

Uniwersytet Jagielloński
Wydział Fizyki, Astronomii, Informatyki Stosowanej
INSTYTUT FIZYKI MEDYCZNEJ
Studia stacjonarne



PRACA LICENCJACKA

Nr albumu: 1155302

Agnieszka Babińska

**ANALIZA POCHODNYCH STEROLI I PRENOLI
W PRÓBKACH PĘCHERZYKÓW
ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH METODĄ
SPEKTROMETRII MASOWEJ TOF-SIMS**

Opiekun pracy licencjackiej:

Prof. dr hab. Ewa Stępień

Opiekun pomocniczy:

Dr inż. Magdalena Marzec

Opracowano zgodnie z obowiązującymi przepisami o prawie autorskim i prawach pokrewnych

Kraków 2021

Imię i nazwisko: Agnieszka Babińska

Nr albumu: 1155304

Kierunek: Biofizyka

Specjalność: Fizyka medyczna

Tryb: STACJONARNE

OŚWIADCZENIE

Ja niżej podpisana Agnieszka Babińska (nr indeksu: 1155304) studentka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego kierunku biofizyka, oświadczam, że przedłożona przeze mnie praca licencjacka pt. „*Analiza pochodnych steroli i prenoli w próbkach pęcherzyków zewnątrzkomórkowych metodą spektrometrii masowej ToF-SIMS*” przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Stępień. Pracę napisałam samodzielnie.

Oświadczam, że moja praca dyplomowa 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 tytułu nabytego na podstawie tej pracy.

Kraków, dnia

.....

podpis studenta

Podziękowania

*Dziękuję mojej promotor **prof. dr hab. Ewie Stępień** z Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ, kierownikowi Zakładu Fizyki Medycznej, za zainteresowanie mnie tematyką pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, udostępnienie materiału badawczego oraz umożliwienie przeprowadzenia badań, a także za zaangażowanie, pomoc merytoryczną oraz nieustającą opiekę.*

*Dziękuję również mojemu opiekunowi pomocniczemu **dr inż. Magdalenie Marzec** z Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ za zaciekawienie mnie tematyką spektrometrii masowej ToF-SIMS oraz cenne wskazówki w trakcie przeprowadzania pomiarów.*

Praca została wykonana ze środków finansowych projektu OPUS 17 (2019/33/B/NZ3/01004) prof. E. Stępień.

Spis treści

Słownik skrótów.....	5
Streszczenie.....	6
Abstract.....	7
Wstęp.....	8
Część teoretyczna.....	9
1. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe.....	9
1.1. Podział i charakterystyka.....	9
1.2. Powstawanie EVs.....	9
1.3. Metody izolacja EVs.....	11
2. Dwuwarstwa lipidowa.....	13
2.1.1. Fosfolipidy.....	15
2.1.2. Glikolipidy.....	16
2.1.3. Sfingolipidy.....	16
2.1.4. Sterole.....	17
2.1.4.1. Cholesterol.....	17
2.1.5. Prenole.....	18
2.1.5.1. Witamina E.....	19
3. Spektrometria Masowa ToF-SIMS.....	19
3.1. Analizator czasu przelotu (ToF).....	21
Część eksperymentalna.....	23
4. Materiały i metody.....	23
4.1. Hodowla komórek.....	23
4.2. Izolacja EVs.....	23
4.3. Przygotowanie próbek do analizy ToF-SIMS.....	24
4.4. Analiza ToF-SIMS.....	24
5. Wyniki z dyskusją.....	25
5.1. Sterole.....	25
5.2. Prenole.....	27
Podsumowanie.....	29
Wnioski.....	30

Słownik skrótów

CHOL (ang. *cholesterol*) – cholesterol,

EV (ang. *extracellular vesicles*) – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe,

HDL (ang. *High Density Lipoprotein*) - lipoproteiny o wysokiej gęstości (tzn. „dobry cholesterol”),

ILVs (ang. *intraluminal vesicles*) - prekursorzy egzosomów,

LVHFD (ang. *Low Vacuum Hydrostatic Filtration Dialysis*) – hydrostatyczna dializa filtracyjna o niskim ciśnieniu próżniowym,

LDL (ang. *Low Density Lipoprotein*) - lipoproteiny o niskiej gęstości (tzn. „zły cholesterol”),

LMIG (ang. *Liquid Metal Ion Gun*) – działło jonowe ciekłego metalu,

LVF (ang. *low vacuum filtration*) – filtracja niskopróżniowa,

MV (ang. *microvesicles*) – mikropęcherzyki (ektosomy),

MVBs (ang. *multivesicular bodies*) - ciała wielopęcherzykowe,

NTA (ang. *nanoparticle tracking analysis*) - analiza śledzenia nanocząstek,

PC (ang. *phosphatidylcholine*) – fosfatydylocholina,

PE (ang. *phosphatidylethanolamine*) – fosfatydyloetanolamina,

PE-O (ang. *polyethylene oxide*) – tlenek polietylenu,

PS (ang. *phosphatidylserine*) – fosfatydyloseryna,

RPS (ang. *resistive pulse sensing*) - rezystancyjne wykrywanie impulsów,

SIMS (ang. *Secondary Ion Mass Spectrometry*) – spektrometria mas jonów wtórnych,

SM (ang. *sphingomyelin*) – sfingomielinina,

ToF (ang. *Time of Flight*) - analizator czasu przelotu

Streszczenie

Niniejsza praca ma na celu przedstawienie wyników wykorzystujących spektrometrię masową jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu (ToF-SIMS) do analizy składu lipidowego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, pochodzących z ludzkich komórek beta trzustki hodowanych w warunkach hiperglikemii. ToF-SIMS jest czułą metodą spektrometryczną, stosowaną do jakościowego określania składu powierzchni. Dzięki jej zaawansowanemu rozwojowi, została zaadoptowana do badań biologicznych, gdzie wykorzystywana jest przede wszystkim do analizy lipidów oraz protein.

Zawartość prenoli i steroli w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych komórek beta trzustki jest regulowana wieloma czynnikami środowiskowymi, jak i genetycznymi. W części eksperymentalnej, czynnikiem wywołującym widoczne zmiany składu lipidowego były warunki hiperglikemiczne.

Z przeprowadzonej jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu Tukey'a wynika, iż dla wszystkich wybranych jonów dla prenoli i steroli występują istotne różnice statystyczne pomiędzy średnimi wartościami intensywności dla warunków normalnych oraz hiperglikemicznych przy $p \geq 0,05$.

Przeprowadzona analiza potwierdziła, iż wykorzystana technika ToF-SIMS jest skuteczna, zaś jej zaawansowany rozwój sprawił, iż jest coraz częściej stosowana do badań biologicznych, gdzie wykorzystywana jest przede wszystkim do analizy lipidów oraz protein.

Abstract

The aim of the dissertation is to present the results of the research using secondary ion mass spectrometry with a time-of-flight analyzer (ToF-SIMS) to analyze the lipid composition of extracellular vesicles collected from human pancreatic β -cells and cultured in hyperglycemia. ToF-SIMS is a sensitive spectrometric method used for the qualitative determination of surface composition. Thanks to advanced development, ToF-SIMS has been adapted to biological research, where it is used primarily for the analysis of lipids and proteins.

The content of prenols and sterols in the extracellular vesicles of pancreatic β -cells is regulated by many environmental and genetic factors. The experimental part of the research indicates that hyperglycemic conditions were the factor causing noticeable changes in lipid composition.

The results of the one-way ANOVA and Tukey's tests show that for all ions selected for prenols and sterols there are significant statistical differences between the mean intensity values received at $p \geq 0,05$ under normal and hypoglycemic conditions.

The conducted analysis confirmed that the ToF-SIMS is an effective method which, thanks to its developmental advances, is more and more often used in biological research, in particular for lipid and protein analysis.

Wstęp

Niniejsza praca, pt. „*Analiza pochodnych steroli i prenoli w próbkach pęcherzyków zewnątrzkomórkowych metodą spektrometrii masowej ToF-SIMS*”, ma na celu przedstawienie wyników analizy składu lipidowego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, pochodzących z ludzkich komórek beta trzustki hodowanych w warunkach hiperglikemii. Komórki te znajdują się w centrum wysepek trzustkowych. Cechują się okrągłymi, pęcherzykowatymi jądrami, rozwiniętą siateczką śródplazmatyczną szorstką oraz wydzielaniem licznych, bioaktywnych peptydów oraz struktur biologicznych takich jak pęcherzyki wydzielnicze np. zawierające insulinę.

W przeprowadzonym eksperymencie zastosowano hiperglikemiczne warunki hodowli komórek, w których stężenie glukozy w roztworze było równe 25 mM. Do zbadania składu lipidowego zastosowano spektrometrię masową jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu (ToF-SIMS), aktualnie sukcesywnie wykorzystywaną do charakterystyki lipidów w układach biologicznych.

Część teoretyczna

1. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

1.1. Podział i charakterystyka

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są małymi, heterogennymi, wydzielniczymi pęcherzykami należącymi do grupy mikropęcherzyków błonowych (EV, ang. *extracellular vesicles*) [1,2]. Ich struktura ograniczona jest dwoma warstwami lipidowymi, stanowiąc barierę dyfuzyjną oraz zapewniając integralność środowiska wewnątrzkomórkowego. Dwuwarstwa lipidowa odpowiedzialna jest również za zakotwiczenie białek, a także przekazywanie sygnału [3].

Opisywana grupa struktur biologicznych, do której należą egzosomy, ektosomy oraz ciała apoptyczne, aktualnie postrzegana jest jako grupa nowych, istotnych mediatorów w komunikacji międzykomórkowej, uczestniczących w procesach fizjologicznych oraz patologicznych [4].

