śródbłonka [8]. Dodatkowym argumentem, który pokazuje fizjologiczny aspekt badania elastyczności jest ścisłe powiązanie tego parametru z produkcją wydzielanego NO przez komórki śródbłonka a także włóknami aktynowymi znajdującymi się w części korowej cytoszkieletu komórkowego [7,9].

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest opracowanie metodyki oraz rzetelnej procedury do badań *in vitro*, które pozwalałyby na zastosowanie AFS w analizie procesów związanych z dysfunkcją śródbłonka oraz jego diagnostyką. W szczególności badania dotyczą oceny zmian strukturalnych oraz właściwości mechanicznych komórek śródbłonka

poddanych działaniu czynników prozapalnych, następnie powszechnie stosowanych leków zapobiegających jego dysfunkcji oraz potencjalnych czynników śródbłonkowych. Pierwszym krokiem niezbędnym w ocenie przeciwzapalnego działania środków śródbłonkowych jest weryfikacja fizjologicznego stężenia tego czynnika tj. takiego, przy którym nie obserwuje się zamian fenotypu komórek (w tym również zmian elastyczności). Następnie, dokonywano oceny „terapeutycznego” bądź „prewencyjnego” działania proponowanego leku na komórkach w odczynie zapalnym, który został indukowany poprzez aplikację cytokiny prozapalnej TNF- α - czynnika martwicy nowotworów. Uzyskane wyniki pomiaru elastyczności za pomocą AFS zostały uzupełnione o pomiar parametrów biochemicznych (zewnątrkomórkowy poziom NO i prostacykliny, wewnątrzkomórkowy poziom Ca²⁺) oraz o znakowanie F-aktyny i mikroskopię fluorescencyjną.

Struktura niniejszej pracy jest następująca, w dwóch pierwszych rozdziałach wprowadzono niezbędne zagadnienia biologiczne (Rozdział 2) oraz opis metod eksperymentalnych używanych w pracy badawczej (Rozdział 3). W kolejnym rozdziale (Rozdział 4) przedstawiono przebieg eksperymentu wraz z protokołami hodowli komórkowych. Drugą część pracy stanowią uzyskane wyniki, które podzielone są na pięć odrębnych rozdziałów. Najpierw scharakteryzowano wpływ cytokiny TNF- α na komórki śródbłonka, która została wykorzystana do zdefiniowania modelu odczynu zapalnego (Rozdział 5). Opracowaną metodykę oceny przeciwzapalnego działania leków zaprezentowano na przykładzie simwastatyny – farmaceutyku powszechnie stosowanego w chorobach układu sercowo-naczyniowego (Rozdział 6). Rozdział 7 stanowi porównanie dwóch antybiotyków doksorubicyny i daunorubicyny, które wykazują duży potencjał w terapii nowotworowej. W Rozdziale 8 i 9 zaprezentowano wyniki oceny przeciwzapalnego działania czynników jak dotąd niezbadanych *in vitro* (chlorku 1-metylonikotynoamidu, chlorku 1,4-dimetylopirydyniowego oraz chlorku 1-metylopirydyniowego), ale wykazujących pożądane działanie *in vivo*. Na podstawie wyników zbadanych substancji, można wysunąć wniosek, że opracowana metodyka pozwala na wiarygodne testowanie działania tych czynników na poziomie pojedynczych komórek, co stanowi uzupełnienie i rozszerzenie badań *in vivo*.

Projekt był finansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach programu Innowacyjna Gospodarka (projekt koordynowany przez Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków Uniwersytetu Jagiellońskiego, nr POIG.01.01.02-00-069/09).

Rozdział 2. Biologiczne aspekty pracy

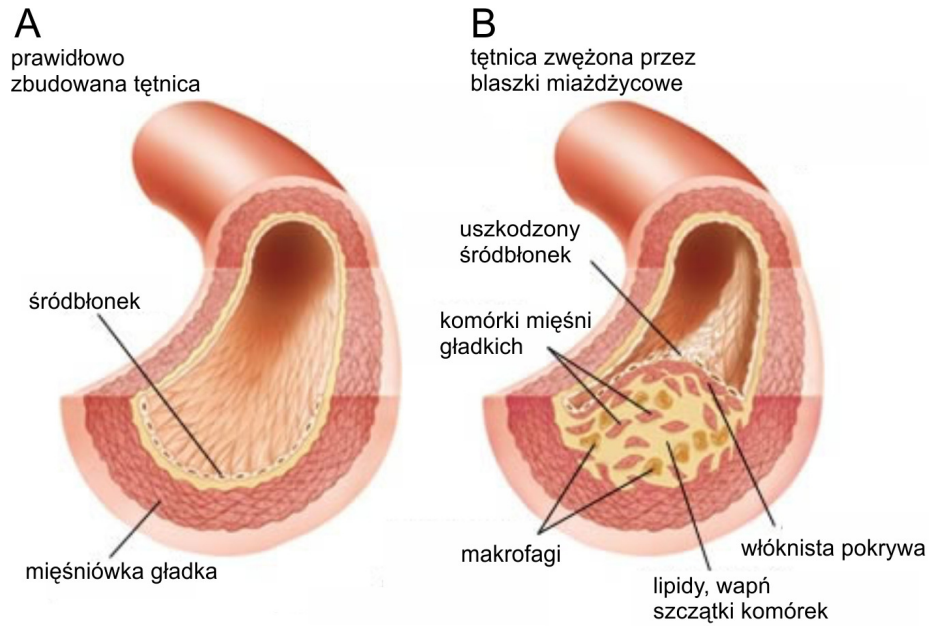
W prezentowanym rozdziale przedstawiono zagadnienia biologiczne: śródbłonek ludzki, dysfunkcja śródbłonka oraz wywołanie odczynu zapalnego śródbłonka *in vitro* poprzez zastosowanie cytokiny prozapalnej TNF- α . Ponadto przytoczono informacje literaturowe na temat dobrze poznanych farmaceutyków stosowanych w chorobach układu sercowo-naczyniowego takich jak statyny oraz przedstawiono potencjalne leki śródbłonkowe, które wykorzystano w pracy badawczej. Dodatkowo, przedstawiono dane literaturowe na temat antybiotyków antracyklinowych doksorubicyny oraz daunorubicyny.

2.1 Pojęcie dysfunkcji śródbłonka w chorobach cywilizacyjnych

2.1.1 Śródbłonek ludzki

Śródbłonek ludzki jest uważany za jeden z większych organów endokrynnych w organizmie ludzkim (hormony wydzielane są do krwi i oddziałują na odległe narządy) [10]. Komórki śródbłonka tworzą monowarstwę po wewnętrznej stronie naczyń krwionośnych, a przez to stanowią barierę pomiędzy krwią i innymi warstwami komórek naczyń krwionośnych np. komórkami mięśni gładkich (Rycina 2.1A). Poprzez wydzielane substancje komórki śródbłonka oddziałują na komórki mięśni gładkich ściany naczyniowej oraz na elementy morfotyczne krwi. Monowarstwa śródbłonka o grubości 0.2-0.3 μ m pokryta jest glikokaliksem, zbudowanym głównie z glikozoaminoglikanów z dominacją siarczanu heparanu, a przez to śródbłonek po wewnętrznej stronie naczynia posiada ujemny ładunek elektrostatyczny.

Dotychczasowe badania śródbłonka pokazały zróżnicowanie funkcji tego organu, które związane są między innymi z utrzymaniem homeostazy układu krwionośnego. Śródbłonek produkuje i reaguje z wieloma związkami chemicznymi, które wpływają na zwężanie i rozszerzanie naczyń krwionośnych poprzez działanie parakryne [10] (syntetyzowanie hormonów działających na sąsiadujące komórki). Organ ten wytwarza mediatory nie tylko do regulacji przepływu krwi, ale również uwalniane są one podczas angiogenezy i pełnią fundamentalną rolę w trombocytozie [11].



Rycina 2.1. Przekrój poprzeczny prawidłowo zbudowanej tętnicy (A) oraz tętnicy zwężonej przez blaszki miażdżycowe (B) [12].

Ważnym czynnikiem wpływającym na wazodylatację jest tlenek azotu (NO). NO powstaje z L-argininy poprzez oksydację N-końcowej guaniny syntazy tlenu azotu. W naczyniach krwionośnych występują trzy izoformy NOS: eNOS – śródbłonkowa, iNOS – indukowana, nNOS – neuronalna, lecz największe znaczenie w biologii naczyń posiadają pierwsze dwie z wymienionych. Syntaza eNOS powoduje syntezę NO w stężeniach nanomolarnych, co jest związane z cytoprotekcyjnym działaniem tlenu azotu. W przypadku iNOS otrzymywany jest tlenek azotu w stężeniach mikromolarnych, co prowadzi do cytotoksycznego działania tego związku. Dodatkowo, wysokie stężenia NO mogą prowadzić do zwiększenia stężenia reaktywnych form tlenowych (ROSów), które powodują powstawanie stresu oksydacyjnego. Konsekwencją stresu oksydacyjnego jest utrata integralności ściany naczyniowej oraz ułatwienie przylegania leukocytów, co prowadzi do dysfunkcji śródbłonka, a także może aktywować apoptozę. Z drugiej strony, NO w stężeniu nanomolarnym pełni rolę regulatora napięcia powierzchniowego, czyli działa relaksująco na mięśniówkę naczyniową, a także powstrzymuje agregację i adhezję płytek krwi.

Drugim istotnym czynnikiem śródbłonkowym jest prostacyklina (PGI₂) – hormon tkankowy z grupy prostaglandyn wytwarzany przez ściany naczyń krwionośnych głównie w śródbłonkach płuc z kwasu arachidonowego (AA). Hormon ten wytwarzany jest pod wpływem takich enzymów jak cyklooksygenazy. PGI₂ przeciwdziała trombocytozie działając synergicznie z NO [10].

Dysfunkcje śródbłonna prowadzą do powstawania chorób układu sercowo-naczyniowego takich jak cukrzyca typu 2 (źródło aktywacji - hiperglikemia), nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemia czy miażdżycy. W przypadku miażdżycy występuje tworzenie się tłuszczowych blaszek miażdżycowych zmniejszających przepływ krwi, co związane jest z pojawianiem się makrofagów oraz limfocytów CD4+ [12] (Rycina 1B). Ligand CD40L obecny w limfocytach aktywuje receptor CD40 w komórkach śródbłonna, co powoduje ekspresję mediatorów zapalnych: E-selektyny, międzykomórkowych cząsteczek adhezyjnych (ICAM) oraz naczyniowych cząsteczek adhezyjnych (VCAM). Dodatkowo limfocyty wydzielają cytokiny prozapalne takie jak interferon gamma oraz czynnik martwicy nowotworów TNF- α , które nasilają zainicjowaną wcześniej ekspresję cząsteczek adhezyjnych. W przypadku hiperglikemii śródbłonek wystawiony na działanie wysokich stężeń glukozy wydziela do pozakomórkowej macierzy kolagen, fibronektynę oraz białka działające prozakrzepowo [13]. Dodatkowo, w tym stanie śródbłonek wykazuje zmniejszoną proliferację i migrację komórek oraz osłabienie własności fibrynolitycznych, nasila się natomiast proces apoptozy [14-18]. Wysokie stężenie glukozy pośrednio powoduje uszkodzenie śródbłonna w wyniku syntezy czynników wzrostu oraz przekaźników wazoaktywnych [19]. Nadciśnienie tętnicze charakteryzuje podwyższone stężenie cząsteczek adhezyjnych [20] oraz upośledzona biodostępność NO. Do zweryfikowania wyżej opisanych dysfunkcji śródbłonna *in vivo* wykorzystuje się biochemiczne oraz fizyczne metody diagnostyczne.

Biochemicznymi metodami oceny czynności śródbłonna *in vivo* są badania stężenia produktów przemian NO (L-cytruliny, azotynów i azotanów) oraz oznaczanie markerów aktywności śródbłonna (czynnika von Willebranda, trombomoduliny, międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej ICAM-1, E-selektyny) immunoenzymatyczną metodą ELISA. Metody fizyczne oceny dysfunkcji śródbłonna *in vivo* można podzielić na inwazyjne i nieinwazyjne (Tabela 1). Metody wymienione w Tabeli 1 służą do oceny stopnia dysfunkcji śródbłonna *in vivo*. W celu określenia parametrów: średnicy tętnicy oraz przepływu tętniczego najczęściej wykorzystuje się ultrasonografię dopplerowską. Kolejno, metody FMD, PWA oraz PWV są głównymi technikami do badania zaawansowania procesów miażdżycowych. FMD ocenia możliwość tętnicy do rozszerzania się pod wpływem niedokrwienia, natomiast PWA oraz PWV określają sztywność/elastyczność dużych naczyń krwionośnych (badanie tzw. „podatności” naczyń tętnicznych). IMT jest metodą pośrednią badania dysfunkcji śródbłonna, gdzie oceniane jest grubość kompleksu błony środkowej – śródbłonna (intima – media). Stosunkowo nową metodą jest RH-PAT, gdzie badana jest aktywność śródbłonna na reaktywne przekrwienie.

Tabela 1. Fizyczne metody oceny śródbłonna naczyniowego [13]. Oznaczenia: FMD (*flow mediated dilatation*) – dylatacja tętnicy w odpowiedzi na niedokrwienie; IMT (*infima-media thickness*) – grubość kompleksu błony środkowej i wewnętrznej; PWA (*pulse wave analysis*) – analiza tętna fali; PWV (*pulse wave velocity*) – prędkość fali tętna; RH-PAT (*reactive hypermia peripheral arteria tonometry*) – tanometria tętnic obwodowych w warunkach reaktywnego przekrwienia.

Metoda	Oceniany parametr
Inwazyjna	Średnica tętnicy Przepływ tętniczy
Nieinwazyjna:	
FMD	Dylatacja tętnicy w odpowiedzi na niedokrwienie
IMT	Grubość kompleksu błony środkowej i wewnętrznej
PWA i PWV	Sztywność naczyń
RH-PAT	Zmiany objętości palca wynikające z pulsacyjnego przepływu tętniczego

Mimo dotychczasowej rozległej wiedzy na temat komórek śródbłonna ciągle prowadzone są badania, których celem jest dokładne poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za funkcje komórek w odczynie zapalnym. Ważnym punktem badawczym zmniejszającym ryzyko chorób układu sercowo-naczyniowego jest diagnostyka śródbłonna, a także testowanie potencjalnych czynników śródbłonkowych.

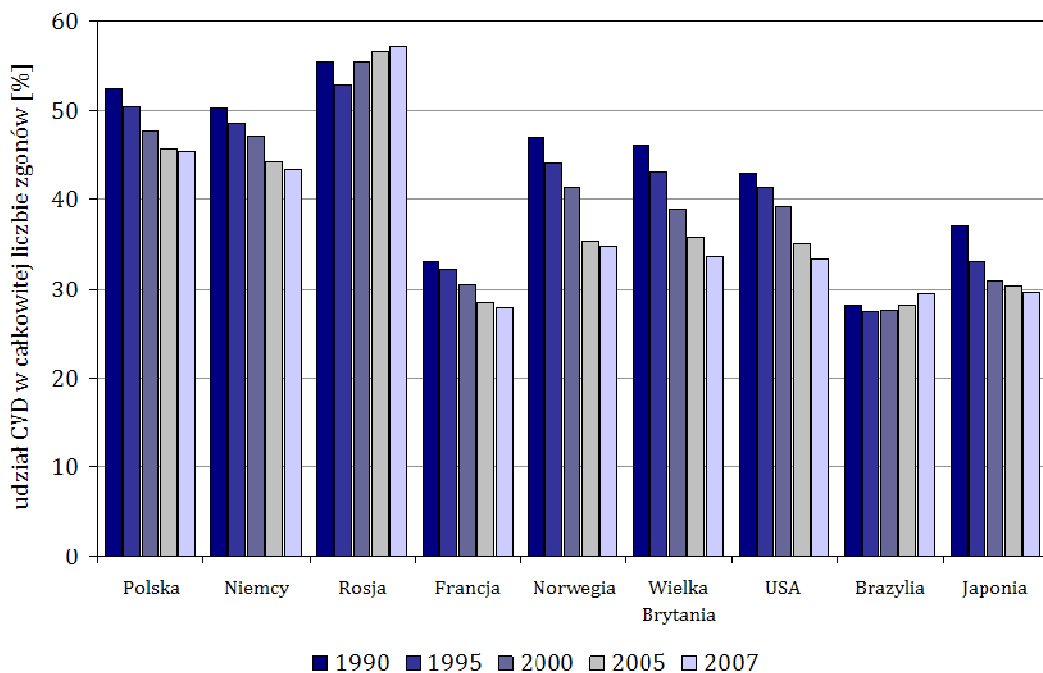
2.1.2 Dysfunkcja śródbłonna a czynnik martwicy nowotworów - TNF- α

Komórki śródbłonna różnią się między sobą ze względu na umiejscowienie w układzie naczyniowym. Zdrowy śródbłonek jest aktywny i adaptacyjny (dostosowuje się do lokalnego mikroświata), natomiast utrata zorganizowanej złożoności jest traktowana jako cecha choroby tego organu *in vivo* [21]. Przez pojęcie dysfunkcji śródbłonna naczyń rozumie się funkcjonalny stan śródbłonna naczyń, który charakteryzuje niedobór czynników wazoprotekcyjnych i zwiększona produkcja czynników pro – koagulacyjnych [22]. Dysfunkcja śródbłonna *in vitro* związana jest przede wszystkim ze zwiększeniem przepuszczalności błony komórkowej oraz „upośledzeniem” wydzielania NO, który współistnieje ze stresem oksydacyjnym oraz zaburzeniami syntezy PGI₂. Kolejnym ważnym wyznacznikiem dysfunkcji jest zwiększenie markerów odczynu zapalenia, przede wszystkim cytokin prozapalnych. TNF- α - czynnik martwicy nowotworów typu alfa jest jedną z cytokin ludzkich stymulującą odczyn zapalny w komórkach śródbłonna. Jest produkowana przez komórki zapalne: makrofagi i monocyty, ale także przez komórki śródbłonna [10]. Działanie TNF- α zwiększa produkcję cząsteczek adhezyjnych (VCAM, ICAM, selektyny E, P, L), a przez to zwiększa się ich obecność na powierzchni komórek śródbłonna. Cząsteczki adhezyjne odpowiedzialne są za przyleganie i przechodzenie limfocytów z krwi do ściany naczynia.

Ponieważ działanie TNF- α związane jest z przyleganiem limfocytów jego działanie *in vivo* skutkuje tworzeniem się blaszki miażdżycowej. Stymulacja śródbłonna tą cytokiną o stężeniu 5ng/ml przez 12h powoduje wzrost ilości cząsteczek adhezyjnych, co potwierdza powstawanie odczynu zapalnego komórek [23]. Dodatkowo stwierdzono, że wysokie stężenia TNF- α : 20 oraz 100ng/ml podane *in vitro* na 24h inicjują w komórkach śródbłonna apoptozę [24]. W prezentowanej pracy badanie wpływu TNF- α na komórki śródbłonna posłużyło do zdefiniowania modelu dysfunkcji śródbłonna i można go nazwać modelem miażdżycowym *in vitro*.

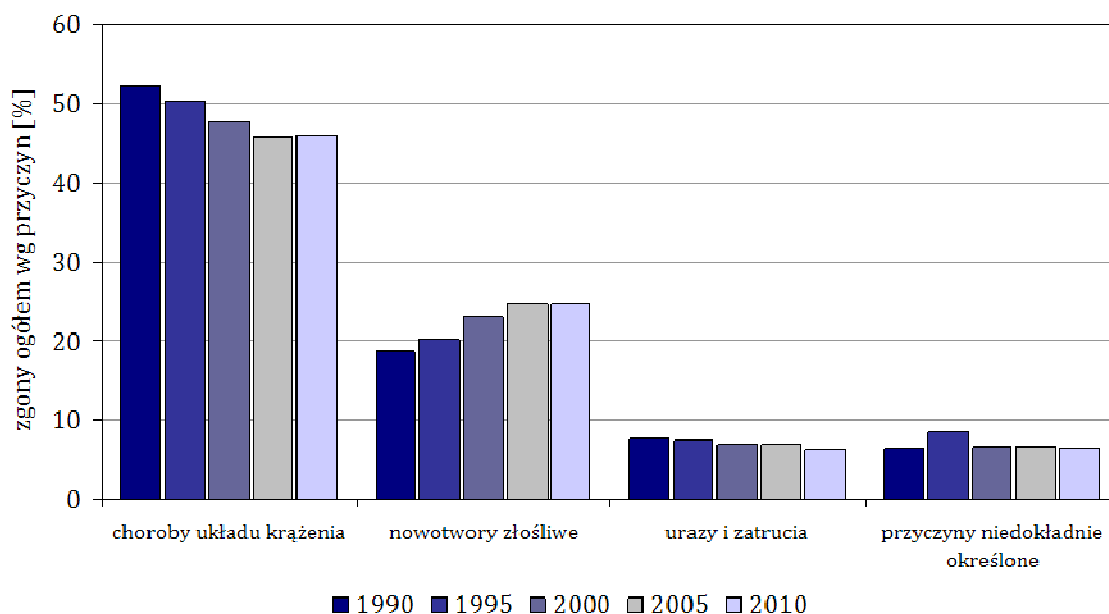
2.1.3 Choroby cywilizacyjne w ujęciu statystycznym

Choroby układu krążenia (CVD) ze względu na dużą zachorowalność oraz przyczynę zgonów są traktowane jako choroby cywilizacyjne. Na Rycinie 2.2 zaprezentowano procentowy udział CVD w całkowitej umieralności dla wybranych państw w latach 1990, 1995, 2000, 2005 i 2007 [25]. Procentowe wartości udziału CVD w całkowitej liczbie zgonów dla poszczególnych państw stanowią istotną przyczynę umieralności i mieszczą się w zakresie od 27 do 57%. Jednakże, zaobserwowano tendencję spadkową udziału chorób krążenia w liczbie zgonów dla krajów Europy Środkowej (np. Polska, Niemcy), skandynawskich (np. Norwegia), Wielkiej Brytanii, Stanów Zjednoczonych oraz Japonii. Z drugiej strony, w przypadku Rosji oraz Brazylii CVD zwiększają udział w całkowitej umieralności. Zaprezentowane dane statystyczne potwierdzają znaczący wpływ chorób układu krążenia jako przyczyny zgonów.



Rycina 2.2. Udział CVD w całkowitej liczbie zgonów [%] w latach 1990, 1995, 2000, 2005 i 2007 [25].

Celem dokładniejszego omówienia przyczyn umieralności w Polsce w latach 1990, 2000, 2005 oraz 2010 zamieszczono Rycinę 2.3 bazującą na statystykach Głównego Urzędu Statystycznego [26].



Rycina 2.3. Przyczyny umieralności w Polsce w latach 1990, 2000, 2005, 2010 i 2011 wyrażone w % [26].

Jako główne przyczyny umieralności wyróżniono: choroby układu krążenia, nowotwory złośliwe, urazy i zatrucia (w tym wypadki drogowe oraz samobójstwa), przyczyny niedokładnie określone oraz pozostałe. CVD na terenie Polski stanowią przyczynę największej umieralności (45%), prawie dwukrotnie więcej niż w przypadku nowotworów złośliwych. Prezentowane wyniki badań statystycznych pokazują tendencję spadkową chorób układu krążenia jako przyczyny zgonów na terenie Polski w porównaniu z poprzednimi latami.

2.2 Zarys wybranych farmaceutyków

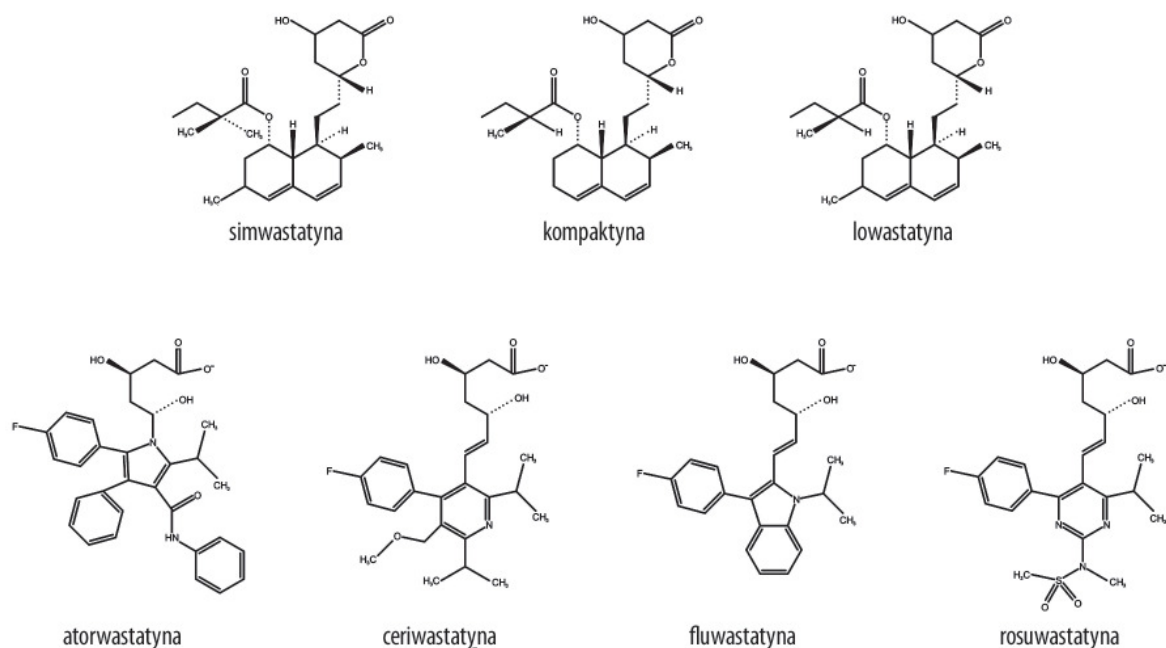
2.2.1 Statyny

Leczenie chorób układu sercowo-naczyniowego związanych z dysfunkcją śródbłonna wymaga stosowania odpowiednich farmaceutyków. Skutecznymi lekami, które są dobrze poznane pod kątem mechanizmów komórkowych są statyny. Statyny są naturalnymi produktami fermentacji różnych mikroorganizmów (np. mewastatyna, simwastatyna, kompaktyna, lowastatyna) lub produktami syntezy chemicznej (np. fluwastatyna, atorwastatyna, rosuwastatyna).

Statyny naturalne mają wspólną jednostkę elementarną, tj. β -lakton, który sprzężony jest z dziesięciocłonowym pierścieniem naftalenu [27]. Różnią się jednak strukturą chemiczną łańcuchów bocznych R_1 i R_2 . Wzory strukturalne wybranych statyn zaprezentowano na

Rycinie 2.4. Statyny naturalnego pochodzenia wytwarzane są w postaci nieaktywnego pro-leku, a ich aktywacja zachodzi w organizmie za pośrednictwem karboksyesterazy katalizującej otwarcie pierścienia β -laktonowego.

Druga klasa statyn, syntetycznego pochodzenia, zbudowana jest z charakterystycznego pierścienia fluorofenyłowego związanego ze szkieletem cząsteczki naśladującej strukturę 3-hydroksy-3-metylo-glutarylo-CoA. Występują one w aktywnej postaci hydroksykwasu. Obecnie przyjmuje się, że otwarta konformacja pierścienia laktonowego odpowiada za aktywność biologiczną tej klasy leków z powodu podobieństwa hydroksykwasu laktonu do naturalnego substratu enzymu, reduktazy 3-HMG-CoA [28,29].



Rycina 2.4. Wzory strukturalne wybranych statyn.

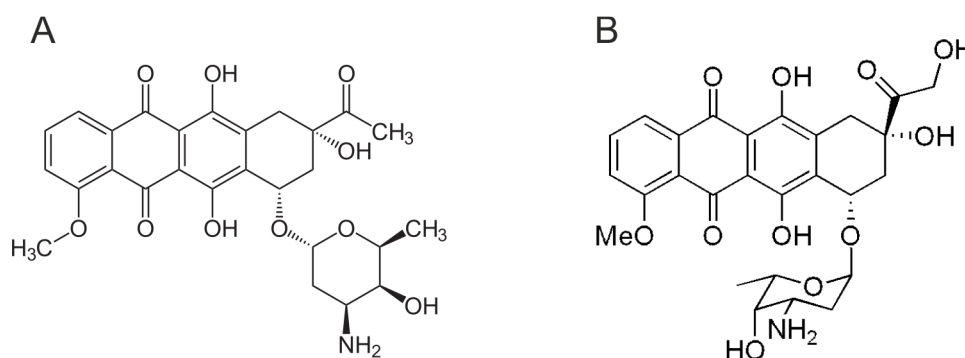
Statyny są lekami stosowanymi w przypadku hipercholesterolemii (zwiększenie cholesterolu LDL), schorzeń sercowo-naczyniowych a także udarów mózgu. Są one inhibitorami reduktazy 3-hydroksy-3metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA), enzymu, który zapewnia wydajność jednej z podstawowych reakcji w procesie powstawania cholesterolu. Zablockowanie reduktazy powoduje zmniejszenie produkcji cholesterolu (zablokowanie szlaku mewalonowego), a także wychwyt frakcji LDL (złego cholesteloru) przez komórki wątroby. Z drugiej strony statyny są często wykorzystywane w terapii nowotworowej. Liczne badania *in vitro* pokazują działanie proapoptotyczne statyn na wiele linii komórek nowotworowych: raka krtani, szyjki macicy, trzustki, tarczycy, jelita grubego, piersi, stercza oraz glejaka złośliwego [30-36].

Jedną z naturalnie syntetyzowanych statyn, która spowalnia postęp zmian miażdżycowych w tętnicach, zmniejsza ryzyko udaru mózgu i zawału serca mięśniowego jest simwastatyna. Stosowana jest w przypadku hiperlipidemii, choroby wieńcowej serca,

nadciśnienia tętniczego oraz cukrzycy typu 2. Dodatkowo lek ten wpływa na zwiększenie produkcji tlenu azotu na śródbłonek naczyń i przez to inaktywację wolnych rodników tlenowych [37]. Choć simwastatyna wykazuje silne działanie terapeutyczne, powoduje również wiele niepożądanych efektów w organizmie ludzkim takich jak bóle mięśniowe, osłabienie a nawet uszkodzenie wątroby i mięśni (miopatia). Stąd ciągła potrzeba poszukiwania nowych leków śródbłonkowych, które wykazywałyby działanie terapeutyczne, a dodatkowo mogłyby być używane prewencyjnie.

2.2.2 Wybrane antybiotyki antracyklinowe

W celu rozwinięcia tematu wykorzystania badań elastyczności w kontekście diagnostyki komórek śródbłonna po aplikacji leków przeprowadzono pomiary dwóch antybiotyków antracyklinowych dokсорubicyny i daunorubicyny, powszechnie stosowanych w chemioterapii. Oba czynniki są cytostatykami powodującymi zatrzymanie fizjologicznych funkcji komórek poprzez utworzenie trwałego kompleksu z DNA, co blokuje dalszy podział komórki i prowadzi do jej śmierci [38]. Na Rycinie 2.5 przedstawiono wzory strukturalne obu antybiotyków.



Rycina 2.5. Wzory strukturalne odpowiednio daunorubicyny (A) oraz dokсорubicyny (B).

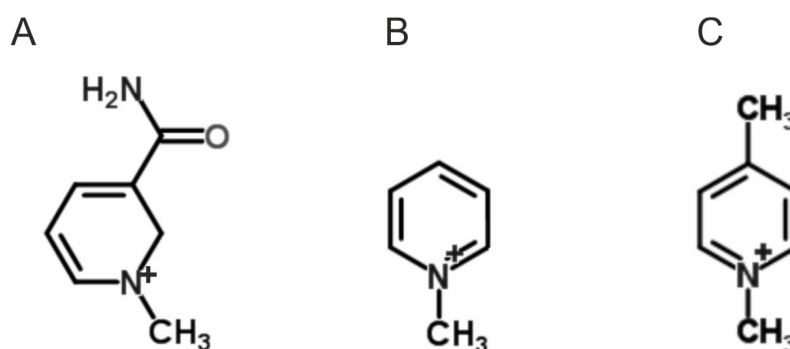
Mechanizm działania dokсорubicyny na komórki nowotworowe jest związany z wbudowywaniem się tej cząsteczki w strukturę DNA powodując jego fragmentację oraz rozerwanie. Powoduje to zahamowanie replikacji DNA. W związku z tym działanie dokсорubicyny związane jest z blokowaniem transkrypcji DNA na RNA hamując w ten sposób syntezę RNA. Dokсорubicyna jest stosowana w przypadku następujących nowotworów: szpiczak mnogi, ziarnica złośliwa, chłoniaki, rak sutka, drobnokomórkowy rak płuc, rak pęcherza moczowego, rak tarczycy i kory nadnerczy. Daunorubicyna wykazuje silniejsze działanie niż dokсорubicyna i często stosowana jest w terapii ostrych białaczek [38]. Jednakże oba czynniki wykazują również dużą kardiotoxycyżność, związaną z zaburzeniami struktury i funkcjonowaniem mitochondriów [39]. Wysoka kardiotoxycyżność dokсорubicyny i daunorubicyny znacznie ogranicza możliwość aplikacji tych antybiotyków w przypadku terapii nowotworowych.

2.2.3 Potencjalne leki śródbłonkowe

Potencjalne leki śródbłonkowe poddane analizie to metabolit nikotynamidu chlorek 1-metylonikotynoamidu oraz czwartorzędowe związki pirydynowe: chlorek 1-metylopirydyniowy oraz chlorek 1,4-dimetylopirydyniowy. Związki te posiadają zdolność do stymulacji endogennej produkcji i uwalniania prostacykliny PGI₂ w śródbłonku naczyń, co pokazano *in vivo*, zatem mogą przynosić skutki terapeutyczne w chorobach związanych z dysfunkcją śródbłonka, stresem oksydacyjnym czy niewydolnością śródbłonkowej syntezy PGI₂.

2.2.3.a Chlorek 1-metylonikotynamidu

Chlorek 1-metylonikotynamidu (1-MNA) był uważany za biologicznie nieaktywny metabolit nikotynamidu (NA), czynnika dostarczanego do organizmu ludzkiego z pokarmem pochodzenia zwierzęcego (wątroba, nerki, ryby) [40]. 1-MNA powstaje w wątrobie przy udziale enzymu cytoplazmatycznego – metylotransferazy nikotynamidu (NNMT), jest chemicznie stabilny, nietoksyczny i dobrze tolerowany [41]. Na Rycinie 2.6A zaprezentowano wzór strukturalny tego związku. Stężenie 1-MNA w osoczu i moczu może ulec zmianie w różnych stanach patologicznych, może on zatem pełnić rolę markera prognostycznego (np. skuteczności leczenia białaczki) [40,42].



Rycina 2.6. Wzory strukturalne badanych substancji: chlorku 1-metylonikotynamidu (A), chlorku 1-metylopirydyny (B), chlorku 1,4-dimetylopirydyny (C).

W pracach [41,43] pokazano, że 1-MNA wykazuje przeciwzapalny efekt w dermatologii poprzez zmniejszanie różnego typu odczynów skórnych takich jak: trądzik różowaty, trądzik pospolity, oparzenia a także przyspiesza gojenie się ran skórnych.

Dodatkowo sprawdzono, że poprzez zdolność do regulacji funkcji śródbłonka posiada anty-trombotyczne i przeciwzapalne właściwości w chorobach układu sercowo-naczyniowego [44,45]. Trombocytoza tętnicza została wywołana na modelu szczurzym [45] poprzez elektryczną stymulację tętnicy szyjnej metodą opisaną przez Schumachera i wsp. [46]. Zaobserwowano, że 1-MNA w zależności od dawki redukuje powstanie zakrzepu (najsilniej dla dawki 30mg/kg). Dodatkowo w pracy tej zmierzono wydzielanie stabilnego

metabolitu PGI_2 - $6\text{ketoPGF}_{1\alpha}$ do krwi u szczurów z prawidłowym ciśnieniem tętniczym i otrzymano wzrost metabolitu po 20min od podania 1-MNA, co świadczy o anty-trombotycznym działaniu tego związku [45]. Tak jak zaznaczono w podrozdziale 2.1.1, wydzielanie prostacykliny jest związane z metabolizowaniem kwasu arachidonowego przez cyklooksigenazy, a także jest synergiczne z NO. Dlatego ważnym punktem wyjaśniającym działanie tego związku *in vivo* jest oznaczenie odpowiedzi trombolitycznej 1-MNA. Mechanizm działania chlorku 1-metylonikotynamidu *in vivo* został oznaczony poprzez blokowanie szlaku syntezy PGI_2 tj. poprzez aplikację następujących inhibitorów: nie-selektywnej cyklooksigenazy (COX), selektywnej cyklooksigenazy (COX - 2) oraz syntazy tlenku azotu [45]. Otrzymane wyniki potwierdziły charakter działania 1-MNA - zależny od COX - 2 [45]. Przeciwwzpalne właściwości 1-MNA potwierdza również stymulacja komórek do produkcji NO poprzez zwiększenie aktywności syntaz eNOS [47].

Kolejno, Bartus i wsp. [48] potwierdzili cytoprotekcyjny wpływ 1-MNA u szczurów z cukrzycą i hipertriglicydemią (tj. zwiększonym stężeniem triglicerydów w surowicy), gdzie po podaniu 1-MNA zaobserwowano poprawę zależnych od śródbłonka mechanizmów regulujących przepływ krwi. Natomiast u ludzi z cukrzycą obserwuje się brak lub niedobór 1-MNA [49,50], zatem jest to jeden z argumentów na to, że czynnik ten może zapobiegać i łagodzić rozwój cukrzycy typu 1 [51]. W pracy [41] sprawdzono, że czynnik ten łączy się z glikozoaminoglikanami zlokalizowanymi na powierzchni komórek śródbłonka, w związku z tym zwiększa się jego stężenie na błonie komórkowej. Zwiększone stężenie 1-MNA na powierzchni komórek śródbłonka może wpływać na redukcję adhezji komórek pro-zapalnych (makrofagów i limfocytów typu T) [41], a przez to może zapobiegać dysfunkcji śródbłonka naczyniowego.

Z drugiej strony badacze poszukują połączenia 1-MNA z procesami nowotworowymi [52-54]. Połączenie to stanowi nadekspresja genu kodującego metylotransferazę nikotynamidu (NNMT) w raku żołądka oraz komórkach raka brodawkowatego tarczycy [52, 53]. Nakagawa i wsp. [54] pokazali, że stężenie 1-MNA we krwi może być markerem nowotworów złośliwych.

Podsumowując, w ostatnich latach powstało wiele prac pokazujących przeciwwzpalne właściwości tego związku *in vivo*, zatem badanie tego czynnika może być ciekawym punktem badawczym do testowania „terapeutycznego” i „prewencyjnego” działania na modelu dysfunkcji komórek śródbłonka.

2.2.3.b Chlorek 1,4 - dimetylopirydyniowy, Chlorek 1 - metylopirydyniowy

Potencjalne czynniki śródbłonkowe: chlorek 1,4-dimetylopirydyny oraz chlorek 1-metylopirydyny to nietlne produkty pirolizy (rozkładu termicznego) trygoneliny (kwas N-

metylonikotynowy, sól 3-karboksy-1-metylopirydyniowa) powstające podczas wypalania kawy. Związki te można również otrzymać poprzez rozdział produktów pirolizy (termolizatu) trygoneliny, otrzymanych na przykład przez pirolizę w atmosferze wolnej od tlenu w temperaturze około 220°C [55]. Badane substancje to czwartorzędowe związki pirydynowe o wzorze strukturalnym przedstawionym na Rycinie 2.6B i 2.6C. W pracy [55] pokazano zastosowanie tych związków do hepatoprotekcji, czyli leczenia bądź zapobiegania chorobom lub stanom związanym z uszkodzeniami wątroby. Zastosowanie to jest związane ze zdolnością tych związków do stymulacji endogennej produkcji i uwalniania prostacykliny w śródbłonku naczyń. Efekt PGI₂ został zbadany metodą opisaną przez Gryglewskiego i wsp. [56] na modelu szczurzym Wistar poprzez weryfikację odpowiedzi trombolitycznej wywołanej poprzez dożylnie podanie *in vivo* następujących związków: nikotynamidu, kwasu nikotynowego, trygoneliny, termolizatu trygoneliny, chlorku 1-metylopirydyniowego oraz chlorku 1,4-dimetylopirydyniowego w dawkach 30mg/kg. Odpowiedź trombolityczna rozumiana jest jako spadek wagi zakrzepu. Tylko w przypadku ostatnich trzech czynników (w tym 1-MP oraz 1,4-DMP) zaobserwowano odpowiedź trombolityczną, co potwierdza udział pochodnych czwartorzędowych pirydyny w stymulacji PGI₂. Obserwacja ta sugeruje, że podawanie tych związków może przynieść skutki terapeutyczne w chorobach związanych z dysfunkcją śródbłonka, stresem oksydacyjnym i niewydolnością śródbłonkowej syntezy PGI₂. Zastosowanie tych związków może być zatem uzasadnione w przypadku cukrzycy, zespołu metabolicznego, miażdżycy oraz uszkodzeniach wątroby. Dodatkowo, stymulacja PGI₂ może przynosić skutki przeciwmiażdżycowe i przeciwcukrzycowe.

Jako uzupełnienie [55] przeprowadzono również badania działania hepatoprotekcyjnego chlorku 1,4-dimetylopirydyny na modelu ostrego uszkodzenia wątroby. Badania przeprowadzono na myszach Balb/c, a efekt protekcyjny weryfikowano dla 7-dniowego prewencyjnego traktowania związkiem 1,4-DMP (dawka 100mg/kg). Zapalenie wątroby wywołano poprzez aplikację konkawaliny A (ConA, 20mg/kg na 8h) stymulującej limfocyty T. Prewencyjne traktowanie myszy czynnikiem 1,4-DMP działa zapobiegawczo – zaobserwowano brak wzrostu aminotransferazy asparaginianowej (AST, enzymu wskaźnikowego pochodzenia cytoplazmatyczno - mitochondrialnego) w osoczu względem myszy niepoddanych działaniu 1,4-DMP, zatem związek ten posiada aktywność hepatoprotekcyjną. W pracy [57] pokazano również możliwość zastosowania tych związków w terapii przeciwnowotworowej.

W prezentowanej pracy związki 1-MP oraz 1,4-DMP stanowią potencjalne leki śródbłonkowe, które poddane zostały diagnostyce do „terapeutycznego” oraz „prewencyjnego” działania na komórkach śródbłonka za pomocą nanoindentacji ostrzem AFM.

Rozdział 3. Metody

W niniejszym rozdziale zostaną przedstawione metody badania dysfunkcji komórek śródbłonna oraz skuteczności innowacyjnych leków o działaniu śródbłonkowym. Głównym narzędziem pracy jest spektroskopia sił, która wykorzystana została jako biowskaźnik przeciwwzapalnego działania substancji śródbłonkowych. Ponieważ pomiar właściwości mechanicznych komórek związany jest z przebarwianiem włókien cytoszkieletu komórkowego, istotnym z punktu widzenia pracy badawczej, okazało się fluorescencyjne znakowanie F-aktyny. Jako metody uzupełniające wykorzystano pomiar tlenu azotu spektrofotometryczną metodą Griessa, pomiar wydzielanego PGI₂ metodą ELISA oraz oznaczanie wewnątrzkomórkowych jonów Ca²⁺ zmierzone na cytometrze przepływowym.

3.1 Wprowadzenie

Tak jak zaznaczono w podrozdziale 2.1.1 śródbłonek ludzki pełni kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy, procesach wazodylatacji i wazokonstrykcji układu krwionośnego. Organ ten może reagować na zmiany ciśnienia i przepływu krwi oraz prężności gazów [10]. Komórki śródbłonna podobnie jak mięśniówka czy czerwone krwinki krwi, poprzez funkcje, które pełnią poddawane są stałemu zginaniu i rozciąganiu przez otoczenie, w którym występują. Ze względu na lokalizację komórek śródbłonna ważnym parametrem określającym prawidłowe ich funkcjonowanie jest elastyczność. Pełni ona kluczową rolę w zrozumieniu właściwości przepływu krwi, regulacji ciśnienia tętniczego i innych funkcji endogenicznych. Badanie elastyczności może również ułatwić określenie fizjologicznych funkcji. Z drugiej strony niefizjologiczne wartości elastyczności mogą pokazywać oznaki niewydolności śródbłonna przyczyniające się do rozróżnienia chorób układu sercowo-naczyniowego [56].

Wartości elastyczności zależą od struktury komórkowej, która będzie poddana działaniu ostrza AFM, tzn. w zależności od głębokości penetracji ostrza AFM uzyskuje się odpowiedź tej części komórki, która ulega odkształceniu. Wśród struktur komórkowych można wyróżnić glikokaliks, błonę komórkową, cytoplazmę, cytoszkielet oraz jądro komórkowe. W niniejszej pracy zastosowana głębokość indentacji rzędu 200nm decyduje, że za właściwości elastyczne komórek odpowiada głównie cytoszkielet (szersze wyjaśnienie w podrozdziale 3.2.4). Jest on zbudowany z sieci włókien białkowych: mikrofilamentów, mikrotubul oraz filamentów pośrednich. Struktury cytoszkieletu, które najbardziej wpływają na mierzoną elastyczność to mikrofilamenty - skoncentrowane przede wszystkim w warstwie korowej, tuż pod błoną komórkową. Zbudowane są one z dwóch form aktyny: G-aktyny (globularnej,

monomerycznej) oraz F-aktyny (fibrylarnej, włókienkowej). Zawartość tych struktur w komórkach jest sprzężona ze sobą poprzez procesy polimeryzacji i depolimeryzacji. Pojedyncze włókno filamentu aktynowego (F-aktyny) jest strukturą spolaryzowaną o średnicy około 7nm, gdzie przy końcu o ładunku dodatnim przyłączane są monomery aktyny (G-aktyny) natomiast na końcu ujemnym następuje odłączanie monomerów. Tworzenie F-aktyny związane jest z powstaniem tzw. „miejsc enukleacji” złożonych z trzech monomerów G-aktyny, do którego przyłączane jest białko profilina. Odłączanie profiliny indukuje proces polimeryzacji włókien aktynowych (powstawanie fibrylarnej aktyny) o długości do kilkudziesięciu μm . Warto tutaj podkreślić, że fibrylarna aktyna ma zdolność do formowania wiązek filamentów aktynowych tzw. „włókien naprężeniowych”, które dodatnimi końcami są zakotwiczone w błonie komórkowej i najczęściej ułożone równolegle wzdłuż linii naprężeń cytoplazmy [59].