Egzosomy – najmniejsze wśród pęcherzyków, o kształcie sferycznym, mierzą od 30 do 100 nm. Zawierają w swoim składzie białka, mRNA, mikroRNA oraz lipidy [1,4]. Mogą one służyć jako wektor dla zakaźnych cząsteczek, np. HIV, prionów. Pęcherzyki te transportują wiele makrocząsteczek z jednej komórki do drugiej wraz z udziałem pęcherzyków o niewielkich rozmiarach. Egzosomy mogą być również nośnikami lipidów, DNA, RNA, białek, a także małych, bioaktywnych cząstek takich jak mikroRNA [4].

Ektosomy, zwane również mikrofragmentami błonowymi (MV, ang. *microvesicles*) mierzą od 100 do 1000 nm. Są wydzielane na zewnątrz komórki przez błonę komórkową. W ich skład wchodzi białka, fosfolipidy, mRNA oraz mikroRNA [4,5]. Ektosomy odgrywają istotną rolę w leczeniu onkogenym, progresji nowotworu, jego inwazji oraz przerzutach [6].

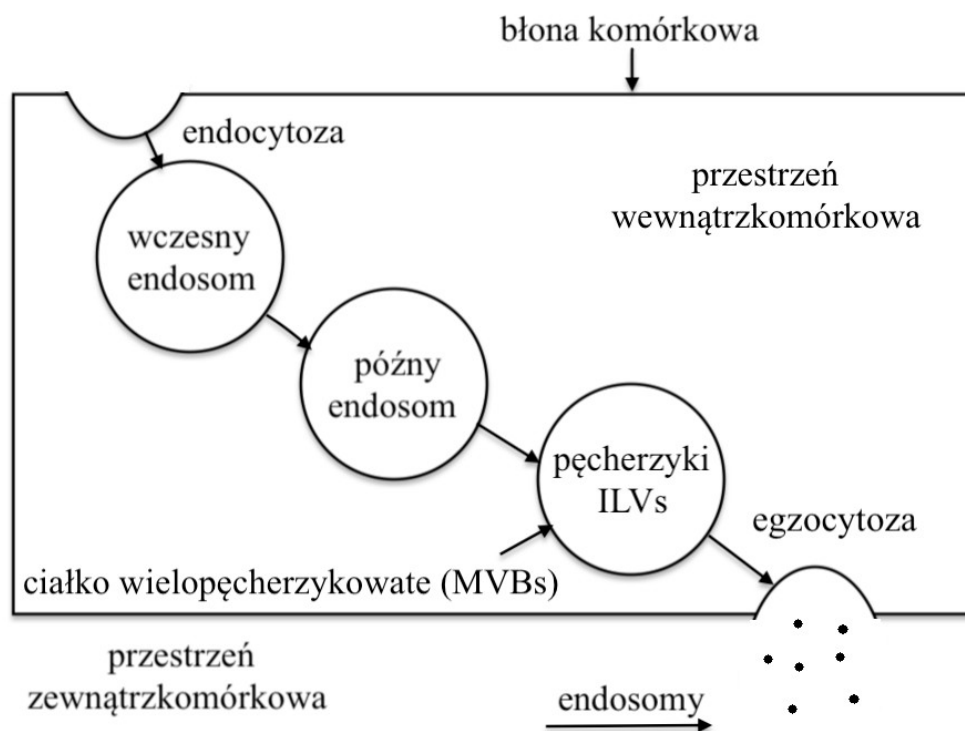
Ciała apoptyczne, będące największymi w tej grupie obiektami, mierzą od 1000 do 4000 nm. Są uwalniane z komórki podczas procesu apoptozy. Struktura ciała apoptycznego zbudowana jest z błony komórkowej, wewnątrz której znajdują się fragmenty cytoplazmy, organelle komórkowe oraz resztki chromatyny [2,5]. Ciała apoptyczne ułatwiają fagocytozę [7].

1.2. Powstawanie EVs

Procesy powstawania i wydzielania poszczególnych frakcji EVs są różne. Biogenezę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych – egzosomów, rozpoczyna proces endocytozy. Proces ten polega na inwaginacji błony komórkowej do wnętrza komórki, co skutkuje tworzeniem się wczesnych endosomów. Jak widać na **Rys. 1**, powstałe w ten sposób struktury przemieszczają się do wnętrza komórki, stając się tzw. *późnymi endosomami*, zaś ich błona ulega wewnętrznemu pączkowaniu.

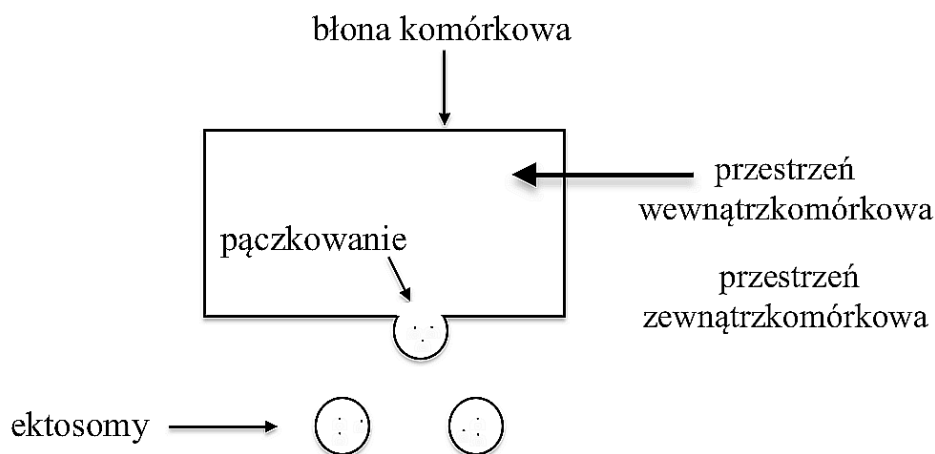
W wyniku internalizacji w świetle pęcherzyka zewnątrzkomórkowego powstają następnie prekursorzy egzosomów (ILVs, ang. *intraluminal vesicles*). Na tym etapie ich wnętrze wzbogacane jest substancjami biologicznymi tj. kwasami nukleinowymi, proteinami oraz innymi substancjami, które są charakterystyczne dla komórek rodzicielskich [2].

Pęcherzyki ILVs, zgromadzone we wnętrzu endosomów, nazywamy ciałkami wielopęcherzykowatymi (MVBs, ang. *multivesicular bodies*). Ich błona przylączy się do błony komórkowej komórek rodzicielskich, natomiast transportowana zawartość MVBs opuszcza przestrzeń wewnątrzkomórkową i przenika do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Efektem końcowym jest uwolnienie egzosomów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, proces ten nosi miano egzocytozy [2].



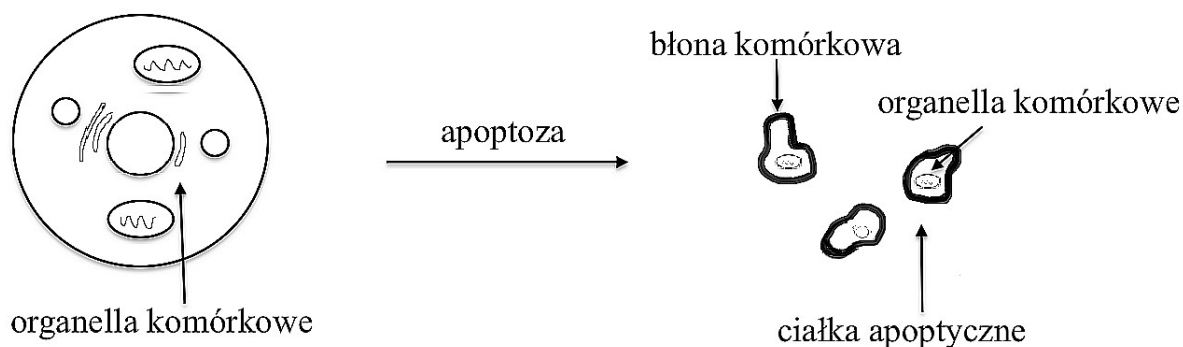
Rys. 1. Schemat biogenezy egzosomów, narysowany na podstawie [2], wykonany przy użyciu programu Dia.

Rys. 2 prezentuje powstawanie ektosomów na drodze pączkowania, czyli uwypukleń błony komórkowej. Do wnętrza ektosomów przedostają się m.in. proteiny oraz kwasy nukleinowe. Pęcherzyki te odłączają się od błony komórkowej, a następnie przemieszczają się na zewnątrz komórki [2].



Rys. 2. Schemat biogenezy ekzosomów, narysowany na podstawie [2], wykonany przy użyciu programu Dia.

Ciała apoptyczne powstają na drodze zaprogramowanej śmierci komórki, określanej apoptozą (**Rys. 3**). Opisywane struktury są otoczone błoną komórkową fragmentami cytoplazmy, wewnątrz których znajdują się organelle oraz resztki chromatyny [2].



Rys. 3. Schemat biogenezy ciałek apoptycznych, narysowany na podstawie [2], wykonany przy użyciu programu Dia.

1.3. Metody izolacja EVs

Mikropęcherzyki zewnątrzkomórkowe w warunkach *in vitro* są wydzielane przez komórki do środowiska zewnętrznego (np. do pożywki hodowlanej). W warunkach *in vivo* zachodzi sekrecja EVs do przestrzeni międzykomórkowej lub płynów ustrojowych. W celu wyizolowania mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych, należy pobrać medium hodowlane, które zawiera EVs, przykładowo może to być płyn z tkanki, mocz lub inne płyny. Następnie pobraną próbkę należy poddać wirowaniu, w celu usunięcia komórek, fragmentów komórek oraz ciał apoptycznych [7]. Niezwykle istotne są również informacje na temat metody pobierania pożywki oraz warunków hodowli przed eksperymentem [8].