F-aktyna to struktura cytoszkieletu odpowiadająca za kształt oraz właściwości elastyczne komórek (zwiększenie F-aktyny skutkuje zmniejszeniem elastyczności komórek). Dodatkowo związana jest ona z migracją komórek i regulacją przepuszczalności monowarstwy śródbłonka [60]. Z drugiej strony zwiększenie G-aktyny w komórkach (depolimeryzacja F-aktyny) skutkuje zwiększeniem miejsc wiążących dla syntaz eNOS oraz zwiększonym transportem L-argininy do syntezy NO. Warto tutaj zastanowić się nad odpowiedzią na pytanie: jak dynamika aktyn cytoszkieletu komórek śródbłonka może regulować ekspresję czynnika, który jest kluczowy w regulacji homeostazy naczyń (NO)? Monomeryczna aktyna (G-aktyna) jest głównym składnikiem 51-kDa rybonukleinoproteiny, która łączy się z potranslacyjnym regionem śródbłonkowych syntaz tlenu azotu (eNOS mRNA 3') [61]. Stąd też organizacja aktyn cytoszkieletu (a dokładnie procesy depolimeryzacyjne prowadzące do zwiększenia ilości G-aktyny w komórkach) prowadzą do zwiększenia ekspresji eNOS. Zwiększenie G-aktyny w komórkach skutkuje więc zwiększeniem produkcji wazodylatacyjnego mediatora śródbłonka naczyń – tlenu azotu.

Podsumowując, elastyczność komórek, procesy polimeryzacji/depolimeryzacji aktyn oraz poziom tlenu azotu to istotne parametry sprzężone ze sobą, a dodatkowo określające prawidłowo funkcjonujący śródbłonek.

Radmacher i wsp. [62] za pomocą spektroskopii sił wyznaczyli elastyczność poszczególnych organelli komórkowych, które mieszczą się w zakresie od 1-50kPa. Dodatkowo zbadano, że wartość elastyczności związana jest z miejscem akwizycji danych na komórce. Rozpłaszczoną, wyhodowaną na płaskim materiale komórkę można podzielić na kilka obszarów: jądro komórkowe, obszar pozajądrowy oraz obszar peryferyjny (wypustki komórek).

W Tabeli 2 zaprezentowano wartości parametru elastyczności dla wybranej linii komórkowej HUVEC (komórki endotelialne z żyły pępowinowej) otrzymane przez różne grupy badawcze.

Tabela 2. Przegląd literaturowy wartości parametru elastyczności dla komórek linii HUVEC.

Linia komórkowa	Parametr elastyczności [kPa]	Autor
HUVEC	1.8 ± 0.6 (obszar pozajądrowy)	Sato i wsp. [63]
HUVEC	3.0 ± 1.6 (jądro komórkowe) 6.7 ± 4.3 (obszar pozajądrowy)	Kataoke i wsp. [64]
HUVEC	6.8 ± 0.4 (jądro komórkowe) 3.3 ± 0.2 (obszar pozajądrowy) 1.4 ± 0.1 (wypustki)	Mathur i wsp. [65]
HUVEC	7.22 ± 0.46 (jądro komórkowe) 2.97 ± 0.79 (obszar pozajądrowy) 1.27 ± 0.36 (wypustki)	Mathur i wsp. [66]
HUVEC	1.20 ± 0.05 (część centralna)	Kołodziejczyk A.

Różnice parametru elastyczności komórek wynikają z doboru parametrów przeprowadzania eksperymentu (siły oraz głębokości indentacji), geometrii ostrza a przez to analizy danych (modele teoretyczne) oraz warunków hodowli komórkowej, dlatego ważne jest dokładne omówienie pomiaru elastyczności za pomocą AFS. W kolejnym podrozdziale przedstawione zostaną założenia teoretyczne eksperymentu, w którym opisano zmodyfikowany model Hertza wykorzystany do analizy krzywych indentacji.

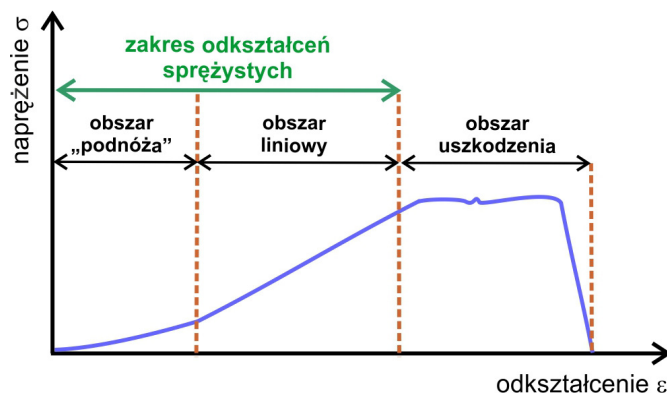
3.2 Pomiar elastyczności komórek

Spektroskopia sił jest jedną z najbardziej wszechstronnych technik, która pozwala na określenie właściwości mechanicznych szerokiego spektrum materiałów biologicznych w skali nanometrowej. W niniejszej pracy, w kontekście metody badań właściwości mechanicznych (pomiar elastyczności komórek) będą stosowane wymiennie pojęcia spektroskopia sił oraz nanoindentacja ostrzem AFM.

3.2.1 Zakresy odkształceń materiałów biologicznych

Bazując na tzw. krzywej naprężenie – odkształcenie dla biomateriałów, często wykorzystywanej w badaniach właściwości mechanicznych, można zdefiniować charakterystyczne obszary odkształcenia biomateriału: obszar „podnóża”, liniowy oraz uszkodzenia [67]. Warto tutaj podkreślić, że biomateriały (np. ludzka skóra, ścięgna, tkanki) nie są materiałami jednorodnymi. Można je porównać do materiału kompozytowego - sieci twardych włókien otoczonych miękką osnową. W innym przypadku biomateriały można

traktować jako wielopoziomowe struktury o zróżnicowanych właściwościach mechanicznych. Przyjmuje się, że biomateriały (np. skóry ssaków i inne tkanki) charakteryzują się J-kształtną krzywą naprężenie – odkształcenie, co zaprezentowano na Rycinie 3.1. Początkowo, w tzw. obszarze „podnóża”, niewielki przyrost naprężenia powoduje znaczne odkształcenie materiału (nieliniowa zależność). Natomiast przy większych odkształceniach materiał staje się sztywniejszy, trudniejszy do odkształcenia. W obszarze liniowym spełnione jest prawo Hooke’a (liniowa zależność odkształcenia od naprężenia), materiał powraca do pierwotnego kształtu po zdjęciu przyłożonego obciążenia. Dwa pierwsze obszary „podnóża” oraz liniowy traktowane są jako zakres odkształceń sprężystych dla biomateriałów. Istotne jest to, że obciążanie i odciążanie w tym zakresie następuje wzdłuż tej samej krzywej (brak histerezy), czyli odkształcenie jest całkowicie odwracalne. Fakt ten potwierdza, że całkowita energia użyta do odkształcania systemu biologicznego jest w pełni odzyskiwana po usunięciu obciążenia. Natomiast w zakresie uszkodzenia zależność naprężenia od odkształcenia nie jest liniowa, następuje trwałe odkształcenie badanego materiału i w konsekwencji utrata jego ciągłości.



Rycina 3.1. Krzywa naprężenie – odkształcenie dla materiałów biologicznych [67].

Sprężystość definiuje się jako zdolność materiału do odzyskania pierwotnego kształtu po zdjęciu zewnętrznych sił powodujących odkształcenie [68]. W niniejszej pracy badania elastyczności komórek przeprowadzono w zakresie odkształceń sprężystych w oparciu o zmodyfikowany model Hertza.

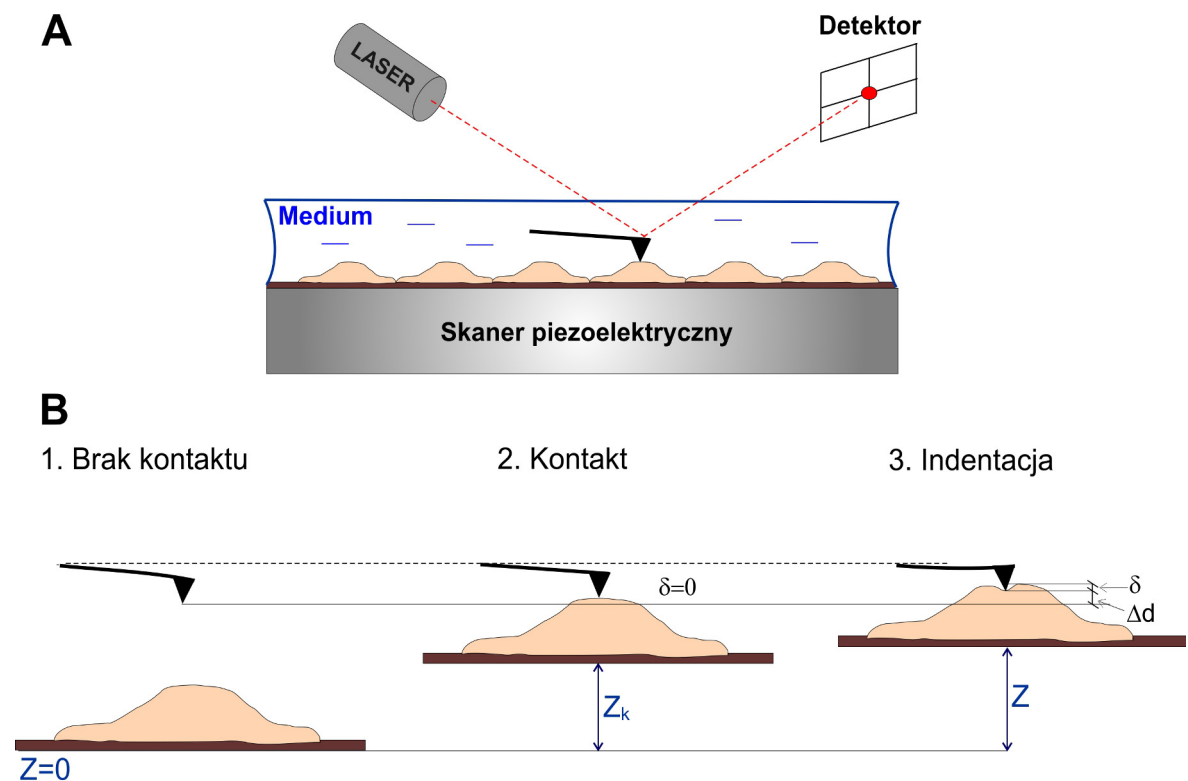
3.2.2 Schemat układu pomiarowego

Na Rycinie 3.2 przedstawiono schemat układu pomiarowego ostrze – próbka bazującego na mikroskopie sił atomowych. Układ pomiarowy (Rycina 3.2A) złożony jest z dźwigni z umieszczonym na jej końcu ostrzem, skanera piezoelektrycznego (układ poruszania próbką i skanowania), lasera oraz diody detekcyjnej (dioda laserowa i detektor).

Wiązka lasera po precyzyjnym zogniskowaniu na końcu dźwigni odbija się od jej powierzchni i jest rejestrowana przez diodę detekcyjną.

Pojawienie się oddziaływania pomiędzy ostrzem a próbką powoduje wychylenie dźwigni, położenie odbitej wiązki lasera zmienia się, przy czym mierzony sygnał z detektora jest proporcjonalny do wychylenia dźwigni. Badania w niniejszej pracy przeprowadzono w trybie kontaktowym, gdzie ostrze dotyka powierzchni komórki, a siła działająca pomiędzy powierzchniami wynika z zachodzenia na siebie chmur elektronowych atomów ostrza i badanej powierzchni (bliskoziębowe odpychanie). Badania elastyczności komórek przeprowadzono w medium komórkowym przy użyciu tzw. komory cieczonej.

Spektroskopia sił jest rozszerzeniem mikroskopii sił atomowych i w niniejszej pracy wykorzystana została do pomiaru właściwości mechanicznych w zakresie odkształceń sprężystych. Pośrednimi wynikami umożliwiającymi ilościowe obliczenie parametru elastyczności są krzywe siła – odległość, które szerzej zostaną opisane w podrozdziale 3.2.4.



Rycina 3.2. Schemat układu pomiarowego ostrze – próbka (A). Oznaczenia: Z – względne przesunięcie skanera, Z_k - względne przesunięcie skanera w momencie styku ostrza z próbką, Δd – ugięcie dźwigni, δ – odkształcenie próbki.

W zakresie odkształceń sprężystych siła oddziaływania pomiędzy ostrzem a próbką opisana jest prawem Hooke'a:

$$F = -k_c \cdot \Delta d \quad (3.1)$$

Odległość rejestrowana w trakcie pomiaru nie jest rzeczywistą odległością między ostrzem a próbką, ale względnym przesunięciem skanera piezoelektrycznego oznaczonym na Rycinie 3.2B jako Z . W przypadku braku kontaktu względne przesunięcie skanera jest równe zero (Rycina 3.2 B-1). W momencie styku ostrza z powierzchnią komórki występuje przesunięcie skanera piezoelektrycznego (oznaczone jako Z_k na Rycinie 3.2B-2) natomiast indentacja (zagłębienie) równa jest zero. Gdy ostrze jest zagłębiane w komórkę dźwignia ulega wychyleniu w osi z o pewną odległość Δd powodując odkształcenie próbki oznaczone jako δ . Rzeczywista odległość pomiędzy ostrzem a próbką D jest różnicą pomiędzy względnym przesunięciem skanera Z a ugięciem dźwigni Δd oraz odkształceniem próbki δ zgodnie z zależnością:

$$D = Z - (\Delta d + \delta) \quad (3.2)$$

Wartością monitorowaną podczas pomiaru jest Z , czyli względne przesunięcie skanera piezoelektrycznego.

3.2.3 Modyfikacja Sneddona do modelu Hertza

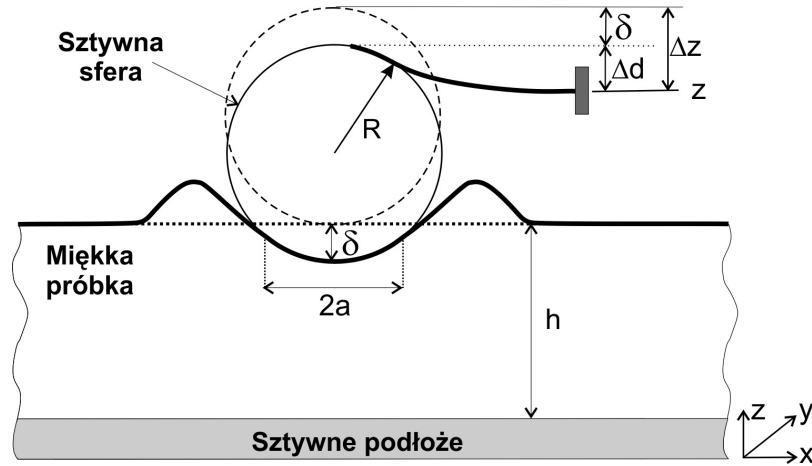
W pracach [2-4,7,69-71] przedstawiona została teoria sprężystości opisująca wyznaczanie modułu elastyczności dla miękkich próbek. Zakładając pewne uproszczenia, indentacja komórki przez ostrze AFM może być porównana do odkształcenia w zakresie sprężystym płaskiej miękkiej próbki przez sztywny, nieodkształcalny wgłębnik zakończony stożkiem bądź sferą, co jest opisane jako modyfikacja Sneddona do modelu Hertza [72,73].

Model Hertza oparty jest na następujących założeniach:

- brak sił powierzchniowych oraz adhezyjnych pomiędzy ostrzem a badaną powierzchnią;
- za punkt kontaktu ostrza przyjmuje się gładką sprężystą sferę;
- badana próbka jest traktowana jako sztywna płaska powierzchnia;
- względne różnice wysokości powierzchni nie są większe od promienia sfery;
- powierzchnia kontaktu jest znacznie mniejsza od powierzchni całej próbki, a stosunek powierzchni kontaktu do powierzchni badanego materiału jest rzędu 10^{-3} .

W przypadku badań próbek biologicznych powyższy model musi zostać zmodyfikowany o dodatkowe założenia uwzględniające odkształcanie badanych powierzchni w wyniku indentacji nieodkształcalnym wgłębniakiem. Dodatkowo, głębokość penetracji nie powinna przekraczać 10% całkowitej grubości badanej próbki (niwelowanie wpływu sztywnego podłoża, na którym osadzany jest materiał biologiczny).

Modyfikacja modelu Hertza uwzględniająca powyższe założenia została zaproponowana przez Sneddona i pozwala na ilościowe określenie modułu sprężystości. Na Rycinie 3.3 przedstawiono schemat odkształcenia miękkiej próbki utwierdzonej na sztywnym podłożu na skutek działania sztywnej sfery [70].



Rycina 3.3. Schemat odkształcenia miękkiej próbki na skutek działania sztywnej sfery [70].

Odształcenie sprężyste powierzchni δ wyrażone jest wzorem:

$$\delta = \int_0^1 \frac{f'(x)}{\sqrt{1-x^2}} dx \quad (3.3)$$

Powstaje ono na skutek działania siły F wyrażonej wzorem:

$$F = \frac{3}{2} E' a \int_0^1 \frac{x^2 f'(x)}{\sqrt{1-x^2}} dx \quad (3.4)$$

gdzie $f(x)$ jest funkcją opisującą przyłożoną siłę,

a – promień kontaktu wyrażony wzorem $a = \sqrt[3]{\frac{3RF}{4E'}}$,

natomiast E' jest zredukowanym modułem Younga określonym zależnością:

$$\frac{1}{E'} = \frac{1-\nu_o^2}{E_o} + \frac{1-\nu_p^2}{E_p} \quad (3.5)$$

E_p, E_o to odpowiednio moduł Younga próbki i ostrza,

ν_p, ν_o współczynniki Poissona próbki i ostrza.

Zakładając, że $E_p \ll E_o$ (w przypadku ostrzy wykonanych z azotku krzemu $E_o=146\text{GPa}$) równanie (3.5) można zredukować do postaci:

$$\frac{1}{E'} \approx \frac{1-\nu_p^2}{E_p} \quad (3.6)$$

Obliczenia numeryczne pozwalają na optymalne dopasowanie zależności opisującej zmianę siły w funkcji zagłębienia ostrza dla zdefiniowanej geometrii ostrza. Dla ostrza o kształcie stożka o kącie rozwarcia α wyrażenie opisujące siłę F w funkcji zagłębienia Δz ma postać:

$$F_{\text{stożek}}(\Delta z) = \frac{2E' \tan(\alpha)}{\pi} (\Delta z)^2 \quad (3.7)$$

Natomiast dla ostrza o kształcie paraboloidy o promieniu krzywizny R siła ta jest opisana wzorem:

$$F_{parab}(\Delta z) = \frac{4\sqrt{R}}{3} E'(\Delta z)^{3/2} \quad (3.8)$$

gdzie:

E' – zredukowany moduł Younga (w pracy zdefiniowany jako parametr elastyczności),

R – promień krzywizny ostrza.

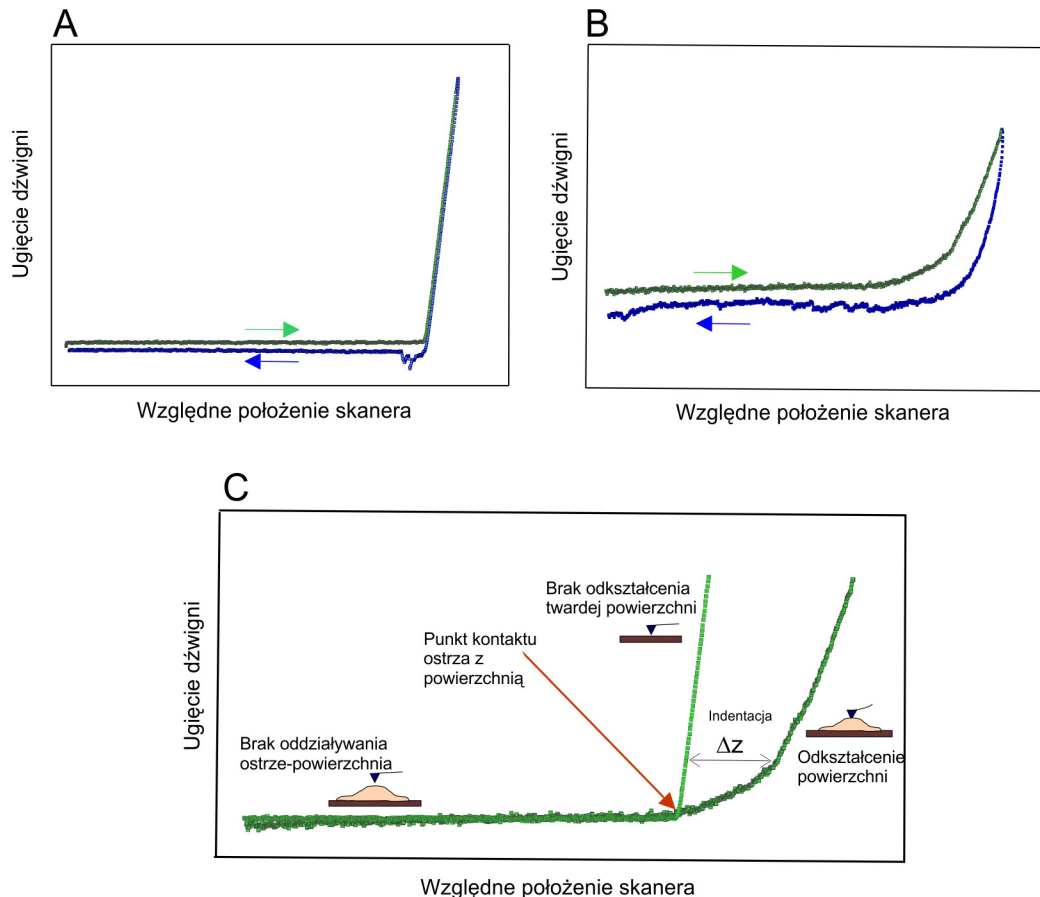
Ostatnio w literaturze [74] dyskutowane jest porównanie ostrza „kulkowego” zakończonych kulą o rozmiarach od kilku do kilkudziesięciu mikrometrów (porównywalne rozmiary ostrza i komórki) oraz ostrza „ostrego” (promień krzywizny rzędu kilkudziesięciu nanometrów) do pomiarów elastyczności komórek. Pomiary za pomocą ostrza „kulkowego” oraz „ostrego” wymagają zastosowania różnych modeli do opracowania rejestrowanych danych, również inny jest sens fizyczny oraz biologiczny takich pomiarów. W przypadku pomiaru za pomocą ostrza „kulkowego” zbierana jest odpowiedź globalna z całej komórki. Zaletami pomiaru elastyczności za pomocą takiego ostrza jest uwzględnienie heterogenicznej niesprężystej struktury powierzchniowej komórek - glikokaliksu, skrócenie czasu pomiaru (wykonanie kilka krzywych siła-odległość na jednej komórce), a przez to zwiększenie statystyki pomiaru (zwiększenie liczby badanych komórek z jednej próbki). W przypadku ostrzy pojmowanych w literaturze jako „ostre” zbierana jest odpowiedź lokalna np. z pojedynczych włókien aktyn cytoszkieletu komórkowego, bądź przestrzeni pomiędzy włóknami. Elastyczność zmierzona ostrzem „ostrym” ściśle odpowiada właściwościom danego poziomu komórkowego (błona komórkowa, cytoszkielet w tym sieć włókien aktynowych, cytoplazma, jądro komórkowe), a w celu uśrednienia pomiaru elastyczności należy wykonać kilkadziesiąt pomiarów na jednej komórce. Pomiar za pomocą ostrza „ostrego” nie uwzględnia jednak struktury glikokaliksu. Istotną zaletą pomiaru za pomocą ostrza „ostrego” jest możliwość jednoczesnego pomiaru morfologii komórki (wypustek oraz innych małych struktur na powierzchni komórek) oraz modułu elastyczności z wysoką rozdzielczością, czego nie można wykonać za pomocą ostrza „kulkowego”.

Wysokorozdzielcze obrazowanie morfologii komórek stanowi uzupełnienie pomiarów elastyczności i może potwierdzić fizjologiczne procesy zachodzące w komórkach śródbłonna w odczynie zapalnym czy podczas inkubacji z potencjalnymi lekami.

W prezentowanej pracy przeprowadzono obliczenia z wykorzystaniem modelu ostrza o kształcie paraboloidy (ostrza „ostrego” o promieniu krzywizny rzędu kilkudziesięciu nm), ponieważ dla mniejszych zagłębień (do 200nm) uzyskano lepsze dopasowania do krzywych indentacji (Rycina 3.5).

3.2.4 Krzywe siła – odległość

Badanie elastyczności komórek za pomocą spektroskopii sił polega na analizie zagłębiania ostrza AFM w badany materiał jako funkcji siły. Zapis zmian siły działającej na ostrze użyte jako penetrator w funkcji odległości pozwala na uzyskanie tzw. krzywych siła – odległość.



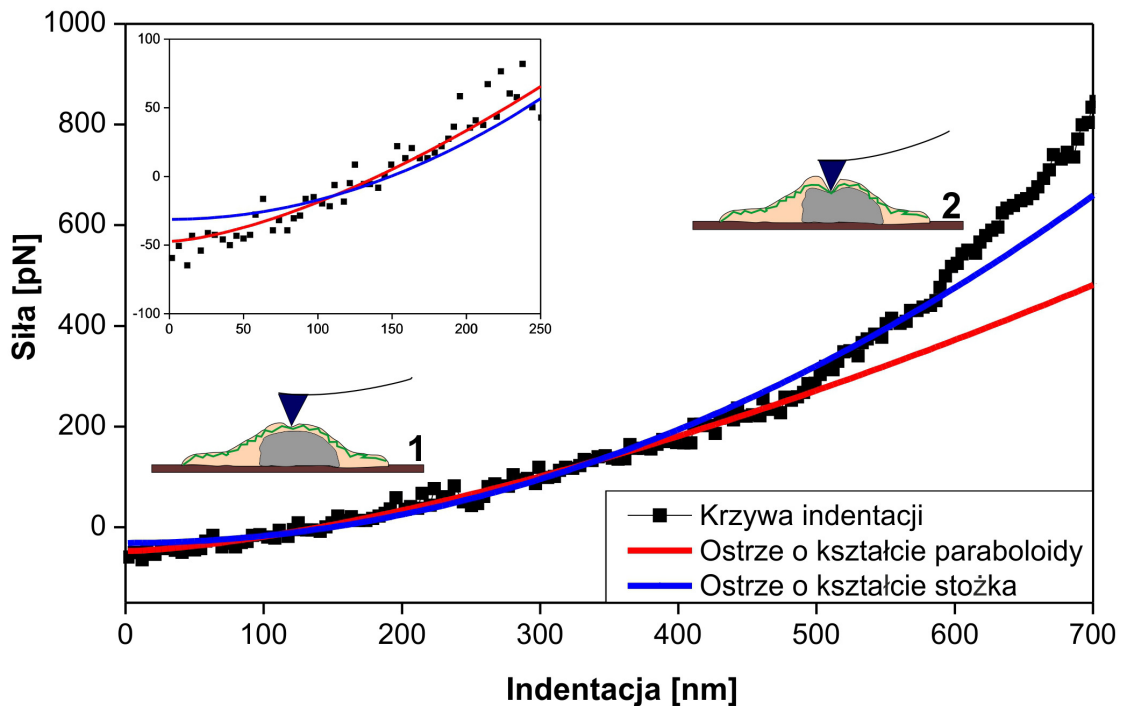
Rycina 3.4. Przykładowe krzywe siła – odległość dla próbki referencyjnej (A), zebrane na komórce (B) oraz złożenie krzywych „dojścia” dla obu materiałów (C).

Na Rycinie 3.4A pokazano przykładowe krzywe siła – odległość dla sztywnego materiału jakim jest szkło (referencja), natomiast 3.4B są to krzywe zebrane na komórce. Najpierw ostrze AFM jest zbliżane do zetknięcia z próbką (tzw. punkt kontaktu) i osiągnięcia zadanej wartości zagłębienia bądź siły (zapis krzywej „dojścia” - zielony kolor na Rycinie 3.4). Następnie przy zdejmowaniu obciążenia zbierana jest krzywa „odejścia” (niebieski kolor na Rycinie 3.4). Ugięcie dźwigni jest zapisywane w funkcji drogi przebytej przez element piezoelektryczny.

Na Rycinie 3.4C przedstawiono złożenie krzywych „dojścia” dla próbki referencyjnej (twardy materiał) oraz zebranej na komórce. Dla twardych materiałów, krzywa dojścia składa się z dwóch obszarów o charakterze liniowym: pierwszym, gdzie ostrze nie dotyka powierzchni, drugim – tzw. „obszar kontaktu” (począwszy od punktu kontaktu ostrza z próbką), gdzie

ugięcie dźwigni jest proporcjonalne do przesunięcia skanera piezoelektrycznego w osi z. Natomiast dla miękkich próbek (np. komórek, bakterii, polimerów) krzywa siła – odległość w „obszarze kontaktu” ma charakter nieliniowy (występuje indentacja ostrza w badany materiał zaznaczona jako Δz na Rycinie 3.4C).

Analiza krzywych siła – odległość pozwala na określenie modułu sprężystości badanej próbki. W tym celu wykorzystuje się tzw. krzywą indentacji, będącą różnicą krzywych „dojścia”: zebranej na badanej komórce oraz próbce referencyjnej (traktowanej jako sztywny nieodkształcalny materiał) (Rycina 3.5).



Rycina 3.5. Krzywa indentacji wraz z dopasowaniem dla ostrza o geometrii paraboloidy (czerwona linia) oraz o geometrii stożka (niebieska linia). Dla indentacji mniejszych (do 200nm) otrzymano lepsze dopasowanie do krzywej indentacji dla ostrza o kształcie paraboloidy (powiększenie wykresu). Dla indentacji do 200nm mierzona jest tzw. elastyczność kortykalna (schemat oznaczony 1), natomiast dla większych indentacji mierzona jest tzw. elastyczność objętościowa (schemat oznaczony 2).

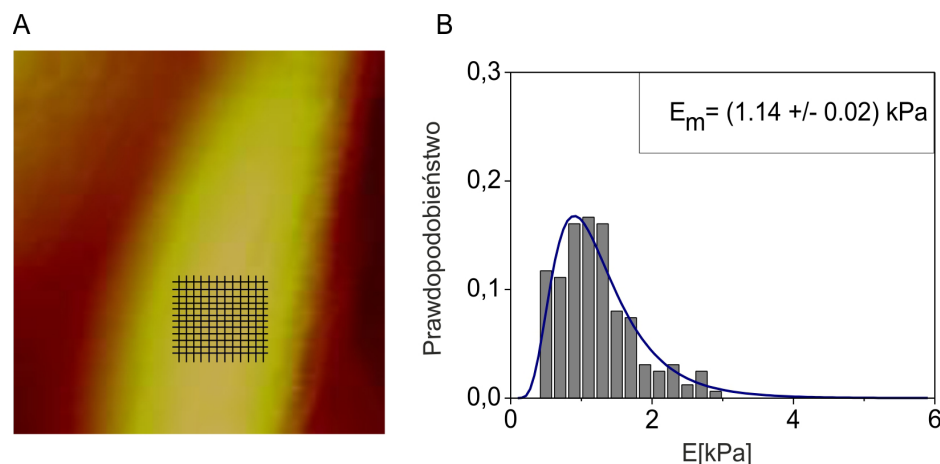
Na Rycinie 3.5 przedstawiono dopasowanie do krzywej indentacji dla ostrza o kształcie stożka oraz paraboloidy. W zakresie indentacji do 200nm uzyskano lepsze dopasowanie dla ostrza o kształcie paraboloidy (powiększenie wykresu). W zależności od głębokości indentacji otrzymywana jest odpowiedź z różnych części komórkowych. Dla indentacji do 200nm mierzona jest tzw. elastyczność kortykalna pochodząca z kortykanej części cytoszkieletu komórkowego, natomiast dla wyższych wartości indentacji mierzona jest tzw. elastyczność objętościowa pochodząca zarówno z cytoszkieletu jak i jądra komórkowego.

3.2.5 Przeprowadzenie eksperymentu

Pomiary morfologii i elastyczności komórek śródbłonka zostały wykonane za pomocą mikroskopu Nanoscope IIIa Multimode - SPM (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA, USA). W pracy badawczej zostały wykorzystane ostrza trójkątne serii MLCT – numer C (Veeco, Camarillo, Kalifornia, USA) wykonane z Si_3N_4 (współczynnik Poissona 0.5) z nominalną stałą sprężystości 0.01N/m . Nominalna długość belki, na której umieszczone jest ostrze to $310\mu\text{m}$, natomiast szerokość wynosi $20\mu\text{m}$. Pomiary morfologii oraz elastyczności komórek zostały wykonane w środowisku ciekłym zbliżonym do naturalnego, co jest niezwykle ważne w przypadku badań układów biologicznych. W tym celu wykorzystano tzw. komorę cieczową AFM, gdzie zarówno próbka z komórkami jak i ostrze AFM znajdowały się w cieczy (pożywka do hodowli komórek).

Na podstawie zeskanowanych obrazów siatki w trybie kontaktowym TGT1 (NT-MDT) obliczono promień krzywizny ostrzy w programie SPIP za pomocą metody rekonstrukcji opisanych przez Villarubia [75] oraz Williams'a i wsp. [76]. W programie SPIP obliczono promienie krzywizn dla składowej x (R_x) i y (R_y), jednakże do obliczeń parametru elastyczności komórek wykorzystano promień krzywizny wyznaczony dla głównej osi skanowania – R_x . Stała sprężystości belki została wyliczona za pomocą drgań termicznych przeprowadzonych w powietrzu [77], analizy dokonano w programie NanoScope 6.1.

Przed dokonaniem pomiaru na komórkach wyznaczono krzywą referencyjną w medium komórkowym na podłożu – szkło poli-L-lizynowane, na którym hodowano komórki (krzywa na twardym materiale). Następnie przeprowadzono pomiary dla próbki z wyhodowanymi komórkami w medium hodowlanym. Eksperyment rozpoczynał się pomiarem topografii powierzchni w trybie kontaktowym AFM. Następnie, w obszarze części centralnej komórki $7\mu\text{m} \times 7\mu\text{m}$ ustawiono prostokątną siatkę 144 punktów jak na Rycinie 3.6A.



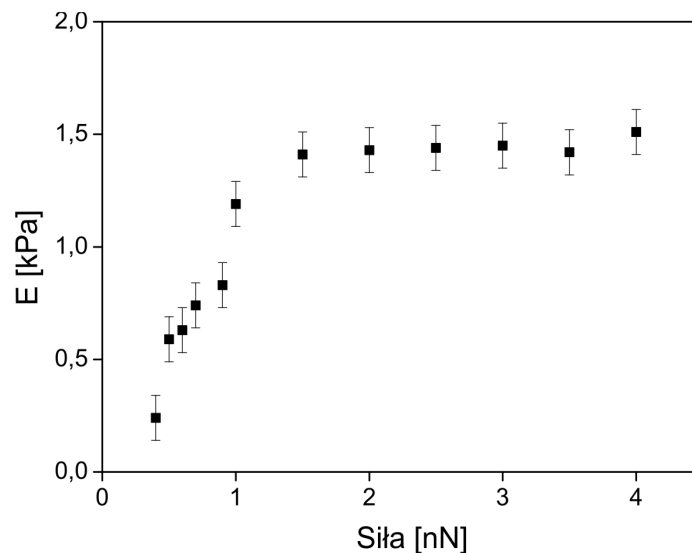
Rycina 3.6. Obraz topografii $25\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$ komórki śródbłonka otrzymany w trybie kontaktowym AFM wraz z zaznaczoną siatką punktów, w których zostały zmierzone krzywe siła – odległość (A) oraz histogram rozkładu parametru elastyczności dla tej komórki (B).

W każdym punkcie siatki zbierano krzywą siła – odległość przy stałym obciążeniu równym 1.5nN (wybór wartości obciążenia wyjaśniony w kolejnym podrozdziale), co pozwala na wyznaczenie punktowych wartości parametru elastyczności. Rozkład parametru elastyczności dla przykładowej komórki został zaprezentowany na Rycinie 3.6B.

W celu otrzymania wartości parametru elastyczności reprezentatywnych dla danej populacji komórek charakteryzowano co najmniej 8 komórek dla danego punktu pomiarowego (komórek inkubowanych z wybraną substancją aktywną przez określone czasy inkubacji) oraz przygotowywano uśredniony - zbiorczy histogram rozkładu parametru elastyczności.

3.2.6 Optymalizacja pomiaru parametru elastyczności

W celu optymalizacji przeprowadzanych eksperymentów wykonano pomiary zależności pomiędzy przyłożoną siłą na ostrze AFM a uzyskanym parametrem elastyczności dla komórek referencyjnych. Dla obciążeń z zakresu od 0.4 do 4nN zmierzono krzywe siła – odległość, a obliczone wartości parametru elastyczności przedstawiono na Rycinie 3.7.



Rycina 3.7. Zależność wartości parametru elastyczności od przyłożonej siły.

Początkowo, dla małych sił uzyskano wzrost parametru elastyczności. Następnie dla około 1.5nN występuje wyraźne *plateau*, które jest argumentem do wyboru właśnie tej siły jako najmniejszej wartości, która daje powtarzalne i porównywalne wyniki.

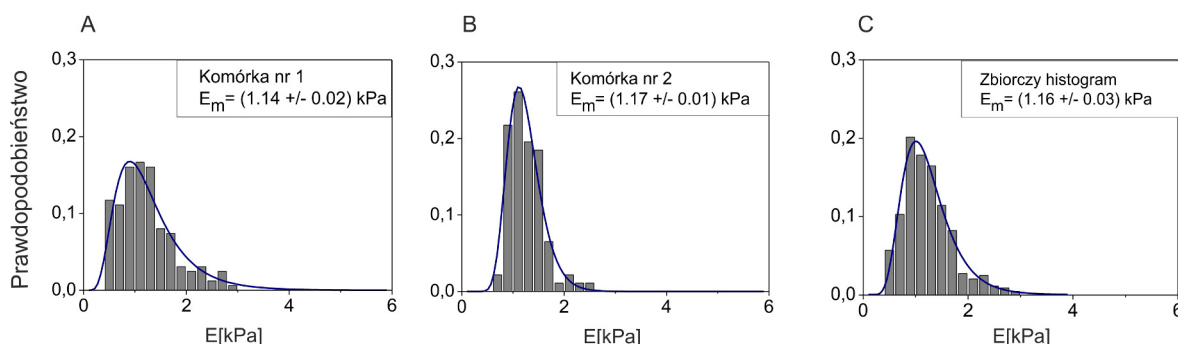
Pomiar topografii i elastyczności komórek został wykonany przy ustalonych parametrach pracy mikroskopu sił atomowych (Tabela 3).

Tabela 3. Parametry pracy mikroskopu sił atomowych. Oznaczenia parametrów pętli sprzężenia zwrotnego: IG (integral gain) - wzmacnienie całkujące, PG (proportional gain) - wzmacnienie proporcjonalne.

Mikroskopia sił atomowych	Nanoindentacja ostrzem AFM
Częstotliwość skanowania = 0.5Hz	Częstotliwość zbierania krzywej = 0.7Hz
Prędkość ostrza = 30 μ m/s	Długość krzywej = 3 μ m
Parametry pętli:	Prędkość zbierania krzywej = 2.1 μ m/s
IG = 0.5	Obciążenie = 1.5nN
PG = 1.0	k – wyznaczone za pomocą drgań termicznych

3.2.7 Analiza danych

Do analizy krzywych siła – odległość zastosowano wcześniej opisany model (podrozdział 3.2.3), który pozwala na obliczenie parametru elastyczności. Parametr elastyczności został zdefiniowany jako wartość mediany z dopasowania funkcji log-normal do rozkładu parametru elastyczności. Na Rycinie 3.8A i B przedstawiono przykłady histogramów dla pojedynczych komórek referencyjnych, natomiast Rycina 3.8C to zbiorczy histogram dla wszystkich komórek referencyjnych.



Rycina 3.8. Histogramy rozkładu parametru elastyczności dla pojedynczych komórek referencyjnych (A, B) oraz zbiorczy dla siedmiu komórek referencyjnych (C).

Ponieważ uzyskane wartości mediany z dopasowania funkcji log-normal dla pojedynczych komórek są zbliżone, przy obliczeniach uwzględniano zbiorcze histogramy dla określonego punktu pomiarowego (np. dla komórek referencyjnych, bądź inkubowanych z wybranymi substancjami aktywnymi przez określone czasy inkubacji). Poprawność dopasowania funkcji log-normal do otrzymanych rozkładów została potwierdzona poprzez wykonanie testów statystycznych Shapiro-Wilk i Kołmogorowa-Smirnowa na poziomie istotności $p=0.05$ w programie STATISTICA 9.0 (StatSoft Inc, Tulsa, USA).

Tak jak zaprezentowano w Tabeli 2, w literaturze występuje duża rozbieżność otrzymanych E dla tej samej linii komórkowej. Wynika ona z różnic w hodowli komórkowej, wykorzystanego modelu bądź analizy danych. Stąd też uzasadnione jest prezentowanie danych w formie

relatywnych zmian, gdzie istotna jest różnica elastyczności komórek z substancjami aktywnymi względem próbki referencyjnej.

3.3 Metody uzupełniające

3.3.1 Spektrofotometryczna metoda Griessa

Śródbłonek jest organem uczestniczącym w ogólnoustrojowej reakcji zapalnej. Przeciwwzapalna reakcja śródbłonka jest związana z wydzielaniem wazoprotekcyjnych mediatorów np. tlenu azotu NO. Cząsteczka ta jest nietrwała, szybko metabolizowana do bardziej stabilnych azotynów i azotanów (NO_3^- i NO_2^-). W prezentowanej pracy jako metodę uzupełniającą wykorzystano spektrofotometryczną metodę Griessa przy użyciu czytnika mikroplątek – Multiscan firmy Labsystems, która pozwala na pomiar stężenia metabolitów NO [78]. Metoda ta oparta jest na reakcji Griessa, która przebiega dwuetapowo. Badania przeprowadzano z nasączy komórek śródbłonka (100 μ l), a następnie inkubowano je z odczynnikami Griessa (0,35% 4-4-aminofenylo sulfonu, 0,1% N-(1-naftyl) dichlorowodorek etylenodiamina w 1M HCl) w temperaturze pokojowej przez 10 min. W pierwszym etapie następuje redukcja azotanu do azotynu pod wpływem reduktazy, następnie drugi czynnik Griessa zamienia NO_2 w związek azowy o kolorze ciemnofioletowym. Absorbancja azotynów została zmierzona dla $\lambda=550$ nm, a jako krzywą wzorcową uwzględniono krzywą azotynu sodu. Do dalszej analizy przeliczono relatywne zmiany produkcji tlenu azotu, względem komórek referencyjnych.

Pomiary oznaczania NO zostały wykonane przy współpracy z Dr Rafałem Biedroniem w Katedrze Immunologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

3.3.2 Pomiar wydzielanego PGI_2

Prostacyklina PGI_2 jest standardowym parametrem określającym prawidłowo funkcjonujący śródbłonek. W badaniach *in vivo* jest on zwykle mierzony z krwi poprzez pomiar absorbancji 6-keto- $PGF_{1\alpha}$, który jest stabilnym metabolitem PGI_2 . W prezentowanej pracy, poziom PGI_2 dostarcza informacji na temat aktywowanych szlaków wewnątrzkomórkowych. Uwalnianie prostacykliny zostało zmierzone z nasączy komórek immunoenzymatycznym testem ELISA. Wyniki pomiaru prostacykliny zostały zaprezentowane jak dla pomiarów elastyczności oraz produkcji NO w formie relatywnych zmian w stosunku do komórek kontrolnych.

Pomiar PGI_2 został przeprowadzony przy współpracy z Dr Tomaszem Wójcikiem w laboratorium Jagiellońskiego Centrum Rozwoju Leków w Krakowie.

3.3.3 Mikroskopia fluorescencyjna

Mikroskopia fluorescencyjna jest odmianą mikroskopii świetlnej, która umożliwia identyfikację struktur sub-komórkowych, przez co ma szerokie zastosowanie w badaniach procesów fizjologicznych komórek. Działanie mikroskopu fluorescencyjnego oparte jest na epifluorescencyjnym systemie optycznym, który umożliwia detekcję i wizualizację sygnału pochodzącego od fluorochromu - substancji zdolnej do emisji światła fluorescencyjnego po wzbudzeniu światłem o określonej długości.

Tak jak wyjaśniono w podrozdziale 3.1 o badanej elastyczności komórek decydują włókna cytoszkieletu komórkowego, przede wszystkim aktyna zlokalizowana w części korowej. Metodą suplementarną do pomiaru elastyczności komórek za pomocą spektroskopii sił jest immunofluorescencyjne wybarwienie cytoszkieletu aktynowego komórek.