Całkowita izolacja mikropęcherzyków błonowych, z innych współistniejących struktur z medium hodowlanego, jest dużym wyzwaniem, a w wielu sytuacjach jest praktycznie niemożliwa. Jedną z pierwszych metod separacji oraz koncentracji mikropęcherzyków błonowych było ultrawierowanie różnicowe. Efektem zastosowanego ultrawierowania jest powstanie osadu, który zawiera frakcje zarówno ektosomów, jak i egzosomów. Następnie aplikowano takie metody jak: gradient gęstości, wytrącanie, filtracja, wykluczanie wielkości, chromatografia czy też immunoizolacja. W celu uzyskania możliwie największej skuteczności separacji mikropęcherzyków w wielu przypadkach stosuje się kilka metod separacyjnych w trakcie jednego eksperymentu [8]. Wciąż modyfikowane i ulepszone są zarówno techniki sekwencyjnego wirowania, jak również optymalizuje się nowe metody, tj. metody kolumnowe, chromatograficzne, precypitacyjne itd.

Określenie ilości wyizolowanych mikropęcherzyków błonowych, będące kolejnym etapem w procedurze izolacji tych struktur, jest również procesem skomplikowanym. Przykładowo w przypadku pęcherzyków pochodzących z moczu, objętość zależy od warunków istniejących przed pobraniem materiału, tj. chociażby spożycie płynów przez dawcę moczu. Powoduje to konieczność zastosowania dodatkowych parametrów normalizujących, np. poziom kreatyniny lub też albuminy w moczu pacjenta [8].

Do ilościowego określenia EV można wykorzystać kwantyfikację białek, lipidów czy też kwasów nukleinowych. Należy jednak mieć na uwadze, iż żadna z oszacowanych wartości wewnętrznych struktur nie jest bezpośrednio skorelowana z liczbą EVs.

Metodami z powodzeniem stosowanymi do określenia liczby EVs są również:

- analiza śledzenia nanocząstek (NTA, ang. *nanoparticle tracking analysis*),
- cytometria przepływowa,
- rezystancyjne wykrywanie impulsów (RPS, ang. *resistive pulse sensing*).

Metody stosowane do określania bezwzględnych wartości rozmiaru oraz liczby EVs są wciąż mało czułe i wymagają dalszych ulepszeń. Niemniej jednak, otrzymywane w ten sposób dane mogą dostarczyć ważnych informacji na temat ilości cząstek na określonej objętości, jak również informować o rozkładach wartości wielkości cząstek [8].

Analiza NTA jest metodą stosowaną do pomiaru stężeń i wielkości struktur pęcherzykowatych takich jak mikropęcherzyki oraz egzosomy. Aplikacja trybu fluorescencyjnego umożliwia różnicowanie oraz charakterystykę odpowiednio oznakowanych cząstek. NTA bazuje na analizie ruchów Browna poruszających się cząstek. Laser oświetla badane cząsteczki zawieszony w cieczy, a pojawiające się rozbłyski są rejestrowane przez kamerę, która jest połączona z mikroskopem. Technika ta jest szybka, stosunkowo dokładna, łatwa w użyciu oraz skuteczna [9].

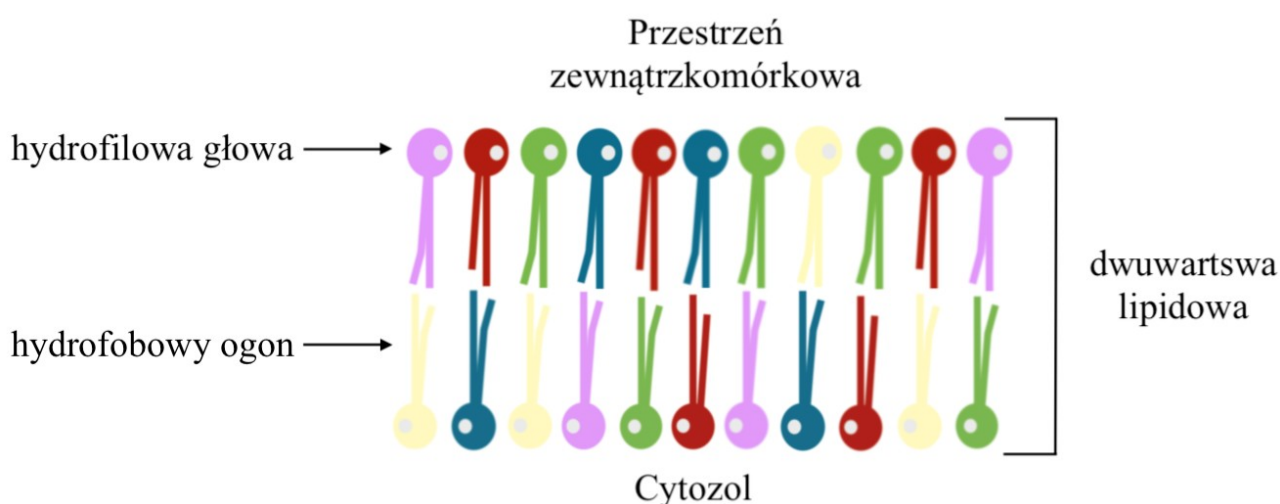
Cytometria przepływowa pozwala zmierzyć oraz zanalizować w trakcie jednego pomiaru wiele właściwości fizycznych i biologicznych komórek, przepływających przez wiązkę światła. Dzięki tej technice można dokonać analizy wielkości komórek, ziarnistości oraz intensywności fluorescencji. Pomiar tych parametrów jest możliwy dzięki systemowi optyczno-elektrycznemu, rejestrującemu sposób rozpraszania wiązki lasera przez komórki oraz emisję sygnału fluorescencyjnego [10].

Rezystancyjne wykrywanie impulsów (RPS) jest skuteczną metodą, pozwalającą na zliczenie cząstek oraz określenie ich wielkość w roztworach elektrolitów. Czujniki RPS mają szerokie spektrum funkcji o wysokiej czułości i przepustowości, dzięki czemu znajdują częste zastosowanie w dziedzinie badań biomedycznych, a także w diagnostyce klinicznej. Czujniki te wykorzystują zależność rezystancji metali bądź półprzewodników od temperatury [11].

2. Dwuwarstwa lipidowa

Podstawową jednostką błony komórkowej jest struktura dwuwarstwy lipidowej, **Rys. 4** i **Rys. 5**. Tworzą ją dwie warstwy fosfolipidów, składające się z hydrofilowej głowy, która umieszczona jest na zewnątrz błony oraz z hydrofobowego ogona, który umieszczony jest do wewnątrz. Dwuwarstwa lipidowa jest odpowiedzialna za zakotwiczenie białek, a także przekazywanie sygnału. Do jej właściwości zalicza się:

- płynność, która zapewnia elastyczność oraz spójność błony,
- asymetrię,
- selektywną przepuszczalność [3].

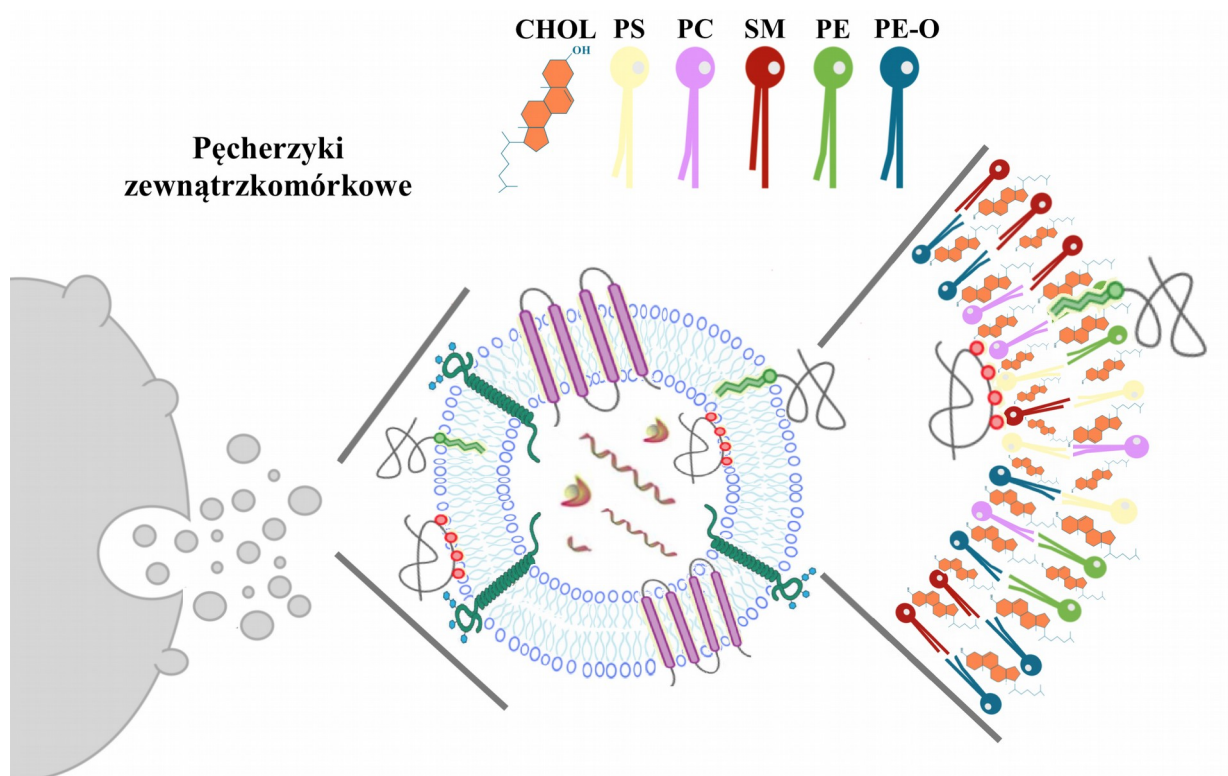


Rys. 4. Budowa dwuwarstwy lipidowej, narysowany na podstawie [3], wykonany przy użyciu programu Dia.

Do trzech podstawowych funkcji błony komórkowej należą:

- przekaz informacji ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki,
- transport do wnętrza oraz na zewnątrz komórki cząsteczek chemicznych,
- kontrola wzrostu, podziału, a także ruchów komórki.

W skład błony komórkowej wchodzi: białka, cukry oraz lipidy, które stanowią 30-40% masy błony komórkowej [12].



Rys. 5. Budowa dwuwarstwy lipidowej, narysowany na podstawie [13], wykonany przy użyciu programu Dia.

2.1. Lipidy błonowe

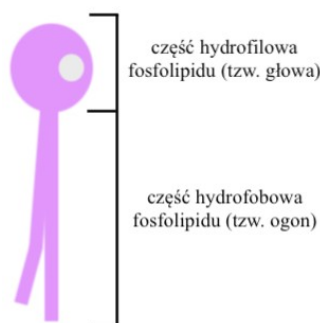
Lipidy odgrywają kluczową rolę w procesach biochemicznych oraz metabolicznych, które zachodzą w komórkach. Nie tylko dostarczają i magazynują energię, lecz także przekazują sygnały oraz tworzą półprzepuszczalną barierę komórkową w postaci dwuwarstwy lipidowej. Badania z dziedziny lipidomiki coraz częściej umożliwiają zrozumienie skomplikowanych procesów zachodzących w strukturach biologicznych o fizjologicznych parametrach. Co istotniejsze, dostarczają cennych informacji o zmianach metabolicznych jakie towarzyszą stanom patologicznym, w tym chorobom metabolicznym i nowotworowym, umożliwiając tym samym wczesną diagnostykę [14].

Ze względu na strukturę chemiczną, lipidy błonowe można podzielić na pięć głównych grup:

- fosfolipidy, które występują w błonie komórkowej wszystkich komórek (ich zawartość w błonie komórkowej stanowi od 62-70%),
- glikolipidy, które występują w błonach biologicznych komórek roślinnych, zwierzęcych oraz bakteryjnych (ich zawartość w błonie komórkowej wynosi ok. 8%),
- sfingolipidy, które występują głównie w układzie nerwowym zwierząt,
- sterole, które występują w błonach biologicznych komórek eukariotycznych,
- prenole, które podobnie jak sterole, występują w błonach komórkowych komórek eukariotycznych [3, 12].

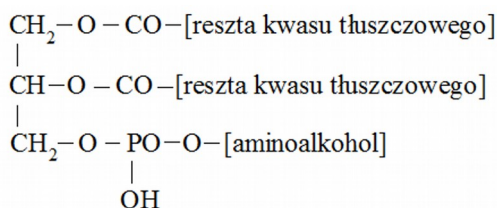
2.1.1. Fosfolipidy

Fosfolipidy występują w błonach biologicznych komórek roślinnych oraz zwierzęcych [12]. Są cząsteczkami amfipatycznymi, co oznacza iż mają część hydrofilową, tzw. głowę oraz część hydrofobową, tzw. ogon [3] (**Rys. 6**).



Rys. 6. Budowa fosfolipidów, narysowany na podstawie [3], wykonany przy użyciu programu Dia.

Lipidy wchodzące w skład tej grupy, pod względem chemicznym, są pochodnymi kwasu fosfatydylowego, który w centralnej części zawiera cząsteczkę glicerolu. Schemat umieszczony na **Rys. 7** ilustruje estryfikację cząsteczki dwoma kwasami tłuszczowymi oraz kwasem fosforowym, który następnie jest zestryfikowany aminoalkoholem [3].

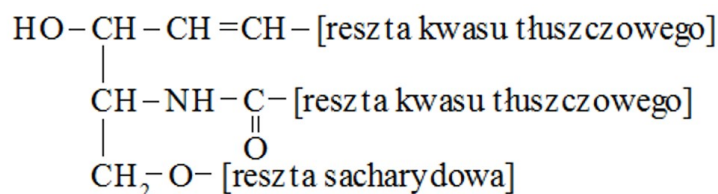


Rys. 7. Wzór strukturalny fosfolipidów, narysowany na podstawie [15], wykonany przy użyciu programu ChemSketch.

Jedna z grup hydroksylowych kwasu fosfatydylowego w fosfolipidach błonowych estryfikuje z dodatkową grupą alkoholi, przez co w zależności od rodzaju alkoholu otrzymujemy np. fosfatydylocholinę (PC, ang. *phosphatidylcholine*), fosfatydyloserynę (PS, ang. *phosphatidylserine*) itd. Duża różnorodność fosfolipidów wynika z występowania różnych alkoholi oraz różnego typu kwasów tłuszczowych, które są przyłączane do glicerolu [12].

2.1.2. Glikolipidy

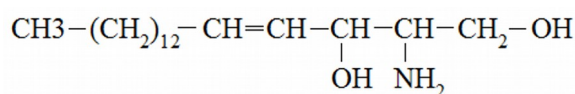
Glikolipidy występują w błonach biologicznych komórek roślinnych, zwierzęcych oraz bakteryjnych [14]. Podstawową jednostką strukturalną glikolipidów jest ceramid, tzw. sfingozyna, która jest połączona z kwasem tłuszczowym wiązaniem amidowym, **Rys. 8**. Grupa hydroksylowa sfingozyny łączy się z cukrem (przeważnie glicerolem) wiązaniem glikozydowym. Ceramidy mają duże znaczenie w wielu procesach biologicznych [12]. Lipidy wchodzące w skład tej grupy usztywniają powierzchnię błony oraz uczestniczą w transporcie elektronów na drodze fotosyntezy zachodzącej u roślin, jak również są istotnym przenośnikiem informacji w komunikacji międzykomórkowej [3, 16].



Rys. 8. Wzór strukturalny glikolipidów, narysowany na podstawie [15], wykonany przy użyciu programu ChemSketch.

2.1.3. Sfingolipidy

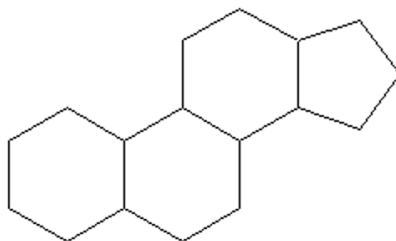
Sfingolipidy występują głównie w komórkach układu nerwowego, tworząc tzw. mielinę, czyli otoczkę aksonów, która jest odpowiedzialna za przekazywanie impulsu nerwowego [3, 16]. Podstawowym elementem strukturalnym sfingolipidów jest długi łańcuch aminoalkoholu – sfingozyna (**Rys. 9**). Cząsteczki sfingolipidów wykazują amfipatyczność, zaś ich cylindryczny kształt powoduje tworzenie dwuwarstwy lipidowej w wodzie. Lipidy te zgromadzone są głównie po zewnętrznej stronie błony plazmatycznej. Sfingolipidy można podzielić na podgrupy sfingomielin oraz glikolipidów [3, 12, 16].



Rys. 9. Wzór strukturalny sfingozyny, narysowany na podstawie [12], wykonany przy użyciu programu ChemSketch.

2.1.4. Sterole

Sterole zbudowane są ze steranu, który składa się z połączonych ze sobą czterech pierścieni węglowych, stanowiących rdzeń cząsteczki, **Rys. 10**. Z jednej strony cząsteczki może być przyłączony kwas tłuszczowy, zaś z drugiej – grupa hydroksylowa. Steran, dzięki swojej budowie, warunkuje sztywność błony [16, 17].



Rys. 10. Wzór strukturalny steranu, narysowany na podstawie [16], wykonany przy użyciu programu ChemSketch.

Lipidy z tej grupy występują w błonie komórek eukariotycznych. W komórkach zwierzęcych, najczęściej występującym steroidem błonowym jest cholesterol, w komórkach roślinnych – sitosterol, zaś w komórkach grzybów – ergosterol. Sterole błonowe odpowiadają za wrażliwość na zmianę temperatury błony, a także jej płynność [3].

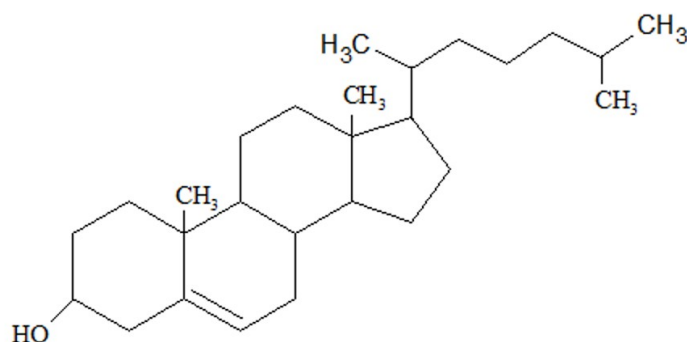
2.1.4.1. Cholesterol

Cholesterol, przedstawiony na **Rys. 11**, występuje wyłącznie u eukariontów. Duża ilość cholesterolu zlokalizowana jest w błonie komórkowej mielinowych włókien nerwowych oraz erytrocytów. W błonach plazmatycznych zawartość cholesterolu jest wyższa, w porównaniu z błonami wewnątrzkomórkowymi. Równocześnie wraz z wysoką zawartością cholesterolu w błonie, zmniejsza się jej płynność. Wpływa on również na przepuszczalność oraz stabilność błony [15].

Cząsteczka cholesterolu ogranicza ruchy boczne, a także uwidacznia dyfuzję boczną lipidów w błonie. W komórkach, w ich cytoplazmie, obecny jest w zestyfikowanej formie z kwasami tłuszczowymi. Cholesterol czynnie uczestniczy w szlakach transdukcji sygnału, a także przyjmuje postać prekursora dla dużej ilości cząsteczek sygnałowych. Towarzyszy również w procesach, które regulują tworzenie synaps, a także jest substratem dla hormonów steroidowych (kortyzolu, witaminy D, testosteronu, progesteronu, a także soli żółciowej) [16, 17].