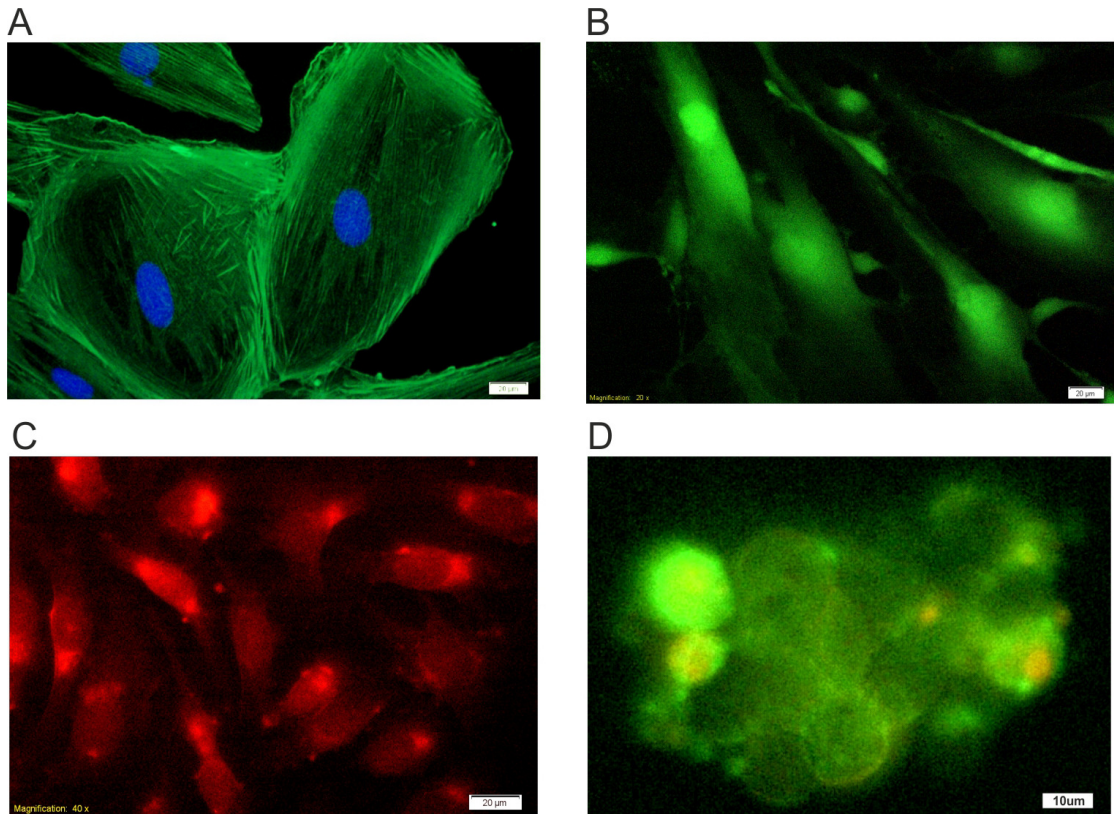
Do znakowania F-aktyny wykorzystano znacznik fluorescencyjny Alexa Fluor 488 z falloidyną – silnie toksycznym alkaloidem wytwarzanym przez muchomor sromotnikowego. W celu analizy szlaków komórkowych indukowanych przez cytokiny prozapalne czy substancje śródbłonkowe niezbędne w pracy badawczej okazało się wybarwienie kwasów nukleinowych (jądra komórkowe) za pomocą DAPI oraz wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} przy użyciu barwnika Fluo4 z przeciwciałem probenecyd. Potwierdzenie/wykluczenie apoptozy oraz nekrozy komórek zostało zrealizowane przez wybarwienie komórek aneksyną V i jodkiem propidyny.

Obrazy fluorescencyjne otrzymano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego o odwróconej optyce Olympus IX71 z zestawem wymiennych filtrów oraz kamerą CCD do wykonywania dokumentacji fotograficznej. Komórki naświetlano lampą Olympus X-Cite Q120, a zdjęcia mikroskopii fluorescencyjnej wykonywano na obiektywach 20X bądź 40X.

Filtry użyte podczas pomiaru:

- U-MWU2 (DAPI; $\lambda_{emisji}=400nm$)
- UMWIB2 (Alexa Fluor 488 z przeciwciałem falloidyną, Fluo 4 z przeciwciałem drugorzędowym probenecyd, aneksyna V z jodkiem propidyny; $\lambda_{emisji}=505nm$)
- U-DM-CY3 (fluorescencja doksorubicyny; $\lambda_{emisji}=565nm$)

Analiza zdjęć została przeprowadzona za pomocą oprogramowania Olympus CellSense. Na Rycinie 3.9 zamieszczono przykładowe zdjęcia mikroskopii fluorescencyjnej komórek linii HMEC (Rycina 3.9A, B, D) oraz EA.hy926 (Rycina 3.9C) dla wyżej wymienionych wybarwień.



Rycina 3.9. Przykładowe obrazy fluorescencyjne. Znakowane fluorescencyjnie włókna F-aktyny (kolor zielony) oraz jądra komórkowe (kolor niebieski) (A), wewnątrzkomórkowe jony Ca^{2+} (zielony obszar) (B) dla komórek linii HMEC, fluorescencja doksorubicyny zaobserwowana na komórkach EA.hy926 (C) oraz wybarwienie aneksyną V oraz jodkiem propidyny dla komórek linii HMEC inkubowanych z simwastatyną (D). Skala dla A, B, C: 20 μm , natomiast dla D: 10 μm .

3.3.4 Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa (ang. flow cytometer, FC) jest techniką analityczną pozwalającą na szybki pomiar rozproszonego światła lub sygnałów fluorescencji emitowanych przez odpowiednio naświetlone komórki. Wyniki analizy światła rozproszonego dostarczają informacji o wielkości, kształcie badanej komórki oraz o jej wewnętrznych ziarnistościach. Do pomiaru FC komórki umieszczone są w zawiesinie i znakowane fluorochromami lub przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromami. Pomiar cytometrii przepływowej opiera się na założeniu, że ilość składnika komórki znakowanego pewnym fluorochromem jest wprost proporcjonalna do intensywność emitowanej fluorescencji wywołanej naświetlaniem komórki światłem lasera o długości fali zbliżonej do maksimum absorpcji dla tego fluorochromu. W cytometrze przepływowym można wymienić cztery podstawowe układy: przepływowy, laserów, optyczny i detektorów. W pierwszej jednostce tzw. transportu cieczy następuje sortowanie komórek w strumień, który podąża w kierunku wiązki laserowej. Układ optyczny kształtuje i ogniskuje wiązkę

lasera na komórce, która jest rozpraszana i kolejno wzbudza fluorochromy przyłączone do komórek. Następnie wiązka poprzez układ optyczny jest doprowadzana do zogniskowania na fotokatodzie detektorów. Niezbędnym minimum w układzie cytometru przepływowego są dwa detektory: jeden do rejestracji wiązki rozproszonej zgodnie z kierunkiem wiązki lasera (kanał FL1), drugi do pomiaru rozproszenia pod kątem 90° (kanał FL2). W pierwszym przypadku rozproszenie rośnie wraz z rozmiarami cząsteczek i nie zależy od współczynnika załamania światła cząsteczek oraz jej kształtu, zatem przy analizie dwuwymiarowej w FL1 komórki są rozdzielane ze względu na ich wielkość. Promieniowanie rozpraszane pod kątem 90° zależy od wielkości, kształtu cząsteczek oraz współczynnika załamania i odbicia światła, zatem przy użyciu FL2 komórki są rozdzielane ze względu na kształt i ziarnistości.

Zaletą cytometrii przepływowej to przede wszystkim możliwość szybkiego, obiektywnego i zautomatyzowanego pomiaru pojedynczych komórek w dużych populacjach komórkowych, a także wykrywanie śladowych subpopulacji i możliwość równoległej analizy wieloparametrowej.

FC ma szerokie zastosowanie w naukach medycznych. Wykorzystywane jest między innymi do immunofenotypowania (cech antygeny), analizy aktywności enzymów, pomiaru stężenia Ca^{2+} , detekcji apoptozy, pH, oceny oporności wielolekowej, badania ploidii (ilości materiału genetycznego - DNA znajdującego się w jądrze komórkowym), replikacji DNA, struktury chromatyny, zawartości RNA, zawartości białek, ekspresji różnych antygenów: powierzchniowych, cytoplazmatycznych, jądrowych, badania właściwości błon cytoplazmatycznych w tym potencjału, przepuszczalności oraz wielu innych.

Metoda ta została wykorzystana do pomiaru wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} w komórkach śródbłonna w odczynie zapalnym oraz poddanych działaniu potencjalnych czynników śródbłonkowych. Pomiaru wykonano w Katedrze Immunologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Do oznaczania jonów Ca^{2+} wykorzystano znacznik Fluo4 w zakresie emisji 510nm. Średnia intensywność fluorescencji została obliczona dla trzech prób, gdzie zliczano do 10 tys. komórek dla pojedynczej próby. Intensywność fluorescencji Fluo4 dla komórek śródbłonna (inkubowanych z cytokiną prozapalną oraz potencjalnymi lekami śródbłonkowymi) została zanalizowana w programie WinMDI, na wykresach zaprezentowano średnie wartości bądź relatywne zmiany intensywności Fluo4 obliczone względem komórek referencyjnych (zachowany czas hodowli na szkiełku, niepoddane działaniu czynników).

3.4 Analiza statystyczna

Relatywne zmiany parametru elastyczności obliczono według wzoru:

$$\Delta E = \frac{\bar{E}_{i_czynnik} - \bar{E}_{i_kontrola}}{\bar{E}_{i_kontrola}} \quad (3.9)$$

gdzie:

i - oznacza kolejne czasy inkubacji,

$\bar{E}_{i_kontrola}$ - wartość parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (wartość mediany z dopasowania funkcji log-normal),

$\bar{E}_{i_czynnik}$ - wartość parametru elastyczności dla komórek z badanym czynnikiem (wartość mediany z dopasowania funkcji log-normal).

Jako błąd relatywnych zmian przyjęto średnią kwadratową niepewność obliczoną według wzoru:

$$\bar{S}_E = \sqrt{\left(\frac{1}{E_{kontrola}}\right)^2 \cdot S_{E_{czynnik}}^2 + \left(\frac{E_{czynnik}}{E_{kontrola}^2}\right)^2 \cdot S_{E_{kontrola}}^2} \quad (3.10)$$

gdzie:

$S_{E_{czynnik}}$ to niepewność dopasowania do rozkładu log - normal dla wartości $\bar{E}_{i_czynnik}$

$S_{E_{kontrola}}$ to niepewność dopasowania do rozkładu log - normal dla wartości $\bar{E}_{i_kontrola}$

W przypadku pomiarów biochemicznych (oznaczanie NO, PGI₂ oraz Ca²⁺) wyniki zostały zaprezentowane jako średnie wartości mierzonych parametrów dla określonej liczby powtórzeń z odchyleniami standardowymi bądź w formie relatywnych zmian względem poziomu kontrolnego, do których jako niepewność obliczono średnią kwadratową niepewność.

Poprawność dopasowania funkcji log-normal do rozkładów parametru elastyczności dla poszczególnych punktów pomiarowych (komórek inkubowanych z czynnikami przy określonych czasach inkubacji) został potwierdzony za pomocą testów statystycznych Kolomogorova-Smirnova na poziomie istotności p=0.05 w programie Statistica9.0.

Do badania zależności parametru elastyczności pomiędzy komórkami inkubowanymi z wybranym odczynnikiem, a poziomem referencyjnym zostały przeprowadzone testy ANOVA (analiza wariancji) w programie Origin8.0 dla punktowych wartości parametru elastyczności (około 700 wartości parametru elastyczności dla jednego punktu eksperymentalnego) na dwóch poziomach istotności oznaczonych (**) p<0.01 oraz (*) p<0.05. W celu porównania zależności pomiędzy poszczególnymi próbkami wykonano dodatkowe testy Tukey'a na takich samych poziomach istotności.

Rozdział 4. Przebieg eksperymentu

4.1 Materiały

Center for Disease Control and Prevention, Atlanta (GA, USA):

Linia komórkowa HMEC

Thermo Scientific (Erembodegem, Belgia):

Szkiełka Pol – L- lizynowane

Life Technologies (Warszawa, Polska):

HAT – suplement hodowli komórkowej (mieszanina sodu hipoksantyny, aminopteryny i tymidyny), medium komórkowe DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Invitrogen (Warszawa, Polska):

L – Glutamina, ludzki śródbłonkowy czynnik wzrostowy (human epidermal growth factor, EGF), płodowa surowica wołowa (fetal bovine serum FBS), zestaw antybiotyków: penicylina, streptomycyna, fungison, znaczniki fluorescencyjne: Alexa Fluor 488 z falloidyną, 4',6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI), Fluo - 4 Direct™ Calcium Assai Kit, Kinazy Lekkich Łańcuchów Miozyny (Myosin Light Chain Kinase, MLCK) z Pacific Orange

Enzo Life Science (Warszawa, Polska):

6-keto-PGF_{1α} EIA kit

Sigma Aldrich (Poznań, Polska):

Medium MCDB, bufor fosforanowy (D - PBS; pH 7.4) 1×, trypsyna (0.25%), hydrokortyzon, czynnik martwicy nowotworów - TNF-α (Tumor Necrosis Factor – alpha)

Linia komórkowa EA.hy926 została udostępniona przez Dr C-J. Edgella (Departament of Pathology, University of North Carolina, USA).

4.2 Hodowla komórek

Komórki linii HMEC hodowano na wcześniej przygotowanym medium wzrostowym z suplementami do siódmego pasażu (P7).

Medium wzrostowe przygotowane w sterylnych warunkach zawiera następujące składniki:

- 1) Medium hodowlane - podłoże MCDB
- 2) L – Glutamina: 8μM
- 3) Hydrokortyzon: 0.05 mg/ml
- 4) Czynnik wzrostowy – EGF: 5ng/ml
- 5) FBS - płodowa surowica bydlęca: 10%
- 6) Zestaw antybiotyków: penicylina, streptomycyna, fungison (1:1000)

Pierwszym etapem tworzenia się hodowli jest adhezja komórek do podłoża. Następnie komórki rozplaszczają się i przybierają charakterystyczny dla siebie wygląd [79]. Komórki śródbłonna hodowano w atmosferze 37°C, 5% CO₂, a pasażowanie przeprowadzano co 72h (do momentu uzyskania 90% konfluentności pokrycia dna butelek hodowlanych). Pasażowanie komórek rozpoczynało zebranie zmetabolizowanego supernatantu komórkowego, następnie płukano je podgrzanym do temperatury 37°C buforem fosforanowym bez jonów wapnia i magnezu. Kolejnym etapem pasażowania jest trypsynizacja (trawienie białek błony plazmatycznej komórek, co skutkuje przechodzeniem komórek do zawiesiny) przez około 2min i neutralizacja inhibitorem trypsyny - surowicą. Przygotowaną zawiesinę komórek przenoszono do probówki typu falcon 15ml, dopełniano medium MCDB i wirowano 5min na 1400obr/min. Po zwirowaniu na dnie tuby osiadły komórki w postaci peletu. Supernatant z trypsyną został usunięty, a pelet zawieszano we wcześniej opisanym medium hodowlanym z suplementami.

Drugą linią komórkową wykorzystaną w pracy badawczej jest EA.hy926 - nieśmiertelna linia komórek uzyskana poprzez fuzję ludzkich komórek śródbłonna z żyły pępowinowej z linią komórkową A-549 (płucne komórki nowotworowe). Komórki hodowano w medium hodowlanym DMEM uzupełnionym o 10% płodowej surowicy bydlęcej, 2mM L-glutaminy, 100µg penicyliny, 100µg streptomycyny oraz 2% suplement HAT (mieszanina sodu hipoksantynowego, aminopteryny i tymidyny stosowana do selekcji i hodowli komórek typu hybridoma). Hodowlę komórkową utrzymywano w temperaturze 37°C w atmosferze z 5% CO₂. Komórki pasażowano dwa razy w tygodniu (po uzyskaniu 90% konfluentności pokrycia dna butelek hodowlanych). Dla obu linii komórkowych HMEC oraz EA.hy926 zawiesinę komórkową wysiewano do badań w stężeniu 5·10⁴ na 48h na płytce 24-dołkowej.

4.3 Przygotowanie próbek

Komórki do badań spektroskopii sił wysiewano na uprzednio wysterylizowane podłoża hodowlane - szkiełka poli-L-lizynowane (pocięte na próbki o rozmiarach 1cm x 1cm) w stężeniu 5·10⁴ na 48h. Jednocześnie do pomiaru przygotowywano próbki referencyjne, które stanowią natywne komórki linii HMEC bądź EA.hy926 zgodnie z procedurą hodowli, o czasie hodowli na szkiełku równym badanej próbce (z substancją czynną). Po 48h do komórek dodawano cytokinę TNF-α (10ng/ml), 1-MNA⁺ (w odpowiednich stężeniach: 0.05µM, 0.1µM, 0.2µM) lub simwastatynę (0.1µM, 1µM, 10µM) bądź czynniki: 1,4-DMP (0.02µM, 0.1µM), 1-MP (0.1µM, 1µM). Przed pomiarem próbkę płukano w podgrzanym do 37°C medium hodowlanym, w celu usunięcia komórek niezwiązanych z podłożem. Pomiar spektroskopii sił był przeprowadzany w medium hodowlanym.

Wybarwienie F-aktyny

Do mikroskopii fluorescencyjnej – wybarwienia F-aktyny komórki wysiewano na płytce 24-dołkowej. Komórki śródbłonna hodowano na płytkach a następnie poddawano je działaniu czynnikom na określone czasy inkubacji. Następnie przeprowadzano wybarwienie F-aktyny według następującej procedury:

1. płukanie podgrzanym do 37°C PBSem (pH 7.4),
2. utrwalenie 2.5% formaldehydem przez 10min,
3. permeabilizacja błony komórkowej za pomocą 0.1% Trytonu X przez 4min (zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej),
4. inkubacja z PBS z 1% BSA przez 35 min w celu usunięcia małych białek,
5. inkubacja z barwnikiem Alexa Fluor 488 z falloidyną (10/500 μ L PBS) przez 15 min. Falloidyna wiąże się zarówno *in vivo* jak i *in vitro* z aktyną powodując stabilizację F-aktyny, również w wiązkach mikrofilamentów tworzących włókna naprężeniowe. Ma ona takie samo powinowactwo do krótkich jak i długich mikrofilamentów i wiąże się z aktyną w stosunku stechiometrycznym 1:1 (1 cząsteczka falloidyny na 1 cząsteczkę aktyny w filamencie aktynowym),
6. inkubacja z DAPI w stężeniu 0.00025% (w/v) przez 5min (wybarwienie jąder komórkowych).

Pomiędzy kolejnymi krokami komórki płukano PBS o pH 7.4. Obserwacje przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej prowadzono bezpośrednio po wybarwieniu komórek.

Znakowanie aneksyną V oraz jodkiem propidyny

Do barwienia wykorzystano gotowy zestaw rekombinowanej aneksyny V koniugowanej z FITC zawieszonym w buforze Tris z BSA i z azydkiem sodu. W skład zestawu dodatkowo wchodzi: bufor zawierający jodek propidyny w stężeniu 50 μ g/ml oraz bufor wiążący oparty na HEPES z dodatkiem NaCl i CaCl₂.

Barwienie:

- płukanie komórek wysiewanych na płytce 24 dołkowej,
- zawieszenie komórek w buforze wiążącym (około 200 μ l na próbkę płytki 24-dołkowej),
- dodanie aneksyny V (w stężeniu 5 μ l na 100 μ l buforu wiążącego) oraz PI (w dawce 10ml/100ml roztworu wiążącego)
- inkubacja komórek w ciemności w temperaturze pokojowej przez 15 minut
- wizualizacja komórek przy pomocy mikroskopu o odwróconej optyce.

Oznaczanie wewnątrzkomórkowych jonów Ca²⁺

Do badań na cytometrze przepływowym przygotowane zostały zawiesiny komórek, które uprzednio inkubowano z wybranymi czynnikami zapalnymi bądź śródbłonkowymi. Komórki do pomiarów pasażowano z płytki 24 - dołkowej a następnie pelet komórek rozpuszczano w roztworze barwnika Fluo 4 (rozcieńczone 1:1000 w medium hodowlanym z Trytonem X w końcowym stężeniu 0.01%) przez 45min. Kolejno komórki wirowano, zbierano supernatant i pelet zawieszono i inkubowano przez 20 min w roztworze probenecydu – organicznego blokera transportu jonów (rozcieńczenie 1:100 w medium hodowlanym). Pomiar wykonywano bezpośrednio po inkubacji w roztworze probenecydu. Równocześnie wyznakowano komórki referencyjne bezpośrednio w dołkach płytki hodowlanej. Pomiar na cytometrze przepływowym wykonywano również dla niewybarwionych komórek.

W celu sprawdzenia poprawności wybarwienia Fluo4 oraz lokalizacji jonów Ca²⁺ wykonano również pomiary wapnia wewnątrzkomórkowego z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej (Rycina 3.7C).

Oznaczanie zewnątrzkomórkowego NO

W celu określenia produkcji NO przez komórki metodą spektrofotometryczną analizie poddano nasącz komórkowy (100µl) z próbek z komórkami. Tak jak opisano w podrozdziale 3.3.1. metoda Griessa pozwala na pośredni pomiar NO (mierzone jest stężenie azotynów i azotanów powstałych z rozpadu niestabilnej cząsteczki NO). Nasącze inkubowano z odczynnikami Griessa (0.35% 4-4-aminofenylo sulfonu, 0.1% N-(1-naftył) dichlorowodorek etylenodiamina w 1M HCl) w temperaturze pokojowej przez 10min. Następnie na czytniku mikroplętek została zmierzona absorbancja azotynów dla długości fali $\lambda = 550\text{nm}$.

Oznaczanie prostacykliny

Oznaczanie prostacykliny przeprowadzano z supernatantów komórkowych za pomocą EIA Kitu do znakowania metabolitu PGI₂ – 6keto PGF_{1 α} . Próbki przygotowywano jak do pomiaru immunofluorescencji czy tlenu azotu, natomiast do analizy pobierano po 100µl supernatantu z każdego dołka płytki 24-dołkowej. Do pomiaru jednocześnie przygotowane zostały komórki z odczynnikami oraz referencyjne.

Supernatanty komórek zakwaszano za pomocą 0.1M HCl i inkubowano przez 15 minut w temperaturze 4°C. Po odwirowaniu zbierano supernatant i наносono go na kolumnę chromatograficzną wypełnioną złożem C18. Do rozdziału chromatograficznego

zastosowano chromatografię odwróconej fazy. Przed naniesieniem próbki na kolumnę złożę przemyto 10ml alkoholu etylowego. Następnie kolumna została przepłukana kolejno 10ml wody dejonizowanej, 10ml 15% alkoholu etylowego i 10ml heksanu. Kolejny etap to elucja i zbieranie frakcji kolumny. Jako eluentu użyto 10ml octanu etylu. W końcowym etapie próbki zostały wysuszone w strumieniu azotu oraz rozpuszczone w 250 μ l buforu testowego. Przed pomiarem próbki były mieszane na wytrząsarce vortex przez 5min w temperaturze pokojowej.

Rozdział 5. Odczyn zapalny – model dysfunkcji śródbłonka

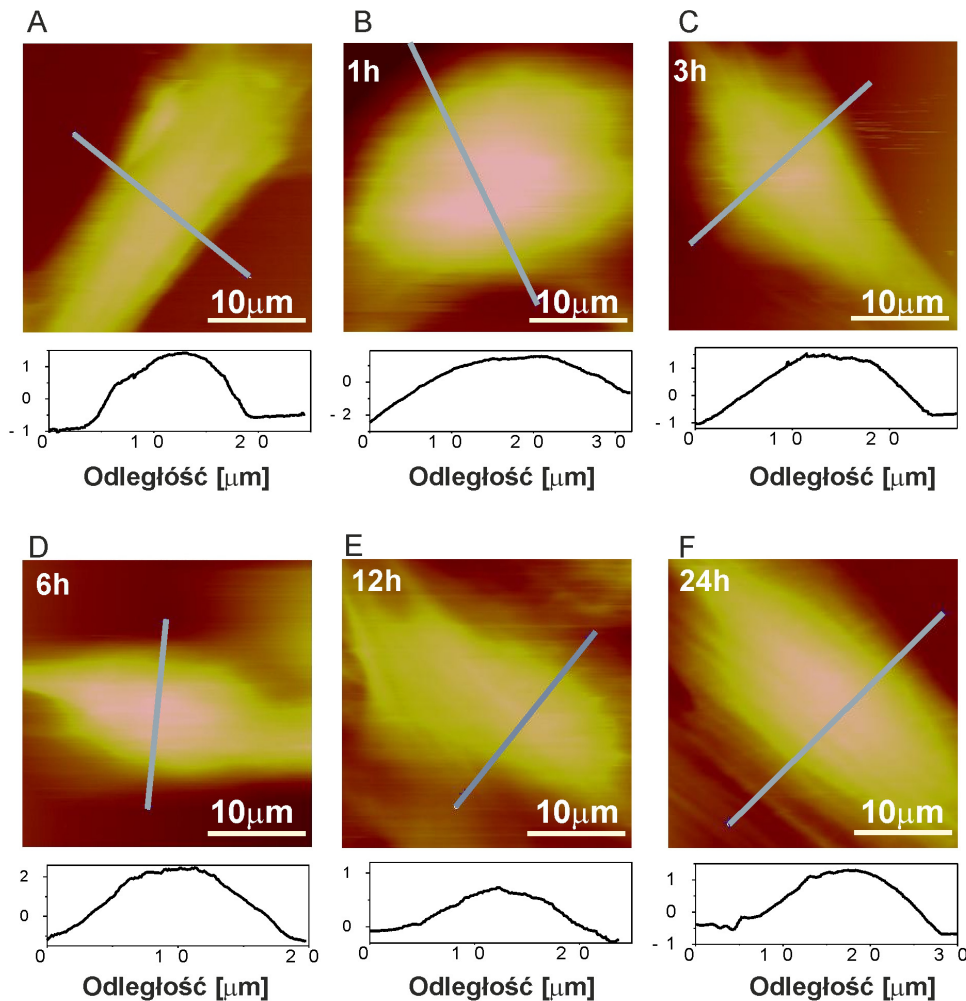
Pojęcie dysfunkcji śródbłonka można zdefiniować jako stan zapalny komórek śródbłonka, który charakteryzuje się przede wszystkim zaburzeniami produkcji czynników biochemicznych przez śródbłonek. W komórkach śródbłonka stanu zapalnego obserwuje się zmniejszenie produkcji tlenu azotu przez eNOS bądź jego silną ciągłą nadprodukcję z udziałem indukowanej odmiany syntazy (iNOS) [80]. W konsekwencji następuje nadmierna aktywacja cyklooksygenazy, co może powodować powstawanie dużych ilości prozapalnych prostaglandyn a także reaktywnych form tlenu. Wiąże się to ze zwiększeniem przepuszczalności śródbłonka, czemu może towarzyszyć przenikanie komórek zapalnych: limfocytów oraz makrofagów. Tak jak zaznaczono w podrozdziale 2.1.2 TNF- α jest czynnikiem stymulującym odczyn zapalny w komórkach śródbłonka. Cytokina ta jest produkowana przez komórki zapalne: makrofagi i monocyty ale także przez same komórki śródbłonka w odczynie zapalnym [10].

W niniejszym rozdziale zaprezentowano wyniki związane z działaniem cytokiny prozapalnej TNF- α na komórki śródbłonka. Wpływ TNF- α na śródbłonek został zbadany za pomocą mikroskopii i spektroskopii sił, wybarwienia F-aktyny cytoszkieletu komórkowego, mikroskopii fluorescencyjnej oraz metody Griessa umożliwiającej pomiar produkowanego tlenu azotu. W pracy badawczej przeprowadzono charakteryzację działania TNF- α na komórki śródbłonka dla stężenia 10ng/ml dla wybranych czasów inkubacji: 1, 3, 6, 12 oraz 24h. Zestawienie otrzymanych wyników pozwoliło na zdefiniowanie modelu wczesnej dysfunkcji śródbłonka *in vitro*.

5.1 Zmiany morfologii komórek po aplikacji TNF- α

Cytokinę prozapalną TNF- α inkubowano w stężeniu 10ng/ml przez 1, 3, 6, 12 i 24h. Następnie analizowano zmiany towarzyszące komórkom z badanym czynnikiem względem komórek referencyjnych. Za pomocą mikroskopii sił atomowych wykonano obrazy topografii komórek dla poszczególnych próbek z TNF- α w rozmiarze 100 μ m na 100 μ m, dzięki czemu możliwa była wizualizacja całej komórki wraz z wypustkami. W pracy badawczej zmierzono następujące parametry morfologii: wydłużenie, pole powierzchni, objętość oraz wysokość części centralnej komórki. Część centralna komórek została zdefiniowana jako obszar powyżej połowy wysokości komórki (średnio powyżej 1 μ m). Do obliczeń uwzględniono od 26 do 28 komórek dla każdego czasu inkubacji. Wydłużenie

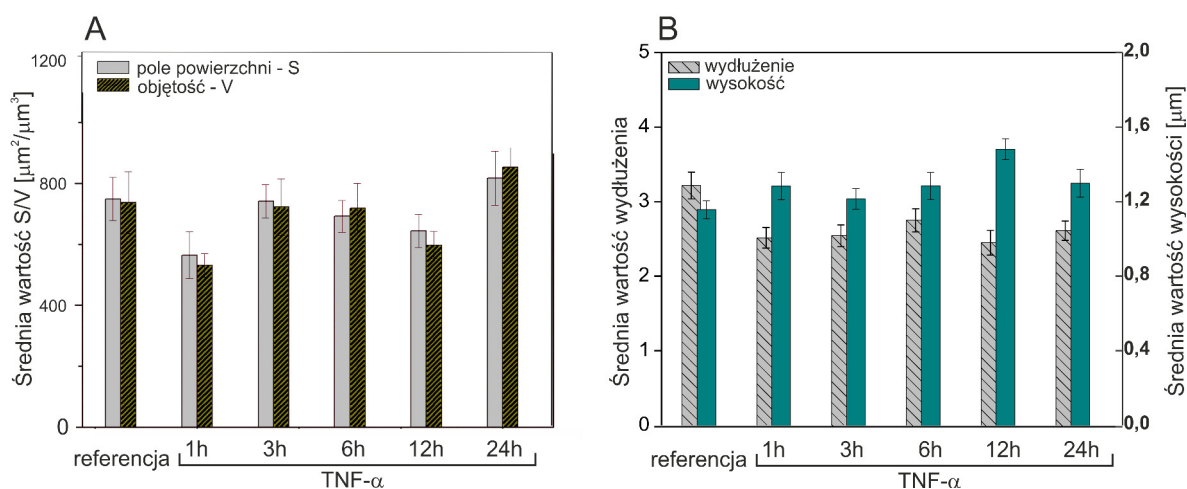
komórki zdefiniowano jako stosunek długości do szerokości części centralnej komórki. Na Rycinie 5.1 zaprezentowano przykładowe obrazy topografii komórek o rozmiarach $30\mu\text{m}$ na $30\mu\text{m}$ dla komórki kontrolnej (A) oraz inkubowanych z $\text{TNF-}\alpha$ (B-F) odpowiednio przez 1, 3, 6, 12 oraz 24h. Pod obrazami topografii komórek zamieszczono odpowiadające im profile poprzeczne przez część centralną. Na podstawie Ryciny 5.1 można wnioskować, że komórki inkubowane z $\text{TNF-}\alpha$ przez 1h zmieniają kształt z wydłużonego na sferyczny. Dla pozostałych czasów inkubacji z cytokiną prozapalną komórki przyjmują kształt wrzecionowaty (podobnie jak w przypadku komórek referencyjnych). Podsumowując, najbardziej widoczne zmiany kształtu komórek na obrazach AFM zostały zaobserwowane dla inkubacji 1h z $\text{TNF-}\alpha$.



Rycina 5.1. Obrazy AFM topografii komórek ($30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$): kontrolnej (A) oraz inkubowanych z $\text{TNF-}\alpha$ odpowiednio przez 1, 3, 6, 12 i 24h (B-F).

Na Rycinie 5.2A zaprezentowano średnie wartości objętości V oraz pola powierzchni S części centralnych komórek. Zauważono wyraźne zmniejszenie obu parametrów dla czasu inkubacji 1h, co świadczy o obkurczeniu komórek w porównaniu z komórkami referencyjnymi. Wraz z wydłużaniem czasu inkubacji zaobserwowano niewielkie fluktuacje

mierzonych parametrów morfologii (S, V). Rycina 5.2B ilustruje średnie wartości wydłużenia i wysokości części centralnych komórek. Wartość wydłużenia dla komórek referencyjnych wynosi powyżej 3, natomiast dla komórek z cytokiną około 2.5, co dodatkowo potwierdza zmianę kształtu części centralnej komórek po zadziałaniu TNF- α . Z drugiej strony, TNF- α powoduje zwiększenie wysokości części centralnej komórek (Rycina 5.2B), największe dla czasu inkubacji 12h, co prawdopodobnie związane jest ze zwiększeniem cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek [10]. Prezentowane wyniki parametrów morfologii wskazują na największe zmiany morfologiczne komórek dla najkrótszego czasu inkubacji (1h) z cytokiną TNF- α .

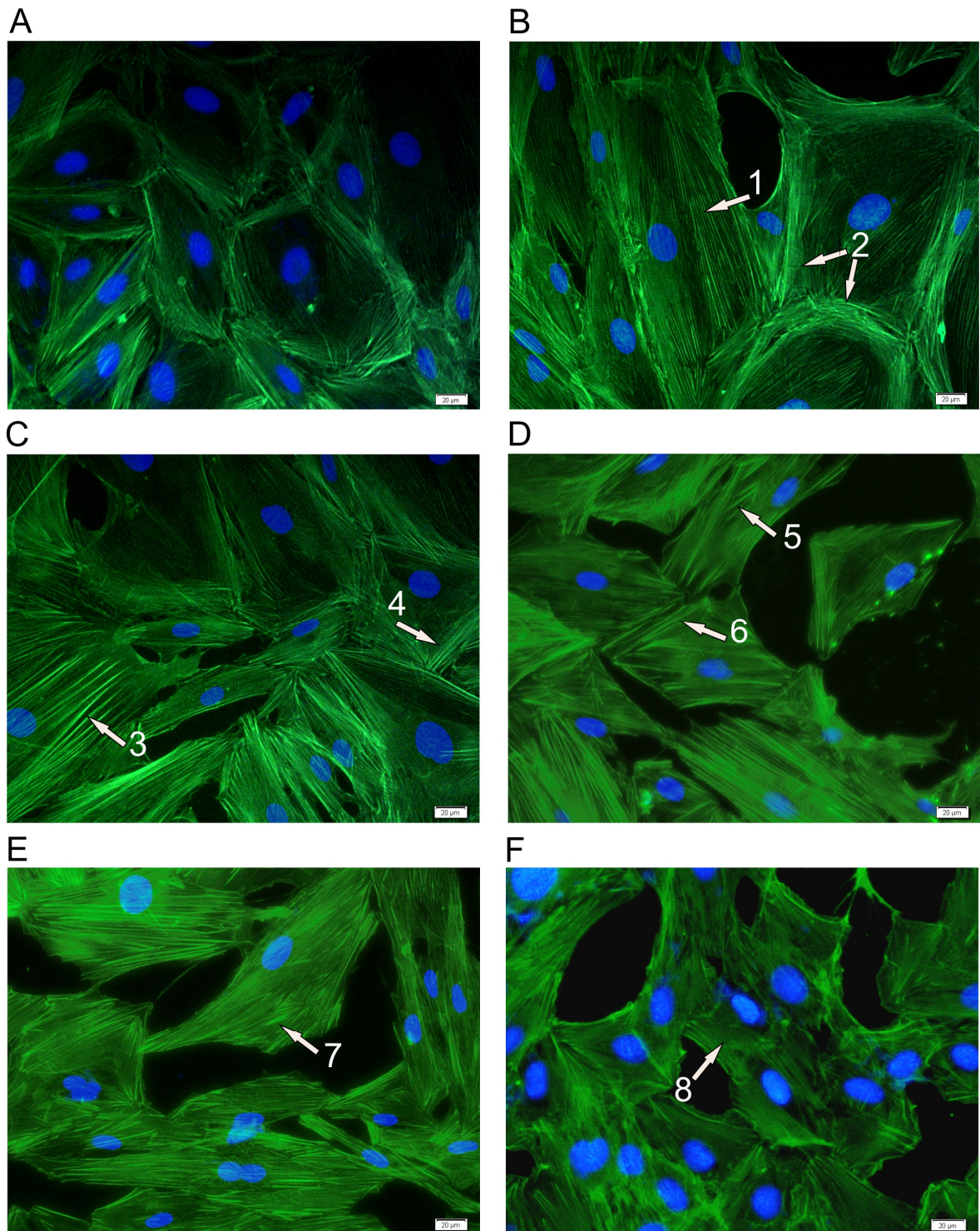


Rycina 5.2. Wartości pola powierzchni i objętości części centralnych komórek (A) oraz wydłużenia i wysokości komórek (B) po dodaniu cytokiny prozapalnej na ustalone czasy inkubacji (średnia arytmetyczna \pm SD).

5.2 Mikroskopia fluorescencyjna

Tak jak opisano w podrozdziale 3.1 mikrofilamenty zbudowane są z dwóch form aktyny: G-aktyny (globularnej) oraz F-aktyny (włókienkowej). Ponieważ F-aktyna jest strukturą cytoszkieletu odpowiadającą za kształt oraz właściwości mechaniczne komórek, znakowanie tej struktury stanowi potwierdzenie pomiarów morfologii oraz elastyczności. Dodatkowo F-aktyna wpływa na migrację komórek, regulację przepuszczalności monowarstwy śródbłonka a także pełni funkcje barierowe [60].

Na Rycinie 5.3 zaprezentowano obrazy mikroskopii fluorescencyjnej znakowanej F-aktyny cytoszkieletu komórkowego (obszar zielony) oraz jąder komórkowych (obszar niebieski) dla różnych czasów inkubacji komórek z TNF- α .



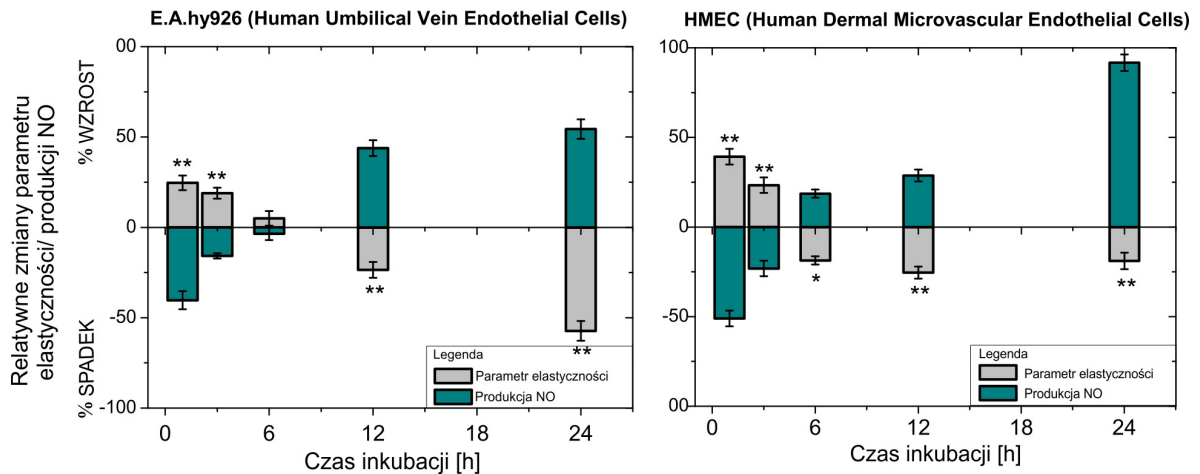
Rycina 5.3. Obrazy fluorescencyjne znakowanej F-aktyny cytoszkieletu komórkowego dla komórek referencyjnych (A) oraz inkubowanych z TNF- α przez 1, 3, 6, 12 i 24h (B-F). Strzałki 1 i 3 prezentują pogrubione włókna F-aktyny układające się wzdłuż głównej osi komórki, natomiast strzałki 2 i 4 pogrubienie włókien na brzegach komórek. Na obrazach D-F widoczna depolimeryzacja włókien, gdzie zaznaczono pojedyncze, skrócone włókna F-aktyny - strzałki 5-7 oraz całkowitą depolimeryzację - strzałka 8. Skala: 20 μ m.

Na obrazach fluorescencyjnych można zauważyć wyraźne zmiany ułożenia oraz gęstości włókien F-aktyny komórek po dodaniu cytokiny prozapalnej. Komórki referencyjne (Rycina 5.3A) ułożone są cegiełkowo, a F-aktyna zlokalizowana jest w częściach peryferyjnych. Dla czasu inkubacji 1h oraz 3h widoczne są pogrubione włókna przebiegające wzdłuż głównej osi komórek tzw. „włókna naprężeniowe” (Rycina 5.3B i C, strzałki 1 i 3) oraz w częściach peryferyjnych (Rycina 5.3B i C, strzałki 2 i 4). Sześciogodzinna inkubacja z TNF- α powoduje skrócenie włókien F-aktyny i jej nieregularne ułożenie (Rycina 5.3D, strzałki 5 i 6). Natomiast w przypadku dłuższych czasów inkubacji 12 oraz 24h obserwowana jest depolimeryzacja włókien aktynowych (Rycina 5.3E i F, strzałki 7 i 8). Dodatkowo w przypadku komórek inkubowanych z TNF- α dla wszystkich czasów inkubacji zaobserwowano charakterystyczne „dziury” międzykomórkowe (brak cegiełkowego ułożenia), świadczące o odczynie zapalnym komórek [60].

Podsumowując, TNF- α aplikowany w stężeniu 10ng/ml powoduje dwustopniowe przegrupowanie włókien cytoszkieletu – początkowo, dla krótszych czasów inkubacji (1 i 3h) obserwowana jest silna polimeryzacja powodująca zgrubienie włókien F-aktyny, natomiast w przypadku dłuższej inkubacji następuje depolimeryzacja prowadząc do zwiększenia ilości G-aktyny w komórkach.

5.3 Dwustopniowa zmiana elastyczności komórek śródbłonka po stymulacji TNF- α

Metodą określającą zmiany stymulowanych komórek TNF- α w stężeniu 10ng/ml jest spektroskopia sił. Badanie właściwości mechanicznych komórek śródbłonka umożliwiło pełniejszą charakteryzację wpływu cytokiny prozapalnej. W załączniku (Rycina Z.1) przedstawiono histogramy rozkładu parametru elastyczności komórek dla poszczególnych czasów inkubacji wraz z wartościami median z dopasowania log-normal. Korzystając ze wzoru (3.9) podrozdziału 3.4 obliczono relatywne zmiany parametru elastyczności dla ustalonych czasów inkubacji, które zaprezentowano na Rycinie 5.4 (szary kolor) dla dwóch linii komórkowych: HMEC - komórki śródbłonka ludzkiego mikronaczyń (Rycina 5.4A) oraz EA.hy926 - ludzkie komórki śródbłonka z żyły pępowinowej (Rycina 5.4B). Dodatkowo, na Rycinie 5.4 zaznaczono relatywne zmiany produkcji NO dla obu linii komórkowych (kolor niebieski).



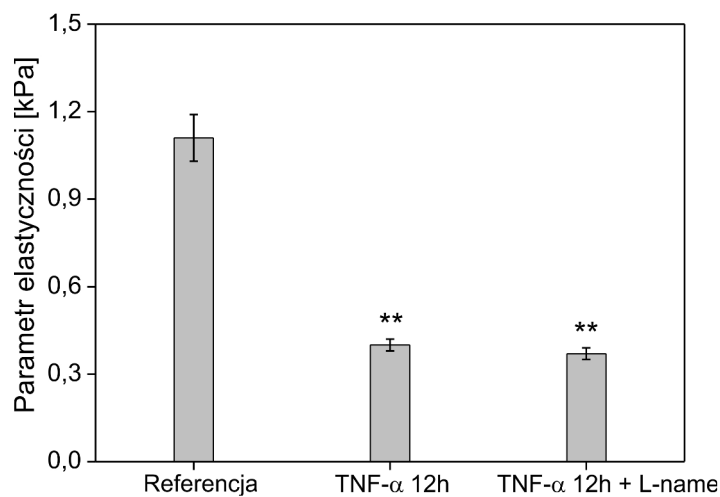
Rycina 5.4. Relatywne zmiany parametru elastyczności oraz produkcji NO dla linii komórkowej EA.hy926 (A) oraz HMEC (B) dla inkubacji z TNF- α przez 1, 3, 6, 12 i 24h. () $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$.**

Zamieszczone wykresy prezentują dwustopniowe zmiany parametru elastyczności oraz produkcji NO dla obu linii komórkowych. Najpierw, dla krótkich czasów inkubacji (1 i 3h), zaobserwowano wzrost parametru elastyczności (zmniejszenie elastyczności) czemu towarzyszy silne zmniejszenie produkcji NO w porównaniu z komórkami referencyjnymi. Sześciogodzinną inkubację można traktować jako „inkubację przejściową”, gdzie dla komórek linii HMEC zaobserwowano zmniejszenie parametru elastyczności i wzrost poziomu NO, natomiast dla linii komórkowej EA.hy926 brak zmian w porównaniu z poziomem odniesienia. Nadprodukcja tlenu azotu oraz zmniejszenie parametru elastyczności utrzymuje się dla czasów inkubacji 12 i 24h w przypadku obu linii komórkowych. Prezentowane wyniki pokazują anty-korelację pomiędzy zmianami parametru elastyczności komórek oraz produkcją NO, co zauważone zostało przez grupy badawcze dla innych czynników wywołujących dysfunkcję śródbłonka [81]. Badanie elastyczności jest pomiarem potwierdzającym przegrupowanie włókien cytoszkieletu części korowej komórek. Zmniejszenie parametru elastyczności (dla dłuższych czasów inkubacji z TNF- α) jest odpowiedzią na procesy depolimeryzacji w komórkach, a zatem związane jest ze zwiększeniem ilości G-aktyny. Skutkuje to zwiększeniem miejsc wiążących dla śródbłonkowych syntaz tlenu azotu, a także zwiększonym transportem L-argininy do syntezy NO [82].

5.4 Zależność pomiędzy parametrem elastyczności a produkcją NO

W celu rozwinięcia zagadnienia anty-korelacji parametru elastyczności z poziomem tlenu azotu zostały przeprowadzone dodatkowe badania, które posłużyły do odpowiedzi na pytanie: czy chemiczne blokowanie syntaz NO będzie wpływało na elastyczność komórek? W pracy [81] pokazano, że blokowanie aktywności syntaz NO można uzyskać poprzez aplikację estru metyloвого N^G-nitro- L-argininy (L-NAME) o stężeniu 100nM na 1h.

Bazując na wynikach otrzymanych w podrozdziale 5.3 (Rycina 5.4) blokowanie syntaz NO przeprowadzono na komórkach z TNF- α inkubowanych 12h (silna nadprodukcja tlenu azotu). Na Rycinie 5.5 zaprezentowano wartości parametru elastyczności dla komórek referencyjnych, inkubowanych z TNF- α przez 12h oraz z TNF- α przez 12h a następnie z L-NAME w stężeniu 100nM przez 1h. Aplikacja TNF- α na 12h skutkuje zmniejszeniem parametru elastyczności względem referencji. Dodatkowo, inkubacja komórek z TNF- α oraz L-NAME nie wpływa na zmianę elastyczności komórek w porównaniu z komórkami inkubowanymi tylko z czynnikiem prozapalnym (wartość zbliżona jak dla TNF- α -12h). Informacja ta potwierdza fakt, że właściwości mechaniczne dostarczają informacji o poziomie produkowanego tlenu azotu przez komórki, ale nie odwrotnie. Nie można jednoznacznie stwierdzić, czy przy zmniejszeniu/zwiększeniu NO obserwowany będzie wzrost/spadek parametru elastyczności (L-NAME poprzez blokowanie syntaz zmniejsza produkcję NO, ale nie wpływa na elastyczność komórek).