Produkcja cholesterolu z acetylo-CoA zachodzi w siateczce śródplazmatycznej i jest kontrolowana poprzez regulację reduktazy HMG-CoA, zaś aktywność tego związku jest modyfikowana poprzez regulację poziomu cholesterolu egzogenego [16, 17].

Zbyt duża ilość cholesterolu w surowicy krwi jest czynnikiem ryzyka zawału serca [18]. Dzieje się tak przez zmiany miażdżycowe, a więc odkładanie się cholesterolu w naczyniach krwionośnych. Zmiany miażdżycowe są spowodowane nieprawidłowym funkcjonowaniem mechanizmu, który wychwytuje cholesterol poprzez lipoproteiny o niskiej gęstości, tzw. „zły cholesterol” (LDL, ang. *Low Density Lipoprotein*). Równocześnie lipoproteiny o wysokiej gęstości, tzw. „dobry cholesterol” (HDL, ang. *High Density Lipoprotein*), zapobiegają odkładaniu cholesterolu w tętnicach. Cholesterol egzogeny jest przyjmowany z pożywieniem, występuje powszechnie w produktach zwierzęcych, głównie w mięsie [16, 17]. Dla człowieka wartość średnia cholesterolu egzogenego wynosi od 0,5 g/dzień do 1 g/dzień, zaś cholesterolu endogenego od 2 do 2,5 g/dzień [18].



Rys. 11. Wzór strukturalny cholesterolu, narysowany na podstawie [19], wykonany przy użyciu programu ChemSketch.

2.1.5. Prenole

Prenole powstają w wyniku syntezy związków, zbudowanych z pięciu atomów węgla – difosforanu izopentenyłu oraz difosforanu dimetyloallilu. Proste izoprenoidy powstają w wyniku syntezy kolejnych jednostek izoprenowych (grup pięciowęglowych).

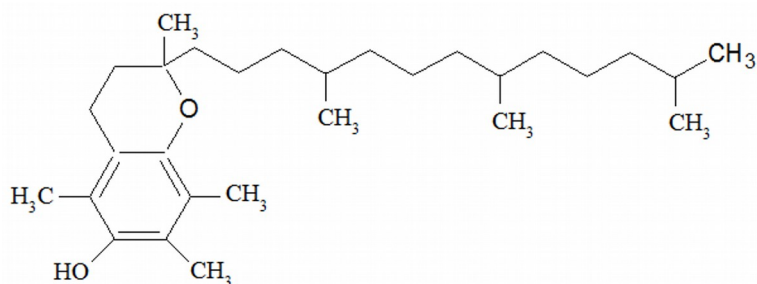
Ze względu na liczbę jednostek izoprenowych wyróżniamy m.in. karotenoidy, zbudowane z ośmiu grup pięciowęglowych, występujące jako żółty, pomarańczowy, bądź czerwony barwnik u roślin. Związki z tej grupy lipidowej charakteryzują się działaniem przeciwutleniającym, silnie absorbują światło oraz są prekursorami witaminy A. Do izoprenoidów należą również politerpeny, które zawierają więcej niż czterdzieści atomów węgla. Przykładem politerpenów jest m.in. kauczuk. Kolejnymi ważnymi grupami cząsteczek są chinony oraz hydrochinony. Do hydrochinon zaliczamy witaminę E, K, a także ubichinon [14, 15].

2.1.5.1. Witamina E

Do grupy związków określanych mianem witaminy E wchodzi tokoferole oraz tokotrienole, które są rozpuszczalne w tłuszczach. Związki te, w organizmie człowieka, są niezbędnym składnikiem pokarmowym, w szczególności α -tokoferol, przedstawiony na **Rys. 12**. Główną cechą tych związków są ich zdolności przeciwutleniające. Dzięki temu chronią i warunkują właściwą strukturę błon biologicznych, zapewniają również syntezę lipidów, przeciwdziałają chorobom układu krążenia, a także mają wpływ na prawidłowe krzepnięcie krwi.

Niedobór witaminy E skutkuje zwiększonym katabolizmem nienasyconych kwasów tłuszczowych, przyczyniający się do nieprawidłowego funkcjonowania błon komórkowych, a także zanik mięśni, bądź uszkodzenie nerwów. Odpowiedni poziom witaminy E w organizmie przeciwdziała chorobie Alzheimera, gdyż hamuje ona tworzenie włókien β -amyloidowych, a także znacznie obniża ich toksyczne działanie na neurony [14, 15].

Witaminę E można naturalnie pozyskać z pożywienia m.in. ze słonecznika, z orzechów ziemnych, bądź laskowych, migdałów, pomidorów czy szpinaku [14, 15].



Rys. 12. Wzór strukturalny α -tokoferolu, narysowany na podstawie [14, 15], wykonany przy użyciu programu ChemSketch.

3. Spektrometria Masowa ToF-SIMS

Spektrometria masowa z analizatorem czasu przelotu (ToF-SIMS, ang. *Time of Flight – Secondary Ion Mass Spectrometry*) jest czułą metodą spektrometryczną, stosowaną do jakościowego określania składu powierzchni. Dzięki jej zaawansowanemu rozwojowi, została zaadoptowana do badań biologicznych, gdzie wykorzystywana jest przede wszystkim do analizy lipidów oraz protein [20].

Technikę ToF-SIMS stosuje się od lat 90-tych do określania składu oraz rozmieszczenia przestrzennego lipidów w błonach komórkowych i tkankach. Otrzymane dotychczas informacje umożliwiły szersze zrozumienie wielu procesów biologicznych oraz rolę, jaką w tych procesach odgrywają lipidy zarówno w stanach fizjologicznych, jak i w tworzeniu nowych stanów

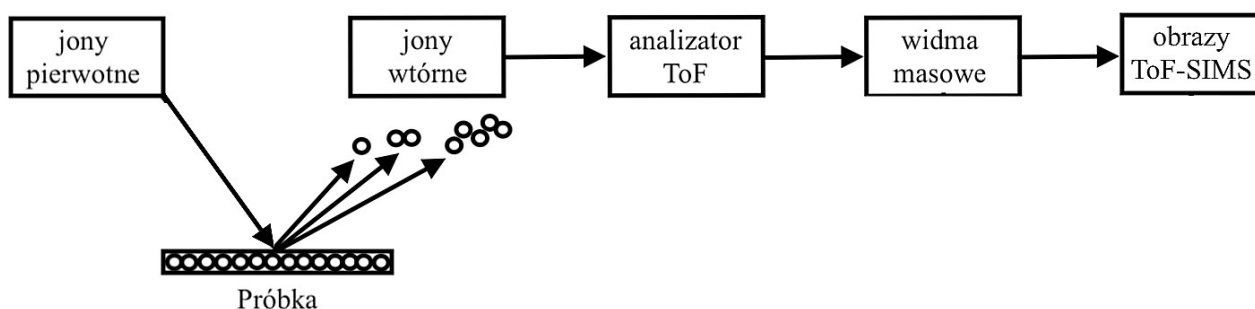
patologicznych. Brunelle i współpracownicy zauważyli poprawę wrażliwości techniki ToF-SIMS w analizie lipidów [14, 21].

Układ eksperymentalny, wchodzący w skład spektrometrii masowej ToF-SIMS, przedstawiony na **Rys. 13**, składa się ze: źródła jonów, z którego wiązka pierwotnych jonów pada na badaną próbkę, analizatora mas, gdzie analizowane są wtórne jony, wyemitowane z próbki oraz detektora, zliczającego zarejestrowane jony.

W przypadku analizy próbek biologicznych, jako źródło pierwotnych jonów zazwyczaj używa się klastrow jonu metalu (złota lub bizmutu), które są generowane z ciekło-metalicznego działa (LMIG, ang. *Liquid Metal Ion Gun*) [16]. W praktyce polega to na umieszczeniu rozgrzanego metalu, który się topi oraz przedostaje się na koniec „igły”, do której przyłożone wysokie napięcie powoduje, iż powstaje stożek Taylora, skąd ewaporują jony pierwotne [16].

Zjonizowane klastry złota lub bizmutu umożliwiają generowanie w badanej strukturze mniejszych uszkodzeń molekularnych, większego rozproszenia energii w badanej objętości próbki, co w znacznym stopniu umożliwia minimalizację zniszczeń w strukturze molekularnej, a ostatecznie zwiększenie sygnału pochodzącego od dużych cząsteczek molekularnych. Procedura ta umożliwiła zwiększenie czułości techniki ToF-SIMS na macierzyste jony takich cząsteczek jak lipidy, stając się narzędziem do badania powierzchni materiałów biologicznych [14].

Zaletą techniki ToF-SIMS jest niewątpliwie wysoka rozdzielczość (dochodzi nawet do 50 nm), jednak metoda ta ma zastosowanie głównie w analizie cząstek o masach mniejszych od m/z 1000 (im większy stosunek masy cząsteczkowej jonu do ładunku elektrycznego jonu, tym analizowany jon porusza się wolniej) [16].



Rys. 13. Schemat działania techniki ToF-SIMS, narysowany na podstawie [22], wykonany przy użyciu programu Dia.

3.1. Analizator czasu przelotu (ToF)

Analizator czasu przelotu (ToF, ang. *Time of Flight*) cechuje się wysoką czułością (<20 ppm). Dzięki pomiarowi czasu przelotu jonu przez obszar o zadanej długości w polu elektrycznym, można dokonać separacji jonu o konkretnym stosunku masy emitowanego jonu wtórnego (m) do jego ładunku (z). Energia kinetyczna jonu (E_k) jest równa:

$$E_k = zU = \frac{1}{2}mv^2 \quad (1)$$

Gdzie: z - ładunek jonu, m - masa jonu, U - potencjał przyspieszający jony, v - prędkość jonu, określona wzorem:

$$v = \frac{d}{t} \quad (2)$$

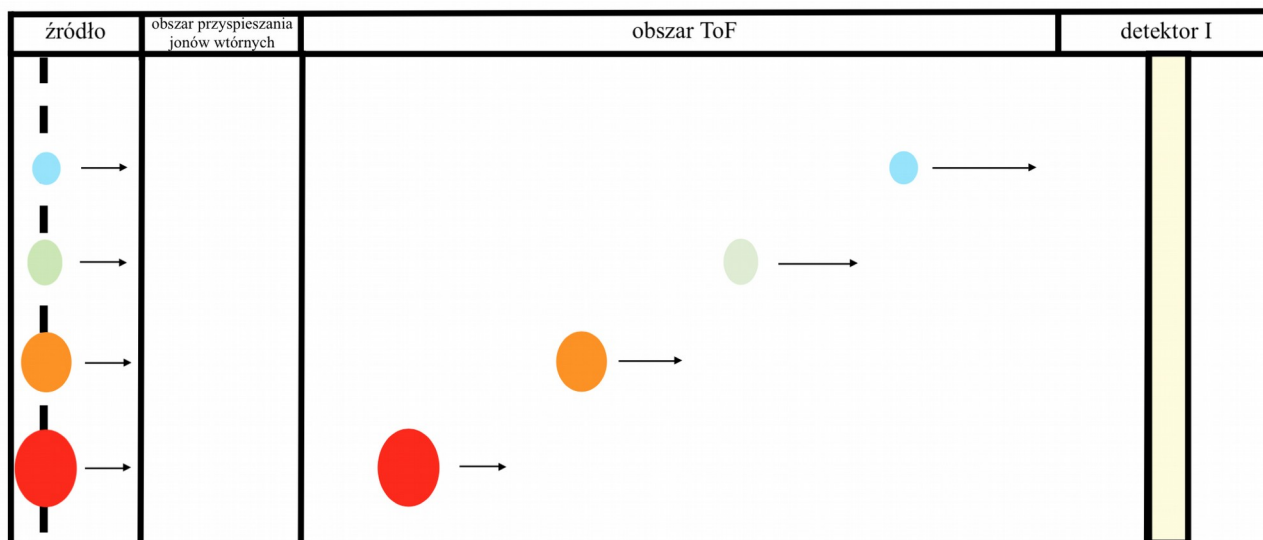
Gdzie: d - długość analizatora, t - czas przelotu jonu. Gdy do **wzoru 1** wstawimy wzór na prędkość, otrzymamy:

$$\frac{m}{z} = \frac{2Ut^2}{d^2} \quad (3)$$

dzięki czemu można wyznaczyć czas przelotu jonu, który wyrażony jest wzorem:

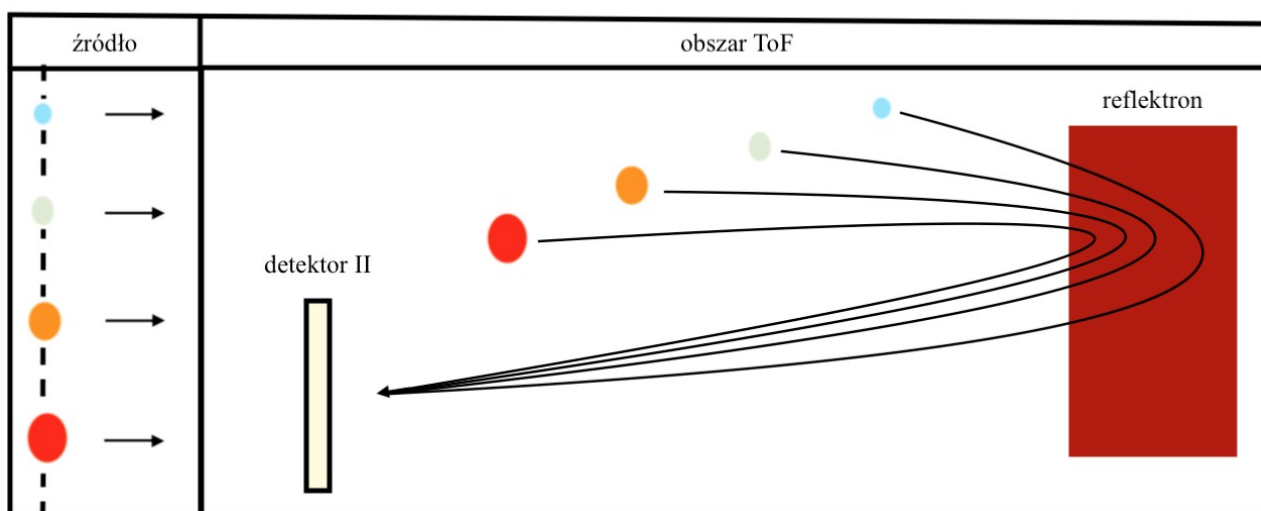
$$t = d\sqrt{\frac{m}{2zU}} \quad (4)$$

Powyższe równanie pokazuje proporcjonalność czasu przelotu jonu (t) do pierwiastka z masy jonu (m), przez co lżejsze jony (o małej masie) poruszają się szybciej od cięższych jonów (o dużej masie), w związku z czym szybciej docierają do detektora, co pokazano na **Rys. 14** [20].



Rys. 14. Schemat ukazujący działanie detektora ToF (tryb liniowy), narysowany na podstawie [20], wykonany przy użyciu programu Dia.

ToF jest uniwersalnym analizatorem o zakresie mas od 0 kDa do 10 kDa (tryb reflektromu) oraz od 0 kDa do 500 kDa (tryb liniowy). W trybie liniowym przeważnie uzyskuje się główne piki poprzez uśrednienie pików izotopowych, z tego powodu większość analizatorów ToF zaopatrzona jest w reflektrom. Dzięki wydłużeniu swobodnej drogi dryfu jonów, uzyskuje się większą rozdzielczość pomiaru mas cząstek (nawet do 10 kDa). Reflektrom w swojej budowie zawiera elektrody pierścieniowe, które posiadają wzrastający potencjał i są ustawione współosiowo (znak pola reflektromu równa się znaku jonów). Wydłużenie czasu przelotu jonów, za czym idzie wzrost stopnia separacji jonów, skutkuje otrzymaniem widma izotopowego, a tym samym zwiększa się rozdzielczość pomiaru [20]. Schemat ukazujący działanie detektora ToF (tryb reflektromu) przedstawiono na **Rys. 15**.



Rys. 15. Schemat ukazujący działanie detektora TOF (tryb reflektromu), narysowany na podstawie [20], wykonany przy użyciu programu Dia.

Analizator ToF charakteryzuje się sprawnym skanowaniem całkowitego zakresu mas. Obszerny zakres mas umożliwia wykorzystanie analizatora ToF do analizy peptydów, metabolitów, polimerów, a także dużych białek [20].

Część eksperymentalna

Część eksperymentalna pracy obejmuje opis prac o charakterze doświadczalnym wraz z przedstawieniem, interpretacją oraz dyskusją wyników dotyczących podjętego tematu badawczego.

Opis eksperymentu umieszczono w czterech podrozdziałach zawierających informacje o materiale biologicznym użytym do badań, izolacji materiału biologicznego, przebiegu eksperymentu, zastosowanej metodzie badawczej oraz analizie statystycznej wyników.

Główna część pracy eksperymentalnej była realizowana przy użyciu aparatury ToF-SIMS. Omówiony został sposób przygotowania danych doświadczalnych z udziałem statystycznych metod analizy wyników, w celu charakterystyki grup lipidowych w badanych próbkach.

4. Materiały i metody

4.1. Hodowla komórek

W doświadczeniu wykorzystano komórki linii beta trzustki (1.1B4), zakupionej w firmie Sigma Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy). Komórki utrzymywano w pożywce RPMI 1640 (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy) uzupełnionej 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 5% 2 mM L-glutaminą (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy) wraz z antybiotykami: 100 µg/ml streptomycyny i 100 jednostek/ml penicyliny (nr kat. 11074440001, oba z Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy).

Wykorzystane w doświadczeniu linie komórkowe hodowano jako monowarstwy na szalkach Petriego o średnicy 100 mm w warunkach 37°C oraz 5% CO₂ w nawilżanym inkubatorze do osiągnięcia 80% konfluencji.

Połowę komórek hodowano w warunkach normoglikemicznych (5 mM glukozy), podczas gdy inne komórki hodowano w warunkach długotrwałej (3 pasaże) hiperglikemii (25 mM glukozy).

4.2. Izolacja EVs

Komórki hodowano przez 24 godziny w pożywce RPMI 1640 bez FBS uzupełnionej L-glutaminą i antybiotykami. Tak przygotowane szalki umieszczono w inkubatorze. Kondycjonowaną pożywkę zebrano i odwirowano przy 400 x g (10 min), 3100 x g (25 min) i 7000 x g (20 min) w celu usunięcia pozostałości komórek. Roztwór z nad osadu zebrano po uprzednim wirowaniu i zagęszczono przy użyciu hydrostatycznej dializy filtracyjnej o niskim ciśnieniu próżniowym (LVHFD, ang. Low Vacuum Hydrostatic Filtration Dialysis). Za pomocą dializacyjnej membrany celulozowej (nr kat. 131486, Spectra/Por Biotech) z odcięciem masy cząsteczkowej

1000 kDa stężenie próbki osiągnęło 3 ml. Następnie próbkę przemyto 100 ml wody demineralizowanej.

4.3. Przygotowanie próbek do analizy ToF-SIMS

Przygotowano podłoża krzemowe o wymiarach 1 x 1 cm² z wafla krzemowych. Każde podłoże oczyszczono kolejno toluenem i etanolem przez 10 min za pomocą myjki ultradźwiękowej i wysuszono pod strumieniem N₂. Na tak przygotowane substraty naniesiono pęcherzyki zewnątrzkomórkowe o objętości 30 μl.

Ostatecznie, naniesienie EVs przeprowadzono przez inkubację z roztworem EVs zawieszonych w buforze PBS, o końcowym stężeniu równym 3·10⁹ cząstek/ml, przez 1 godzinę, a następnie przemycie buforem PBS. Przed pomiarem wszystkie próbki przepłukano wodą destylowaną i wysuszono w strumieniu N₂.