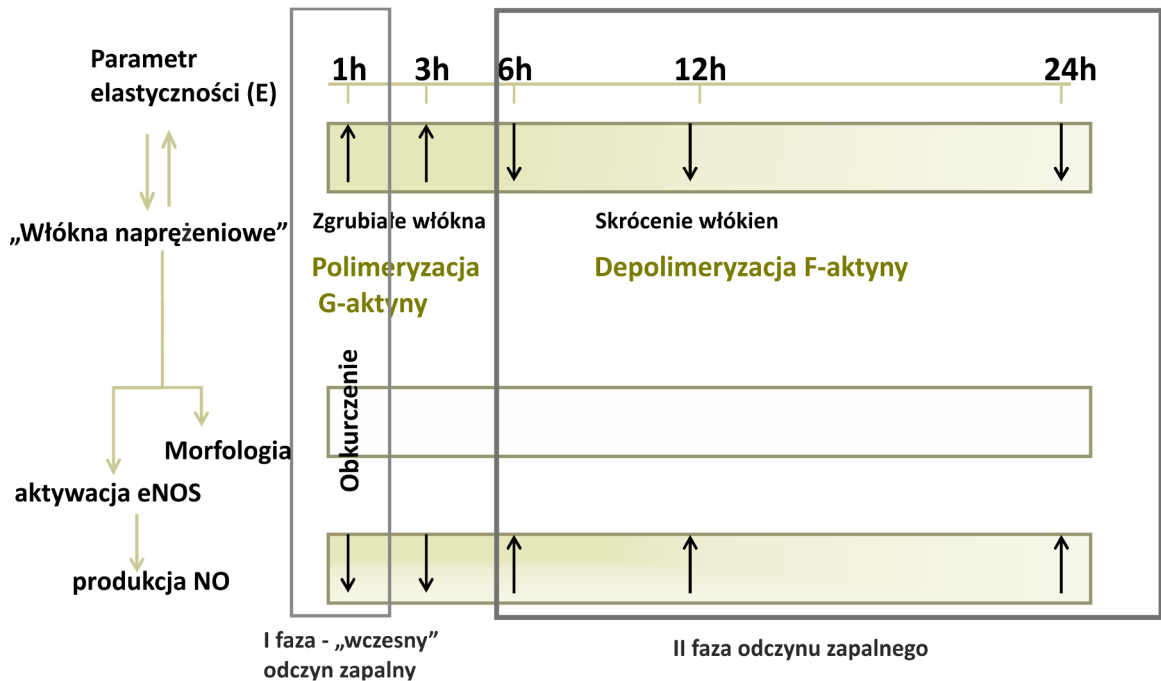
Rycina 5.5. Wartości parametru elastyczności dla komórek referencyjnych, inkubowanych z TNF- α przez 12 oraz TNF- α 12h + L-name 1h. (**) $p < 0.01$.

5.5 Odczyn zapalny po zastosowaniu TNF- α

Głównymi regulatorami organizacji cytoszkieletu są białka z rodziny Rho – molekularne „przełączniki” do regulacji procesów komórkowych. Jednym z białek tej rodziny jest Rho A, które poprzez stymulację polimeryzacji G-aktyny wpływa na powstanie „włókien naprężeniowych” [83]. Pojawienie się „włókien naprężeniowych” w komórkach śródbłonna skutkuje zmniejszeniem elastyczności komórek (wzrostem parametru elastyczności). Z drugiej strony obecność „włókien naprężeniowych”, czyli zwiększenie ilości F-aktyny może wpływać na zmiany morfologii komórek (związane z kształtem, wydłużeniem, polem powierzchni czy objętością komórek) a także na zmniejszenie aktywności śródbłonkowych

syntaz NO [82]. Dodatkowo, zmniejszony poziom tlenu azotu może aktywować produkcję reaktywnych form tlenowych w komórkach [4]. Natomiast depolimeryzacja włókien aktywnych zwiększa ilość miejsc wiążących dla syntaz NO. Syntazy te zlokalizowane są głównie w aparatach Golgiego, a także w kaweolach - strukturach białkowo-lipidowych oddziałujących z G-aktyną cytoszkieletu [82]. Połączenie eNOS z G-aktyną nie tylko umożliwia aktywację samych syntaz, ale również stabilizuje kompleks kierujący dostawą substratu (L-argininy) do optymalnego wytwarzania NO.

Na Rycinie 5.6 zaprezentowano schematyczne połączenie zmierzonych parametrów po stymulacji cytokiną prozapalną.



Rycina 5.6. Schemat przedstawiający zależności pomiędzy zmierzonymi parametrami. Podsumowanie działania TNF- α dla stężenia 10ng/ml i ustalonych czasach inkubacji.

Dla krótkich czasów inkubacji TNF- α (1 i 3h) zaobserwowano zmniejszenie elastyczności komórek, czemu towarzyszy powstawanie „włókien naprężeniowych” (poprzez procesy polimeryzacji G-aktyny) oraz zmniejszenie produkcji tlenu azotu. Otrzymane wyniki są zgodne z obserwacją, że TNF- α aplikowany w stężeniu 20ng/ml na 4h powoduje zwiększenie kinaz lekkich łańcuchów miozyny (MLCK) [60]. Fosforylacja lekkich łańcuchów miozyny jest wywoływana poprzez działanie białek Rho i może stymulować interakcję aktyny z miozyną [84], a tym samym wywoływać polimeryzację G-aktyny.

Dla dłuższych czasów inkubacji 6, 12 oraz 24h uzyskano zmniejszenie parametru elastyczności, co zostało potwierdzone zaobserwowaną depolimeryzacją F-aktyny na obrazach fluorescencyjnych oraz zwiększeniem produkcji NO. Jednogodzinna stymulacja komórek śródbłonka cytokiną TNF- α powoduje zamianę kształtu komórek z wrzecionowego

na sferyczny. Z przedstawionego schematu wynika, że wpływ TNF- α można podzielić na dwie fazy: I-wczesna dla krótkich czasów inkubacji oraz II (powyżej 6h), gdzie komórki produkują nadmiar NO, co prawdopodobnie związane jest z uruchomieniem indukowanej syntazy tlenu azotu i może prowadzić do ich apoptozy. Podsumowując, aplikowanie TNF- α na 1h daje najsilniejszy odczyn zapalny i przypadek ten w niniejszej pracy doktorskiej został zdefiniowany jako model wczesnej dysfunkcji śródbłonka *in vitro*.

5.6 Wnioski

W niniejszym rozdziale zaprezentowano zastosowanie głównej metody badawczej spektroskopii sił do charakterystyki odczynu zapalnego komórek śródbłonka. Odczyn ten uzyskano poprzez aplikację cytokiny prozapalnej TNF- α w stężeniu 10ng/ml, na ustalone czasy inkubacji 1, 3, 6, 12 oraz 24h. Uzyskane wyniki pomiaru elastyczności potwierdzono dodatkowymi metodami: mikroskopią fluorescencyjną i znakowaniem F-aktyny cytoszkieletu komórkowego oraz pomiarem wydzielanego tlenu azotu.

Warto podkreślić, że otrzymano anty-korelację pomiędzy parametrem elastyczności a produkcją NO przez komórki śródbłonka. Związana jest ona z aktywacją śródbłonkowych syntaz NO poprzez zwiększenie miejsc wiążących (zwiększenie G-aktyny w komórkach), co z kolei skutkuje zmniejszeniem parametru elastyczności komórek.

Wyniki otrzymane dla dwóch linii komórek śródbłonka: HMEC – mikronaczyń oraz EA.hy926 pozyskiwanych z żyły pępowinowej, wskazują na dwuetapowy odczyn zapalny komórek śródbłonka inkubowanych z cytokiną prozapalną TNF- α . Dla krótkich czasów inkubacji obserwowane jest zwiększenie sztywności komórek i spadek produkcji NO, dla dłuższych czasów odwrotnie.

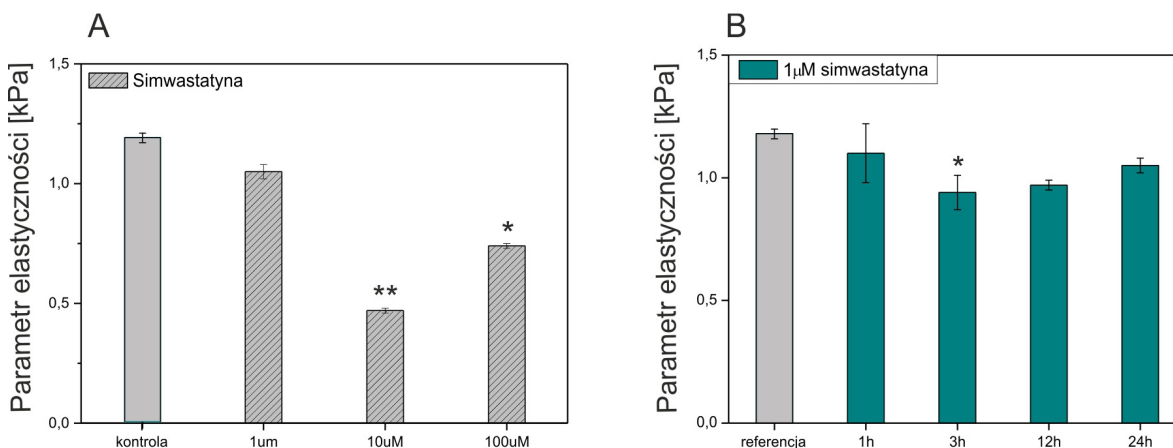
Największe zmiany fenotypu komórek śródbłonka zostały zaobserwowane dla 1h inkubacji z TNF- α , co zostanie wykorzystane w dalszej pracy eksperymentalnej jako model dysfunkcji śródbłonka *in vitro*.

Rozdział 6. „Leczenie” simwastatyną *in vitro*

W prezentowanym rozdziale przedstawione zostaną wyniki badania wpływu simwastatyny na komórki śródbłonna w zakresie stężeń: odpowiadającemu terapeutycznemu *in vivo* - $1\mu\text{M}$ oraz dla stężeń wyższych: 10 oraz $100\mu\text{M}$. Dodatkowo, dla stężenia $1\mu\text{M}$ oraz $0.1\mu\text{M}$ zostanie zbadane przeciwzapalne działanie tego związku *in vitro* na modelu wczesnej dysfunkcji opisanym w rozdziale 5. Jako że simwastatyna jest powszechnie stosowanym farmaceutykiem do normalizacji stężenia lipidów we krwi, ale także jako uzupełnienie leczenia w przypadku miażdżycy naczyń serca i cukrzycy, zaprezentowane wyniki stanowią punkt odniesienia do badań potencjalnych czynników śródbłonkowych *in vitro*.

6.1 Weryfikacja stężenia simwastatyny

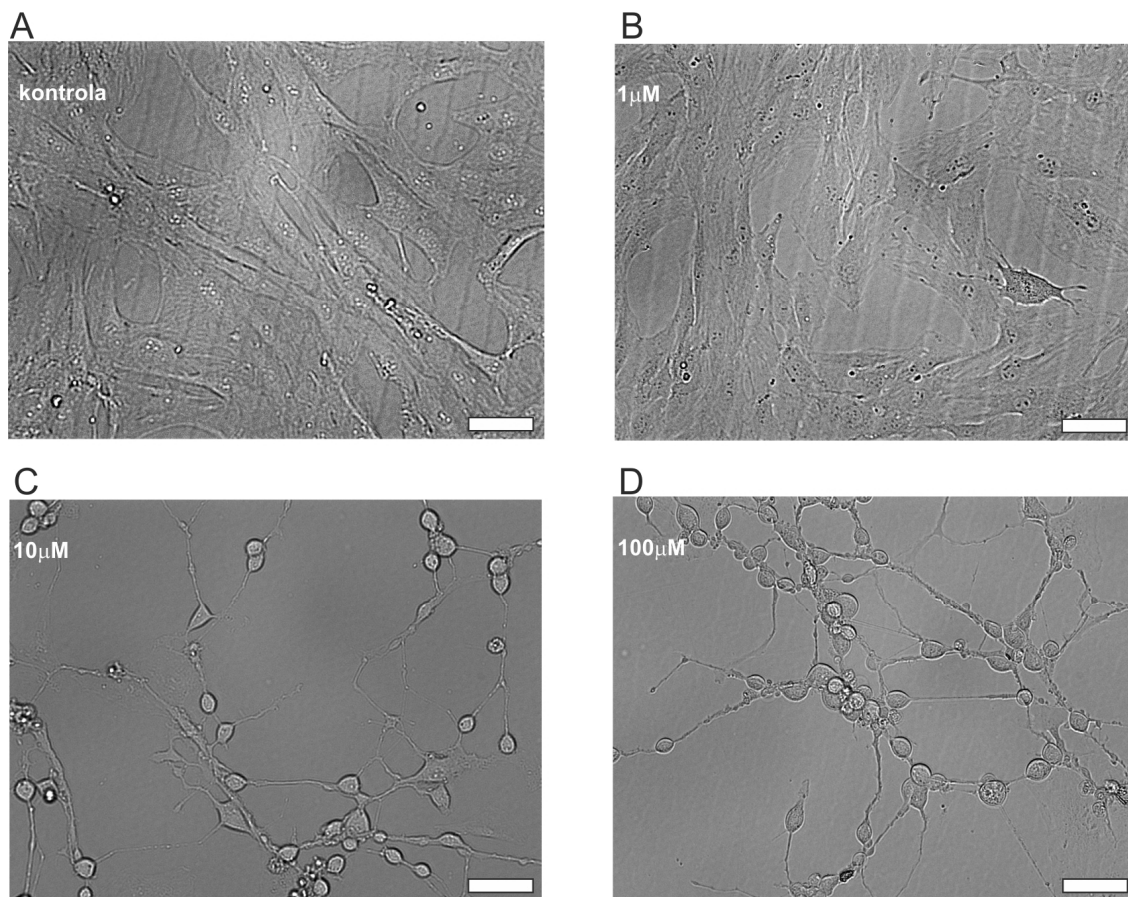
Weryfikację fizjologicznego stężenia simwastatyny przeprowadzono na komórkach śródbłonna ludzkiego mikronaczyń dla czasu inkubacji 24h oraz stężeń: $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ i $100\mu\text{M}$. Na Rycinie 6.1A zaprezentowano wartości parametru elastyczności dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z lekiem. Na Rycinach Z.2 oraz Z.3 załącznika zamieszczono rozkłady parametrów elastyczności komórek odpowiadające punktom pomiarowym odpowiednio z Ryciny 6.1A oraz B.



Rycina 6.1. Wartości parametru elastyczności dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z simwastatyną ($1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$) dla 24h (A) oraz inkubowanych z simwastatyną ($1\mu\text{M}$) dla różnych czasów inkubacji (B). (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$.

Bazując na wynikach zamieszczonych na Rycinie 6.1A można stwierdzić, że działanie wybranej statyny ma charakter dawko-zależny. Dla najniższego wybranego stężenia *in vitro* ($1\mu\text{M}$) występuje zmniejszenie parametru elastyczności o około 7% wartości referencji,

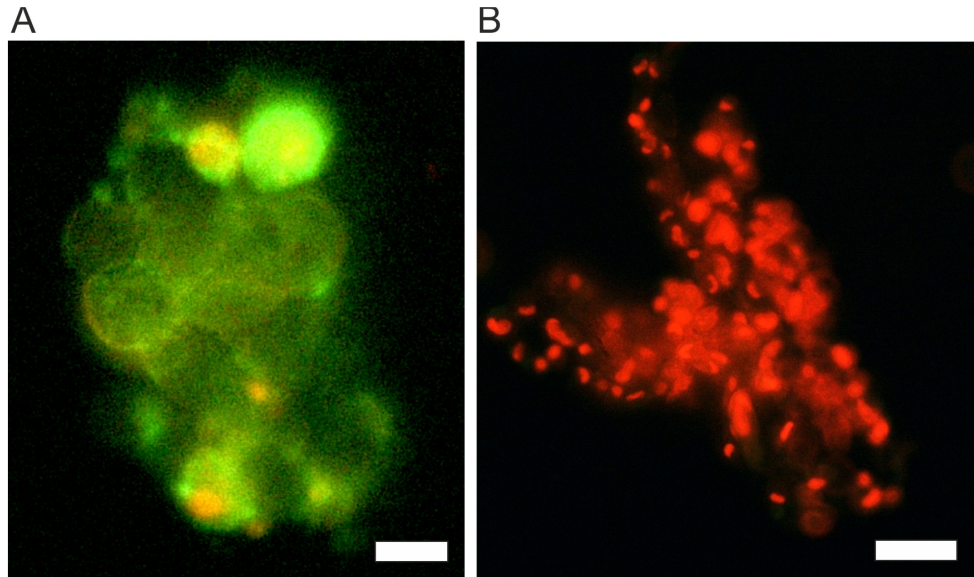
natomiast dla wyższych stężeń $10\mu\text{M}$ i $100\mu\text{M}$ zaobserwowano spadek parametru elastyczności odpowiednio o około 60% i 40%. Należy zwrócić uwagę na wyższą wartość parametru elastyczności dla najwyższego stężenia ($100\mu\text{M}$) w porównaniu z $10\mu\text{M}$. Na Rycinie 6.2 przedstawiono obrazy optyczne komórek, które odpowiadają punktom eksperymentalnym do Ryciny 6.1.



Rycina 6.2. Obrazy optyczne komórek śródbłónka: referencyjnych (A) oraz inkubowanych z simwastatyną w dawkach $1\mu\text{M}$ (B), $10\mu\text{M}$ (C) oraz $100\mu\text{M}$ (D). Skala: $50\mu\text{m}$.

Na obrazach optycznych można zauważyć zmiany morfologii oraz rozmieszczenia komórek inkubowanych z simwastatyną dla wyższych stężeń. Komórki referencyjne oraz inkubowane w najniższym badanym stężeniu simwastatyny tworzą monowarstwę. Dla stężeń $10\mu\text{M}$ oraz $100\mu\text{M}$ komórki przybierają kształt kulisty, tworzą skupiska i ich gęstość jest znacznie mniejsza w porównaniu z referencją. Ponieważ zaobserwowane zmiany na obrazach mikroskopii optycznej wskazują na apoptozę oraz nekrozę komórek, przypuszczenia te zostały potwierdzone wybarwianiem fluorescencyjnym aneksyną V oraz jodkiem propidyny. Obrazy fluorescencyjne przedstawiono na Rycinie 6.3. Dla komórek inkubowanych z simwastatyną w stężeniu $1\mu\text{M}$ nie zaobserwowano emisji światła fluorescencyjnego. Dla komórek z lekiem w stężeniu $10\mu\text{M}$ zaobserwowano zieloną fluorescencję, są one obkurczone i występuje kondensacja chromatyny, co świadczy o apoptozie komórek [85].

Dla najwyższego stężenia obserwowana jest głównie czerwona fluorescencja informująca o „późnej” fazie apoptozy bądź nekrozie komórkowej. Nekroza komórkowa jest skutkiem zbyt dużego nasilenia czynnika (w przypadku simwastatyny $100\mu\text{M}$), gdzie w komórkach nie zostały zainicjowane procesy naprawcze ani kaskady zjawisk charakterystycznych dla apoptozy [85].



Rycina 6.3. Obrazy fluorescencyjne komórki śródbłonka inkubowanych z simwastatyną w dawce $10\mu\text{M}$ (A) oraz $100\mu\text{M}$ (B) znakowanych aneksyną V (zielona fluorescencja) oraz jodkiem propidyny (czerwona fluorescencja). Skala dla A: $10\mu\text{m}$, B: $50\mu\text{m}$.

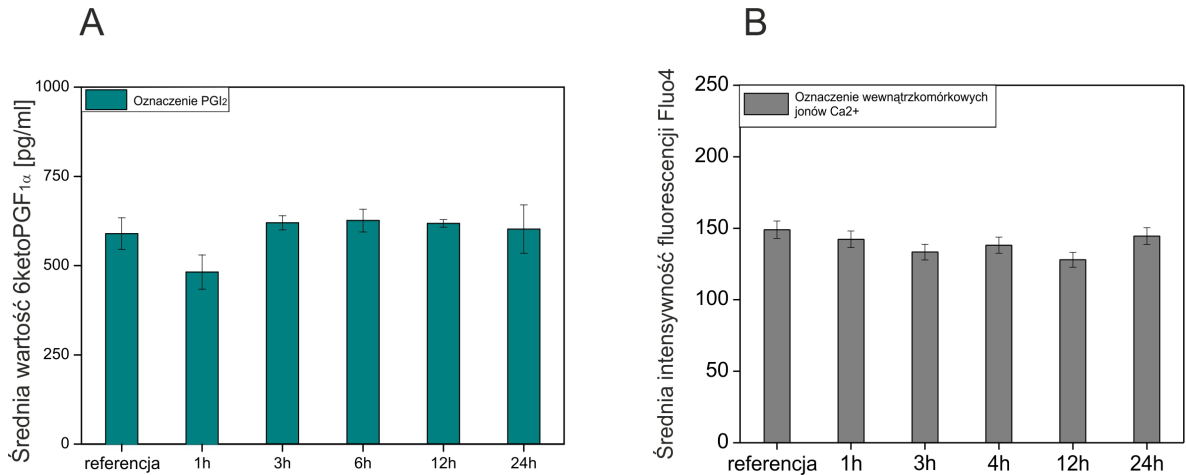
Otrzymane wyniki znakowania fluorescencyjnego korelują z wartościami parametru elastyczności zaprezentowanymi na Rycinie 6.1A. Dla stężenia $10\mu\text{M}$ zaobserwowano apoptozę komórek, co skutkuje silną depolimeryzacją F-aktyny a tym samym zwiększeniem elastyczności komórek (spadek parametru elastyczności względem referencji) [86]. Z drugiej strony, dla wyższego stężenia zaobserwowano „późne” stadium apoptozy lub nekrozę komórek, co koreluje z niewielkim zwiększeniem parametru elastyczności względem komórek inkubowanych z lekiem w stężeniu $10\mu\text{M}$. Otrzymane wyniki są zgodne z doniesieniami literaturowymi na temat wpływu simwastatyny na inne linie komórek śródbłonka. Simwastatyna w stężeniu $2\mu\text{M}$ nie inicjuje proapoptotycznych sygnałów w komórkach szczurzych tętnicy płucnej mięśni gładkich [87], natomiast $100\mu\text{M}$ dawka tego leku indukuje apoptozę w komórkach szczurzych aorty piersiowej mięśni gładkich [88]. Podobny efekt simwastatyny uzyskano również w przypadku komórek nowotworowych. Cho i wsp. [89] pokazali, że $10\mu\text{M}$ simwastatyna indukuje „wczesną” fazę apoptozy na komórkach ludzkich raka okrężnicy, natomiast $50\mu\text{M}$ „późną” fazę apoptozy bądź nekrozę.

Podsumowując, spektroskopia sił, mikroskopia optyczna oraz fluorescencyjna posłużyły do weryfikacji fizjologicznego stężenia simwastatyny, tzn. takiego przy którym zaobserwowane są najmniejsze zmiany fenotypu komórek. Najmniejsze zmiany morfologii

i elastyczności komórek uzyskano dla stężenia $1\mu\text{M}$, wobec czego badania elastyczności zostały kontynuowane dla tego właśnie stężenia oraz krótszych czasów inkubacji (1, 3 i 12h). Na Rycinie 6.1B zaprezentowano wartości parametru elastyczności dla komórek poddanych działaniu leku dla pozostałych czasów inkubacji. Dla 1h otrzymana wartość parametru elastyczności jest zbliżona do wartości referencji (różnice nieistotne statystycznie na poziomie istotności $p=0.05$). Wydłużenie czasu inkubacji do 3h skutkuje istotnym statystycznie zmniejszeniem parametru elastyczności o około 15% wartości referencji. Kontynuując, dla 12 i 24h inkubacji następuje zwiększenie parametru elastyczności względem 3h inkubacji (zależność potwierdzona testem Tukey'a przeprowadzonym między grupami 3h i 12h oraz 3h i 24h na poziomie istotności $p=0.05$). Zmniejszenie parametru elastyczności w przypadku komórek inkubowanych z simwastatyną przez 3h w dawce $1\mu\text{M}$ jest prawdopodobnie związane z wewnątrzkomórkowym mechanizmem produkcji tlenu azotu przez śródbłonek pod wpływem tego leku. Simwastatyna hamuje izopropylację Rho, który jest negatywnym regulatorem ekspresji syntaz NO [90]. W konsekwencji reguluje ona produkcję tlenu azotu przez komórki śródbłonka, co związane jest również z powstawaniem miejsc wiążących śródbłonkowych syntaz NO (depolimeryzacja F-aktyny). Przebudowa cytoszkieletu komórkowego, a dokładnie zwiększenie G-aktyny skutkuje zwiększeniem elastyczności komórek [62], czyli zmniejszeniem wartości parametru elastyczności, który również zaobserwowano w przypadku aplikacji simwastatyny w stężeniu $1\mu\text{M}$ dla wybranych czasów inkubacji (Rycina 6.1B).

Tak jak zaznaczono w podrozdziale 2.1.1 jednym ze standardowych czynników śródbłonkowych decydującym o prawidłowo funkcjonującym śródbłonku jest prostacyklina. Innym parametrem przydatnym w celu wykluczenia/potwierdzenia procesów związanych z zaburzeniami cyklu komórkowego (na przykład apoptozy) jest poziom wapnia wewnątrzkomórkowego. Silne zwiększenie jonów Ca^{2+} może być spowodowane uszkodzeniem błony komórkowej, w której zlokalizowane są pompy wapniowe [91].

W celu potwierdzenia wyboru fizjologicznego stężenia simwastatyny przeprowadzono pomiary parametrów biochemicznych: oznaczanie wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} oraz pomiar wydzielanej prostacykliny (PGI_2). Na Rycinie 6.4A zaprezentowano średnie wartości zmierzonego metabolitu prostacykliny ($6\text{ketoPGF}_{1\alpha}$), natomiast na Rycinie 6.4B średnią intensywność Fluo4 dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z simwastatyną w stężeniu $1\mu\text{M}$ dla wybranych czasów inkubacji.



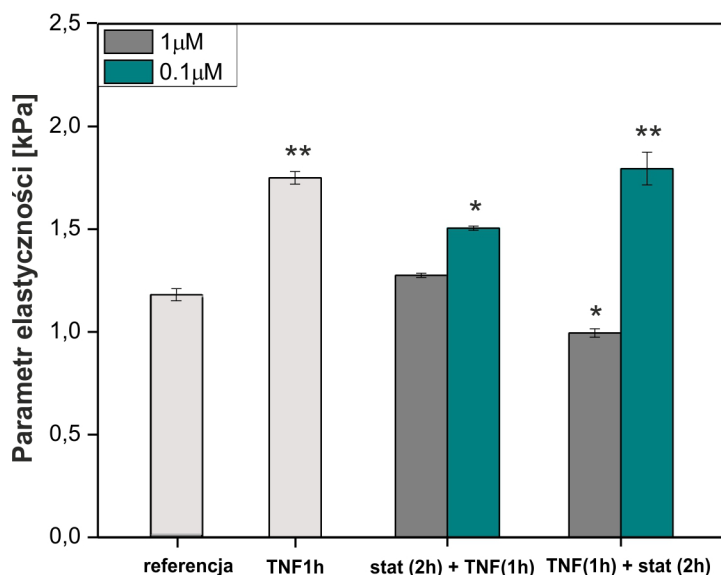
Rycina 6.4. Średnia wartość metabolitu prostacykliny (A) oraz intensywności fluorescencji Fluo4 (B) (średnia \pm SD).

Dla komórek inkubowanych z lekiem w stężeniu $1\mu\text{M}$ nie zaobserwowano zmian w ilości jonów wapnia wewnątrzkomórkowego względem referencji (średnia wartość intensywności Fluo4 oscyluje wokół poziomu odniesienia). W przypadku PGI₂ otrzymano spadek wydzielania prostacykliny (o około 15% wartości referencji) dla 1h oraz brak zmian dla dłuższych czasów inkubacji.

Bazując na wynikach spektroskopii sił (parametru elastyczności) oraz biochemicznych parametrach (Ca²⁺ oraz PGI₂) można stwierdzić, że simwastatyna w stężeniu $1\mu\text{M}$ nie powoduje zmian fenotypu komórek śródbłonna. Stąd też uzasadnione jest badanie przeciwzapalnego działania simwastatyny (w konfiguracji zdefiniowanej jako terapeutyczna oraz prewencyjna) dla tego właśnie stężenia oraz niższego $0.1\mu\text{M}$ – odpowiadającej najniższej wartości terapeutycznej *in vivo*.

6.2 Przeciwzapalne działanie simwastatyny *in vitro*

Ponieważ okres półtrwania głównego metabolitu simwastatyny *in vivo* jest w zakresie 1.5–2h, badanie przeciwzapalnego działania tego leku przeprowadzono dla czasu inkubacji 2h. W tym celu wykorzystano wcześniej opisany model dysfunkcji śródbłonna zdefiniowany jako inkubacja komórek z cytokiną prozapalną TNF- α (10ng/ml) przez 1h. Badania simwastatyny zostały przeprowadzone w konfiguracji TNF- α (1h) + statyna(2h) – weryfikacja „terapeutycznego” działania oraz statyna(2h) + TNF- α (1h) – „prewencyjnego”. Rozkłady parametrów elastyczności dla zdefiniowanych konfiguracji przedstawiono na Rycinie Z.4 załącznika. Otrzymane wartości parametru elastyczności zaprezentowano na Rycinie 6.5.



Rycina 6.5. Wartości parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z simwastatyną w dwóch konfiguracjach: terapeutycznej oraz protekcyjnej dla dwóch stężeń 1 μM (ciemny szary) oraz 0.1 μM (zaznaczono na niebiesko). Zaprezentowano również wartości parametru elastyczności otrzymane dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z cytokiną TNF-α przez 1h. (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$.

Tak jak opisano w rozdziale 5 cytokina prozapalna TNF-α aplikowana na 1h zmniejsza elastyczność komórek. Jest to związane z polimeryzacją G-aktyny w części korowej cytoszkieletu komórkowego. Aplikacja 1 μM simwastatyny z TNF-α w konfiguracji „terapeutycznej” nie powoduje zmian parametru elastyczności względem poziomu referencji. W przypadku konfiguracji „prewencyjnej” zaobserwowano spadek parametru elastyczności względem komórek z TNF-α ale również względem referencji, a otrzymana wartość parametru elastyczności jest zbliżona jak dla komórek inkubowanych tylko z simwastatyną przez 3h (Rycina 6.1B). Zmniejszenie parametru elastyczności świadczy o procesach depolimeryzacji F-aktyny, a przez to zwiększeniu produkcji tlenu azotu. Otrzymane wyniki dla 1 μM dawki simwastatyny wskazują na przeciwzapalne działanie tego związku na komórkach w odczynie zapalnym wywołanym czynnikiem martwicy nowotworów.

Z drugiej strony, niższe stężenie leku (0.1 μM) zastosowane w konfiguracji terapeutycznej skutkuje wzrostem parametru elastyczności jak w przypadku aplikacji TNF-α (brak „terapeutycznego” działania). Natomiast w konfiguracji zapobiegawczej wartość parametru elastyczności jest mniejsza niż w przypadku komórek z TNF-α (inicjacja działania przeciwzapalnego), ale otrzymana wartość jest wyższa (o około 16%) w porównaniu z wartością uzyskaną dla komórek referencyjnych, co sugeruje, że należałoby wydłużyć prewencyjny czas inkubacji dla tego stężenia. Dla dawki 0.1 μM badanego leku nie zaobserwowano przeciwzapalnego efektu na komórkach śródbłonna w odczynie zapalnym.

6.3 Mechanizmy działania statyn

6.3.1 Proapoptotyczne działanie statyn

Statyny działają wielokierunkowo na komórki śródbłonna. W niższych stężeniach (około 1 μ M) mają charakter przeciwzapalny, natomiast w wyższych wykazują działanie cytostatyczno-cytotoksyczne tzn. zatrzymują funkcjonowanie komórek lub wywołują śmierć komórkową na drodze apoptozy bądź nekrozy. Zdolność do selektywnego indukowania apoptozy (brak wywoływania apoptozy, np. w komórkach szpiku kostnego) decyduje o ich przydatności w terapii chorób nowotworowych. Biosynteza cholesterolu oraz produktów pośrednich (związków izoprenoidowych) obejmuje szlak mewalonowy. W komórkach nowotworowych występuje wzrost stężenia mewalonianu (jednego z substratów do szlaku mewalonowego), a tym samym związków steroidowych. Sprzyja to intensywnej proliferacji komórek, powstawaniu fenotypu inwazyjnego i rozwoju lekooporności, co zmniejsza skuteczność tradycyjnych leków przeciwnowotworowych [92-95]. Statyny aplikowane w wyższych stężeniach obniżają poziom cholesterolu, a zatem obniżają stężenie kwasu mewalonianego, co potwierdza ich potencjał w terapii przeciwnowotworowej.

W ostatnich latach powstało wiele prac przedstawiających proapoptotyczne mechanizmy działania statyn. Zestawienie danych literaturowych zamieszczono w Tabeli 4. Zróżnicowane mechanizmy prowadzące do zaprogramowanej śmierci komórkowej związane są z możliwością indukowania dwóch rodzajów szlaków apoptotycznych tzw. „zewnątrznego” (zależnego od receptorów śmierci) bądź „wewnętrznego” (mitochondrialnego). Mitochondrialny szlak apoptotyczny indukowany jest w komórkach na skutek zwiększenia przepuszczalności błon mitochondrialnych. W efekcie zaburzona zostaje w komórkach gospodarka jonowa, potencjał elektrochemiczny oraz wewnątrzkomórkowy poziom pH. Częstym skutkiem „mitochondrialnego” szlaku apoptotycznego jest zwiększenie liczby kanałów w błonie mitochondrium, co może prowadzić do produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) powodujących tzw. stres oksydacyjny. Wewnętrzny proces apoptozy jest regulowany przez białka z rodziny Bcl-2, które ze względu na swoje umiejscowienie w komórce (cytoplazma lub błona mitochondrialna) mogą działać pro bądź antyapoptotycznie. Z drugiej strony, „zewnątrznego” szlak apoptotyczny inicjowany zostaje przez błonowe receptory śmierci (DR), które posiadają wewnątrzkomórkowe domeny śmierci (DD). DD związana z odpowiednim ligandem oraz białkami receptorowymi aktywuje kaspazę 8 (pełniącą funkcje inicjatorowe), która jest bezpośrednim aktywatorem kaspazy 3 (związaną z działaniem efektorowym w tym hydrolizą białek cytoszkieletu). W obu szlakach apoptozy śmierć komórki zachodzi na drodze kaskady kaspaz.

Statyny w odpowiednim stężeniu mają zdolność indukowania apoptozy w komórkach nowotworowych jak również w komórkach śródbłonna ludzkiego, co zaznaczone zostało w Tabeli 4.

Tabela 4. Zestawienie danych literaturowych na temat proapoptotycznych mechanizmów działania statyn.

Statyna/rodzaj komórek	Mechanizm	Autor
Simwastatyna, prawastatyna/komórki nowotworowe	Wewnętrzny szlak mitochondrialny (uwalnianie cytochromu c i drugiego aktywatora kaspaz-Apaf)	Cafforio i wsp. [30]
Lowostatyna/komórki nowotworowe	Regulacja transkrypcji i translacji genu antyapoptycznego Bcl-2.	Cafforio i wsp. [30]
Lowostatyna/komórki nowotworowe	Ekspresja proapoptotycznego białka Bax	Van de Donk i wsp. [96]
Simwastatyna/komórki nowotworowe	Generowanie apoptozy przy udziale reaktywnych form tlenu	Podhorecka i wsp. [97]
Lowostatyna/komórki nowotworowe	Obniżona ekspresja białka antyapoptycznego Mcl-1	Van de Donk i wsp. [96]
Lowostatyna/komórki nowotworowe	Ekspresję receptorów Fas/APO1 i aktywacja kaspazy 8	Sleijfer i wsp. [98]
Simwastatyna/komórki śródbłonna	Aktywacją kaspazy 3 oraz ekspresja Rac 1	Laimute i wsp. [87]
Simwastatyna/komórki śródbłonna	Indukowanie wewnętrznego szlaku mitochondrialnego zależnego od Bax	Zhu i wsp.[99]
Simwastatyna/komórki śródbłonna	Zmniejszanie ekspresji Bcl-2	Blanco-Colio i wsp.[88]
Atorwastatyna/komórki śródbłonna	Wzrost ekspresji integryny β 4 (zahamowanie wzrostu naczyń)	Feng i wsp. [100]

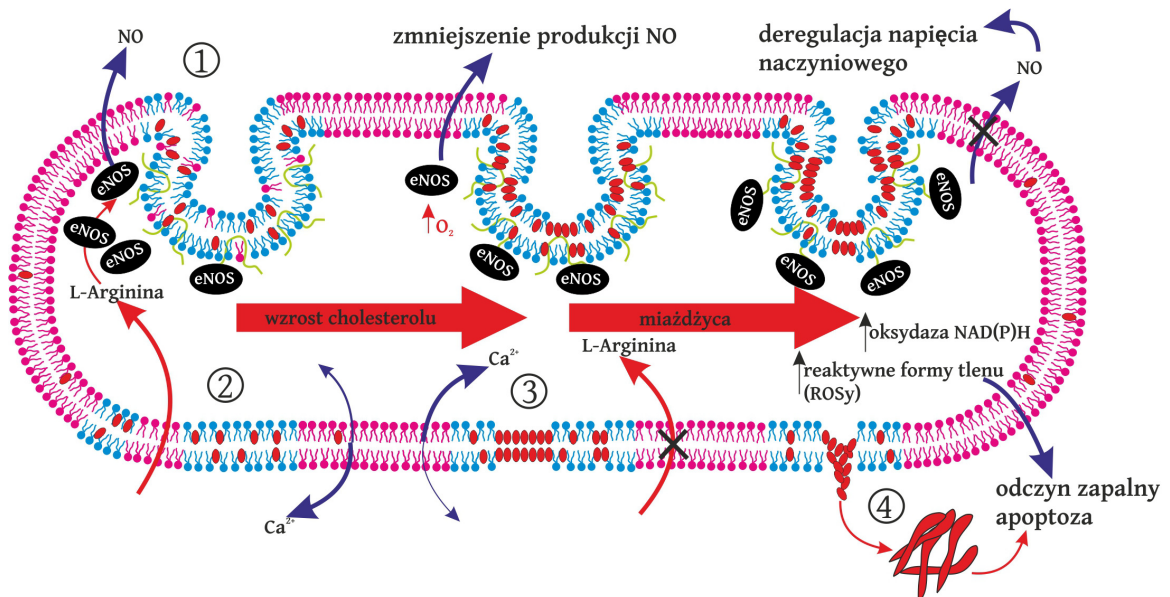
Warto tutaj podkreślić, że proapoptotyczne działanie statyn na wiele linii komórek nowotworowych ściśle koreluje ze zmianami w organizacji cytoszkieletu komórkowego. Związane jest to z destabilizacją włókien aktynowych (procesami depolimeryzacji F-aktyny), oraz zanikaniem włókien naprężeniowych. Kolejno następuje zmniejszanie się wypustek cytoplazmatycznych co wpływa na zmiany morfologiczne oraz utratę ruchliwości przez komórki [100-102].

Destabilizacja włókien aktynowych w przypadku proapoptycznego działania statyn jest zgodna z wynikami pomiaru parametru elastyczności zmierzonego za pomocą spektroskopii sił. Dla stężeń 10 μ M oraz 100 μ M simwastatyny uzyskano wyraźny spadek parametru elastyczności względem referencji, co świadczy o depolimeryzacji włókien aktynowych w części korowej cytoszkieletu komórkowego i/lub zanikaniu „włókien naprężeniowych”.

6.3.2 Przeciwwzapalne działanie statyn

Terapeutyczne działanie statyn przede wszystkim związane jest z hamowaniem przerzutowania nowotworów. Leki te obniżają syntezę endoteliny-1 (czynnika regulującego hemostazę naczyniową) oraz zmniejszają ekspresję cząsteczek przylegania komórkowego ICAM-1 i selektyny E. Obniżona liczba ICAM-1 i selektyny E zmniejsza adhezję komórek nowotworowych do śródbłonna wyściełającego naczynia krwionośne a zatem uczestniczy w blokowaniu przerzutowania nowotworu [103-105].

Przeciwwzapalne działanie statyn związane jest z redukcją odczynu zapalnego śródbłonna wywołanego zwiększoną syntezą cholesterolu. Na Rycinie 6.6 zaprezentowano schemat ilustrujący zmiany w strukturze błony komórkowej oraz funkcjonowaniu komórek wywołane zwiększonym poziomem cholesterolu, a następnie miażdżycą.



Rycina 6.6. Schemat odczynu zapalnego wywołanego zwiększonym stężeniem cholesterolu [106].

W prawidłowo funkcjonujących komórkach śródbłonna produkcja tlenku azotu (czynnika odpowiedzialnego za wazodylatację naczyń śródbłonna) zachodzi przy udziale kaweoli (zagłębień błony komórkowej – obszar 1 na Rycinie 6.6). Główną strukturą kaweoli jest białko kaweolina (struktury w kolorze zielonym na Rycinie 6.6) stanowiące tzw. „rusztowanie”, do którego może się przyłączać cholesterol [106]. Kaweolina oddziałuje na makromolekuły sygnałowe oraz białka regulujące poziom wapnia wewnątrzkomórkowego.

Substratem niezbędnym do produkcji NO jest L-arginina dostarczana bezpośrednio przez błonę komórkową, a wysyntytegowany tlenek azotu dyfunduje przez błonę komórkową, działając w ten sposób relaksująco na mięśniówkę. Dodatkowo, pompy wapniowe wypompowują jony wapnia do przestrzeni międzykomórkowej, co związane jest z utrzymaniem właściwego poziomu Ca^{2+} wewnątrz komórek.

Zwiększenie cholesterolu powoduje osadzanie się go w błonie komórkowej śródbłonna (obszar 2 na Rycinie 6.6, czerwone struktury), a także prowadzi do zwiększenia liczby kaweoli. Wzrost cholesterolu w komórkach skutkuje zwiększeniem jonów Ca^{2+} w cytozolu oraz zmniejszeniem L-argininy wewnątrz komórek. To powoduje wzbogacanie „tratw lipidowych” błony komórkowej w cholesterol oraz sfingolipidy (obszar 3 na Rycinie 6.6). Kolejno, zwiększa się zawartość reaktywnych form tlenu, spada produkcja NO i następuje przerwanie „tratw lipidowych” (obszar 4 na Rycinie 6.6), co skutkuje odczynem zapalnym komórek. W pierwszym stadium odczynu zapalnego cholesterol osadza się na komórkach śródbłonna prowadząc do powstawania blaszki miażdżycowej, a jego nasilenie może prowadzić do apoptozy komórek. W podrozdziale 2.2.1 zaznaczono, że statyny są reduktorami HMG-CoA - czynnika niezbędnego do biosyntezy cholesterolu. Regulują one biosyntezę cholesterolu, aktywację śródbłonkowych syntaz NO oraz blokują formowanie reaktywnych form tlenu [106]. Normalizacja poziomu tlenu azotu związana jest „przywracaniem” produkcji NO (aktywacja syntaz eNOS) a przez to polepszaniem funkcjonowania śródbłonna.

W pracy [90] został omówiony wpływ statyn na produkcję tlenu azotu w powiązaniu z ekspresją białka Rho („negatywnego” regulatora ekspresji eNOs). Statyny blokują ekspresję białka Rho A, który stymuluje polimeryzację G-aktyny, co potwierdza ich udział w regulowaniu śródbłonkowych syntaz tlenu azotu.

Obserwowane zmniejszenie parametru elastyczności dla komórek z simwastatyną + TNF- α oraz w konfiguracji odwrotnej względem komórek pobudzonych cytokiną TNF- α świadczy o przeciwzapalnym działaniu tego czynnika prawdopodobnie związanym z aktywacją śródbłonkowych syntaz tlenu azotu. Zmniejszenie parametru elastyczności po zadziałaniu statyn (do poziomu referencyjnego) świadczy o procesach depolimeryzacji włókien F-aktyny, a zatem skutkuje zwiększeniem ilości monomerycznej aktyny w komórkach. To powoduje zwiększenie miejsc wiążących do syntaz eNOS, a tym samym regulację wazoaktywnego czynnika - tlenu azotu.

6.4 Wnioski

W niniejszym rozdziale zaprezentowano charakterystykę wpływu simwastatyny na komórki śródbłonka dla stężeń $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ oraz $100\mu\text{M}$. Simwastatyna jest powszechnie stosowanym terapeutycznym i może działać wielopłaszczyznowo na komórki śródbłonka. Bazując na wynikach uzyskanych za pomocą spektroskopii sił oraz mikroskopii optycznej i fluorescencyjnej można stwierdzić, że dla stężeń $10\mu\text{M}$ oraz $100\mu\text{M}$ lek ten powoduje uwalnianie procesów zaprogramowanej śmierci komórkowej bądź całkowitego rozpadu komórek (nekrozy). Zdolność do indukowania apoptozy w komórkach pod wpływem statyn jest szeroko testowana w hamowaniu nowotworów. Plejotropowe działanie statyn, mniejsza toksyczność niż w przypadku standardowych leków przeciwnowotworowych stanowi o ich wysokim potencjale w terapiach nowotworowych [107,108].

Dokładna analiza wpływu simwastatyny w stężeniu $1\mu\text{M}$ (badanie elastyczności dla pozostałych czasów inkubacji, pomiar prostacykliny oraz wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+}) pozwoliła na wybranie tego stężenia do weryfikacji terapeutycznego oraz protekcyjnego działania leku *in vitro* na modelu odczynu zapalnego wywołanego $\text{TNF-}\alpha$.