4.4. Analiza ToF-SIMS

Do przeprowadzenia pomiarów wykorzystano system dynamicznej i statycznej spektrometrii mas wtórnych jonów z analizatorem czasu przelotu ToF-SIMS 5 (ION-ToF GmbH, Münster, Niemcy), znajdującym się w Instytucie Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Jako źródło pierwotnych jonów zastosowano działło bizmutowe LMIG. Dla wszystkich wykonanych pomiarów jonami bombardującymi powierzchnie próbek były klastry Bi₃⁺ (30 keV). Wybór takiego działła został podyktowany analizą danych literaturowych. Ten typ klastrów umożliwia generowanie zwiększonego sygnału jonowego z materiałów molekularnych, co znacząco zwiększa czułość techniki ToF-SIMS dla jonów molekularnych lipidów [12]. Zakres masowy podlegający analizie wynosił od 0 do 900 amu. Ciśnienie gazów resztkowych w komorze spektrometru utrzymywano na poziomie 10⁻⁸ mbar w trakcie wykonywania pomiarów. Analizę składu lipidowego wykonano w statycznym modzie pracy spektrometru, co umożliwia otrzymanie szczegółowej informacji o składzie chemicznym powierzchni badanego materiału.

W celu neutralizacji powstającego ładunku na powierzchni próbki, w przerwie między dwoma impulsami pochodzącymi ze źródła pierwotnych jonów, zastosowano niskoenergetyczne działło elektronowe. W przedstawianym cyklu prac eksperymentalnych wykonane eksperymenty przeprowadzono w tym samym czasie i takich samych warunkach.

Do analizy ToF-SIMS próbek mikropęcherzyków wykorzystano holder, na którym umieszczono równocześnie wszystkie mierzone próbki, po dwie z badanych dwóch grup pomiarowych. W pierwszym kroku wykonano analizę powierzchniową na obszarze 150×150 μm² dla ujemnie oraz dodatnio naładowanych wtórnych jonów.

Kalibrację każdego zmierzonego widma wykonano za pomocą sygnałów zidentyfikowanych od następujących jonów dodatnich: H^+ , H_2^+ , CH^+ , CH_2^+ , CH_3^+ oraz $C_3H_2^+$, natomiast w przypadku widm jonów ujemnie naładowanych za pomocą pików C^- , CH^- , CH_2^- , C_2^- , C_2H^- . Odtworzenie przeprowadzonych pomiarów oraz wstępną analizę umożliwił program SurfaceLab 7.2.

Po wykonaniu pomiarów na powierzchniach $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ dla ujemnie oraz dodatnio naładowanych wtórnych jonów, dokonano edycji otrzymanych widm. Na podstawie obrazów emisyjnych, otrzymanych dla prenoli i steroli, wybrano wtórne powierzchnie, z których uzyskano widma użyte do analizy porównawczej.

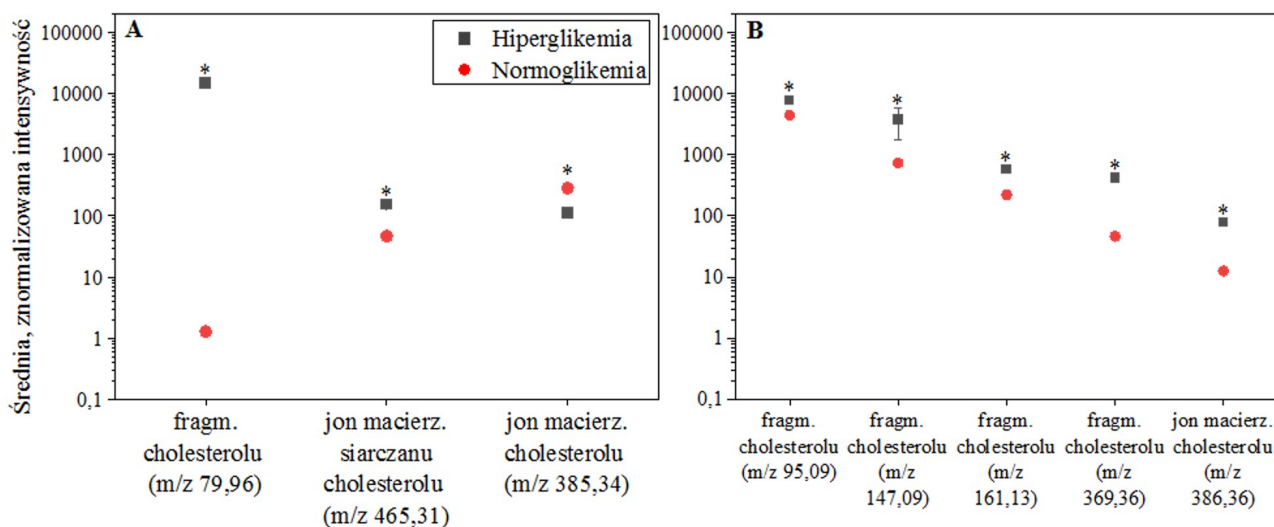
Przeprowadzono analizę statystyczną otrzymanych wyników, określając wartości średnie, odchylenia standardowe dla danej grupy oraz jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Do określenia istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi dla obu grup zastosowano test Tukey'a. Do wykonania jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz wszystkich prezentowanych wykresów wykorzystano program OriginPro 2020b.

5. Wyniki z dyskusją

5.1. Sterole

Cholesterol jest najlepiej poznanym lipidem w grupie steroli, a jego prawidłowy poziom jest niezwykle istotny w fizjologicznym funkcjonowaniu układu biologicznego. Wykazano, iż metabolizm cholesterolu u osób chorych na cukrzycę różni się od tego u osób bez cukrzycy. Wynika to ze zmian w syntezie cholesterolu oraz modyfikacji jego poziomu przez insulinę. Stwierdzono, że skuteczna utrata masy ciała u osób z cukrzycą poprawia efektywność wchłaniania cholesterolu i markerów insulinooporności, a przede wszystkim ma wpływ na efektywność wchłaniania cholesterolu [23]. Simonen i współpracownicy wykazali jednowymiarowy związek między poziomem glukozy we krwi, a syntezą cholesterolu, co oznacza, iż obniżenie poziomu glukozy we krwi zmniejsza syntezę cholesterolu i zwiększa jego wchłanianie [24].

Mając na uwadze powyżej wskazane zależności przeprowadzono analizę porównawczą poziomu średnich wartości intensywności dla dwóch analizowanych grup badawczych. Otrzymane wyniki zaprezentowano na **Rys. 16 A i B**. W celu weryfikacji różnic między dwoma warunkami eksperymentalnymi, przeprowadzono jednoczynnikową analizę ANOVA, a także test Tukey'a. Otrzymane istotne statystycznie różnice między średnimi, znormalizowanymi intensywnościami dla określonych mas przy $p \geq 0,05$, przedstawiono na **Rys. 16 A i B** symbolem *.



Rys. 16. Średnie, znormalizowane intensywności charakterystycznych pików w polaryzacji **A)** ujemnej dla steroli, **B)** dodatniej dla steroli. Symbol * przypisany jest średnim wartościom, dla których wykazano istotne różnice przy $p \geq 0,05$.

Rys. 16A ilustruje, jak kształtuje się średnia, znormalizowana intensywności dla trzech mas: m/z 79,96 [fragm. cholesterolu], m/z 385,34 [jon macierz. cholesterolu], m/z 465,31 [jon macierz. siarczanu cholesterolu]. Dla wszystkich związków widoczne jest zróżnicowanie średnich, znormalizowanych intensywności w badanych warunkach.

Dla pięciu mas: m/z 95,09 [fragm. cholesterolu], m/z 147,09 [fragm. cholesterolu], m/z 161,13 [fragm. cholesterolu], m/z 369,36 [fragm. cholesterolu], m/z 386,36 [jon macierz. cholesterolu], przedstawionych na **Rys. 16B**, widoczna jest istotna statystycznie różnica średnich, znormalizowanych intensywności w badanych warunkach. Analizując powyższy wykres można zaobserwować, iż w warunkach normalnych średnia wartość intensywności jest niższa, niż w warunkach hiperglikemii.

Przeprowadzona analiza wskazuje, iż dla wszystkich charakterystycznych jonów z grupy steroli w polaryzacji ujemnej – fragmentu cholesterolu, jonu macierzystego siarczanu cholesterolu oraz jonu macierzystego cholesterolu, występuje istotna statystycznie różnica między badanymi warunkami.