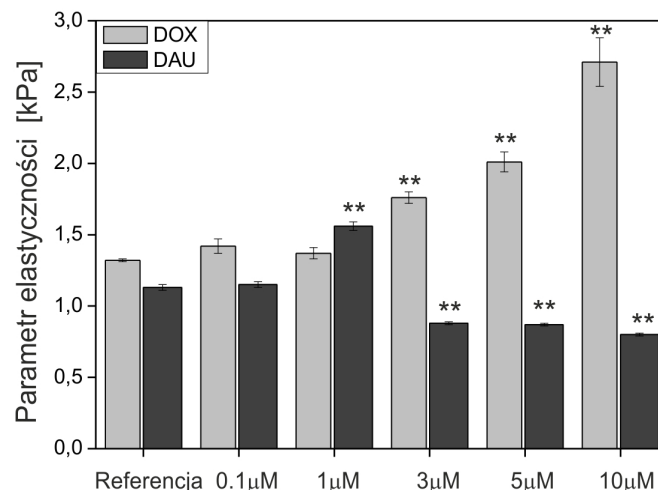
Uzyskane wyniki stanowią prezentację metodyki do diagnostyki śródbłonka *in vitro*. Prezentowany model diagnostyki komórek śródbłonka obejmuje weryfikację właściwego - „fizjologicznego” stężenia badanego związku tzn. takiego, przy którym nie obserwuje się zmian fenotypu komórek (brak zmian elastyczności komórek, dodatkowo potwierdzone metodami biochemicznymi). Diagnostyka komórek śródbłonka dokonana została w dwóch konfiguracjach: „terapeutycznej” (badanie wpływu simwastatyny na komórki w odczynie zapalnym) oraz „prewencyjnej” (zapobiegawcza aplikacja simwastatyny, a następnie aplikacja $\text{TNF-}\alpha$ w celu wywołania odczynu zapalnego). Dla $1\mu\text{M}$ stężenia simwastatyny aplikowanej na 2h uzyskano efekt przeciwwzapalny na komórkach mikronaczyń śródbłonka ludzkiego.

Rozdział 7. Porównanie działania doksorubicyny i daunorubicyny

W prezentowanym rozdziale przedstawiono porównanie wpływu doksorubicyny (DOX) i daunorubicyny (DAU) na komórki śródbłonna w zakresie stężeń 0.1–10 μ M. Czynniki te posiadają szerokie zastosowanie w chemioterapii, działają cytostatycznie bądź cytotoksycznie na komórki nowotworowe. Z drugiej strony, oba czynniki wykazują również działanie kardiotoksyczne. Celem niniejszych badań jest sprawdzenie zakresu toksyczności tych antybiotyków na śródbłonek. Badania elastyczności komórek z DOX i DAU zostały uzupełnione o wybarwienie F-aktyny cytoszkieletu komórek linii EA.hy926.

7.1 Elastyczność komórek po zastosowaniu DOX i DAU potwierdzona mikroskopią fluorescencyjną

W celu porównania wpływu doksorubicyny (DOX) oraz daunorubicyny (DAU) na elastyczność komórek aplikowano wymienione antybiotyki na 24h w stężeniach 0.1, 1, 3, 5 i 10 μ M. Badania przeprowadzono na komórkach endotelialnych pozyskanych z żyły pępowinowej linii EA.hy926. Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z doksorubicyną i daunorubicyną w wybranych dawkach zaprezentowano na Rycinach Z.5 oraz Z.6 załącznika. Na Rycinie 7.1 zaprezentowano wartości parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z wyżej wymienionymi antybiotykami.



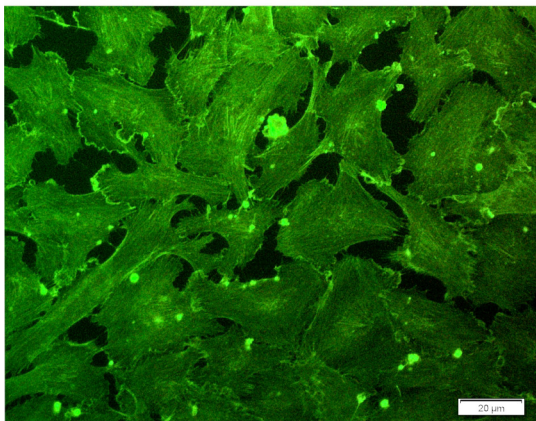
Rycina 7.1. Wartości parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z doksorubicyną oraz daunorubicyną przez 24h w następujących stężeniach 0.1, 1, 3, 5 oraz 10 μ M.

Dla dawki 0.1 μ M nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian względem poziomu referencji dla obu antybiotyków. W przypadku DOX, również 1 μ M stężenie nie powoduje zmian

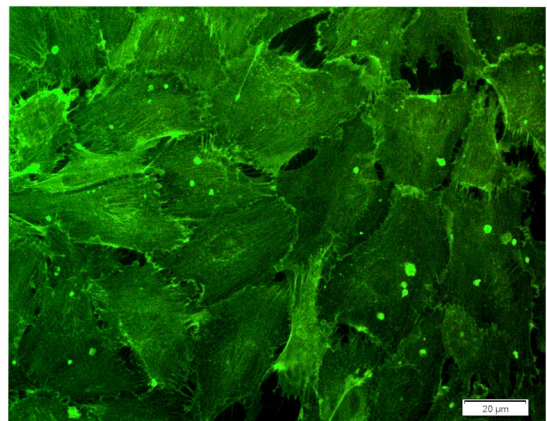
elastyczności komórek, natomiast dla wyższych stężeń (powyżej $3\mu\text{M}$) uzyskano stopniowy wzrost parametru elastyczności. Uzyskany wynik świadczy o zmniejszeniu elastyczności komórek dla wyższych stężeń po dodaniu dokсорubicyny. Odwrotną zależność otrzymano w przypadku drugiego antybiotyku. Stężenie $1\mu\text{M}$ powoduje istotny statystycznie wzrost parametru elastyczności, natomiast zwiększenie dawki DAU (powyżej $3\mu\text{M}$) stopniowo zmniejsza parametr elastyczności. Obserwowane zmniejszenie/zwiększenie parametru elastyczności wskazuje na zwiększenie/zmniejszenie elastyczności komórek. Warto tutaj podkreślić, że w przypadku obu aplikowanych czynników zaobserwowano wzrost parametru elastyczności jednakże przy różnych dawkach, dla DAU w przypadku $1\mu\text{M}$, natomiast dla DOX powyżej $3\mu\text{M}$.

W celu potwierdzenia otrzymanych wyników przeprowadzono wybarwienie F-aktyny cytoszkieletu komórkowego. Na Rycinach 7.2 oraz 7.3 zaprezentowano obrazy mikroskopii fluorescencyjnej dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych odpowiednio z DOX/DAU przez 24 dla stężeń: $1\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$ oraz $10\mu\text{M}$.

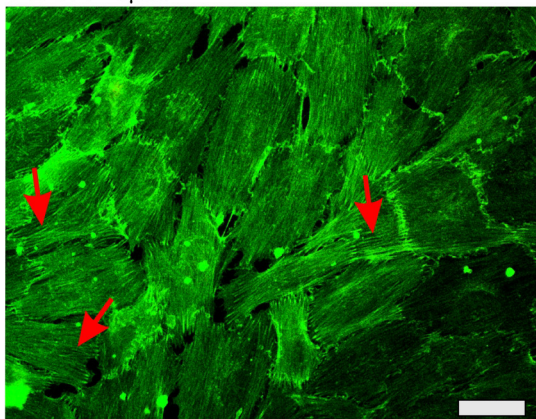
A Referencja



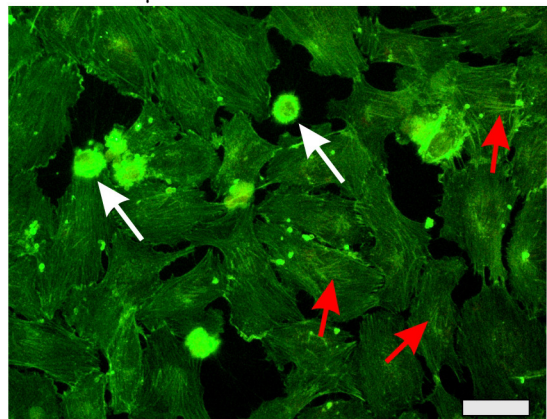
B DOX - $1\mu\text{M}$



C DOX - $5\mu\text{M}$

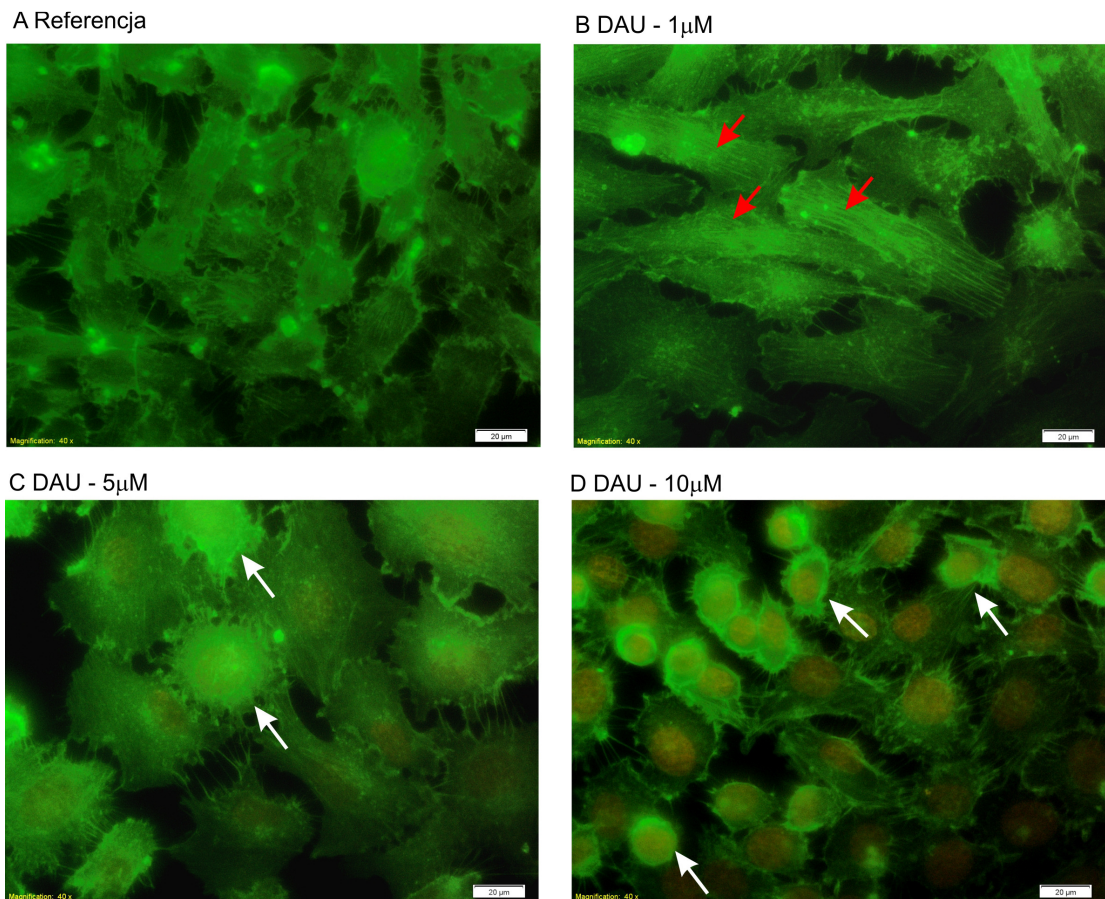


D DOX - $10\mu\text{M}$



Rycina 7.2. Obrazy fluorescencyjne znakowanej F-aktyny komórek referencyjnych (A) oraz inkubowanych z DOX przez 24h w stężeniach $1\mu\text{M}$ (B), $5\mu\text{M}$ (C) i $10\mu\text{M}$ (D). Czerwone strzałki wskazują pogrubione włókna F-aktyny, białe – komórki apoptotyczne. Skala: $20\mu\text{m}$.

Komórki inkubowane z DOX w stężeniu $5\mu\text{M}$ mają wyraźnie pogrubione włókna F-aktyny, tzw. „włókna naprężeniowe” ułożone równolegle wzdłuż głównej osi komórki (strzałki czerwone, Rycina 7.2C). Również dla najwyższego stężenia tego związku zaobserwowano pogrubione włókna aktynowe w części centralnej komórek oraz komórki apoptotyczne (białe strzałki, Rycina 7.2D). Otrzymane obrazy mikroskopii fluorescencyjnej potwierdzają wyniki pomiaru elastyczności komórek, gdzie dla wyższych stężeń zaobserwowano wzrost parametru elastyczności (zmniejszenie elastyczności komórek spowodowane pogrubieniem włókien aktynowych w części korowej cytoszkieletu komórkowego).



Rycina 7.3. Obrazy fluorescencyjne znakowanej F-aktyny komórek referencyjnych (A) oraz inkubowanych z DAU przez 24h w stężeniach $1\mu\text{M}$ (B), $5\mu\text{M}$ (C) i $10\mu\text{M}$ (D). Czerwone strzałki wskazują pogrubione włókna F-aktyny, białe strzałki – komórki apoptotyczne. Skala: $20\mu\text{m}$.

W przypadku DAU dla stężenia $1\mu\text{M}$ zaobserwowano pogrubienie włókien aktynowych. Z drugiej strony, zwiększenie dawki tego związku ($5\mu\text{M}$) skutkuje pojawieniem się komórek apoptotycznych (białe strzałki, Rycina 7.3C). Śmierć komórek na drodze apoptozy skutkuje silną depolimeryzacją F-aktyny [83]. W przypadku najwyższego stężenia DAU ($10\mu\text{M}$) komórki są obkurczone, następuje kondensacja chromatyny, co może świadczyć o późnej fazie apoptozy komórek (strzałki białe, Rycina 7.3D). Obrazy fluorescencyjne są zgodne z wynikami pomiaru parametru elastyczności, gdzie dla wyższych stężeń DAU otrzymano zwiększenie elastyczności komórek związane z procesami depolimeryzacji włókien aktynowych i indukowaniem apoptozy.

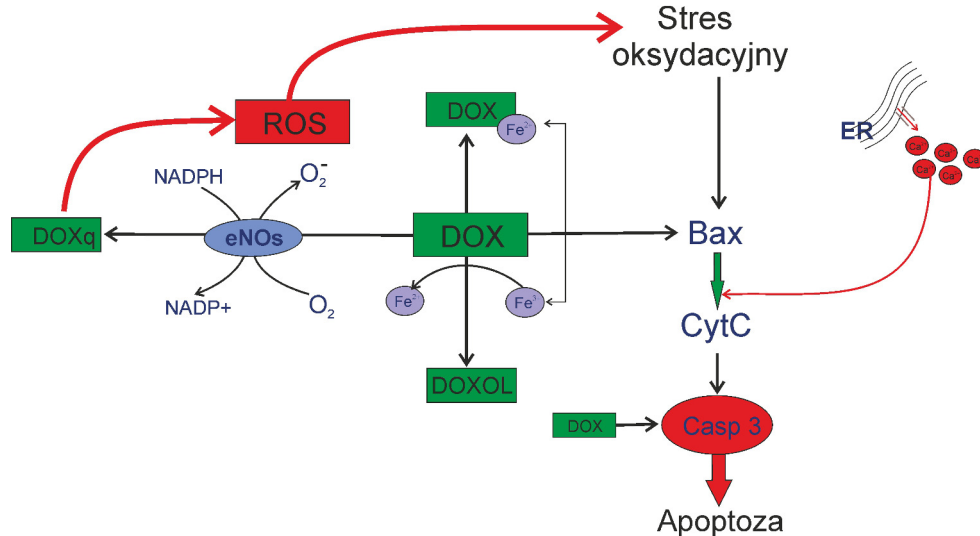
Podsumowując, dla obu antybiotyków zaobserwowano przebudowę aktyn cytoszkieletu. Jest ona związana z indukowaniem procesów apoptozy w komórkach. Komórki śródbłonna poddane DAU oraz DOX ulegają charakterystycznym dla zaprogramowanej śmierci komórkowej zmianom morfologicznym tj. obkurczeniu, kondensacji chromatyny, tworzeniu się pęcherzyków apoptotycznych. Jednakże intensywność tych procesów dla komórek poddanych działaniu tych antybiotyków jest różna. W przypadku DOX komórki apoptotyczne zostały zaobserwowane dla najwyższego badanego stężenia, natomiast dla DAU pojawiają się powyżej 3 μ M. W obu przypadkach zaobserwowano zwiększenie ilości F-aktyny (powstanie tzw. „włókien naprężeniowych”), co konieczne jest do wypuklenia błony komórkowej w celu tworzenia pęcherzyków apoptotycznych [109,110]. Włókna aktynowe obecne są w podstawie formujących się pęcherzyków apoptotycznych, jednakże ulegają trawieniu przez kaspazy, co zaobserwowano jako depolimeryzację aktyn oraz zwiększenie elastyczności komórek z DAU dla wyższych dawek. Można zatem stwierdzić, że podczas procesu apoptozy indukowane są dwa procesy przebudowy aktyn cytoszkieletu, najpierw polimeryzacja włókien aktynowych, a następnie silna depolimeryzacja aktyny związana z działaniem kaspaz. W przypadku DOX, w badanym zakresie stężeń do 5 μ M zaobserwowano pierwszy etap przebudowy aktyn (polimeryzację aktyn), natomiast dla DAU polimeryzację dla 1 μ M oraz depolimeryzację aktyn dla wyższych dawek.

7.2 Mechanizm działania DOX i DAU

Przeciwnowotworowy mechanizm badanych antybiotyków antracyklinowych związany jest ze zdolnością wiązania się ich z kwasem dezoksyrybonukleinowym, co hamuje syntezę kwasów nukleinowych. DOX oraz DAU wbudowują się pomiędzy pary zasad podwójnej nici kwasu DNA, hamując w ten sposób aktywność topoizomerazy II [111,112], polimeraz DNA i RNA [113] oraz helikaz i enzymów naprawiających uszkodzenia DNA [114]. Czynniki te uniemożliwiają replikację i transkrypcję, co blokuje proliferację komórek zatrzymując cykl komórkowy.

Na Rycinie 7.4 przedstawiono mechanizm działania doksorubicyny. Schemat przedstawia działanie związków, które związane jest z powstawaniem wolnych rodników tlenowych, reaktywnych form tlenu (ROS) [38] oraz dysocjacją eNOS. Doksorubicyna ma zdolność do oddziaływania z jonami żelaza znajdującymi się wewnątrz komórek, czemu towarzyszy tworzenie się kompleksów DOX/Fe²⁺ [115]. Kompleksy te wiążą się z DNA komórek bądź błonami biologicznymi prowadząc w ten sposób do ich destrukcji. Z drugiej strony DOX jest metabolizowana w wątrobie do doksorubicynolu (DOXOL), metabolitu, który odpowiada za kardiotoksyczność tego związku. Tak jak zaznaczono, lek ten powoduje syntezę wolnych rodników tlenowych (np. O₂⁻) oraz reaktywnych form tlenowych prowadząc w ten sposób do powstania stresu oksydacyjnego, który inicjuje procesy apoptozy w komórkach. Reaktywne formy tlenu indukują wewnątrz- oraz zewnątrzkomórkowe mechanizmy prowadzące między

innymi do inaktywacji enzymów błonowych, rozrywania nici DNA, zaburzeń homeostazy wapnia wewnątrzkomórkowego, zaburzeń cytoszkieletu komórkowego i wielu innych. Zaburzenia cytoszkieletu komórkowego związane są z polimeryzacją aktyny i rozrywaniem mikrofilamentów [116]. Powstały stres oksydacyjny wpływa na indukowanie tzw. „wewnętrznego” szlaku mitochondrialnego apoptozy zależnego od białek Bax. Dodatkowo, stres oksydacyjny powoduje uwalnianie wapnia z siateczki sarkoplazmatycznej co wspomaga postępowanie apoptozy. Z drugiej strony DOX może bezpośrednio działać na kaspazę 3, co skutkuje kaskadą kaspaz i śmiercią komórek na drodze apoptozy.



Rycina 7.4. Schemat przedstawiający działanie DOX [116] Oznaczenia: ROS - reaktywne formy tlenu, DOX - doksorubicyna, DOXOL - doksorubicynol, DOXq - półchinon doksorubicyny, Casp 3 - kaspaza 3, CytC - cytochrom C, Bax - białko z rodziny Bcl-2 związane z X ER - siateczka sarkoplazmatyczna, Ca^{2+} - jony wapnia, Fe^{2+} oraz Fe^{3+} - jony żelaza, O_2^- - anionorodnik ponadtlenny, O_2 - cząsteczka tlenu, NADPH - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, NADP⁺ - forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowy.

Pomimo wielu doniesień na temat kardiotoksyczności doksorubicyny, wysoka skuteczność przeciwnowotworowa tego związku przekonuje do jego stosowania w terapii nowotworów.

7.3 Wnioski

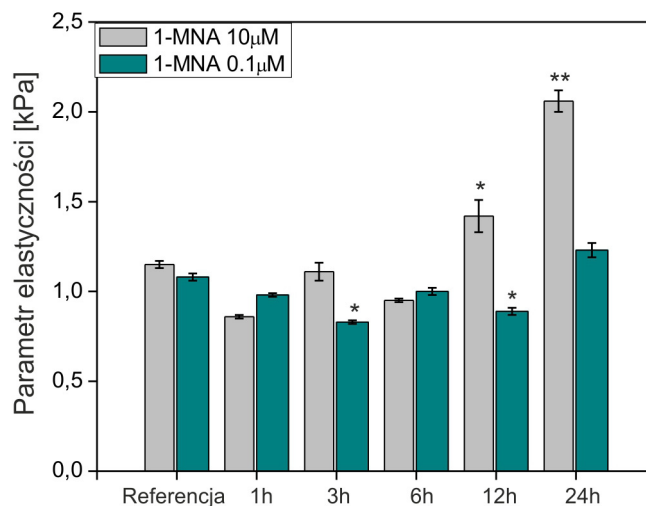
W niniejszym rozdziale zaprezentowano charakterystykę wpływu dwóch antybiotyków antracyklinowych, doksorubicyny oraz daunorubicyny, na komórki śródbłonna dla stężeń 0.1, 1, 3, 5 oraz 10 μ M. Oba czynniki są chemioterapeutykami, jednakże w różnym stopniu działają na komórki. Bazując na wynikach uzyskanych za pomocą spektroskopii sił oraz mikroskopii fluorescencyjnej można stwierdzić, że daunorubicyna działa silniej na śródbłonek, powyżej 3 μ M indukuje apoptozę w komórkach śródbłonna. W przypadku doksorubicyny, powyżej 3 μ M zaobserwowano silny efekt cytotoksyczny – zmniejszenie elastyczności oraz pogrubienie włókien aktynowych, natomiast komórki apoptotyczne występują dla 10 μ M.

Rozdział 8. Przeciwwzapalne działanie chlorku 1-metylonikotynoamidu *in vitro*

W niniejszym rozdziale zaprezentowano wykorzystanie spektroskopii sił do diagnostyki komórek śródbłonna. Przedstawiona praca stanowi prezentację metody do weryfikacji działania potencjalnych czynników śródbłonkowych na poziomie pojedynczych komórek. Badania zostały zrealizowane z wykorzystaniem chlorku 1-metylonikotynoamidu (1-MNA), związku który w warunkach *in vivo* wykazuje właściwości anty-trombotyczne. Jako pierwszy etap badań przeprowadzono charakterystykę tego czynnika na komórkach śródbłonna ludzkiego mikronaczyń w celu weryfikacji stężenia fizjologicznego. Następnie, w oparciu o zdefiniowany model dysfunkcji śródbłonna, 1-MNA zostało zbadane w konfiguracji „terapeutycznej”, gdzie najpierw aplikowano cytokinę prozapalną TNF- α na 1h, a następnie 1-MNA na wybrane czasy inkubacji. W kolejnym etapie przeprowadzono badanie tego związku w tzw. konfiguracji „prewencyjnej”, gdzie pre-inkubowano komórki z 1-MNA, a następnie z TNF- α przez 1h.

8.1 Charakterystyka działania 1-MNA

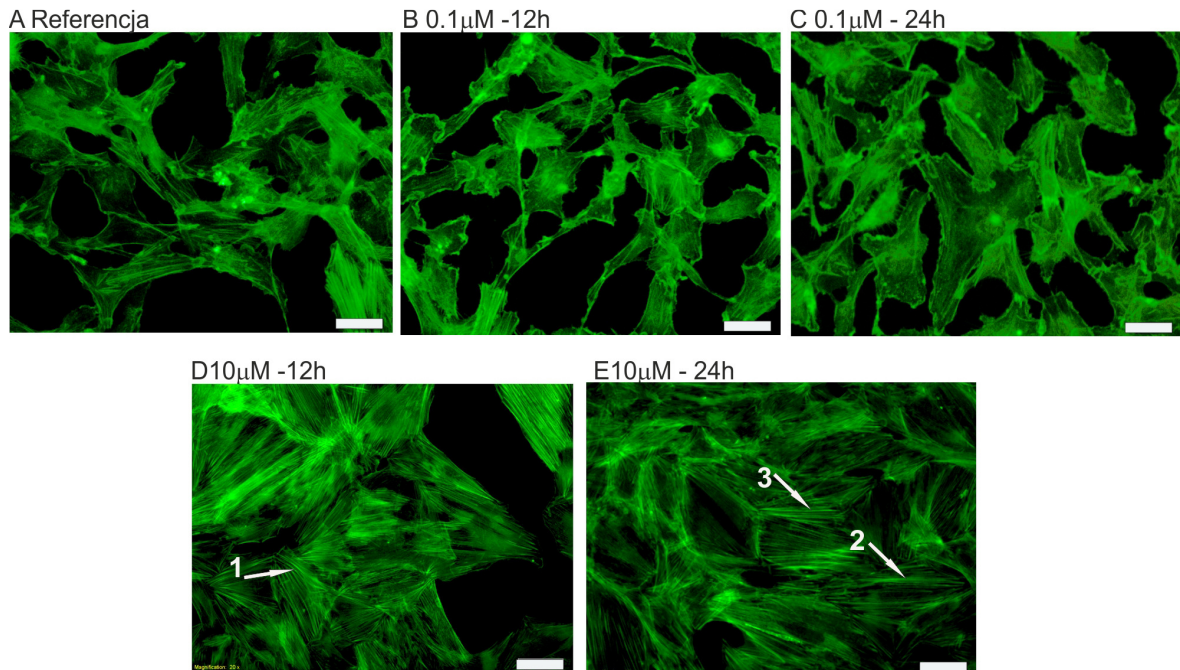
W niniejszym podrozdziale zostaną przedstawione wyniki pomiaru elastyczności komórek oraz wybarwienia aktyn cytoszkieletu komórkowego, które posłużą do charakterystyki wpływu 1-MNA na komórki śródbłonna dla dwóch stężeń 0.1 μ M oraz 1 μ M.



Rycina 8.1. Wartości parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z 1-MNA dla dwóch stężeń 10 μ M (kolor szary) oraz 0.1 μ M (niebieski). Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) $p < 0.01$ oraz (*) $p < 0.05$.

Na Rycinach Z.7 oraz Z.8 załącznika przedstawiono rozkłady parametrów elastyczności dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z 1-MNA. Na Rycinie 8.1 zostały przedstawione wartości parametrów elastyczności dla komórek inkubowanych z chlorkiem 1-metylonikotynoamidu dla dwóch stężeń $0.1\mu\text{M}$ (kolor niebieski) oraz $10\mu\text{M}$ (kolor szary) oraz wybranych czasów inkubacji (1, 3, 6, 12 i 24h). W przypadku wyższego stężenia wzrasta wartość parametru elastyczności komórek dla dłuższych czasów inkubacji.

Otrzymane wyniki są zgodne ze zmianami cytoszkieletu komórkowego zaprezentowanymi na obrazach fluorescencyjnych na Rycinie 8.2D i E.

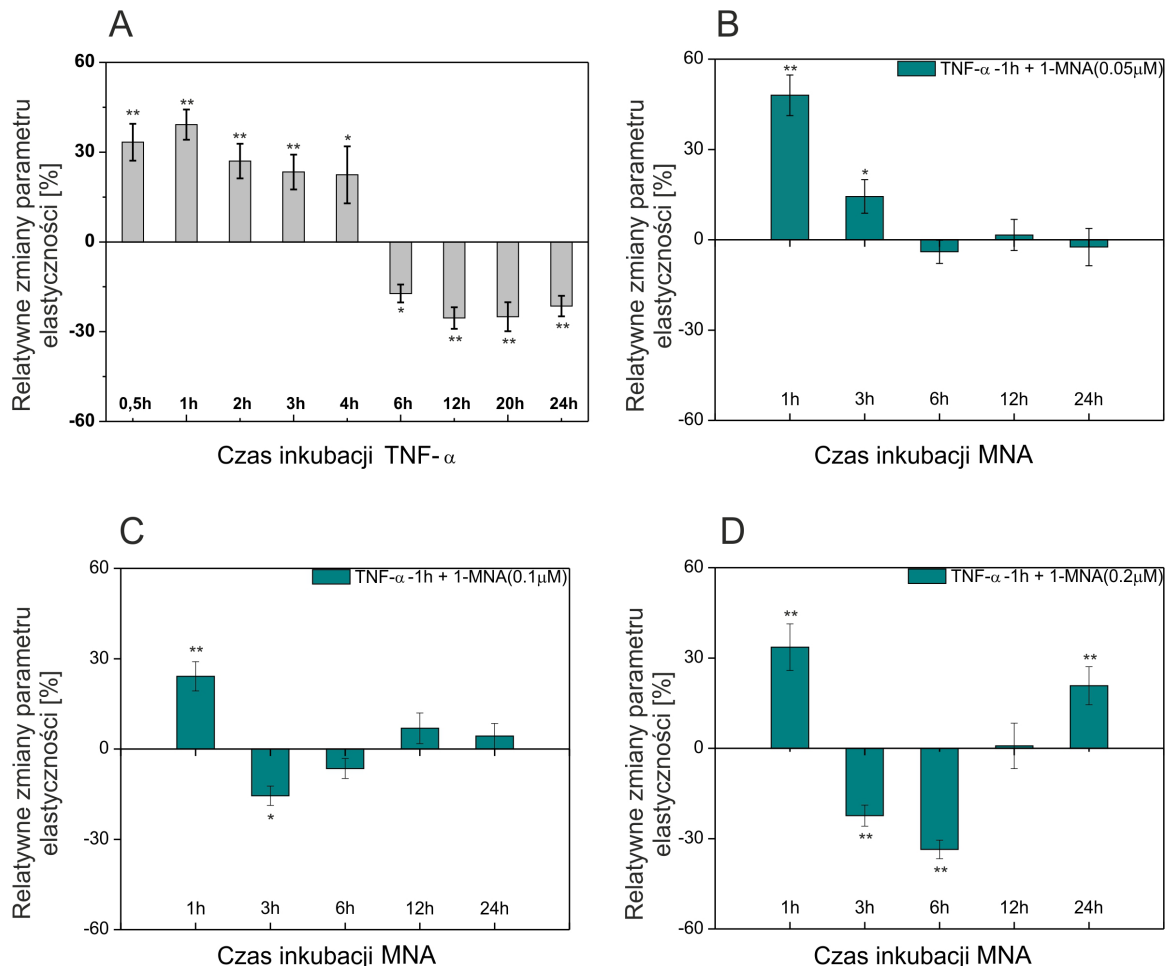


Rycina 8.2. Obrazy fluorescencyjne komórek znakowanych Alexą Fluor 488: referencja (A) oraz komórek inkubowanych z 1-MNA $0.1\mu\text{M}$ dla 12h (B) oraz 24h (C) oraz $10\mu\text{M}$ (D, E) dla tych samych czasów inkubacji. Strzałki 1-3 wskazują pogrubione włókna aktynowe. Skala: $50\mu\text{m}$.

Aplikacja 1-MNA w wyższym stężeniu na dłuższe czasy inkubacji (12, 24h) związana jest z polimeryzacją G-aktyny, co widoczne jest jako pogrubione włókna, ułożone równolegle wzdłuż głównej osi komórek (strzałki 1, 2 Rycina 8.2D i E). Z drugiej strony, dla stężenia $0.1\mu\text{M}$ uzyskana wartość parametru elastyczności oscyluje wokół wartości uzyskanej dla komórek referencyjnych (Rycina 8.1) oraz zaobserwowano niewielkie zmniejszenie parametru elastyczności, co zostało potwierdzone testami statystycznymi ANOVA na poziomie istotności $p < 0.05$. Obserwacja ta jest zgodna z wybarwieniem F-aktyny cytoszkieletu komórkowego, gdzie zaobserwowano niewielką depolimeryzację włókien aktynowych (Rycina 8.2B i C). Podsumowując, można stwierdzić, że stężenie $0.1\mu\text{M}$ nie powoduje istotnych zmian fenotypu komórek. Dlatego kontynuację badań weryfikacji przeciwwzapalnego działania 1-MNA przeprowadzono w obrębie tego stężenia dla $0.05\mu\text{M}$, $0.1\mu\text{M}$ oraz $0.2\mu\text{M}$.

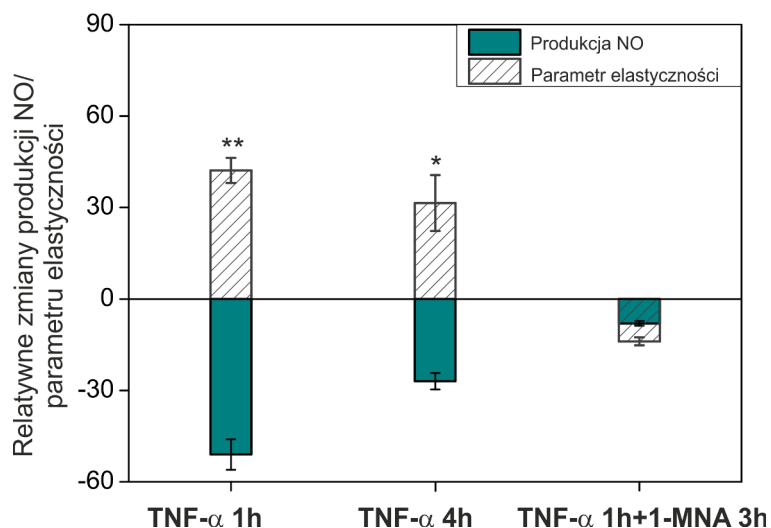
8.2 Badanie 1-MNA w konfiguracji „terapeutycznej”

Badanie chlorku 1-metylonikotynoamidu w konfiguracji „terapeutycznej” zostało przeprowadzone na komórkach śródbłonna uprzednio stymulowanych cytokiną prozapalną TNF- α . Bazując na obserwacjach z Rozdziału 5, zastosowanie TNF- α skutkuje dwustopniową odpowiedzią komórek, gdzie dla krótkich czasów inkubacji (1, 3h) uzyskano zwiększenie parametru elastyczności wraz z wyraźnym zmniejszeniem produkcji NO względem poziomu referencji. Z drugiej strony, wydłużenie czasu inkubacji do 12 i 24h skutkuje zmniejszeniem parametru elastyczności i zwiększeniem produkcji tlenu azotu. Na Rycinie 8.3A zaprezentowano relatywne zmiany parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z cytokiną prozapalną TNF- α , gdzie dodatkowo zaznaczono zmiany elastyczności dla 0,5, 4 oraz 20h inkubacji. Bazując na wszystkich punktach pomiarowych można stwierdzić, że najsilniejsze zmiany elastyczności komórek, które związane są z wywołaniem wczesnego odczynu zapalnego, występują dla inkubacji 1h.



Rycina 8.3. Relatywne zmiany parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z TNF- α (A), TNF- α (1h) +1-MNA (1, 3, 6, 12 i 24h) dla 0,05 μ M (B), 0,1 μ M(C) oraz 0,2 μ M (D). Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) $p < 0.01$ oraz (*) $p < 0.05$.

Na kolejnych rycinach zaprezentowano relatywne zmiany parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z TNF- α (1h) + 1-MNA (1, 3, 6, 12 i 24h) dla trzech stężeń 0.05 μ M (Rycina 8.3B), 0.1 μ M (Rycina 8.3C) oraz 0.2 μ M (Rycina 8.3D). Uzyskane wyniki bazują na rozkładach parametru elastyczności zaprezentowanych na Rycinach Z.10, Z.11, Z.12 załącznika. Aplikacja 1-MNA w najniższym stężeniu minimalizuje efekt TNF- α po 6h. Natomiast dla dłuższych czasów (powyżej 6h) dla tej dawki nie zaobserwowano zmian względem poziomu referencyjnego. Zastosowanie 1-MNA w stężeniu 0.1 μ M powoduje stopniowe zmniejszenie efektu działania cytokiny prozapalnej (porównanie z Ryciną 8.3A), kolejno odwrócenie efektu dla 3h (komórki bardziej elastyczne) oraz brak zmian dla dłuższych czasów inkubacji. Badany czynnik aplikowany w najwyższym stężeniu 0.2 μ M skutkuje drastycznymi zmianami parametru elastyczności komórek, gdzie dla krótkich czasów inkubacji (3 i 6h) otrzymano zmniejszenie parametru elastyczności, następnie dla 12h wartość jest zbliżona jak do poziomu referencyjnego oraz kolejno obserwuje się wzrost parametru elastyczności dla 24h. Podsumowując, chlorek 1-metylonikotynoamidu aplikowany w niższych stężeniach (0.05 μ M, 0.1 μ M) minimalizuje efekt działania TNF- α , natomiast wyższa dawka 1-MNA (0.2 μ M) aplikowana na komórki w odczynie zapalnym powoduje silne zmiany parametru elastyczności potwierdzone testami statystycznymi ANOVA na poziomie $p < 0.01$, które mogą świadczyć o cytotoksycznym wpływie na komórki. Interesującym punktem badawczym wydaje się inkubacja 1-MNA w stężeniu 0.1 μ M przez 3h, gdzie zaobserwowano wyraźny spadek parametru elastyczności w porównaniu z próbkami referencyjnymi (komórki z TNF- α 1h czy TNF- α 4h), dlatego ten szczególny przypadek został poddany dodatkowym badaniom biochemicznym.

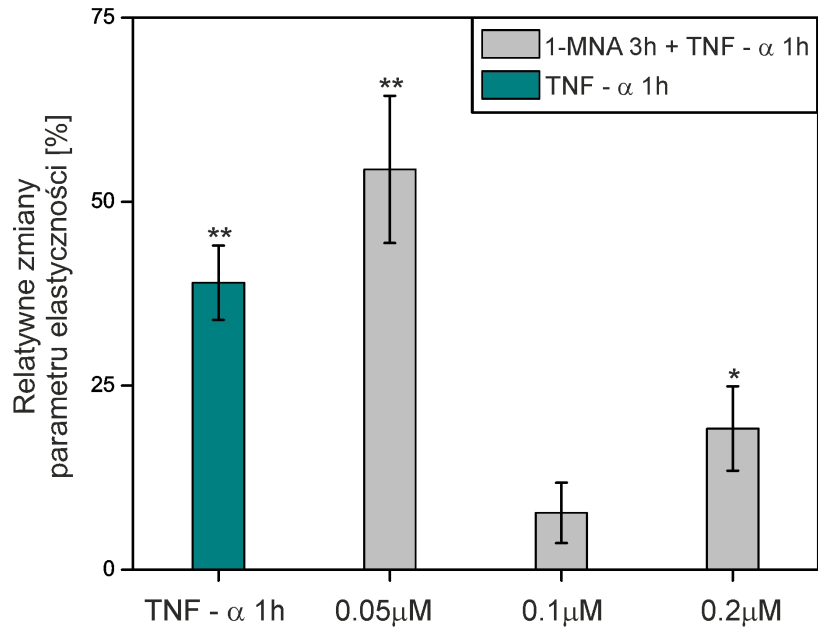


Rycina 8.4. Relatywne zmiany parametru elastyczności (obszary zakreskowane) oraz produkcji tlenu azotu wydzielanego przez komórki śródbłonna (kolor niebieski) dla komórek inkubowanych z TNF- α 1h, TNF- α 4h oraz TNF- α 1h + 1-MNA 3h. Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) $p < 0.01$ oraz (*) $p < 0.05$.

Na Rycinie 8.4 zaprezentowano relatywne zmiany parametru elastyczności oraz produkcji NO dla wybranego punktu pomiarowego - inkubacji komórek przez 3h z 1-MNA w stężeniu $0.1\mu\text{M}$. Jako próbki referencyjne przyjęto komórki inkubowane z TNF- α przez 1h (wczesna faza odczynu zapalnego) oraz TNF- α przez 4h. Cytokina prozapalna TNF- α aplikowana na 1h bądź na 4h powoduje zmniejszenie elastyczności komórek (wzrost parametru elastyczności), co ulega odwróceniu po dodaniu 1-MNA na 3h (komórki są bardziej elastyczne). Tej obserwacji towarzyszą również istotne zmiany związane z wydzielaniem tlenu azotu przez komórki śródbłonna. TNF- α aplikowane na 1h bądź 4h blokuje aktywność śródbłonkowych syntaz (eNOS), przez co obserwujemy deficyt wydzielanego NO w stosunku do referencji. W przypadku dodania 1-MNA do komórek w odczynie zapalnym występuje zwiększenie produkcji NO do poziomu referencyjnego. Zwiększenie wydzielania/syntezy NO potwierdza przeciwzapalny charakter działania 1-MNA dla 3h inkubacji w stężeniu $0.1\mu\text{M}$.

8.3 Badanie 1-MNA w konfiguracji „prewencyjnej”

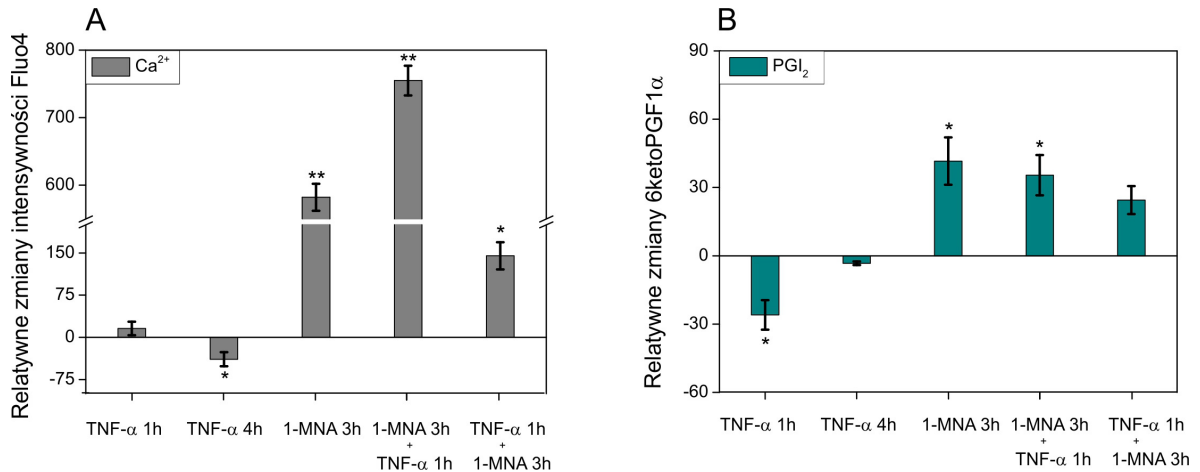
W niniejszym podrozdziale zostaną przedstawione wyniki związane z badaniem działania „prewencyjnego” 1-MNA. Korzystając z informacji podrozdziału 8.2, że aplikacja 1-MNA na 3h działa przeciwzapalnie na komórki, kontynuację badań w konfiguracji „prewencyjnej” przeprowadzono dla tego czasu inkubacji oraz stężeń $0.05\mu\text{M}$, $0.1\mu\text{M}$ oraz $0.2\mu\text{M}$. W tym celu aplikowano 1-MNA na 3h a następnie dodawano TNF- α do komórek na 1h. Na Rycinie 8.5 przedstawiono relatywne zmiany parametru elastyczności dla komórek wstępnie inkubowanych z 1-MNA, a następnie z TNF- α oraz inkubowanych tylko z cytokiną prozapalną przez 1h. Uzyskane wyniki bazują na rozkładach parametru elastyczności zaprezentowanych na Rycinie Z.9 załącznika. Wstępna inkubacja komórek z 1-MNA w najniższym stężeniu nie powoduje zmian elastyczności komórek w porównaniu z inkubacją z cytokiną prozapalną TNF- α (otrzymano wzrost parametru elastyczności, co potwierdza odczyn zapalny komórek dla tego punktu pomiarowego). W przypadku stężeń wyższych $0.1\mu\text{M}$ oraz $0.2\mu\text{M}$ otrzymano spadek parametru elastyczności odpowiednio do poziomu referencyjnego oraz o około 20% powyżej, co zostało potwierdzone testami statystycznymi ANOVA na poziomie istotności $p < 0.05$. Otrzymane wyniki pomiaru elastyczności wskazują na przeciwzapalne (zapobiegawcze) działanie tego związku dla wyższych stężeń, w szczególności dla stężenia $0.1\mu\text{M}$, co dodatkowo zostanie potwierdzone pomiarem wydzielanej prostacykliny, wapnia wewnątrzkomórkowego i uzupełnione o wybarwienie F-aktyny cytoszkieletu komórkowego.



Rycina 8.5. Relatywne zmiany parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z 1-MNA a następnie z TNF- α (1) (kolor szary). Jako poziom referencyjny zaznaczono wartość relatywnych zmian parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z TNF- α przez 1h (kolor niebieski). Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) $p < 0.01$ oraz (*) $p < 0.05$.

8.4 Pomiar wapnia wewnątrzkomórkowego oraz wydzielania prostacykliny

W podrozdziałach 8.2 oraz 8.3 zostały przedstawione wyniki pomiaru zmian parametru elastyczności komórek inkubowanych z 1-MNA w celu weryfikacji „terapeutycznego” oraz „prewencyjnego” działania. Podsumowując, uzyskane wyniki pomiaru elastyczności komórek wskazują na istotny punkt badawczy, którym jest aplikacja tego związku na 3h w stężeniu $0.1\mu\text{M}$ przed bądź po stymulacji odczynu zapalnego czynnikiem martwicy nowotworów. Przeciwwzpalny charakter 1-MNA dla tego przypadku potwierdzają i uzupełniają wyniki pomiaru wapnia wewnątrzkomórkowego oraz wydzielanej prostacykliny PGI_2 , które zostały zaprezentowane na Rycinie 8.6.



Rycina 8.6. Relatywne zmiany wydzielanej prostacykliny PGI₂ (A) oraz średniej intensywności fluorescencji Fluo4 (B) dla komórek inkubowanych z TNF-α (1h), TNF-α (4h), 1-MNA (3h), 1-MNA (3h) + TNF-α(1h), TNF-α (1h)+ 1-MNA (3h) obliczone względem komórek referencyjnych. Na rycinie zaznaczono średnie wartości istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych () p<0.01 oraz (*) p<0.05.**

Jony Ca²⁺ odgrywają kluczową rolę w mechanizmie sygnalizacji komórkowej, który kontroluje żywotność komórek, proliferację, ruchliwość, apoptozę i różnicowanie. Stężenie jonów Ca²⁺ w medium zewnątrzkomórkowym oraz gładkiej siateczce sarkoplazmatycznej (odpowiednio mM oraz μM) jest znacznie wyższe niż w cytozolu (10⁻⁷M). Na Rycinie 8.6A zaprezentowano relatywne zmiany intensywności Fluo4, które pokazują zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca²⁺ dla komórek referencyjnych: inkubowanych z TNF-α przez 1h oraz przez 4h, następnie inkubowanych tylko z 1-MNA (0.1μM) przez 3h i komórek inkubowanych z 1-MNA w konfiguracji „terapeutycznej” i „prewencyjnej”. Jednogodzinna inkubacja komórek śródbłonna z TNF-α skutkuje niewielkim wzrostem wapnia wewnątrzkomórkowego, natomiast dla 4h zaobserwowano spadek stężenia Ca²⁺, co może świadczyć o zaburzeniach wewnątrzkomórkowych wapnio-zależnych mechanizmów skutkujących np. redukcją proliferacji komórek. Dla komórek inkubowanych tylko z 1-MNA oraz w konfiguracjach 1-MNA 3h + TNF-α 1h, TNF-α 1h + 1-MNA 3h otrzymano duży wzrost stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego (o odpowiednio 580%, 700%, 150%), który prawdopodobnie spowodowany jest nie tylko uwalnianiem wapnia z gładkiej siateczki sarkoplazmatycznej ale także transportem Ca²⁺ z medium zewnątrzkomórkowego przez pompy wapniowe. W pracy Fleming i in. [118] pokazano, że wzrost poziomu wapnia stymuluje szlak związany z aktywnością śródbłonkowych syntaz tlenu azotu, co skutkuje zwiększoną produkcją NO. Dokładny mechanizm tego szlaku zostanie omówiony w podrozdziale 8.6.

Kolejnym parametrem biochemicznym potwierdzającym przeciwzapalny charakter 1-MNA, który został zmierzony w pracy badawczej jest wydzielanie prostacykliny (Rycina 8.6B). Pomiar ten wykonywano z nadsączy komórkowych, gdzie oznaczano stężenie trwałego

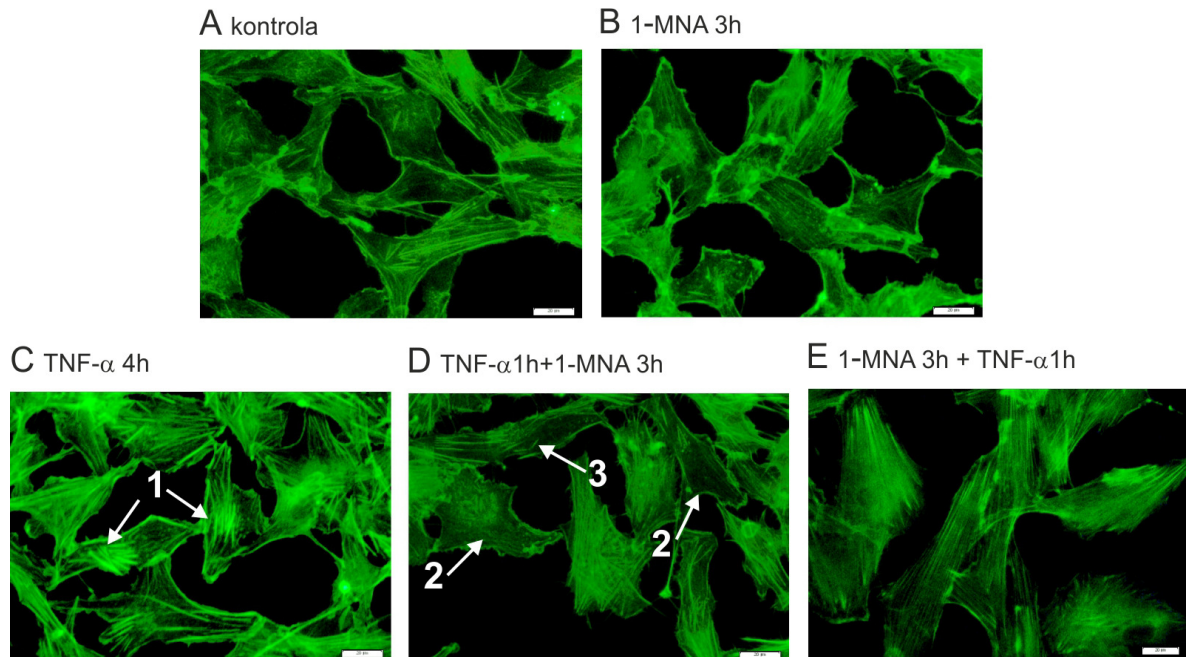
metabolitu prostacykliny – 6ketoPGF_{1α}. Inkubacja komórek z TNF-α przez 1h i 4h powoduje spadek wydzielanej prostacykliny względem poziomu referencyjnego (o odpowiednio 27% i 5%), podczas gdy 1-MNA dodane na 3h zwiększa wydzielanie PGI₂ przez komórki śródbłonna o około 40%. Również komórki poddane działaniu 1-MNA i TNF-α w obu konfiguracjach przeciwzapalnych posiadają zwiększoną aktywność do produkcji i wydzielania prostacykliny. Otrzymane wyniki *in vitro* potwierdzają anty-trombotyczne działanie 1-MNA, które zostało pokazane *in vivo* na modelach zwierzęcych [45].

W niniejszym podrozdziale zaprezentowane wyniki oznaczania poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego oraz pomiar wydzielanej prostacykliny pokazują zwiększenie poziomów obu wymienionych parametrów biochemicznych po zadziaaniu „prewencyjnie” oraz „terapeutycznie” chlorkiem 1-metylonikotynoamidu na komórki śródbłonna. Dodatkowo, w podrozdziale 8.6 zaproponowano mechanizm związany z zaobserwowanym zwiększeniem poziomów PGI₂ oraz Ca²⁺.

8.5 Znakowanie fluorescencyjne potwierdzające przeciwzapalne działanie 1-MNA

Tak jak zaznaczono w podrozdziale 3.1 za elastyczność komórek odpowiadają głównie włókna aktynowe zlokalizowane w części korowej komórki. Zmniejszenie/zwiększenie parametru elastyczności związane jest odpowiednio z procesami depolimeryzacji/polimeryzacji aktyn cytoszkieletu komórkowego. Metodą uzupełniającą pomiary elastyczności przeciwzapalnego działania 1-MNA jest mikroskopia fluorescencyjna i wybarwianie F-aktyny. Na Rycinie 8.7 zaprezentowano obrazy fluorescencyjne dla próbek referencyjnych oraz inkubowanych z 1-MNA w dwóch wymienionych konfiguracjach. Zgodnie z obserwacjami z Rozdziału 5 komórki inkubowane z TNF-α (1 i 3h) mają widoczne, pogrubione włókna aktynowe ułożone równolegle wzdłuż głównej osi komórek, natomiast F-aktyna zlokalizowana jest w częściach peryferyjnych. Kontynuując, dla komórek inkubowanych z TNF-α przez 4h zaobserwowano liczne włókna aktynowe w częściach centralnych komórek (Rycina 8.7C, strzałka 1), co jest zgodne ze zwiększeniem parametru elastyczności dla tego przypadku (Rycina 8.5). W przypadku inkubacji tylko z 1-MNA przez 3h obserwowana jest niewielka depolimeryzacja włókien F-aktyny w porównaniu z komórkami referencyjnymi (Rycina 8.7B). Dla komórek inkubowanych z TNF-α + 1-MNA bądź w konfiguracji odwrotnej zauważono pojedyncze włókna F-aktyny w częściach centralnych komórek (Rycina 8.7D, strzałka 3) a także całkowitą depolimeryzację włókien aktynowych (Rycina 8.7D-E, strzałka 2). Zaobserwowana przebudowa cytoszkieletu komórek potwierdza przeciwzapalne działanie 1-MNA, które prawdopodobnie związane jest ze zwiększeniem ilości G-aktyny w komórkach, a tym samym aktywacją śródbłonkowych

syntez eNOS. Depolimeryzacja włókien aktynowych zwiększa ilość miejsc wiążących dla eNOS, a zatem wpływa na regulację produkcji tlenu azotu co zostało zaobserwowane na Rycinie 8.4.



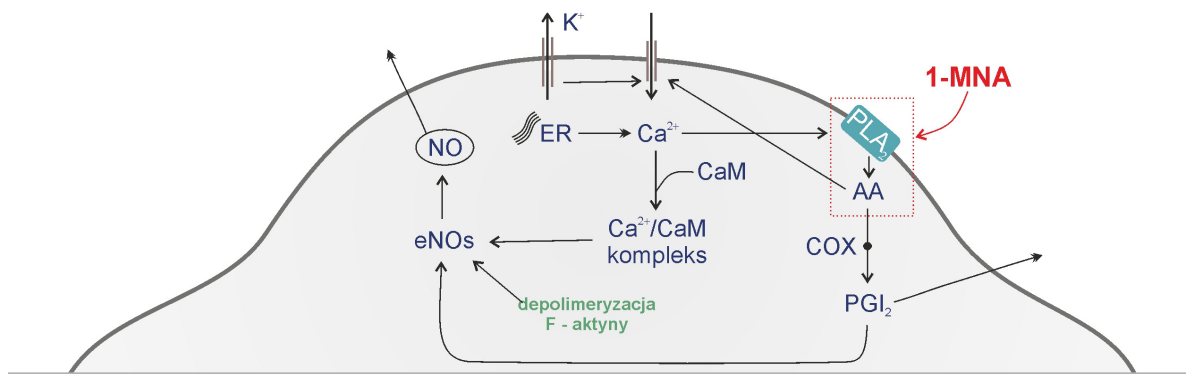
Rycina 8.7. Obrazy fluorescencyjne wybarwionej F-aktyny, dla komórek referencyjnych (A), inkubowanych z 1-MNA 3h (B), TNF-α 4h (C), TNF-α 1h + 1-MNA 3h (D) oraz 1-MNA 3h + TNF-α 1h (E). Strzałka 1 pokazuje pogrubione włókna w części centralnej komórek, 2 – depolimeryzację F-aktyny oraz 3 – pojedyncze włókna w części centralnej komórki. Skala: 20μm.

8.6 Proponowany mechanizm działania 1-MNA

W poprzednich podrozdziałach zaprezentowano wyniki nanoindentacji ostrzem AFM pokazujące zmiany parametru elastyczności komórek po zadziałaniu chlorku 1-metylonikotynoamidu. Dodatkowo zamieszczono wyniki biochemiczne pomiaru NO, PGI₂, wewnątrzkomórkowych jonów Ca²⁺ oraz fluorescencyjnie znakowanej F-aktyny, które potwierdzają przeciwzapalny i przeciwtrombotyczny charakter 1-MNA. „Prewencyjny” i „terapeutyczny” wpływ 1-MNA wyjaśnia zaproponowany mechanizm działania tego związku (Rycina 8.8).

W przedstawionej interpretacji zaproponowano hipotezę, że 1-MNA pobudza fosfolipazę PLA₂ do produkcji kwasu arachidonowego. Następnie kwas ten jest metabolizowany przez cyklooksygenazę do prostacykliny. Zwiększony poziom PGI₂ został zaobserwowany dla komórek inkubowanych tylko z 1-MNA oraz komórek inkubowanych z 1-MNA w obu konfiguracjach przeciwzapalnych (Podrozdział 8.4). Następnie PGI₂ jest uwalniane przez błonę komórkową na zewnątrz komórki, ale również może aktywować śródbłonkowe syntazy tlenu azotu do produkcji NO, co zaobserwowano poprzez regulację tlenu azotu (Podrozdział 8.2).

Z drugiej strony kwas arachidonowy pobudza pompy wapniowe do transportu jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki, przez co zaobserwowano zwiększone stężenie jonów wapnia wewnątrzkomórkowego (Podrozdział 8.4). Jony Ca^{2+} aktywują fosfolipazę i tutaj cykl się zamyka. Z drugiej strony, jony Ca^{2+} mogą zostać również uwalniane z gładkiej siateczki sarkoplazmatycznej i w kompleksie $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ pobudzać do aktywacji eNOSów. Aktywacja śródbłonkowych syntez tlenku azotu skorelowana jest ze zwiększeniem miejsc wiążących (zwiększenie G-aktyny), przez co obserwowana jest depolimeryzacja F-aktyny po zadziałaniu tylko 1-MNA jak również 1-MNA w badanych konfiguracjach (Podrozdział 8.5).



Rycina 8.8. Biochemiczny cykl wydzielania i uwalniania Ca^{2+} , NO oraz PGI_2 . Czerwona strzałka wskazuje czynnik, na który 1-MNA może wpływać bezpośrednio. Zaprezentowany schemat zawiera następujące oznaczenia: siateczka sarkoplazmatyczna (ER), fosfolipaza A₂ (PLA₂), kwas arachidonowy (AA), cyklooksygenaza (COX), prostacyklina (PGI_2), śródbłonkowa syntaza tlenku azotu (eNOS), tlenek azotu (NO), kalmodulina (CaM), Ca^{2+} /kompleks kalmoduliny ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ kompleks).

Proponowany mechanizm działania 1-MNA pokazuje wewnątrzkomórkowy szlak uwalniania NO i PGI_2 , dwóch mediatorów przeciwzapalnych śródbłonka. Zaproponowany schemat na Rycinie 8.8 przedstawia hipotezę wewnątrzkomórkowego szlaku indukowanego przez chlorek 1-metylonikotynoamidu, która uzasadnia działanie 1-MNA w konfiguracji „terapeutycznej” jak również „prewencyjnej”. Terapeutyczny efekt związany jest z pobudzeniem PLA₂ do metabolizowania AA, które następnie jest produktem do powstawania PGI_2 i kolejno aktywacji śródbłonkowych syntez tlenku azotu. Z drugiej strony pre-inkubacja z 1-MNA powoduje depolimeryzację F-aktyny, przez co zostaje zwiększona ilość miejsc wiążących eNOS, a tym samym ilość produkowanego NO. Również w przypadku zapobiegawczej aplikacji 1-MNA aktywowany jest szlak związany z wydzielaniem PGI_2 oraz zwiększonym stężeniem wapnia wewnątrzkomórkowego.

8.7 Wnioski

W niniejszym rozdziale zaproponowano wykorzystanie nanoindentacji ostrzem AFM jako biowskaźnika do diagnostyki śródbłonka po zadziałaniu chlorkiem 1-metylonikotynoamidu. W pierwszym etapie diagnostyki przeprowadzono badanie zmian

elastyczności śródbłonna do weryfikacji fizjologicznego stężenia 1-MNA, czyli stężenia przy którym nie występują zmiany elastyczności komórek. Następnie w oparciu o wcześniej zdefiniowany model dysfunkcji śródbłonna przeprowadzono badania weryfikacji przeciwzapalnego działania 1-MNA w dwóch konfiguracjach „terapeutycznej” oraz „prewencyjnej”. Ponieważ badanie elastyczności komórek jest metodą pozwalającą na detekcję zmian elastyczności związanych z przebudową cytoszkieletu w części korowej komórek, a także jest ściśle powiązana z produkcją NO przez komórki jako metody uzupełniające wykorzystano mikroskopię fluorescencyjną i wybarwienie F-aktyny oraz spektrofotometryczną metodę Griessa do pomiaru tlenu azotu. Dodatkowo, uzyskane wyniki potwierdzono pomiarem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia oraz wydzielania prostacykliny.

Badania spektroskopii sił zastosowane do oceny właściwego stężenia 1-MNA wskazały, że dla dawki 0.1 μ M związek ten nie zmienia fenotypu komórek, co uzasadnia wybór następujących stężeń: 0.05 μ M, 0.1 μ M oraz 0.2 μ M do weryfikacji działania w konfiguracjach „terapeutycznej” oraz „protekcijnej”.

Następnie, w konfiguracji „terapeutycznej” (TNF- α 1h + 1-MNA) uzyskano dawko-zależność działania 1-MNA, gdzie wytłumienie działania cytokiny prozapalnej zostało zaobserwowane dla stężeń 0.05 μ M oraz 0.1 μ M. Z drugiej strony, w konfiguracji „prewencyjnej” (1-MNA + TNF- α 1h) działanie zapobiegawcze uzyskano dla wyższych stężeń, w szczególności dla 0.1 μ M.

Ciekawym punktem badawczym obu konfiguracji okazała się inkubacja komórek z 1-MNA przez 3h w stężeniu 0.1 μ M. Przypadek ten w konfiguracji „terapeutycznej” powoduje odwrócenie efektu działania TNF- α , co zostało uzupełnione o dodatkową analizę biochemiczną oraz fluorescencyjnym znakowaniu F-aktyny. W oparciu o otrzymane wyniki zaproponowano mechanizm działania 1-MNA, łączący uwalnianie mediatorów przeciwzapalnych: tlenu azotu oraz prostacykliny, który może tłumaczyć działanie 1-MNA w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. Otrzymane wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi *in vivo*, prezentują przeciwzapalny potencjał 1-MNA skorelowany z przeciwtrombotycznym działaniem.

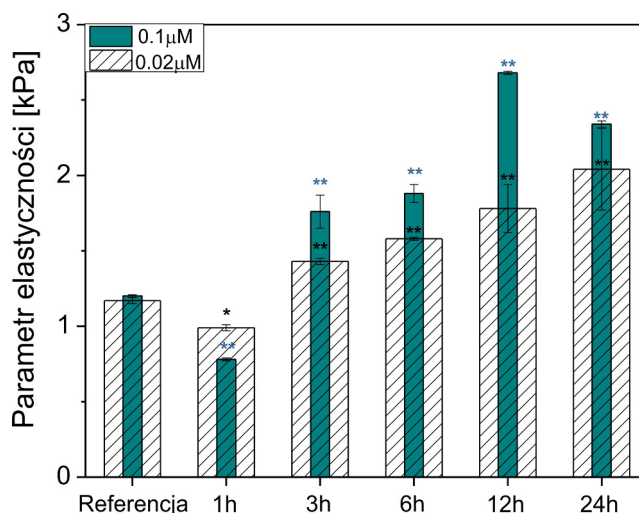
W niniejszym rozdziale zademonstrowano metodykę diagnostyki komórek śródbłonna bazującą na pomiarach elastyczności komórek spektroskopią sił oraz dodatkowej analizie biochemicznej. Prezentacja metodyki została przeprowadzona na przykładzie chlorku 1-metylonikotynoamidu, czynnika, który wykazuje potencjał terapeutyczny i prewencyjny komórkach śródbłonna ludzkiego mikronaczyń w odczynie zapalnym.

Rozdział 9. Wpływ wybranych soli pirydynowych na komórki śródbłónka

Prezentowany rozdział stanowi kontynuację badań potencjalnych czynników śródbłonkowych. Nanoindentacja ostrzem AFM posłużyła do badań właściwości mechanicznych komórek śródbłónka poddanych działaniu soli pirydynowych chlorku 1,4-dimetylopirydyny ($0.02\mu\text{M}$, $0.1\mu\text{M}$) oraz chlorku 1-metylopirydyny ($0.1\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$). Jako metody uzupełniające wykorzystano mikroskopię fluorescencyjną i wybarwienie F-aktyny cytoszkieletu komórkowego oraz metodę Griessa do pomiaru wydzielanego NO przez komórki śródbłónka. Zaproponowane związki wykazują silne działanie trombolityczne *in vivo*, stąd motywacja do badań wpływu wybranych soli pirydynowych na komórki śródbłónka. Dodatkowo, z doniesień literaturowych wiadomo, że 1,4-DMP jest hepatoprotekcyjnie aktywny.

9.1 Cytotoksyczny efekt po aplikacji 1,4-DMP

Uzyskanie przeciwzapalnego efektu dla $0.1\mu\text{M}$ w przypadku 1-metylonikotynoamidu zasugerowało do wyboru właśnie tego stężenia w przypadku badania wpływu 1,4-DMP. Po uzyskaniu wstępnych wyników dla tej dawki zaproponowano 5-krotne zmniejszenie stężenia badanego czynnika. Na Rycinie 9.1 przedstawiono wartości parametru elastyczności dla dwóch wybranych stężeń: $0.02\mu\text{M}$ i $0.1\mu\text{M}$ oraz ustalonych czasów inkubacji (1, 3, 6, 12 i 24h).

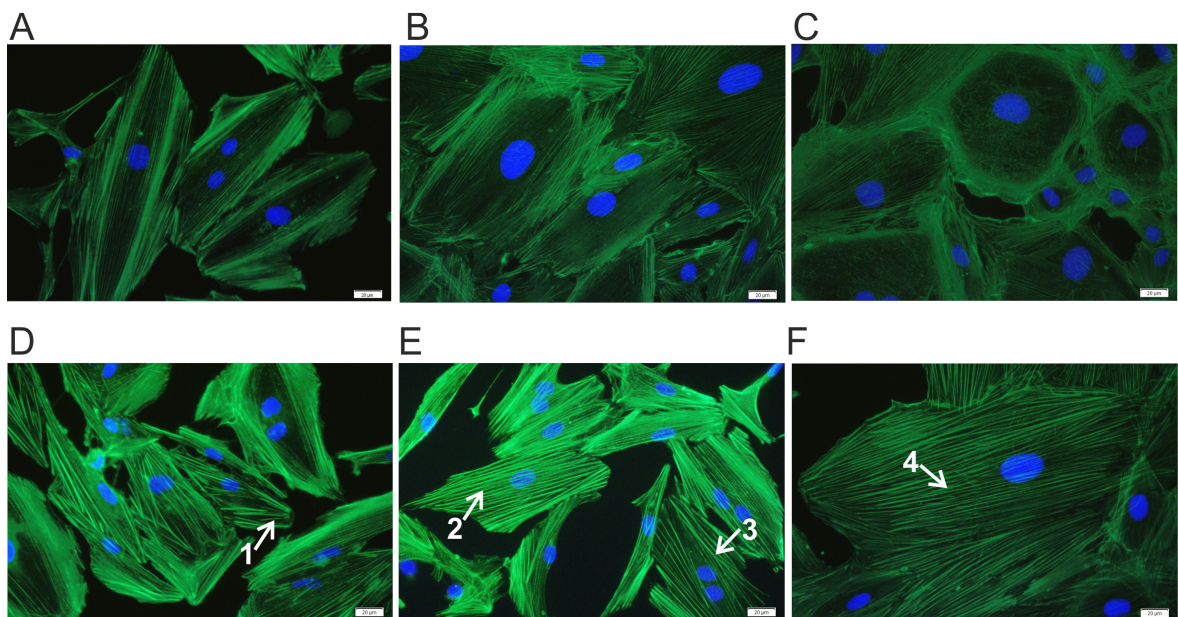


Rycina 9.1. Wartości parametru elastyczności dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z 1,4-DMP dla dwóch stężeń $0.1\mu\text{M}$ (kolor niebieski) i $0.02\mu\text{M}$ (obszar zakreskowany) oraz wybranych czasów inkubacji (1, 3, 6, 12 oraz 24h). Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) $p < 0.01$ oraz (*) $p < 0.05$.

Rozkłady parametru elastyczności dla wyżej wymienionych stężeń oraz dawek zaprezentowano na Rycinach Z.13 oraz Z.15 załącznika.

W przypadku jednogodzinnej inkubacji otrzymano zmniejszenie parametru elastyczności dla wybranych stężeń, większe w przypadku mniejszej dawki. Z drugiej strony, dla dłuższych czasów inkubacji (powyżej 3h) wzrasta parametr elastyczności (komórki mniej elastyczne) dla obu wybranych stężeń. Jednakże w przypadku wyższego stężenia otrzymane wartości parametru elastyczności są znacznie wyższe niż dla $0.02\mu\text{M}$. Podsumowując, zmniejszenie stężenia stosowanego związku obniża jego wpływ na zmiany elastyczności.

W celu potwierdzenia otrzymanych wyników przeprowadzono wybarwienie F-aktyny cytoszkieletu komórkowego. Na Rycinie 9.2 zaprezentowano otrzymane obrazy mikroskopii fluorescencyjnej dla dawki $0.1\mu\text{M}$.



Rycina 9.2. Fluorescencyjne obrazy znakowanej F-aktyny (obszary zielone) oraz jąder komórkowych (obszar niebieski) dla komórek kontrolnych (A) oraz inkubowanych z $0.1\mu\text{M}$ 1,4-DMP odpowiednio przez 1h (B), 3h (C), 6h (D), 12h (E) oraz 24h (F). Strzałki 1-4 pokazują grube włókna F-aktyny zlokalizowane wzdłuż głównej osi komórek. Skala: $20\mu\text{m}$.

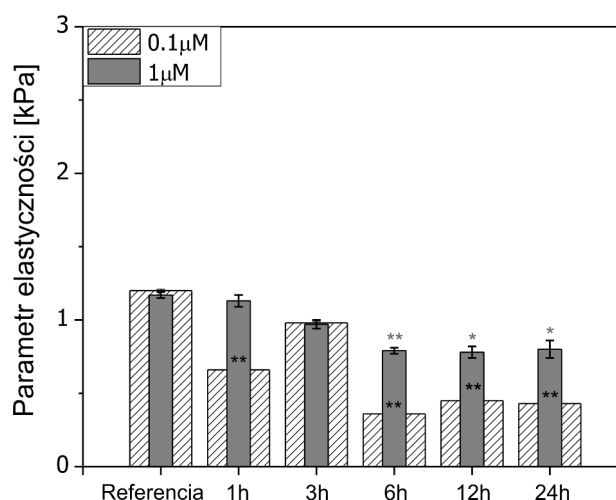
Na obrazach fluorescencyjnych zaobserwowano wyraźne zmiany rozmieszczenia oraz grubości włókien aktynowych w komórkach wraz z wydłużaniem czasu inkubacji z 1,4-DMP. Dla krótkich czasów (1 i 3h) F-aktyna zlokalizowana jest w obszarach peryferyjnych komórek. Z drugiej strony, w przypadku 6, 12 oraz 24h zauważono pogrubione włókna aktynowe ułożone równolegle wzdłuż głównej osi komórek, czyli tzw. „włókna naprężeniowe” (Rycina 9.2, strzałki 1-4), co jest związane z silną polimeryzacją G-aktyny oraz potwierdza wzrost parametru elastyczności (Rycina 9.1). Porównując otrzymane wyniki z charakterystyką wpływu cytokiny prozapalnej TNF- α na komórki śródbłónka [1], która w pierwszym etapie działania (1 i 3h) powoduje silną polimeryzację włókien aktynowych

skutkując w ten sposób zwiększeniem parametru elastyczności, można stwierdzić, że 1,4-DMP w badanych stężeniach wywołuje efekt cytotoksyczny. Interesującą obserwacją jest zwiększenie elastyczności komórek dla krótkiego czasu (1h), które potwierdzone zostało wybarwianiem fluorescencyjnym.

Podsumowując, 1,4-DMP jest czynnikiem powodującym istotne zmiany cyklu komórkowego prowadzące przede wszystkim do reorganizacji włókien cytoszkieletu, która uzasadnia zmniejszenie elastyczności komórek. Jednakże w przypadku niższego stężenia efekt działania 1,4-DMP jest znacznie mniejszy.

9.2 Zwiększenie elastyczności komórek po zastosowaniu 1-MP

Kolejną solą pirydynową zbadaną w pracy badawczej jest chlorek 1-metylopirydyny (1-MP). Związek ten inkubowano z komórkami na ustalone czasy inkubacji (1, 3, 6, 12 oraz 24h) w dawkach 0.1 μ M oraz 1 μ M. Wyniki zaprezentowano na Rycinie 9.3, w oparciu o rozkłady parametru elastyczności przedstawione na Rycinach Z.14 oraz Z.16 załącznika.

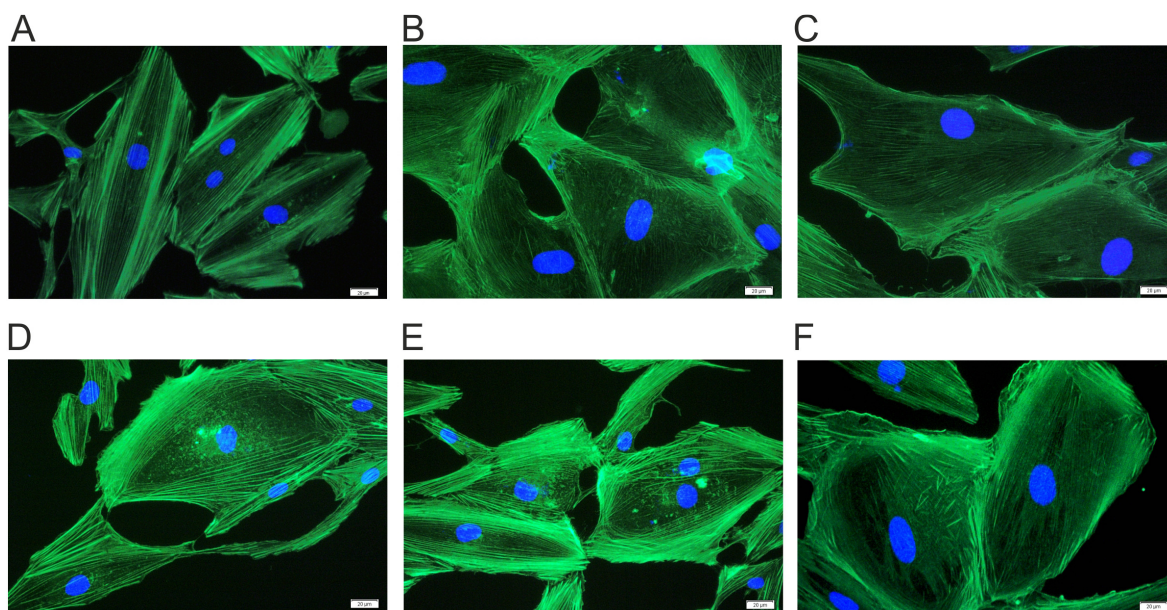


Rycina 9.3. Wartości parametru elastyczności dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z 1-MP dla dwóch stężeń: 100nM (słupki zakreskowane) i 1 μ M (słupki szare) oraz wybranych czasów inkubacji (1, 3, 6, 12 i 24h). Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) $p < 0.01$ oraz (*) $p < 0.05$.

Dla niższego stężenia zaobserwowano oscylacyjne zmiany parametru elastyczności: zwiększenie elastyczności dla 1h, następnie zmniejszenie dla 3h oraz spadek parametru elastyczności dla pozostałych czasów inkubacji utrzymujący się na tym samym poziomie (około 45% wartości referencyjnej). Aplikacja 1-MP w wyższym stężeniu skutkuje łagodniejszymi zmianami parametru elastyczności, gdzie dla krótkich czasów inkubacji (1 i 3h) wartości parametru elastyczności są zbliżone do wartości otrzymanej dla komórek referencyjnych. 1-MP dla dłuższych czasów inkubacji (6, 12 i 24h) w stężeniu 1 μ M powoduje zmniejszenie parametru elastyczności (o około 20% wartości kontroli), czyli wzrost elastyczności

komórek. Podsumowując, wydłużenie czasu inkubacji z 1-MP skutkuje zwiększeniem elastyczności komórek, a intensywność tego procesu zależy od aplikowanego stężenia.

W celu uzupełnienia analizy wpływu 1-MP na komórki śródbłónka przeprowadzono fluorescencyjne znakowanie F-aktyny cytoszkieletu komórkowego. Na Rycinie 9.4 zaprezentowano obrazy mikroskopii fluorescencyjnej komórek śródbłónka inkubowanych z 1-MP dla stężenia $0.1\mu\text{M}$. Dla wszystkich czasów inkubacji widoczne są na obrazach fluorescencyjnych zgrupowania F-aktyny w obszarach peryferyjnych komórek. W części centralnej komórek zaobserwowano cienkie, pojedyncze włókna, które ułożone są tak jak w przypadku komórek referencyjnych.



Rycina 9.4. Fluorescencyjne obrazy znakowanej F-aktyny (obszary zielone) oraz jąder komórkowych (obszar niebieski) dla komórek kontrolnych (A) oraz inkubowanych ze 100nM 1-MP odpowiednio przez 1h (B), 3h (C), 6h (D), 12h (E) oraz 24h (F). Skala: $20\mu\text{m}$.

Depolimeryzacja F-aktyny powoduje zwiększenie ilości miejsc wiążących śródbłónkowych syntaz tlenku azotu, przez co zwiększona zostaje produkcja tlenku azotu przez komórki. Istotnym parametrem potwierdzającym otrzymane wyniki elastyczności jest pomiar tlenku azotu wydzielanego przez komórki inkubowane z 1-MP. W Tabeli 5 zestawiono relatywne zmiany produkcji NO dla stężenia $0.1\mu\text{M}$ oraz wybranych czasów inkubacji.

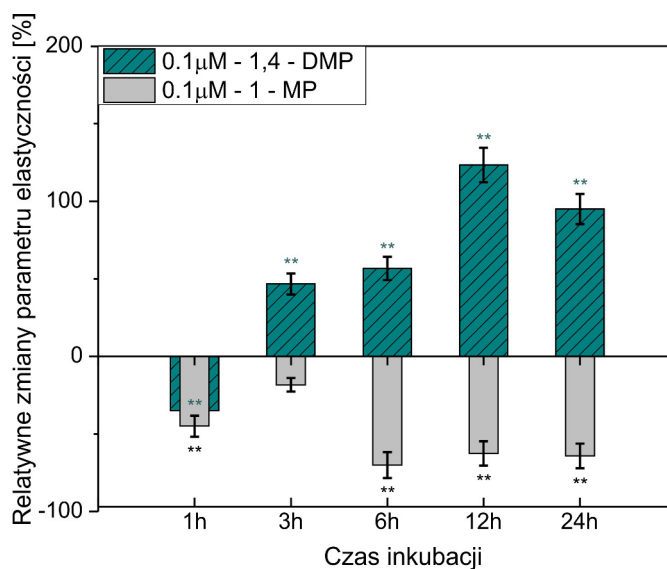
Tabela 5. Relatywne zmiany produkcji NO przez komórki śródbłónka inkubowane z 100nM 1-MP dla czasów inkubacji 1, 3, 12 oraz 24h.

Czas inkubacji z $0.1\mu\text{M}$ 1-MP	Relatywne zmiany produkcji NO
1h	80%
3h	35%
12h	119%
24h	12%

Zwiększona produkcja tlenu azotu otrzymana dla komórek inkubowanych z 1-MP dla wszystkich czasów inkubacji świadczy o podwyższonej aktywności śródbłonkowych syntaz NO. Dla jednogodzinnej inkubacji komórek z 1-MP zaobserwowano 80% nadmiar tlenu azotu. Wynik ten anty-koreluje ze zmniejszeniem parametru elastyczności dla 1h, a zatem potwierdza obserwację, że „miękkie” komórki produkują więcej NO [81]. Dla 3h uzyskano spadek nadmiarowo produkowanego NO (do 35%) oraz wzrost parametru elastyczności w porównaniu z 1h inkubacją. Wydłużenie inkubacji skutkuje zwiększeniem elastyczności komórek względem 3h (Rycina 9.3) oraz silnym wzrostem produkcji NO (do 119% dla 12h). Otrzymane wyniki potwierdzają anty-korelację pomiędzy elastycznością komórek oraz produkcją tlenu azotu.

9.3 Porównanie 1-MP oraz 1,4-DMP

Uzyskane wyniki dla 0.1 μ M obu soli pirydyniowych prezentują anty-korelujące zmiany elastyczności dla dłuższych czasów inkubacji (Rycina 9.5). Wynik ten sugeruje różne mechanizmy komórkowe indukowane przez te związki, związane z depolimeryzacją F-aktyny zlokalizowanej w części korowej cytoszkieletu komórkowego w przypadku 1-MP oraz polimeryzacją G-aktyny po zadziałaniu 1,4-DMP. Otrzymane wyniki dla 1,4-DMP – zmniejszenie elastyczności komórek przy dłuższych czasach inkubacji (12 i 24h) są efektem jaki zaobserwowano również w przypadku chlorku 1-metylonikotyloamidu dla stężenia 10 μ M.



Rycina 9.5. Relatywne zmiany parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z 1,4-DMP (słupki zakreskowane) oraz 1-MP (słupki szare) dla stężenia 100nM dla różnych czasów inkubacji 1, 3, 6, 12 oraz 24h. Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) $p < 0.01$ oraz (*) $p < 0.05$.

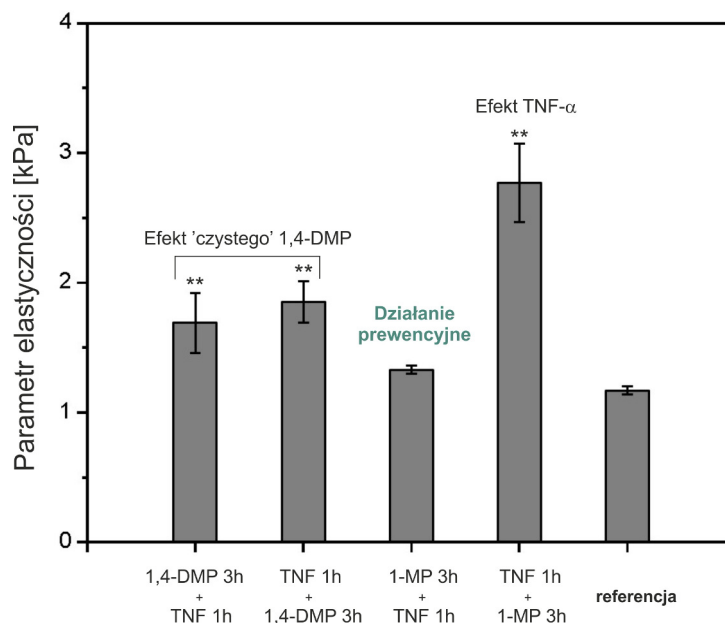
Podsumowując, dla obu soli pirydynowych zmiany elastyczności komórek są najbardziej widoczne dla dłuższych czasów inkubacji (po 6h). Wyniki nanoindentacji ostrzem AFM

zostały potwierdzone obserwacjami F-aktywności cytoszkieletu oraz wydzielania NO przez komórki zmierzonego metodą Griessa.

Dla czynnika 1,4-DMP zmierzone wartości parametru elastyczności dla obu stężeń pokazują podobną tendencję zmian elastyczności komórek, jednakże silniejszą w przypadku wyższego stężenia (0.1μM). Stanowi to potwierdzenie, że zastosowanie niższych stężeń tego związku do weryfikacji „prewencyjnego” bądź „terapeutycznego” działania wydaje się bardziej uzasadnione. Dawka 1μM czynnika 1-MP powoduje mniejsze zmiany elastyczności komórek, dlatego dalsze badanie zostało przeprowadzone dla tego stężenia.

9.4 Zmiany elastyczności komórek jako biowskaźnik do oceny „terapeutycznego”/„prewencyjnego” działania 1-MP oraz 1,4-DMP

Do analizy „terapeutycznego”/„prewencyjnego” działania badanych soli pirydynowych wybrano stężenie 1μM w przypadku 1-MP oraz 0.02μM dla 1,4-DMP. Badania zostały przeprowadzone w oparciu o wcześniej opisany model dysfunkcji śródbłonna zdefiniowany jako inkubacja komórek z cytokiną prozapalną TNF-α przez 1h. Sole pirydynowe dodawano do komórek w dwóch konfiguracjach badania przeciwzapalnego działania czynników. Na Rycinie 9.6 przedstawiono wartości parametru elastyczności dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych odpowiednio TNF-α przez 1h + 1,4-DMP/1-MP przez 3h oraz w konfiguracji odwrotnej 1,4-DMP/1-MP przez 3h + TNF-α przez 1h.



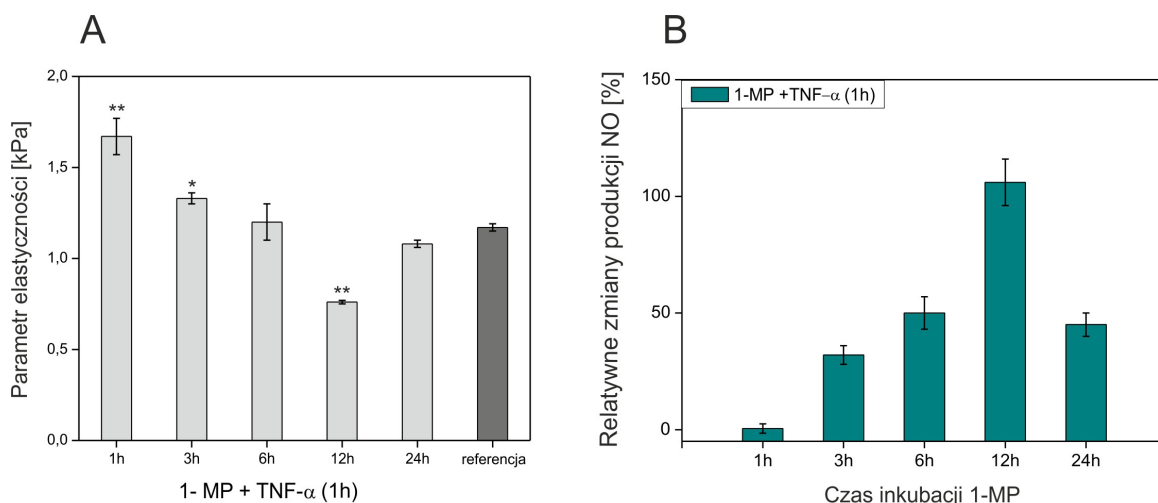
Rycina 9.6. Wartości parametru elastyczności dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z 1,4-DMP 3h + TNF-α 1h, TNF-α 1h + 1,4-DMP 3h, 1-MP 3h + TNF-α 1h, TNF-α 1h + 1-MP 3h. Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem poziomu referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) p<0.01 oraz (*) p<0.05.

Poniżej zawarto wnioski wynikające ze zmierzonych wartości parametru elastyczności:

1. w przypadku komórek inkubowanych z 1,4-DMP oraz TNF- α w obu konfiguracjach można stwierdzić, że widoczny jest efekt 'czystego' 1,4-DMP tzn. wartości parametru elastyczności są zbliżone do otrzymanych w przypadku 3h inkubacji z 1,4-DMP (Rycina 9.1),
2. dla inkubacji komórek z TNF- α przez 1h a następnie z 1-MP przez 3h otrzymano zwiększenie parametru elastyczności - efekt TNF- α , brak „terapeutycznego” działania,
3. inkubacja komórek z 1-MP przez 3h a następnie TNF- α przez 1h – wartość parametru elastyczności jak dla poziomu odniesienia, działanie zapobiegawcze.

Zaprezentowane wyniki pomiarów elastyczności komórek dla soli pirydynowych pokazały, że 1,4-DMP w stężeniu 0.02 μ M nie działa przeciwzapalnie na komórki śródbłónka w odczynie zapalnym. Interesujące okazały się wyniki 1-MP dla stężenia 1 μ M, dla którego zaobserwowano „prewencyjne” działanie tego czynnika (parametr elastyczności jak dla referencji). Badania w konfiguracji zapobiegawczej dla tego związku zostały rozszerzone o pozostałe czasy inkubacji (1, 6, 12 oraz 24h). Rozkłady parametru elastyczności dla „prewencyjnej” konfiguracji 1-MP zostały zamieszczone w załączniku (Rycina Z.17).

Na Rycinie 9.7 zaprezentowano wartości parametru elastyczności (A) oraz relatywne zmiany produkcji NO (B) dla komórek inkubowanych z 1 μ M 1-MP w konfiguracji „prewencyjnej”.



Rycina 9.7. Wartości parametru elastyczności (A) oraz relatywne zmiany produkcji NO (B) dla komórek inkubowanych z 1 μ M 1-MP dla 1, 3, 6, 12 i 24h, a następnie z TNF- α przez 1h. Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem poziomu odniesienia dla dwóch poziomów istotności oznaczonych () $p < 0.01$ oraz (*) $p < 0.05$.**

Dla czasów inkubacji z 1-MP do 12h w konfiguracji zapobiegawczej zaobserwowano stopniowe zwiększenie produkcji NO przez komórki względem poziomu referencyjnego,

a następnie spadek nadprodukcji dla 24h względem 12h. Na podstawie Ryciny 9.7A można wnioskować, że 1-MP powoduje wy tłumienie działania cytokiny prozapalnej.

Dla 3h pre-inkubacji zaobserwowano zmniejszenie parametru elastyczności, jednakże dla 6h wartość parametru elastyczności jest zbliżona jak dla poziomu odniesienia. W przypadku 12h obserwowane jest znaczne zwiększenie elastyczności komórek (wartość parametru elastyczności spada o około 30% poziomu referencyjnego), co anty-koreluje z produkcją NO (największa nadprodukcja dla 12h). Przy 24h pre-inkubacji następuje wzrost parametru elastyczności do wartości referencyjnej i zmniejszenie nadprodukcji NO względem 12h.

Podsumowując, uzyskane wyniki do weryfikacji prewencyjnego działania 1 μ M 1-MP wskazują na zapobiegawczy potencjał tego związku (wy tłumienie efektu TNF- α oraz przy 24h pre-inkubacji wartość parametru elastyczności jak dla poziomu odniesienia). Jednakże, do wyjaśnienia wewnątrzkomórkowego mechanizmu 1-MP związanego ze zmniejszeniem parametru elastyczności i silną nadprodukcją NO dla 12h należałoby zastosować dodatkowe metody badawcze.

9.5 Mechanizm działania 1-MP w konfiguracji „prewencyjnej”

Proponowany mechanizm działania 1-MP w konfiguracji „prewencyjnej” związany jest z uwalnianiem dwóch mediatorów przeciwzapalnych śródbłónka NO oraz PGI₂. Zwiększenie produkcji tlenu azotu zostało zaobserwowane w przypadku komórek inkubowanych z 1-MP we wcześniej wymienionej konfiguracji (największe w przypadku 12h inkubacji). Z drugiej strony w pracy [53] pokazano, że czynnik ten stymuluje endogenną PGI₂ w śródbłónku naczyń w warunkach *in vivo*. Regulacja prostacykliny przez komórki śródbłónka po zadziałaniu 1-MP może skutkować zwiększoną aktywnością śródbłónkowych syntaz tlenu azotu (Rycina 9.7B). Kontynuując, aktywacja eNOS skorelowana jest ze zwiększeniem miejsc wiążących (zwiększenie G-aktyny), przez co obserwowana jest depolimeryzacja F-aktyny po zadziałaniu 1-MP (Rycina 9.4). Również w przypadku wyników pomiaru elastyczności komórek otrzymano potwierdzenie działania 1-MP związane z procesami depolimeryzacji aktyn cytoszkieletu komórkowego. Niewielkie zmniejszenie parametru elastyczności w przypadku działania 1-MP dla dłuższych czasów inkubacji (Rycina 9.3) a także spadek parametru elastyczności dla 12h pre-inkubacji z tym czynnikiem potwierdzają przebudowę cytoszkieletu komórkowego obserwowaną na obrazach fluorescencyjnych.

Podsumowując, otrzymane wyniki dla chlorku 1-metylopirydyny wskazują na przeciwzapalne działanie tego związku w konfiguracji „prewencyjnej”.

9.6 Wnioski

W niniejszym rozdziale zaprezentowano charakterystykę związków chlorku 1-metylopirydyny oraz chlorku 1,4-dimetylopirydyny dla wybranych stężeń na skórnym komórkach śródbłonna ludzkiego. Uzyskane wyniki pomiaru elastyczności komórek zostały potwierdzone fluorescencyjnym wybarwianiem F-aktyny. Jako badania uzupełniające wykonano pomiar wydzielanego tlenu azotu spektrofotometryczną metodą Griessa.

Podsumowując, w prezentowanym rozdziale nanoindentacja ostrzem AFM została wykorzystana do zbadania zmian elastyczności, które stanowią bio wskaźnik do weryfikacji „terapeutycznego” oraz „prewencyjnego” działania badanych soli pirydynowych. Wstępne badania 1,4-DMP świadczą o cytotoksycznym wpływie tego związku (zwiększenie polimeryzacji G-aktyny skorelowane ze zmniejszeniem elastyczności komórek) dla wybranych stężeń: 0.02 μM, 0.1 μM. Natomiast odwrotna zależność obserwowana jest w przypadku soli pirydynowej 1-MP. Wpływ 1-MP na komórki śródbłonna można porównać do efektu uzyskanego dla simwastatyny (Rozdział 6). Dla obu tych czynników uzyskano zmniejszenie parametru elastyczności dla stężenia 1 μM, w przypadku simwastatyny dla 3h pre-inkubacji natomiast dla 1-MP po 12h. Dodatkowo, dla tego stężenia uzyskane wyniki elastyczności wskazują na zapobiegawcze działanie 1-MP, co zostało uzupełnione o pomiary tlenu azotu wydzielanego przez komórki.

Rozdział 10. Podsumowanie

Głównym zagadnieniem niniejszej pracy doktorskiej jest ocena dysfunkcji śródbłonka oraz skuteczności potencjalnych czynników śródbłonkowych za pomocą spektroskopii sił. W ostatniej dekadzie, metoda ta jest szeroko wykorzystywana w badaniach komórek oraz innych biomolekuł. Zastosowanie tej metody daje możliwość ilościowego pomiaru właściwości mechanicznych komórek. W niniejszej pracy doktorskiej zostało wprowadzone pojęcie parametru elastyczności, które opisuje elastyczność komórek zależnością - zwiększenie parametru elastyczności świadczy o zmniejszeniu elastyczności komórek. Elastyczność jest istotnym punktem badawczym w przypadku komórek śródbłonka, ze względu na ich umiejscowienie oraz funkcje jakie pełnią w organizmie ludzkim. Śródbłonek ludzki jest warstwą komórek wyścielającą naczynia krwionośne, podlega ciśnieniu wywieranemu przez przepływającą krew przez światło naczynia a także pełni funkcje transportowe substancji z krwi do tkanek położonych głębiej. Można zatem stwierdzić, że elastyczność tych komórek jest jednym z parametrów fizjologicznych określających jego prawidłowy stan. Dodatkowo, parametr ten skorelowany jest z produkcją tlenu azotu przez komórki oraz ilością F-aktyny w części korowej cytoszkieletu komórkowego [4,62].

W Rozdziale 5 przedstawiono dwustopniową odpowiedź komórek śródbłonka po zadziałaniu cytokiną prozapalną TNF- α , gdzie dla krótkich czasów inkubacji (1, 3h) otrzymano zmniejszenie elastyczności komórek oraz zmniejszenie produkcji tlenu azotu. Odwrotna sytuacja jest w przypadku dłuższych czasów inkubacji (12, 24h) zwiększenie elastyczności oraz silna nadprodukcja NO. Charakterystyka wpływu TNF- α posłużyła do zdefiniowania modelu wczesnej dysfunkcji *in vitro* jako 1h inkubację komórek w stężeniu 10ng/ml. Dodatkowo, pomiary elastyczności komórek zostały potwierdzone znakowaniem F-aktyny cytoszkieletu komórkowego i mikroskopią fluorescencyjną, gdzie w przypadku zmniejszenia elastyczności komórek (aplikacja TNF- α przez 1h) zaobserwowano tzw. „włókna naprężeniowe”.

W Rozdziale 6, na przykładzie simwastatyny została zaprezentowana metodyka diagnostyki komórek śródbłonka. W tym celu, pomiar elastyczności komórek oraz dodatkowe badania biochemiczne zostały wykorzystane do weryfikacji fizjologicznego stężenia leku (w przypadku simwastatyny 1 μ M). Wyższe stężenia (10, 100 μ M) wykazały cytotoksyczne działanie na komórki śródbłonka. Następnie, w celu identyfikacji przeciwwzapalnego działania simwastatyny wywołano odczyn zapalny komórek poprzez aplikację TNF- α .

Przeciwzapalne działanie simwastatyny oraz pozostałych potencjalnych leków zostało zbadane w dwóch konfiguracjach, gdzie aplikowano związki w następującej kolejności: TNF- α 1h + badany czynnik to tzw. „terapeutyczna” konfiguracja oraz odwrotnie: badany czynnik + TNF- α 1h - „prewencyjna”. W przypadku 1 μ M stężenia simwastatyny uzyskano przeciwzapalne działanie tego związku na komórki śródbłonna w odczynie zapalnym (wartość parametru elastyczności jak dla poziomu odniesienia).

W Rozdziale 7 zaprezentowano charakterystykę doksorubicyny i daunorubicyny w zakresie stężeń 0.1–10 μ M. Badania porównawcze DOX oraz DAU potwierdzają silniejszy efekt cytotoksyczny w przypadku zastosowania DAU na komórki śródbłonna. Doksorubicyna wywołuje zmniejszenie elastyczności komórek skorelowane z polimeryzacją G-aktyny powyżej stężenia 3 μ M, jednakże dla tej dawki oraz 5 μ M nie zaobserwowano komórek apoptotycznych. W przypadku daunorubicyny, 1 μ M stężenie powoduje zmniejszenie elastyczności, natomiast w przypadku 3 μ M i 5 μ M czynnik ten indukuje apoptozę. Podsumowując, w przypadku doksorubicyny dla najwyższych badanych (5 μ M oraz 10 μ M) stężeń zaobserwowano fazę poprzedzającą apoptozę (polimeryzacja G-aktyny), gdzie dla tych samych dawek w przypadku daunorubicyny widoczne były charakterystyczne zmiany w morfologii prowadzące do apoptozy.

W Rozdziałach 8 oraz 9 zaprezentowano wyniki oceny skuteczności potencjalnych leków śródbłonkowych. Badania przeprowadzono dla następujących czynników: chlorku 1-metylonikotynoamidu (1-MNA), chlorku 1-metylopirydyny (1-MP) oraz chlorku 1,4-dimetylopirydyny (1,4-DMP).

Badania 1-MNA (Rozdział 8) rozpoczyna porównanie wpływu tego związku dla dwóch stężeń 0.1 μ M oraz 10 μ M. Wyniki pomiaru elastyczności oraz mikroskopii fluorescencyjnej wykorzystana do zbadania F-aktyny cytoszkieletu pozwoliły na wybór stężenia 0.1 μ M, wokół którego (0.05, 0.1 oraz 0.2 μ M) zostały wykonane badania przeciwzapalnego działania na komórkach w odczynie zapalnym we wcześniej zdefiniowanych konfiguracjach. „Terapeutyczne” oraz „prewencyjne” działanie tego związku zostało pokazane dla inkubacji 3h w dawce 0.1 μ M. Pomiar elastyczności uzupełniony o pomiary biochemiczne (wydzielanie prostacykliny, pomiar NO, pomiar wapnia wewnątrzkomórkowego, wybarwienie F-aktyny) pozwala na zdefiniowanie mechanizmu działania tego związku, który może tłumaczyć działanie tego czynnika *in vitro* oraz *in vivo*.

W Rozdziale 9 zaprezentowano charakterystykę wpływu soli pirydyniowych 1-MP (0.1 μ M, 1 μ M) oraz 1,4-DMP (0.02 μ M, 0.1 μ M) na komórki śródbłonna. Otrzymano, że czynniki te działają przeciwstawnie, w przypadku 1-MP występuje zwiększenie elastyczności komórek oraz depolimeryzacją F-aktyny, natomiast dla 1,4-DMP zaobserwowano polimeryzację aktyn i zmniejszenie elastyczności. Dodatkowo, w rozdziale tym

zaprezentowano „prewencyjne” działanie 1-MP na komórki śródbłonka w dawce $1\mu\text{M}$. Z drugiej strony związek 1,4-DMP nie wykazuje działania przeciwzapalnego w zakresie badanych stężeń (0.02 , $0.1\mu\text{M}$). Zaprezentowane wyniki stanowią prezentację metodyki do oceny skuteczności potencjalnych czynników śródbłonkowych.

Na podstawie wyników dla simwastatyny, leku który stanowi referencję dla przeprowadzonych badań, można wysunąć wniosek, że opracowana, nowatorska metodyka pozwala na wiarygodne testowanie działania potencjalnych leków na poziomie pojedynczych komórek. Diagnostyka komórek śródbłonka za pomocą spektroskopii sił może stanowić uzupełnienie i rozszerzenie badań śródbłonka *in vivo*. Zaproponowana metodyka została wykorzystana w niniejszej pracy doktorskiej do zbadania wpływu potencjalnych leków śródbłonkowych: 1-MP, 1,4-DMP i 1-MNA. W przypadku 1-MNA oraz 1-MP otrzymano wyniki wskazujące na istotny potencjał tych czynników w przypadku komórek w odczynie zapalnym.

Streszczenie

Choroby układu sercowo-naczyniowego, w tym choroby krążenia, w ostatniej dekadzie stanowią największą przyczynę umieralności na świecie. W celu zmniejszenia umieralności powodowanej tymi chorobami oraz poprawienia skuteczności ich leczenia poszukiwane są nowe metody badawcze, które umożliwią badanie śródbłonna *in vivo* oraz *in vitro*.

Niniejsza praca doktorska stanowi opracowanie nowej metodyki badania dysfunkcji śródbłonna oraz testowania potencjalnych leków o działaniu śródbłonkowym. Obejmuje ona pomiar elastyczności komórek za pomocą spektroskopii sił uzupełniony o pomiary biochemiczne (pomiar tlenu azotu, stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego, wydzielania prostacykliny oraz znakowania F-aktyny cytoszkieletu komórkowego). Metodyka badania skuteczności leków *in vitro* złożona jest z kilku etapów. Najpierw wykonano charakterystykę dysfunkcji śródbłonna wywołanej czynnikiem martwicy nowotworów (TNF- α), co posłużyło do zdefiniowania modelu odczynu zapalnego. Kolejno weryfikację przeciwzapalnego działania związków dokonywano na komórkach śródbłonna w dwóch konfiguracjach, „terapeutycznej” – gdzie określano wpływ potencjalnych leków na komórki w odczynie zapalnym oraz „prewencyjnej” – gdzie badano zdolność wywołania odczynu zapalnego cytokiną TNF- α na komórkach pre-inkubowanych z potencjalnymi lekami. Skuteczność zaproponowanej metodyki została zaprezentowana na przykładzie simwastatyny – powszechnie stosowanego leku w przypadku chorób układu sercowo-naczyniowego. Metodykę testowania potencjalnych leków o działaniu śródbłonkowym wykorzystano do weryfikacji przeciwzapalnego działania soli pirydynowych: chlorku 1-metylopirydyny (1-MP), chlorku 1-metylonikotynoamidu (1-MNA) oraz chlorku 1,4-dimetylopirydyniowego (1,4-DMP). Uzyskane wyniki potwierdzają przeciwzapalne działanie 1-MNA w obu konfiguracjach, 1-MP w konfiguracji prewencyjnej oraz brak przeciwzapalnego działania w przypadku 1,4-DMP dla wybranych stężeń.

Na przykładzie wyników uzyskanych dla zbadanych substancji można stwierdzić, że opracowana procedura badania skuteczności potencjalnych leków stanowi doskonałe narzędzie diagnostyczne śródbłonna *in vitro*. Pomiar elastyczności komórek za pomocą spektroskopii sił dostarcza informacji o właściwościach mechanicznych, które w przypadku śródbłonna są ściśle powiązane z parametrami biochemicznymi (NO, PGI₂, Ca²⁺) oraz mogą stanowić biopskaźnik fizjologicznego stanu komórek.

Abstract

Over the last decade cardiovascular system diseases, including circulatory diseases, are the largest cause of the mortality in the world. In order to reduce mortality caused by above mentioned diseases and to improve the effectiveness of their treatment new investigation methods of endothelium *in vivo* and *in vitro* have to be developed. Endothelial cells, similar to muscle, or red blood cells, undergo constant squeezing and stretching from the environment due to their function and localization. Therefore, the elasticity of endothelial cells plays a key role in the maintenance of proper blood vessel flow, vascular pressure regulation, and other endogenous functions.

This thesis focuses on the development of a new methodology for the study of endothelial dysfunction and testing prospective endothelium-targeted agents. It covers measurement of cell elasticity using atomic force spectroscopy complemented with biochemical analyses (nitric oxide production and concentration of intracellular calcium measurements, release of prostacyclin and labeling of F-actin fibers). The proposed methodology of drug testing *in vitro* consists of several stages. Firstly, the characterization of endothelial inflammation induced by tumor necrosis factor (TNF- α) was performed, which allows to define the dysfunction model of the endothelial cells. Subsequently, verification of anti-inflammatory effects of the compounds was carried out on endothelial cells in two configurations, "therapeutic" and "preventive". The first configuration was aimed to evaluate the effect of prospective drugs on the inflamed cells. The "preventive" one was targeted on the inability of inflammation induction by the cytokine TNF- α on the cells pre-incubated with prospective drugs. The effectiveness of the proposed methodology was proved based on simvastatin - a drug commonly used for the cardiovascular system diseases. Methodology of testing prospective endothelial drugs was used to verify the anti-inflammatory action of the pyridine salts: 1-methylpyridinium chloride (1-MP), 1-methylnicotinamide chloride (1-MNA) and 1,4-dimethylpyridinium chloride (1,4-DMP). Obtained results confirmed anti-inflammatory effect of 1-MNA in both configurations, 1-MP in the preventive one, and no anti-inflammatory effect in the case of 1,4-DMP for selected concentrations.

Based on the obtained results it can be concluded that the elaborated procedure for testing efficacy of prospective drugs can be a perspective diagnostic tool of endothelium *in vitro*. Cell elasticity measurements by atomic force spectroscopy provide information on the mechanical properties which, in the case of endothelium are closely linked to biochemical parameters (NO, PGI₂, Ca²⁺). Concluding, cell elasticity changes may serve as bio-indicator of the cell physiological state.

Bibliografia

- [1] Cappella B, Dietler G, Force distance curves by atomic force microscopy. *Surf. Sci. Rep.* 1999; 34: 1-104
- [2] Targosz – Korecka M, Biedron R, Szczygiel AM, Stiffness changes of tumor HEP2 cells correlates with the inhibition and release of TRAIL-induced apoptosis pathways. *J. Mol. Recognit.* 2012; 25: 299–308
- [3] Zuk A, Targosz – Korecka M, Szymonski M, Effect of selected drugs used in asthma treatment on morphology and elastic properties of red blood cells. *International Journal of Nanomedicine* 2011; 6: 249–257
- [4] Szczygiel AM, Brzezinka G, Targosz-Korecka M, Chlopicki S, Szymonski M, Elasticity changes anti-correlate with NO production for human endothelial cells stimulated with TNF- α . *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2011; 463(3): 487-96
- [5] Kusche-Vihrog K, Sobczak K, Bangel N, Wilhelmi M, Nechyporuk-Zloy V, Schwab A i wsp., Aldosterone and amiloride alter ENaC abundance in vascular endothelium. *Cell and Molecular Physiology, Pflugers Arch - Eur J Physiol* 2008; 455: 849–857
- [6] Oberleithner H, Peters W, Kusche-Vihrog K, Korte S, Schillers H, Kliche K i wsp., Salt overload damages the glycocalyx sodium barrier of vascular endothelium. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 2011; 462: 519–528
- [7] Oberleithner H, Riethmullera C, Schillers H, Graham AMG, de Wardener HE, Hausberg M, Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *PNAS* 2007; 104(41): 16281–16286
- [8] Oberleithner H, Riethmuller C, Ludwig T, Hausberg M, Schillers H, Aldosterone remodels human endothelium. *Acta Physiol* 2006; 187: 305–312
- [9] Oberleithner H, Callies C, Kusche-Vihrog K, Schillers H, Shahin V, Riethmüller C i wsp., Potassium softens vascular endothelium and increases nitric oxide release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106(8): 2829–34
- [10] Wnuczko K, Szczepański M, Śródbłonek – charakterystyka i funkcje. *Pol. Merk. Lek.* 2007, XXIII, 133: 60-65
- [11] Lüscher T, Barton M, Biology of endothelium. *Clin Cardiol* 1997; 20: II-3–II-10
- [12] Pasiński T, Gaciong Z, Rozwój i regresja miażdżycy, *Angiologia (50-58)*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2004
- [13] Obońska K, Grąbczewska Z, Fisz J, Kubica J, Cukrzyca i dysfunkcja śródbłonek— krótkie spojrzenie na złożony problem. *Folia Cardiologica Excerpta* 2011, 6(2): 109–116
- [14] Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, Waldhausl W, High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1995; 44: 1323–1327

- [15] Cagliero E, Maiello M, Boeri D, Roy S, Lorenzi M, Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. *J. Clin. Invest.* 1988; 82: 735–738
- [16] McGinn S, Saad S, Poronnik P, Pollock CA, High glucose- -mediated effects on endothelial cell proliferation occur via p38 MAP kinase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003; 285: E708–E717
- [17] Graier WF, Grubenthal I, Dittrich P, Wascher TC, Kostner GM, Intracellular mechanism of high D-glucose-induced modulation of vascular cell proliferation. *Eur J Pharmacol* 1995; 294: 221–229
- [18] Maiello M, Boeri D, Podesta F i wsp., Increased expression of tissue plasminogen activator and its inhibitor and reduced fibrinolytic potential of human endothelial cells cultured in elevated glucose. *Diabetes* 1992; 41: 1009–1015
- [19] Kofler S, Nickel T, Weis M, The role of cytokines in cardiovascular diseases: focus on endothelial response to inflammation. *Clin Sci* 2005; 108: 205–213
- [20] Boulbou MS, Koukoulis GN, Makri ED, Petinaki EA, Gourgoulis KI, Germenis AE Circulating adhesion molecules levels in type 2 diabetes mellitus and hypertension. *Int. J. Cardiol.* 2005; 98: 39–44
- [21] Aird WC, Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1392-1406
- [22] Chłopicki S, *Kardiologia po Dyplomie* 2005, 4(5): 77-88
- [23] Caprio M, Newfell BG, la Sala A, Baur W, Fabbri A, Rosano G i wsp., Functional mineralocorticoid receptors in human vascular endothelial cells regulate intercellular adhesion molecule-1 expression and promote leukocyte adhesion. *Circ Res* 2008, 102(11): 1359–1367
- [24] Deshpande S, Angkeow P, Huang J, Ozaki M, Irani K, Rac1 inhibits TNF- α -induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species. *The FASEB Journal* 2000, 14: 1705-1714
- [25] WHO Raport, <http://www.who.int/research/en/> (odczyt z dn. 20 czerwca 2013r.)
- [26] Główny Urząd Statystyczny, Podstawowe informacje o rozwoju demograficznym Polski do 2012 roku, <http://www.stat.gov.pl/> (odczyt z dn. 20czerwca 2013r.)
- [27] Sławińska A, Kandefer-Szerszeń M, The anticancer properties of statins. *Postepy Hig Med Dosw* 2008; 62: 393-404
- [28] Kumar B, Cole WC, Prasad KN, Alpha tocopheryl succinate, retinoic acid and polar carotenoids enhanced the growth-inhibitory effect of a cholesterol-lowering drug on immortalized and transformed nerve cells in culture. *J. Am. Coll. Nutr.* 2001; 20: 628–636
- [29] Moghadasian MH, Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sci.* 1999; 65: 1329–1337

- [30] Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F, Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 2005; 26: 883–891
- [31] Dimitroulakos J, Ye LY, Benzaquen M, Moore MJ, Kamel-Reid S, Freedman MH, Yeger H, Penn LZ, Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin induced apoptosis: therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 158–167
- [32] Feleszko W, Młynarczuk I, Nowis D, Correspondence *in vitro* antitumor activity of cerivastatin, a novel and potent HMG-CoA reductase inhibitor. *Febs. Lett.* 2001; 503: 219–220
- [33] Jones KD, Couldwell WT, Hinton DR, Su Y, He S, Anker L i wsp., Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 205: 1681–1687
- [34] Wong W, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ, HMG-CoA reductase inhibitors and malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 2002; 16: 508–519
- [35] Zhong WB, Wang CY, Chang TC, Lee WS, Lovastatin induces apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells via inhibition of protein geranylgeranylation and *de novo* protein synthesis. *Endocrinology* 2003; 14: 3852–3859
- [36] Muller C, Bockhorn AG, Klusmeier S, Kiehl M, Roeder C, Kalthoff H, Koch OM, Lovastatin inhibits proliferation of pancreatic cancer cell lines with mutant as well as with wild-type K-ras oncogene but has different effects on protein phosphorylation and induction of apoptosis. *Int. J. Oncol.* 1998; 12: 717–723
- [37] Kozłowski D, Simwastatyna – statyną o optymalnym stosunku skuteczności i bezpieczeństwa dla pacjentów wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego. *Geriatrics* 2011; 5: 139-154
- [38] Kulawiak-Gałaska D, Mechanizmy wolnorodnikowego działania doksorubicyny w układach biologicznych, Rozprawa doktorska, Gdańsk 2006
- [39] Deptała A, Omyła-Staszewska J, Staszewska-Skurczyńska M, Kardioprotekcja antracyklin i kardioprotekcja. *Fakty i mity. Współcz Onkol* 2004, 8(2): 107–111
- [40] Słomińska E M, Metabolity nikotynamidu i ich rola w fizjologii i patologii człowieka, Rozprawa habilitacyjna, Gdańsk 2009
- [41] Gebicki J, Sysa-Jedrzejowska A, Adamus J, Wozniacka A, Rybak M, Zielonka J, 1-Methylnicotinamide: a potent anti-inflammatory agent of vitamin origin. *Pol J Pharmacol* 2003; 55:109 –112
- [42] Tamulevicius P, Streffer C, N-methylnicotinamide as a possible prognostic indicator of recovery from leukaemia in patients treated with total-body irradiation and bone marrow transplants. *Strahlentherapie* 1984; 160: 249-254
- [43] Wozniacka A, Wieczorkowska M, Gebicki J, Sysa-Jedrzejowska A, Topical application of 1-methylnicotinamide in the treatment of rosacea : a pilot study. *Clinical and Experimental Dermatology* 2005; 30: 632 – 635

- [44] Bryniarski K, Biedron R, Jakubowski A, Chlopicki S, Marcinkiewicz J, Anti-inflammatory effect of 1-methylnicotinamide in contact hypersensitivity to oxazolone in mice; involvement of prostacyclin. *European Journal of Pharmacology* 2008; 578: 332–338
- [45] Chlopicki S, Swies J, Mogielnicki A, Buczek W, Barus M, Lomnicka M et al. 1-Methylnicotinamide (1-MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by acyclooxygenase-2/prostacyclin pathway. *British Journal of Pharmacology* 2007; 52: 230-39
- [46] Schumacher WA, Steinbacher TE, Heran CL, Megill JR, Durham SK, Effects of antithrombotic drugs in a rat model of aspirininsensitive arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 1993; 69: 509–514
- [47] Domagala TB, Szeffler A, Dobrucki LW, Dropinski J, Polanski S, Leszczynska-Wiloch M i wsp., Nitric Oxide Production and Endothelium-Dependent Vasorelaxation Ameliorated by N1-Methylnicotinamide in Human Blood Vessels. *Hypertension* 2012; 59(4): 825-32
- [48] Bartus, M, Lomnicka M, Kostogrys R, Kazmierczak P, Watala C, Slominska EM i wsp., 1-Methylnicotinamide (1-MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats. *Pharmacol. Rep.* 2008; 60: 127-138
- [49] Pasquariello G, Research on the typtophan-nicotinic acid pathway in diabetes mellitus. *Acta Vitaminol. Enzymol.* 1964; 18: 225-234
- [50] Thomas MC, Tikellis, C, Burns WC, Thallas V, Forbes JM, Cao Z i wsp., Reduced tubular cation transport in diabetes: prevented by ACE inhibition. *Kidney Int.* 2003; 63: 2152-2161
- [51] Gosteli J, Nicotinamide trials in diabetes intervention. Does a metabolite provide benefit? *Med. Hypotheses* 2005; 64: 1062-1063
- [52] Xu J, Moatamed F, Caldwell JS, Walker JR, Kraiem Z, Taki K wsp., Enhanced expression of nicotinamide N-methyltransferase in human papillary thyroid carcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2003; 88: 4990-4996
- [53] Xu, J, Hershman JM, Histone deacetylase inhibitor depsipeptide represses nicotinamide N-methyltransferase and hepatocyte nuclear factor-1beta gene expression in human papillary thyroid cancer cells. *Thyroid* 2006; 16: 151-160
- [54] Nakagawa K, Miyazaki M, Okui K, Kato N, Moriyama Y, Fujimura S, N1-methylnicotinamide level in the blood after nicotinamide loading as further evidence for malignant tumor burden. *Jpn. J. Cancer Res.* 1991; 82: 1277-1283.
- [55] Gębicki J, Marcinek A, Chłopicki S, Adamus J, Zastosowanie pochodnych N-metylopirydyniowych do hepatoprotekcji. *Europejski Biuletyn Patentowy* 2012; EP 2124946 B1
- [56] Gryglewski RJ, Korbut R, Ocetkiewicz A, Stachura J. *In vivo* method for quantitation for anti-platelet potency of drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1978; 302: 25-30
- [57] Stadler R, *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 1192-1199, 1200-1206
- [58] Carl P, Schillers H, Elasticity measurement of living cells with an atomic force microscope: data acquisition and processing. *Pflügers Arch* 2008; 457(2): 551–559
- [59] Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, Garland Science 2002

- [60] Petrache I, Verin AD, Crow MT, Birukova A, Liu F, Garcia JG, Differential effect of MLC kinase in TNF- α -induced endothelial cell apoptosis and barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: L1168-L1178
- [61] Searles C, Ide L, Davis ME, Cai H, Weber M, Actin Cytoskeleton Organization and Posttranscriptional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase During Cell Growth. *Circulation Research* 2004; 95: 488-495
- [62] Radmacher M, Fritz M, Kacher CM, Cleveland JP, Hansma PK, Measuring the Viscoelastic Properties of Human Platelets with the Atomic Force Microscope. *Biophysical Journal* 1996; 70: 556-567
- [63] Sato H, Kataoka N, Kajiyama F, Katano M, Takigawa T, Masuda T, Kinetic study on the elastic change of vascular endothelial cells on collagen matrices by atomic force microscopy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2004; 34: 141-146
- [64] Kataoka N, Iwaki K, Hashimoto K, Mochizuki S, Ogasawara Y, Sato M i wsp., Measurements of endothelial cell-to-cell and cell-to-substrate gaps and micromechanical properties of endothelial cells during monocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 15638-15643
- [65] Mathur AB, Collinsworth AM, Reichert WM, Kraus WE, Truskey GA, Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *J. Biomech.* 2001; 34: 1545-1553
- [66] Mathur AB, Truskey GA, Reichert WM, Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells. *Biophys. J.* 2000; 78: 1725-1735
- [67] Ari Karchin, Mechanical Properties of Biomaterials. University of Washington 2004; <http://www.uweb.engr.washington.edu/research/tutorials/mechproperties.html> (odczyt z dn. 23 czerwca 2013r.)
- [68] Kasas S, Dietler G, Probing the nanomechanical properties of viruses, cells and cellular structures, Dufrene Y (red), *Life At the Nanoscale* (335-352), Pan Stanford Publishing 2011
- [69] Lekka M, Laidler P, *Mikroskop Sił Atomowych (AFM)*, Barciszewski J, Koroniak H (red), *Na pograniczu chemii i biologii Tom XII* (569-592), Wydawnictwo Naukowe UAM 2005
- [70] Dimitriadis EK, Horkay F, Maresca J, Kachar B, Chadwick RS, Determination of Elastic Moduli of Thin Layers of Soft Material Using the Atomic Force Microscope. *Biophysical Journal* 2002; 82: 2798-2810
- [71] Lekka M, Atomic force microscopy: A tip for diagnosing cancer. *Nature Nanotechnology* 2012; 7: 691-692
- [72] Hertz H, Über die berührung fester elastischer Körper. *Journal für die reine und angewandte mathematik. J Reine Angew Math* 1881; 92: 156-171
- [73] Sneddon IN, The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int J Eng Sci* 1965; 3(1): 47-57
- [74] Sokolov I, Dokukin ME, Guz NV, Method for quantitative measurements of the elastic modulus of biological cells in AFM indentation experiments. *Methods* 2013; 60: 202-213

- [75] Villarrubia JS, Algorithms for Scanned Probe Microscope, Image Simulation, Surface Reconstruction and Tip Estimation. *J. Nat. Inst. Stand. and Technol.* 1997; 102: 435-454
- [76] Williams PM, Shakesheff KM, Davies MC, Jackson DE, Roberts CJ, Blind reconstruction of scanning probe image data. *JVST B* 1996; 14(2): 1557-62
- [77] Schäffer TE, Calculation of thermal noise in an atomic force microscope with a finite optical spot size. *Nanotechnology* 2005; 16(6): 664-670
- [78] Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ, Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988; 141(7): 2407-2412
- [79] Sokołowska S, *Hodowla komórek i tkanek*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004
- [80] Sokołowska M, Włodek L, Dobre i złe strony tlenu azotu. *Folia Cardiol.* 2001; 8(5): 467-477
- [81] Fels J, Callies C, Kusche-Vihrog K, Oberleithner H. Nitric oxide release follows endothelial nanomechanics and not vice versa. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2010; 460(5): 915-923
- [82] Su Y, Edwards B, Bubbs S, Michael R, Block E, Regulation of endothelial nitric oxide synthase by the actin cytoskeleton. *Am J Cell Physiol* 2003; 284(6): C1542- C1549
- [83] Nowak JM, Grzanka A, Żuryń A, Stępień A, Rodzina białek Rho i ich rola w cytoszkielecie komórki. *Postępy Hig Med Dosw* 2008; 62: 110-117
- [84] Wójciak-Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley A, Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1998; 176(1): 150-65
- [85] Skierski J, Badanie działania cytotoksycznego substancji chemicznych. *Postępy biologii komórki* 2008; 35(24): 147-163
- [86] Pelling AE, Veraitch FS, Pui-Kei Chu C, Mason C, Horton MA, Mechanical Dynamics of Single Cells During Early Apoptosis. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 2009; 66: 409-422
- [87] Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Kang-Hyeon C, Cool C, Simvastatin causes endothelial cell apoptosis and attenuates severe pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 29: L668-L676
- [88] Blanco-Colio LM, Villa A, Ortego M, Hernandez-Presa MA, Pascual A I wsp., 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* 2002; 161: 17-26
- [89] Soo-Jeong C, Sung Kim J, Mogg Kim J, Yeul Lee J, Chae Jung H, Sung Song I, Simvastatin induces apoptosis in human colon cancer cells and in tumor xenografts, and attenuates colitis-associated colon cancer in mice. *Int J Cancer* 2008; 123: 951-957
- [90] Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, James K, Suppression of Endothelial Nitric Oxide Production After Withdrawal of Statin Treatment Is Mediated by Negative Feedback Regulation of Rho GTPase Gene Transcription. *Circulation* 2000; 102: 3104-3110

- [91] Helewski K, Kowalczyk-Ziomek G, Konecki J, Apoptoza i martwica – dwie drogi do jednego celu. *Wiadomości Lekarskie* 2006; LIX: 9–10
- [92] Duncan RE, El-Soheemy A, Archer MC, Mevalonate promotes growth of tumors derivated from human cancer cells *in vivo* and stimulates proliferation *in vitro* with enhanced cyclin-dependent kinase-2 activity. *J Biol Chem* 2004; 279: 33079–33084
- [93] Fernandez C, Lobo M, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA, Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces poliploid cell formation. *Exp. Cell. Res.* 2004; 300: 109–120
- [94] Mehta N, Hordines J, Volpe C, Doerr R, Cohen SA, Cellular effects of hypercholesterolemia in modulation of cancer growth and metastasis: a review of the evidence. *Surg. Oncol.* 1997; 6: 179–185
- [95] Sutter AP, Maaser K, Hopfner M, Hopfner A, Schuppan D, Scherubl H, Cell cycle arrest and apoptosis induction in hepatocellular carcinoma cells by HMG-CoA reductase inhibitors. Synergistic antiproliferative action with ligands of the peripheral benzodiazepine receptor. *J. Hepatol.* 2005; 43: 808–816
- [96] van de Donk NW, Kamphuis MM, van Kessel B, Lokhorst HM, Bloem AC, Inhibition of protein geranylgeranylation induces apoptosis in myeloma plasma cells by reducing Mcl-1 protein levels. *Blood* 2003; 102: 3354–3362
- [97] Podhorecka M, Halicka D, Klimek P, Kowal M, Chocholska S, Dmoszynska A, Simvastatin and purine analogs have a synergic effect on apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Ann Hematol.* 2010; 89(11): 1115–24
- [98] Sleijfer S, Van der Gaast A, Planting AS, Stoter G, Verweij J, The potential of statins as part of anti-cancer treatment. *Eur. J. Cancer* 2005; 41: 516–522
- [99] Zhu Y, Casey PJ, Kumar AP, Pervaiz S, Deciphering the signaling networks underlying simvastatin-induced apoptosis in human cancer cells: evidence for non-canonical activation of RhoA and Rac1 GTPases. *Cell Death and Disease* 2013; doi: 10.1038/cddis.2013.103
- [100] Feng C, Ye C, Liu X, Ma H, Li M, α_4 integrin in statin-induced endothelial cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 323: 858–864
- [101] Denoyelle C, Albanese P, Uzan G, Hong L, Vannier JP, Soria J, Soria C, Molecular mechanism of the anti-cancer activity of crivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, on aggressive human breast cancer cells. *Cell Signal.* 2003; 15: 327–338
- [102] Jones KD, Couldwell WT, Hinton DR, Su Y, He S, Anker L, Law RE, Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994; 205: 1681–1687
- [103] Arnaud C, Braunersreuther V, Mach F, Toward immunomodulatory and anti-inflammatory properties of statins. *Trends Cardiovasc. Med.* 2005; 15: 202–206
- [104] Mach F, Statins as immunomodulators. *Transpl. Immunol.* 2002; 9:197–200
- [105] Nubel T, Dippold W, Kleinert H, Kaina B, Fritz G, Lovastatin inhibits rho regulated expression of E selectin by TNF- α and attenuates tumor cell adhesion. *FASEB J.* 2004; 18: 140–142

- [106] Mason RP, Walter MF, Jacob RF, Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on endothelial function: role of microdomains and oxidative stress. *Circulation*. 2004; 109(21): II34-41.
- [107] Lev S, Gilburd B, Lahat N, Shoenfeld Y, Prevention of tumor spread by matrix metalloproteinase-9 inhibition: old drugs, new concept. *Eur. J. Intern. Med.* 2002; 13: 101–103
- [108] Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK, Suppression of invasion and MMP-9 expression in NIH 3T3 and v-H-Ras 3T3 fibroblasts by lovastatin through inhibition of ras isoprenylation. *Oncology* 2000; 59: 245–254
- [109] Hagmann J, Burger MM, Dagan D, Regulation of plasma membrane blebbing by the cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.* 1999; 73: 488–499
- [110] Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN, Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J. Cell Biol.* 1998; 140: 627–636
- [111] Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF, Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 1984; 226: 446–468
- [112] Drlica K, Franco RJ, Inhibitors of DNA topoisomerases. *Biochemistry* 1988; 27: 2253-2259
- [113] Spadari S, Arcamone F, DNA polymerase and DNA topoisomerase as a targets for the development of anticancer drugs. *Anticancer Res.* 1986; 6: 935–940
- [114] Beraldo H, Garnier-Suillerot A, Tosi L, Lavelle F, Iron(III)-adriamycin and Iron(III)-daunorubicin complexes: physicochemical characteristics, interaction with DNA, and antitumor activity. *Biochemistry* 1985; 24(2): 284–9
- [115] Booser DJ, Hortobagyi GN, Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. *Drugs* 1994; 47(2): 223–58
- [116] Łuszczewski A, Matyska-Piekarska E, Trefler J, Wawer I, Łącki J, Śliwińska-Stańczyk P, Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu. *Reumatologia* 2007; 45(5): 284–289
- [117] Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL, Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2012; 52: 1213–1225
- [118] Fleming I, Busse R, Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovascular research* 1999; 43: 532–541

Spis rycin

Rycina 2.1. Przekrój poprzeczny prawidłowo zbudowanej tętnicy (A) oraz tętnicy zwężonej przez blaszki miażdżycowe (B) [12].	12
Rycina 2.2. Udział CVD w całkowitej liczbie zgonów [%] w latach 1990, 1995, 2000, 2005 i 2007 [25].	15
Rycina 2.3. Przyczyny umieralności w Polsce w latach 1990, 2000, 2005, 2010 i 2011 wyrażone w % [26].	16
Rycina 2.4. Wzory strukturalne wybranych statyn.	17
Rycina 2.5. Wzory strukturalne odpowiednio daunorubicyny (A) oraz doksorubicyny (B).	18
Rycina 2.6. Wzory strukturalne badanych substancji: chlorku 1-metylonikotynamidu (A), chlorku 1-metylopirydyny (B), chlorku 1,4-dimetylopirydyny (C).	19
Rycina 3.1. Krzywa naprężenie – odkształcenie dla materiałów biologicznych [67].	25
Rycina 3.2. Schemat układu pomiarowego ostrze – próbka (A). Oznaczenia: Z – względne przesunięcie skanera, Z_k - względne przesunięcie skanera w momencie styku ostrza z próbką, Δd - ugięcie dźwigni, δ – odkształcenie próbki.	26
Rycina 3.3. Schemat odkształcenia miękkiej próbki na skutek działania sztywnej sfery [70].	28
Rycina 5.1. Obrazy AFM topografii komórek (30 μ m x 30 μ m): kontrolnej (A) oraz inkubowanych z TNF- α odpowiednio przez 1, 3, 6, 12 i 24h (B-F).	46
Rycina 5.2. Wartości pola powierzchni i objętości części centralnych komórek (A) oraz wydłużenia i wysokości komórek (B) po dodaniu cytokiny prozapalnej na ustalone czasy inkubacji (średnia arytmetyczna \pm SD).	47
Rycina 5.3. Obrazy fluorescencyjne znakowanej F-aktywny cytoszkieletu komórkowego dla komórek referencyjnych (A) oraz inkubowanych z TNF- α przez 1, 3, 6, 12 i 24h (B-F). Strzałki 1 i 3 prezentują pogrubione włókna F-aktywny układające się wzdłuż głównej osi komórki, natomiast strzałki 2 i 4 pogrubienie włókien na brzegach komórek. Na obrazach D-F widoczna depolimeryzacja włókien, gdzie zaznaczono pojedyncze, skrócone włókna F-aktywny - strzałki 5-7 oraz całkowitą depolimeryzację - strzałka 8. Skala: 20 μ m.	48
Rycina 5.4. Relatywne zmiany parametru elastyczności oraz produkcji NO dla linii komórkowej EA.hy926 (A) oraz HMEC (B) dla inkubacji z TNF- α przez 1, 3, 6, 12 i 24h. (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$.	50
Rycina 5.5. Wartości parametru elastyczności dla komórek referencyjnych, inkubowanych z TNF- α przez 12 oraz TNF- α 12h + L-name 1h. (**) $p < 0.01$.	51
Rycina 5.6. Schemat przedstawiający zależności pomiędzy zmierzonymi parametrami. Podsumowanie działania TNF- α dla stężenia 10ng/ml i ustalonych czasach inkubacji.	52
Rycina 6.1. Wartości parametru elastyczności dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z simwastatyną (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) dla 24h (A) oraz inkubowanych z simwastatyną (1 μ M) dla różnych czasów inkubacji (B). (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$.	54
Rycina 6.2. Obrazy optyczne komórek śródbłonna: referencyjnych (A) oraz inkubowanych z simwastatyną w dawkach 1 μ M (B), 10 μ M (C) oraz 100 μ M (D). Skala: 50 μ m.	55
Rycina 6.3. Obrazy fluorescencyjne komórki śródbłonna inkubowanych z simwastatyną w dawce 10 μ M (A) oraz 100 μ M (B) znakowanych aneksyną V (zielona fluorescencja) oraz jodkiem propidyny (czerwona fluorescencja). Skala dla A: 10 μ m, B: 50 μ m.	56
Rycina 6.4. Średnia wartość metabolitu prostacykliny (A) oraz intensywności fluorescencji Fluo4 (B) (średnia \pm SD).	58
Rycina 6.5. Wartości parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z simwastatyną w dwóch konfiguracjach: terapeutycznej oraz protekcyjnej dla dwóch stężeń 1 μ M (ciemny szary) oraz 0.1 μ M (zaznaczono na niebiesko). Zaprezentowano również wartości parametru	

elastyczności otrzymane dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z cytokiną TNF- α przez 1h. (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$.	59
Rycina 6.6. Schemat odczynu zapalnego wywołanego zwiększonym stężeniem cholesterolu [106].	62
Rycina 7.1. Wartości parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z doksorubicyną oraz daunorubicyną przez 24h w następujących stężeniach 0.1, 1, 3, 5 oraz 10 μ M.	65
Rycina 7.2. Obrazy fluorescencyjne znakowanej F-aktyny komórek referencyjnych (A) oraz inkubowanych z DOX przez 24h w stężeniach 1 μ M (B), 5 μ M (C) i 10 μ M (D). Czerwone strzałki wskazują pogrubione włókna F-aktyny, białe – komórki apoptotyczne. Skala: 20 μ m.	66
Rycina 7.3. Obrazy fluorescencyjne znakowanej F-aktyny komórek referencyjnych (A) oraz inkubowanych z DAU przez 24h w stężeniach 1 μ M (B), 5 μ M (C) i 10 μ M (D). Czerwone strzałki wskazują pogrubione włókna F-aktyny, białe strzałki – komórki apoptotyczne. Skala: 20 μ m.	67
Rycina 7.4. Schemat przedstawiający działanie DOX [116] Oznaczenia: ROS - reaktywne formy tlenu, DOX - doksorubicyna, DOXOL - doksorubicynol, DOXq - półchinon doksorubicyny, Casp 3 - kaspaza 3, CytC - cytochrom C, Bax - białko z rodziny Bcl-2 związane z X ER - siateczka sarkoplazmatyczna, Ca ²⁺ - jony wapnia, Fe ²⁺ oraz Fe ³⁺ - jony żelaza, O ₂ ⁻ - anionorodnik ponadtlenkowy, O ₂ - cząsteczka tlenu, NADPH - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, NADP ⁺ - forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowy.	69
Rycina 8.1. Wartości parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z 1-MNA dla dwóch stężeń 10 μ M (kolor szary) oraz 0.1 μ M (niebieski). Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) $p < 0.01$ oraz (*) $p < 0.05$.	70
Rycina 8.2. Obrazy fluorescencyjne komórek znakowanych Alexą Fluor 488: referencja (A) oraz komórek inkubowanych z 1-MNA 0.1 μ M dla 12h (B) oraz 24h (C) oraz 10 μ M (D, E) dla tych samych czasów inkubacji. Strzałki 1-3 wskazują pogrubione włókna aktynowe. Skala: 50 μ m.	71
Rycina 8.3. Relatywne zmiany parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z TNF- α (A), TNF- α (1h) + 1-MNA (1, 3, 6, 12 i 24h) dla 0.05 μ M (B), 0.1 μ M (C) oraz 0.2 μ M (D). Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) $p < 0.01$ oraz (*) $p < 0.05$.	72
Rycina 8.4. Relatywne zmiany parametru elastyczności (obszary zakreskowane) oraz produkcji tlenu azotu wydzielanego przez komórki śródbłonna (kolor niebieski) dla komórek inkubowanych z TNF- α 1h, TNF- α 4h oraz TNF- α 1h + 1-MNA 3h. Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) $p < 0.01$ oraz (*) $p < 0.05$.	73
Rycina 8.5. Relatywne zmiany parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z 1-MNA a następnie z TNF- α (1) (kolor szary). Jako poziom referencyjny zaznaczono wartość relatywnych zmian parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z TNF- α przez 1h (kolor niebieski). Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) $p < 0.01$ oraz (*) $p < 0.05$.	75
Rycina 8.6. Relatywne zmiany wydzielanej prostacykliny PGI ₂ (A) oraz średniej intensywności fluorescencji Fluo4 (B) dla komórek inkubowanych z TNF- α (1h), TNF- α (4h), 1-MNA (3h), 1-MNA (3h) + TNF- α (1h), TNF- α (1h) + 1-MNA (3h) obliczone względem komórek referencyjnych. Na rycinie zaznaczono średnie wartości istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) $p < 0.01$ oraz (*) $p < 0.05$.	76
Rycina 8.7. Obrazy fluorescencyjne wybarwionej F-aktyny, dla komórek referencyjnych (A), inkubowanych z 1-MNA 3h (B), TNF- α 4h (C), TNF- α 1h + 1-MNA 3h (D) oraz 1-MNA 3h + TNF- α 1h (E). Strzałka 1 pokazuje pogrubione włókna w części centralnej komórek, 2 – depolimeryzację F-aktyny oraz 3 – pojedyncze włókna w części centralnej komórki. Skala: 20 μ m.	78
Rycina 8.8. Biochemiczny cykl wydzielania i uwalniania Ca ²⁺ , NO oraz PGI ₂ . Czerwona strzałka wskazuje czynnik, na który 1-MNA może wpływać bezpośrednio. Zaprezentowany schemat zawiera następujące oznaczenia: siateczka sarkoplazmatyczna (ER), fosfolipaza A ₂ (PLA ₂), kwas arachidonowy (AA), cyklooksygenaza (COX), prostacyklina (PGI ₂), śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (eNOS), tlenek azotu (NO), kalmodulina (CaM), Ca ²⁺ /kompleks kalmoduliny (Ca ²⁺ /CaM kompleks).	79

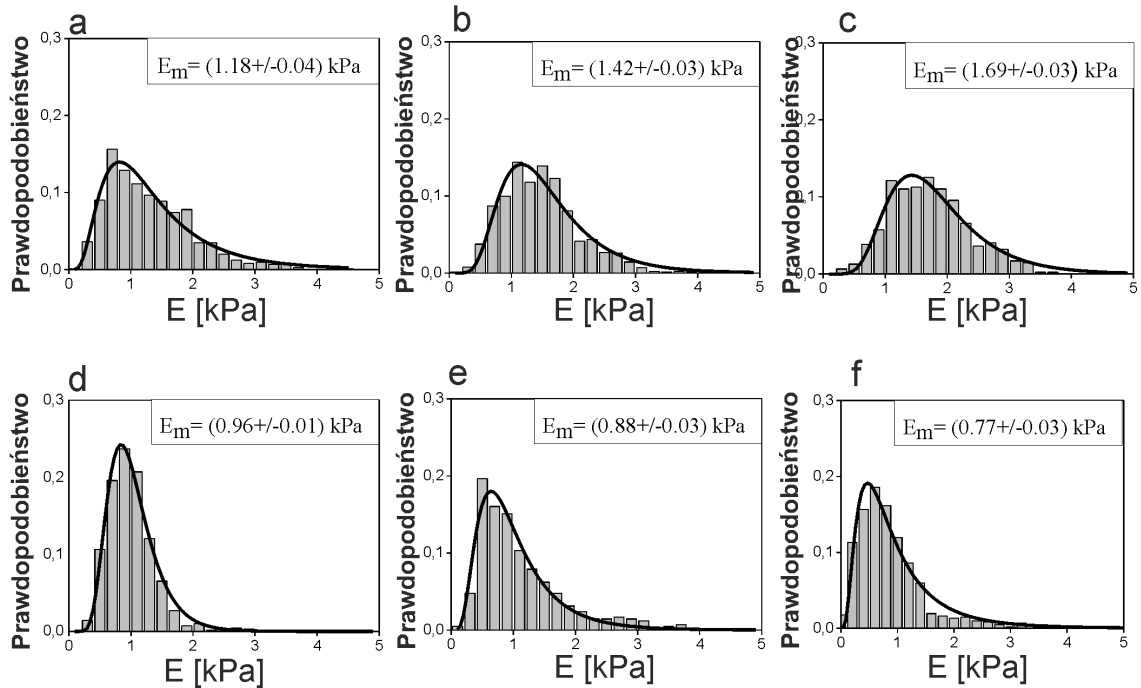
Rycina 9.1. Wartości parametru elastyczności dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z 1,4-DMP dla dwóch stężeń 0.1 μ M (kolor niebieski) i 0.02 μ M (obszar zakreskowany) oraz wybranych czasów inkubacji (1, 3, 6, 12 oraz 24h). Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) p<0.01 oraz (*) p<0.05. _____	81
Rycina 9.2. Fluorescencyjne obrazy znakowanej F-aktyny (obszary zielone) oraz jąder komórkowych (obszar niebieski) dla komórek kontrolnych (A) oraz inkubowanych z 0.1 μ M 1,4-DMP odpowiednio przez 1h (B), 3h (C), 6h (D), 12h (E) oraz 24h (F). Strzałki 1-4 pokazują grube włókna F-aktyny zlokalizowane wzdłuż głównej osi komórek. Skala: 20 μ m. _____	82
Rycina 9.3. Wartości parametru elastyczności dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z 1-MP dla dwóch stężeń: 100nM (słupki zakreskowane) i 1 μ M (słupki szare) oraz wybranych czasów inkubacji (1, 3, 6, 12 i 24h). Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) p<0.01 oraz (*) p<0.05. _____	83
Rycina 9.4. Fluorescencyjne obrazy znakowanej F-aktyny (obszary zielone) oraz jąder komórkowych (obszar niebieski) dla komórek kontrolnych (A) oraz inkubowanych ze 100nM 1-MP odpowiednio przez 1h (B), 3h (C), 6h (D), 12h (E) oraz 24h (F). Skala: 20 μ m. _____	84
Rycina 9.5. Relatywne zmiany parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z 1,4-DMP (słupki zakreskowane) oraz 1-MP (słupki szare) dla stężenia 100nM dla różnych czasów inkubacji 1, 3, 6, 12 oraz 24h. Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) p<0.01 oraz (*) p<0.05. _____	85
Rycina 9.6. Wartości parametru elastyczności dla komórek referencyjnych oraz inkubowanych z 1,4-DMP 3h + TNF- α 1h, TNF- α 1h + 1,4-DMP 3h, 1-MP 3h + TNF- α 1h, TNF- α 1h + 1-MP 3h. Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem poziomu referencji dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) p<0.01 oraz (*) p<0.05. _____	86
Rycina 9.7. Wartości parametru elastyczności (A) oraz relatywne zmiany produkcji NO (B) dla komórek inkubowanych z 1 μ M 1-MP dla 1, 3, 6, 12 i 24h, a następnie z TNF- α przez 1h. Na rycinie zaznaczono wartości parametru elastyczności istotne statystycznie względem poziomu odniesienia dla dwóch poziomów istotności oznaczonych (**) p<0.01 oraz (*) p<0.05. _____	87
Rycina Z.1 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z TNF- α odpowiednio przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f). _____	108
Rycina Z.2 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z simwastatyną (24h) dla wybranych stężeń 1, 10 oraz 100 μ M (b-d). _____	108
Rycina Z.3 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z simwastatyną (1 μ M) dla wybranych czasów inkubacji: 1, 3, 12, 24h (a-d). _____	109
Rycina Z.4 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) inkubowanych z TNF- α przez 1h (b), TNF- α przez 1h a następnie z simwastatyną przez 2h dla stężeń 1, 0.1 μ M (c oraz d) oraz inkubowanych w odwrotnej kolejności-najpierw z simwastatyną przez 2h (1, 0.1 μ M) a następnie z TNF- α przez 1h (e oraz f) _____	109
Rycina Z.5 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z doksorubicyną przez 24h w odpowiednich stężeniach 0.1 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M oraz 10 μ M (b-f). _____	110
Rycina Z.6 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z daunorubicyną przez 24h w odpowiednich stężeniach 0.1 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M oraz 10 μ M (b-f). _____	110
Rycina Z.7 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z 10 μ M 1-MNA przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f). _____	111
Rycina Z.8 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z 0.1 μ M 1-MNA (b-f) przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f). _____	111
Rycina Z.9 Rozkłady parametru elastyczności komórek inkubowanych z 1-MNA w dawkach 0.05 μ M, 0.1 μ M oraz 0.2 μ M przez 3h a następnie z TNF- α przez 1h (a-c). _____	112

Rycina Z.10 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z TNF- α przez 1h a następnie z 0.1 μ M 1-MNA przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).	112
Rycina Z.11 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z TNF- α przez 1h a następnie z 0.05 μ M 1-MNA przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).	113
Rycina Z.12 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z TNF- α przez 1h a następnie z 0.2 μ M 1-MNA przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).	113
Rycina Z.13 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z 0.1 μ M 1,4-DMP przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).	114
Rycina Z.14 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z 0.1 μ M 1-MP przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).	114
Rycina Z.15 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z 0.02 μ M 1,4-DMP przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).	115
Rycina Z.16 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z 1 μ M 1-MP przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).	115
Rycina Z.17 Rozkłady parametru elastyczności komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z 1-MP w dawce 1 μ M przez odpowiednio 1, 3, 6, 12, 24h a następnie z TNF- α przez 1h (b-f).	116

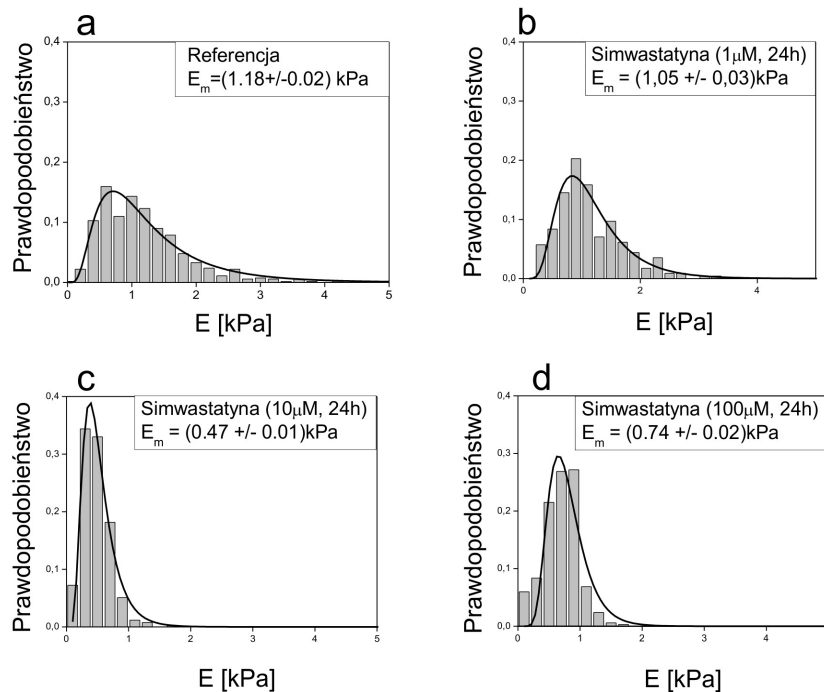
Spis tabel

Tabela 1. Fizyczne metody oceny śródbłonna naczyniowego [13]. Oznaczenia: FMD (<i>flow mediated dilatation</i>) – dylatacja tętnicy w odpowiedzi na niedokrwienie; IMT (<i>infima-media thickness</i>) – grubość kompleksu błony środkowej i wewnętrznej; PWA (<i>pulse wave analysis</i>) – analiza tętna fali; PWV (<i>pulse wave velocity</i>) – prędkość fali tętna; RH-PAT (<i>reactive hypermia peripheral arteria tonometry</i>) – tanometria tętnic obwodowych w warunkach reaktywnego przekrwienia. _____	14
Tabela 2. Przegląd literaturowy wartości parametru elastyczności dla komórek linii HUVEC. _____	24
Tabela 3. Parametry pracy mikroskopu sił atomowych. Oznaczenia parametrów pętli sprzężenia zwrotnego: IG (integral gain) - wzmacnienie całkowite, PG (proportional gain) - wzmacnienie proporcjonalne. _____	34
Tabela 4. Zestawienie danych literaturowych na temat proapoptotycznych mechanizmów działania statyn. _____	61
Tabela 5. Relatywne zmiany produkcji NO przez komórki śródbłonna inkubowane z 100nM 1-MP dla czasów inkubacji 1, 3, 12 oraz 24h. _____	84

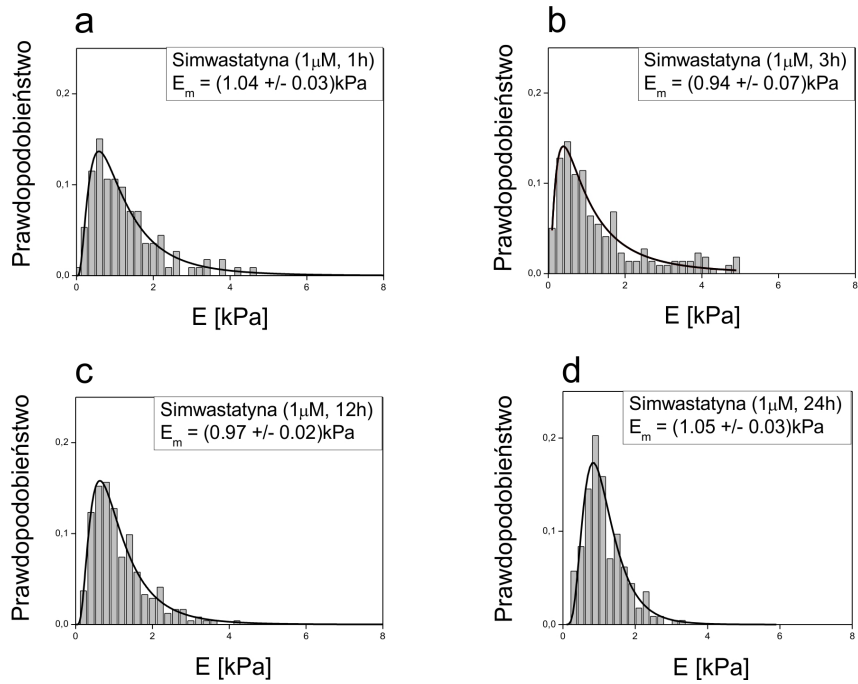
Załącznik



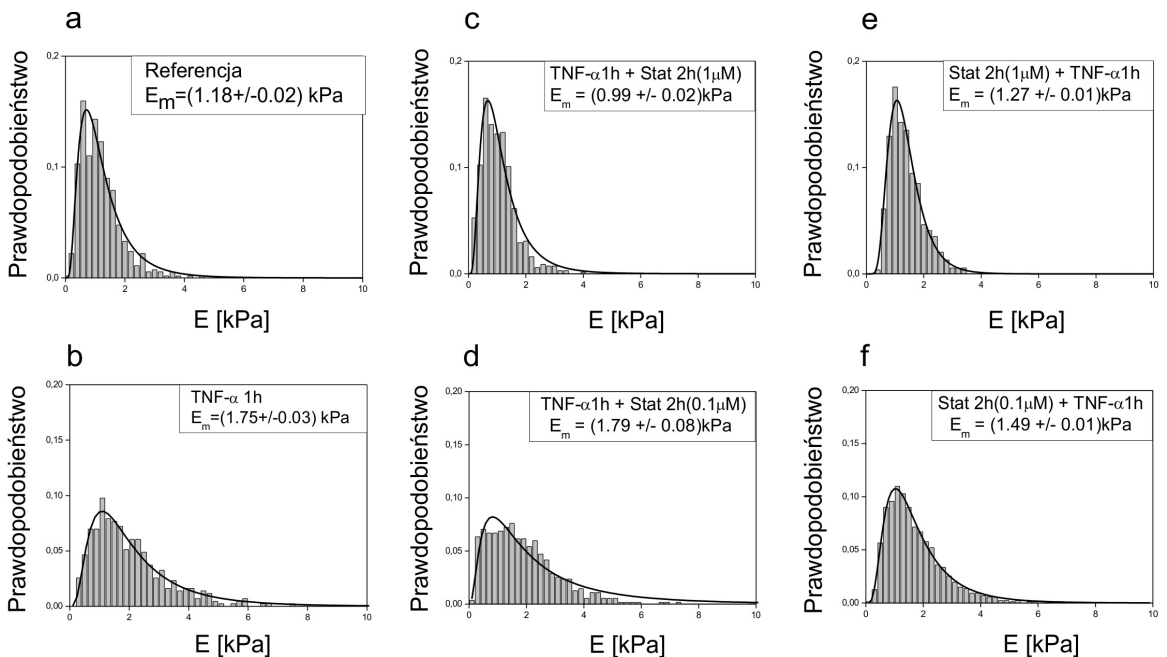
Rycina Z.1 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z TNF- α odpowiednio przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).



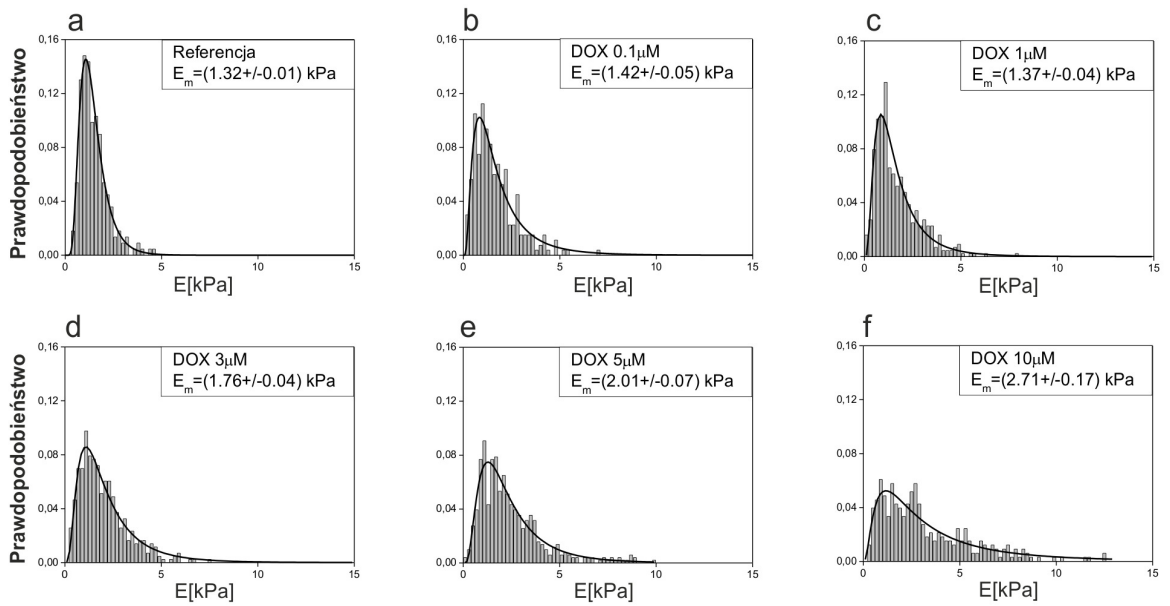
Rycina Z.2 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z simwastatyną (24h) dla wybranych stężeń 1, 10 oraz 100 μ M (b-d).



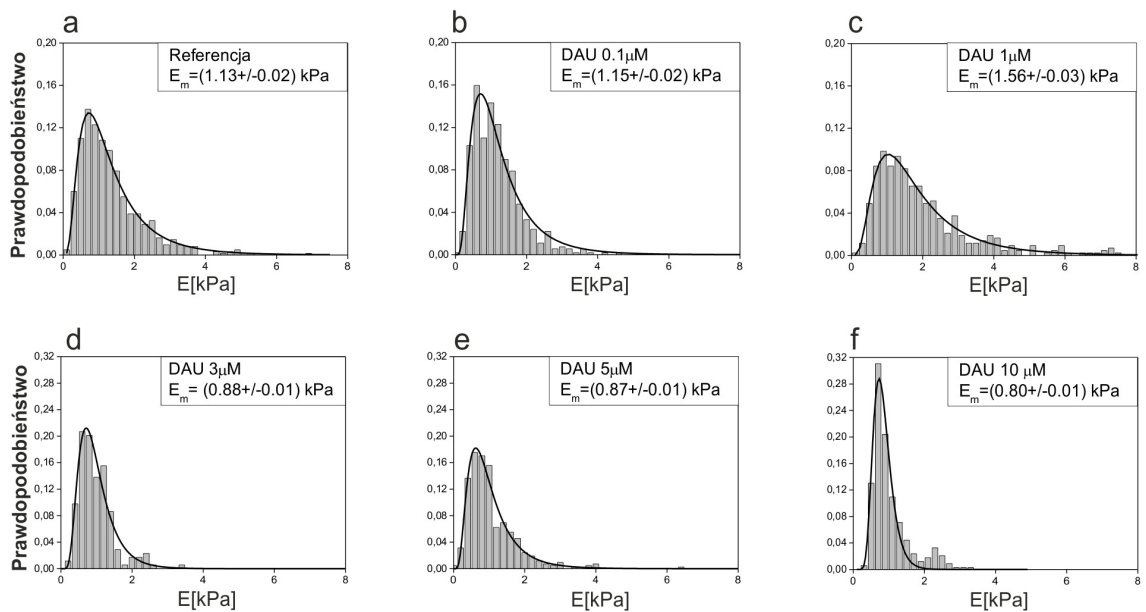
Rycina Z.3 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek inkubowanych z simwastatyną (1 μ M) dla wybranych czasów inkubacji: 1, 3, 12, 24h (a-d).



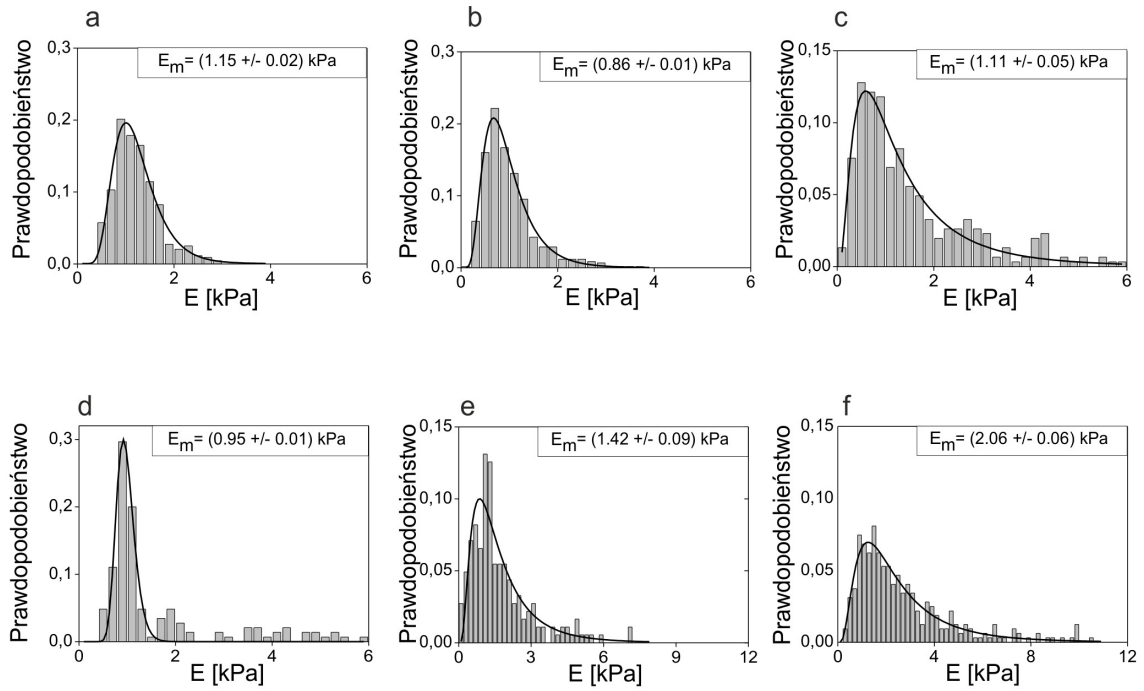
Rycina Z.4 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) inkubowanych z TNF- α przez 1h (b), TNF- α przez 1h a następnie z simwastatyną przez 2h dla stężeń 1, 0.1 μ M (c oraz d) oraz inkubowanych w odwrotnej kolejności-najpierw z simwastatyną przez 2h (1, 0.1 μ M) a następnie z TNF- α przez 1h (e oraz f)



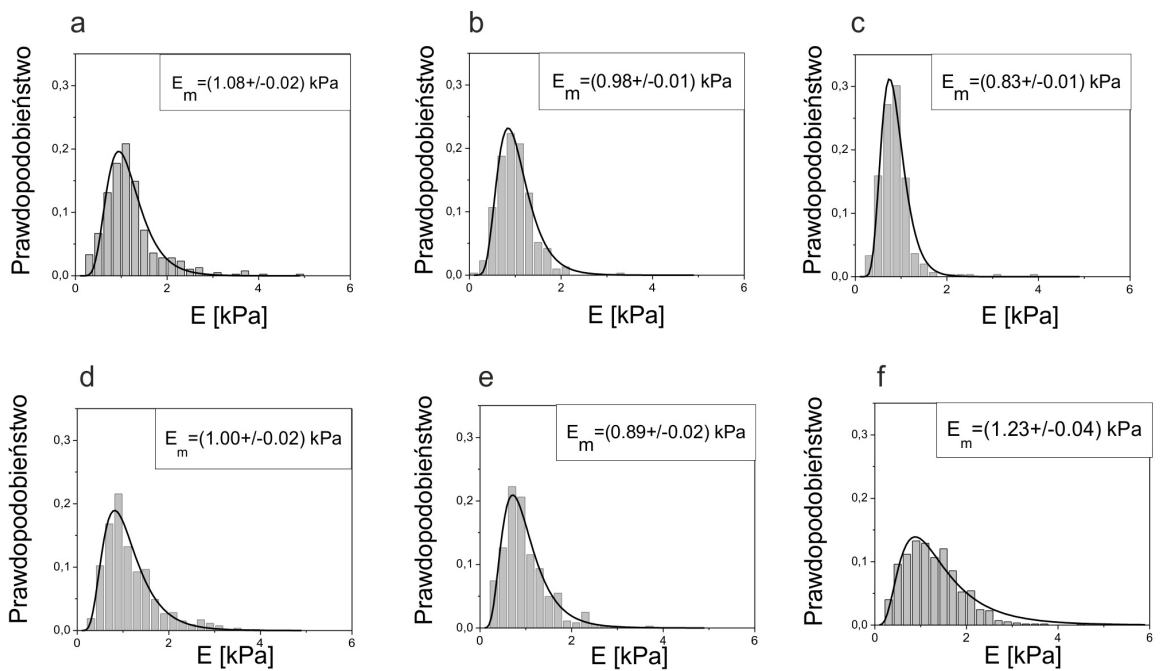
Rycina Z.5 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z doksorubicyną przez 24h w odpowiednich stężeniach 0.1 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M oraz 10 μ M (b-f).



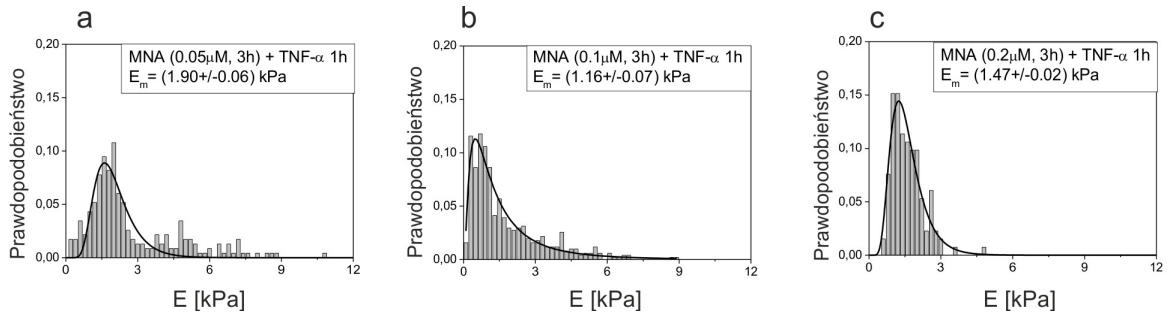
Rycina Z.6 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z daunorubicyną przez 24h w odpowiednich stężeniach 0.1 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M oraz 10 μ M (b-f).



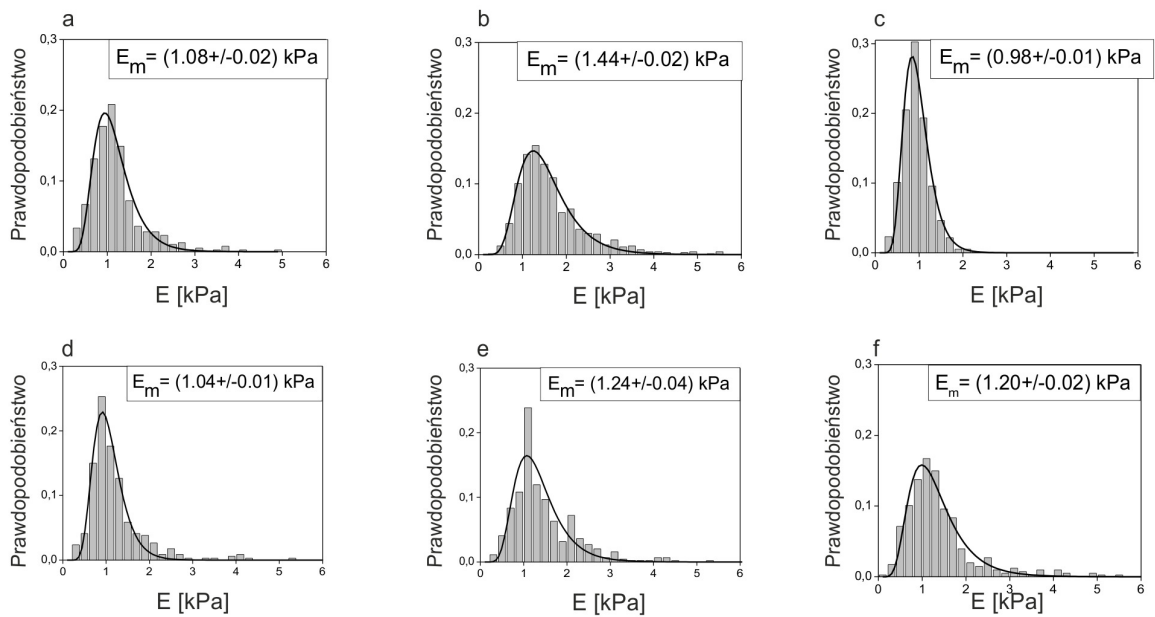
Rycina Z.7 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z $10\mu\text{M}$ 1-MNA przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).



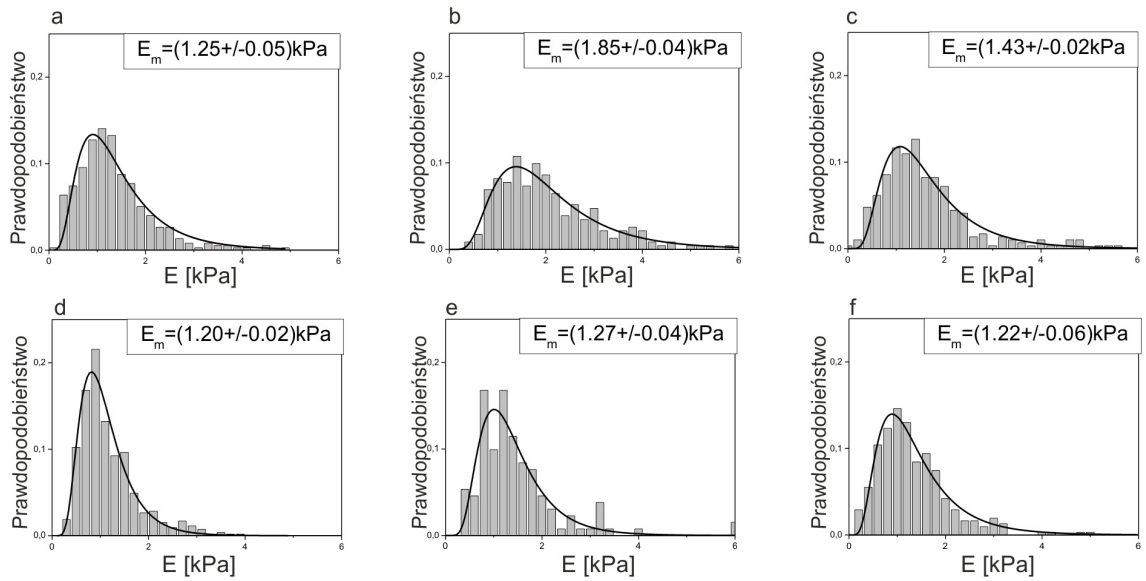
Rycina Z.8 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z $0.1\mu\text{M}$ 1-MNA (b-f) przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).



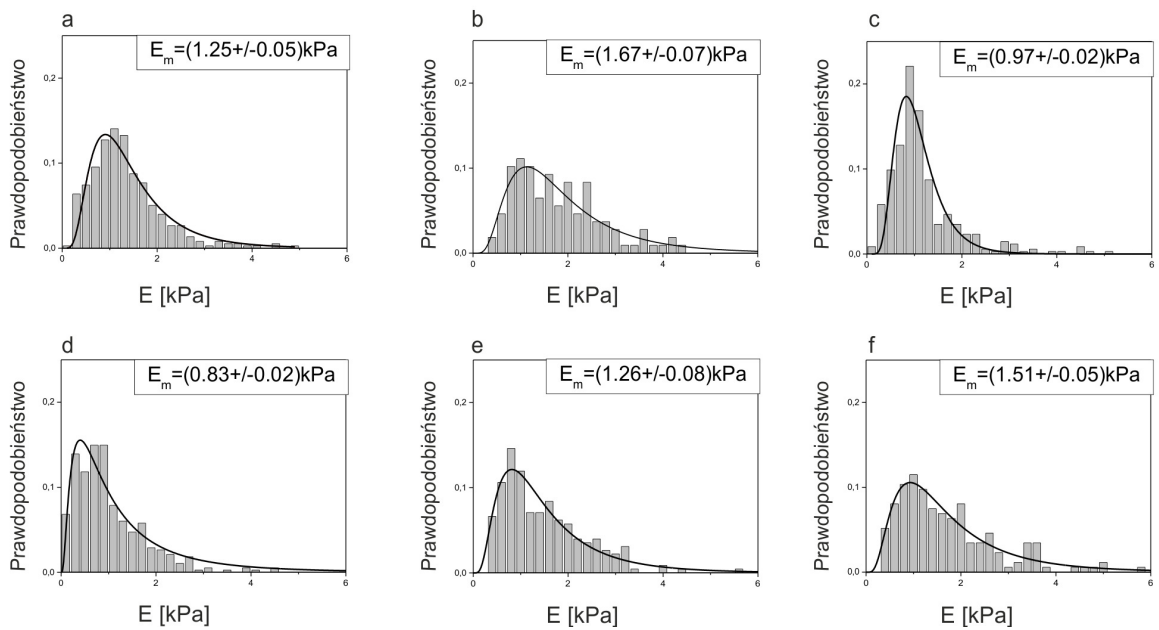
Rycina Z.9 Rozkłady parametru elastyczności komórek inkubowanych z 1-MNA w dawkach 0.05 μ M, 0.1 μ M oraz 0.2 μ M przez 3h a następnie z TNF- α przez 1h (a-c).



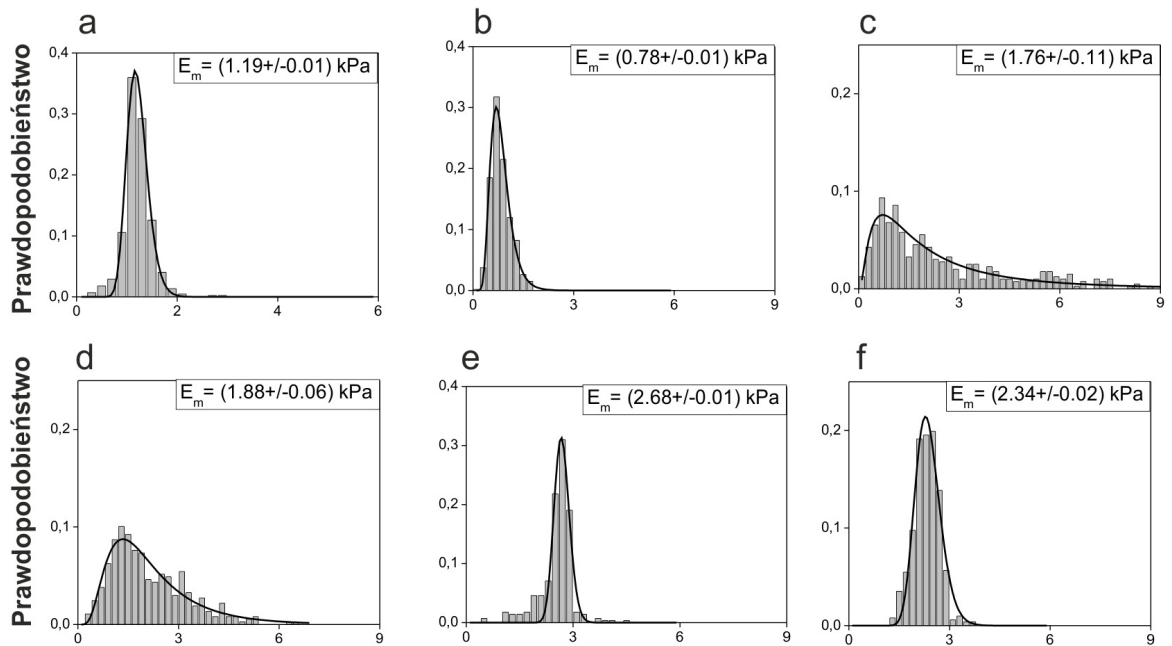
Rycina Z.10 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z TNF- α przez 1h a następnie z 0.1 μ M 1-MNA przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).



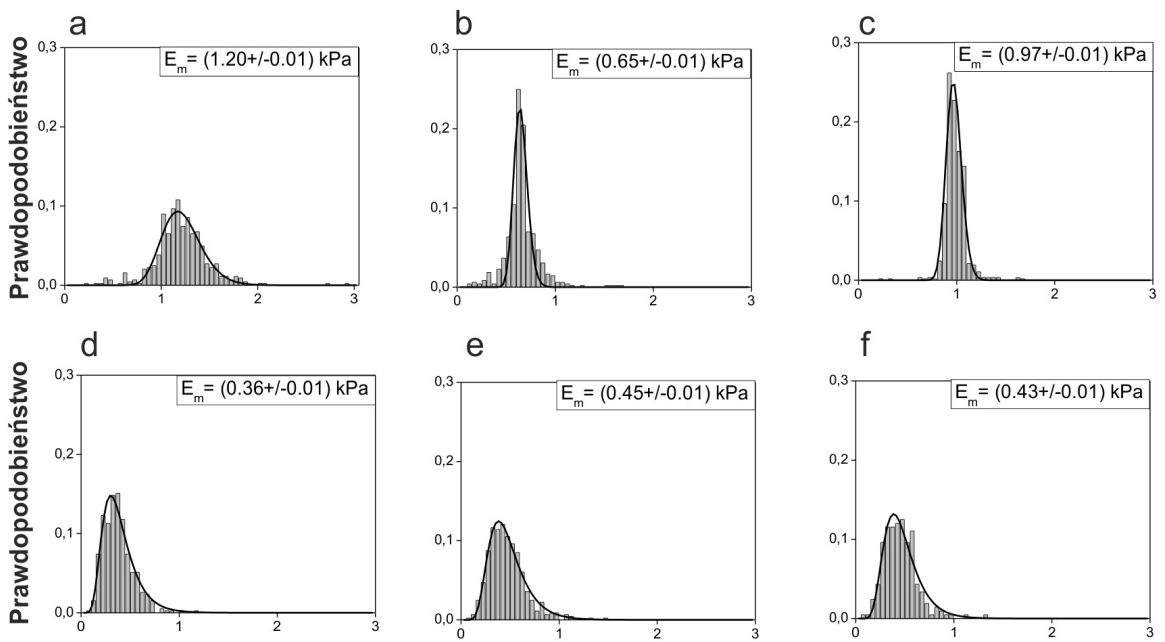
Rycina Z.11 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z TNF- α przez 1h a następnie z 0.05 μ M 1-MNA przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).



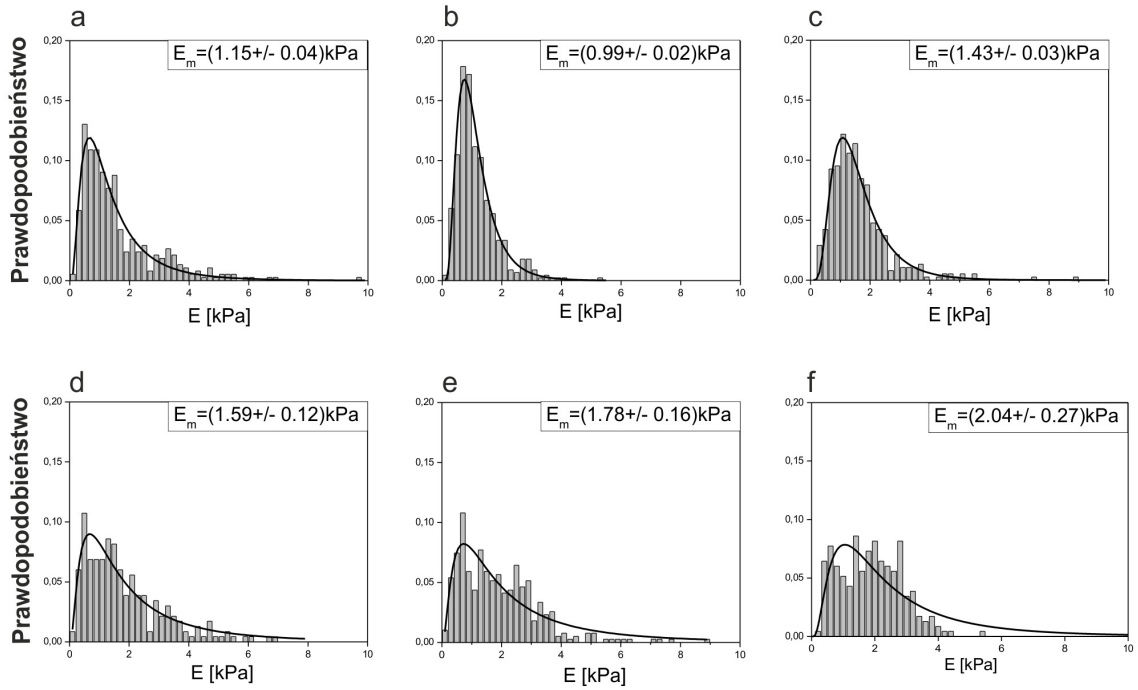
Rycina Z.12 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z TNF- α przez 1h a następnie z 0.2 μ M 1-MNA przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).



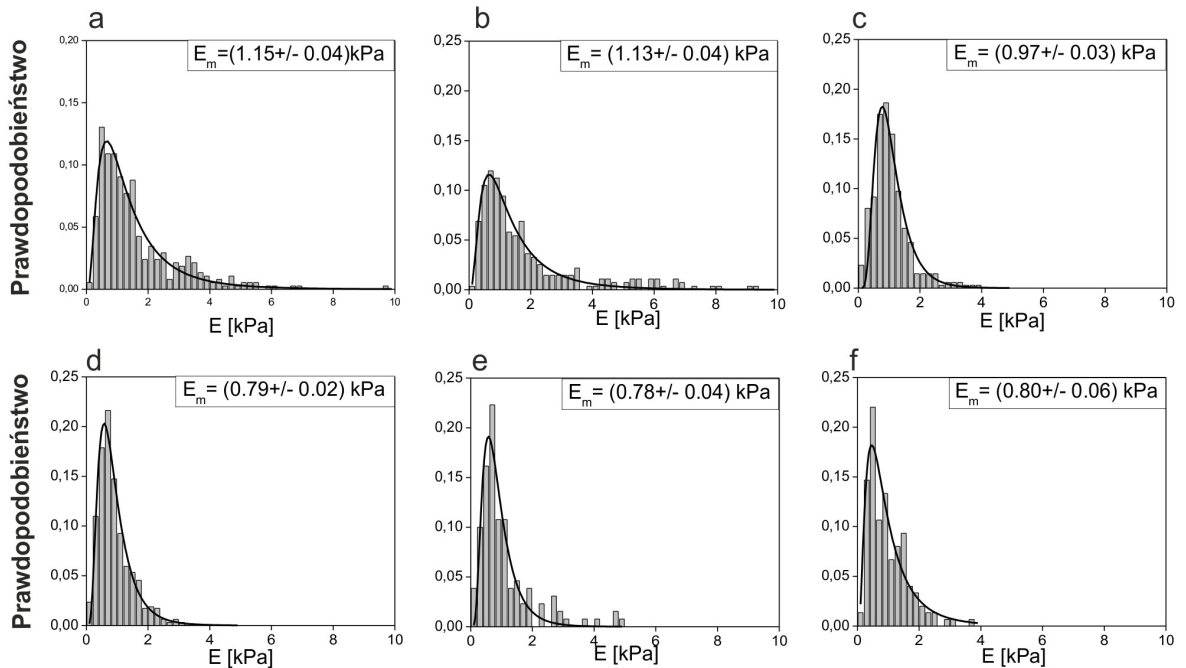
Rycina Z.13 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z 0.1 μ M 1,4-DMP przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).



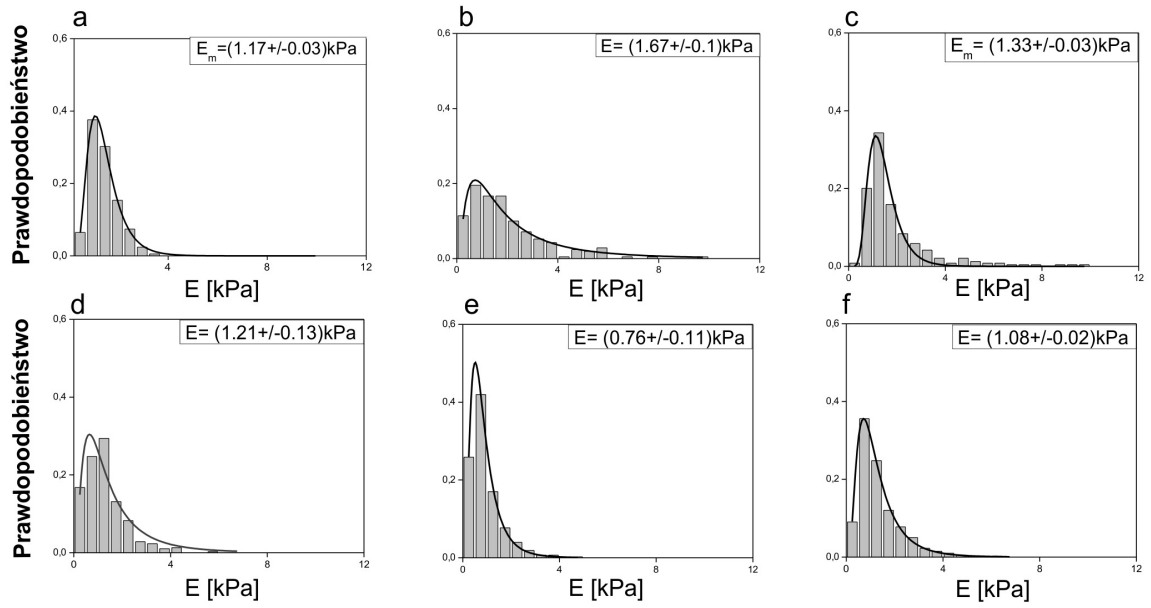
Rycina Z.14 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z 0.1 μ M 1-MP przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).



Rycina Z.15 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z $0.02 \mu\text{M}$ 1,4-DMP przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).



Rycina Z.16 Rozkłady parametru elastyczności dla komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z $1 \mu\text{M}$ 1-MP przez 1, 3, 6, 12, 24h (b-f).



Rycina Z.17 Rozkłady parametru elastyczności komórek referencyjnych (a) oraz inkubowanych z 1-MP w dawce $1\mu\text{M}$ przez odpowiednio 1, 3, 6, 12, 24h a następnie z TNF- α przez 1h (b-f).