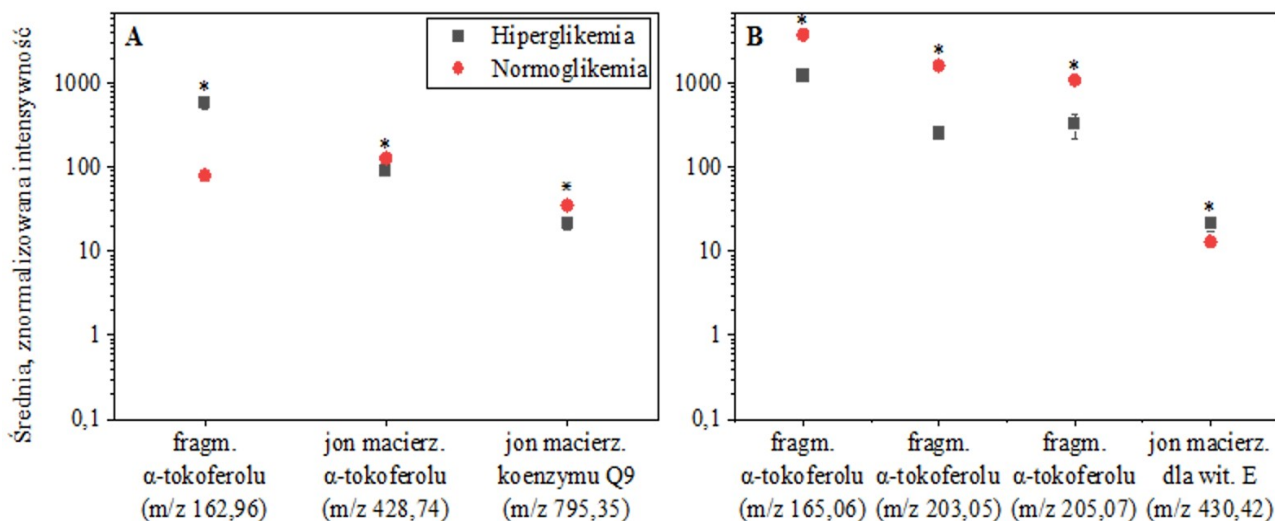
Opierając się na wynikach, umieszczonych na powyższych rysunkach, można stwierdzić, iż warunki hiperglikemiczne mają istotny wpływ na zawartość cholesterolu w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych izolowanych komórek beta trzustki. Aktualne wytyczne, oparte na analizie danych statystycznych, wzywają do agresywnej strategii leczenia w celu obniżenia poziomu cholesterolu, ciśnienia krwi i poziomu glukozy u pacjentów z cukrzycą, zaś dane dotyczące leczenia wysokiego poziomu trójglicerydów i niskiego poziomu cholesterolu pozostają niejednoznaczne

[25]. Wiadomo, że HDL jest odwrotnie skorelowany z chorobami układu krążenia ze względu na różnorodne funkcje przeciwmiażdżycowe. Funkcje te obejmują wypływ cholesterolu i odwrotny transport cholesterolu, działanie przeciwutleniające oraz przeciwzapalne. Jednakże wykazano, iż HDL ulega utracie funkcji w kilku stanach patofizjologicznych, takich jak odpowiedź ostrej fazy, otyłość czy przewlekłe choroby zapalne. Wykazano również, że niektóre z tych chorób są związane ze zwiększonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych. Jedną z takich chorób, która jest związana z dysfunkcją HDL i przyspieszoną miażdżycą tętnic, jest cukrzyca, choroba, w której cząsteczka HDL podlega różnym modyfikacjom strukturalnym, które powodują znaczące zmiany w jej funkcji. [26]

5.2. Prenole

Witamina E, będąca niezbędnym składnikiem pokarmowym, w szczególności α -tokoferol, chroni oraz warunkuje właściwą strukturę błon biologicznych, zapewnia syntezę lipidów, przeciwdziała chorobom układu krążenia, a także ma wpływ na prawidłowe krzepnięcie krwi. U cukrzyków witamina E powoduje obniżenie poziomu glukozy oraz cholesterolu we krwi, a także spowalnia choroby niedokrwienne serca. Chorzy na cukrzycę mają większe zapotrzebowanie na wit. E, gdyż poprawia ona aktywność insuliny oraz zmniejsza tolerancję glukozy. Annand i Vaishali Jain wykazali, iż pacjenci przyjmujący suplementację witaminy E mieli opóźniony rozwój i powolny postęp powikłań cukrzycowych [27]. Stwierdzono również, iż witamina E poprawia stres oksydacyjny oraz funkcje wątrobowo-komórkowe. Insulinooporność również się poprawia, jednak efekt ten wydaje się przemijający [28].

Biorąc pod uwagę powyższe dane przeprowadzono analizę porównawczą poziomu średnich wartości intensywności dla dwóch analizowanych grup badawczych. Otrzymane wyniki zaprezentowano na **Rys. 17 A i B**. W celu weryfikacji różnic między dwoma warunkami eksperymentalnymi, przeprowadzono jednoczynnikową analizę ANOVA, a także test Tukey'a. Otrzymane istotne różnice między średnimi, znormalizowanymi intensywnościami dla określonych mas przy $p \geq 0,05$, przedstawiono na **Rys. 17 A i B** symbolem *.



Rys. 17. Średnie, znormalizowane intensywności charakterystycznych jonów w polaryzacji **A)** ujemnej dla prenoli, **B)** dodatniej dla prenoli. Symbol * przypisany jest średnim wartościom, dla których wykazano istotne różnice przy $p \geq 0,05$.

Analizując **Rys. 17A**, widoczne są istotne statystycznie różnice średnich, znormalizowanych intensywności dla fragmentu α-tokoferolu (m/z 162,96), jonu macierzystego α-tokoferolu (m/z 428,74) oraz jonu macierzystego koenzymu Q9 (m/z 795,35) ze względu na badane warunki.

Dla czterech mas: m/z 165,06 [fragm. α-tokoferolu], m/z 203,05 [fragm. α-tokoferolu], m/z 205,07 [fragm. α-tokoferolu], m/z 430,42 [jon macierz. dla wit. E], przedstawionych na **Rys. 17B**, widoczne są istotne statystycznie różnice średnich, znormalizowanych intensywności w badanych warunkach. Dla fragmentów α-tokoferolu można zaobserwować, iż w warunkach hiperglikemii średnia wartość intensywności jest niższa, niż w warunkach normalnych. Jedynie dla jonu macierzystego dla witaminy E, zależność ta jest odwrotna.

W analizie zawierającej koenzym Q9, uwzględniono wyniki otrzymane dla trzech charakterystycznych jonów w polaryzacji ujemnej prenoli. Dla fragmentu jonu macierzystego α-tokoferolu (m/z 428,74) wykryto nieznaczną różnicę między średnimi, znormalizowanymi intensywnościami, zaś dla pozostałych jonów różnica ta jest bardziej widoczna.

W analizie zawierającej witaminę E, uwzględniono wyniki otrzymane dla czterech charakterystycznych jonów w polaryzacji dodatniej prenoli. Otrzymano istotne statystycznie różnice pomiędzy średnimi wartościami intensywności dla warunków normalnych oraz hiperglikemicznych. Fragmenty α-tokoferolu mają większą intensywność w warunkach normalnych, zaś jon macierzysty dla witaminy E w warunkach hiperglikemii.

Opierając się na zamieszczonych wynikach można stwierdzić, iż warunki hiperglikemiczne mają istotny wpływ na zawartość witaminy E w badanych próbkach pęcherzyków

zewnątrzkomórkowych pochodzących z komórek beta trzustki. Wyniki te mogą przyczynić się do hipotezy, iż suplementacja witaminy E odgrywa istotną rolę w opóźnianiu wystąpienia powikłań cukrzycowych [27].

Podsumowanie

W polaryzacji ujemnej dla steroli, dla fragmentu cholesterolu, jonu macierzystego siarczanu cholesterolu oraz jonu macierzystego cholesterolu, występuje istotna statystycznie różnica między badanymi warunkami.

W polaryzacji dodatniej dla steroli, w warunkach normalnych średnia wartość intensywności jest niższa, niż w warunkach hiperglikemii.

W polaryzacji ujemnej dla steroli, dla fragmentu jonu macierzystego α -tokoferolu (m/z 428,74) wykryto nieznaczną różnicę między średnimi, znormalizowanymi intensywnościami, zaś dla pozostałych jonów różnica ta jest bardziej widoczna.

W polaryzacji dodatniej dla prenioli, fragmenty α -tokoferolu mają większą intensywność w warunkach normalnych, zaś jon macierzysty dla witaminy E w warunkach hiperglikemii.

Zdolność komórek do wydzielania pęcherzyków otoczonych podwójną warstwą lipidową jest zjawiskiem wszechobecnym, proces ten jest obserwowany u zwierząt, bakterii, a także u roślin [13]. Równocześnie lipidy odgrywają dobrze zdefiniowaną rolę w sygnalizacji i transkrypcji genów, jako paliwa metaboliczne oraz jako składniki strukturalne komórek [29]. Ich istota wzrasta tym bardziej, iż na podstawie znanej zawartości lipidowej można ocenić stan układu biologicznego. W związku z tym, analiza porównawcza przedstawiająca zmiany zawartości poszczególnych lipidów może rzucać światło na to, czy skład lipidów w próbce pasuje do oczekiwanego składu dwuwarstwy lipidów komórkowych, czy też stanowi prognostyk zachodzących stanów patologicznych [13].

Ostatecznie charakterystyka lipidowa błony pęcherzyków może posłużyć do oceny stanu fizjologicznego badanych pęcherzyków, komórek wydzielających, jak i całego układu biologicznego.

Bieżące postępy w spektrometrii mas oferują coraz wrażliwsze techniki analizowania lipidów w celu lepszego zbadania składu lipidowego układu biologicznego [29]. Opisywana grupa struktur biologicznych, do której należą egzosomy, ektosomy oraz ciała apoptyczne, jest aktualnie postrzegana jako nowe, istotne mediatory w komunikacji międzykomórkowej, uczestniczące w procesach fizjologicznych oraz patologicznych. Zbadanie komunikacji międzykomórkowej, prowadzonej przez egzosomy i mikropęcherzyki, otworzyło nową erę w rozpoznawaniu procesów

patofizjologicznych. Zarówno egzosomy jak i mikropęcherzyki, przyczyniają się do kilku patofizjologii, tj. zapalenie, rozwój guza czy miażdżyca. Jednak pęcherzyki zewnątrzkomórkowe działają również pozytywnie w obrębie układu odpornościowego w węzłach chłonnych lub w fizjologii mózgu poprzez m.in. aktywację neuronów [30].

Wnioski

Najważniejsze wnioski, które wynikają z przeprowadzonych badań:

1. Z przeprowadzonej jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu Tukey'a jednoznacznie wynika, iż dla wszystkich wybranych jonów dla prenoli i steroli występują istotne statystycznie różnice pomiędzy średnimi wartościami intensywności dla warunków normalnych oraz hiperglikemicznych przy $p \geq 0,05$.
2. Przeprowadzona analiza potwierdziła, iż wykorzystana technika ToF-SIMS jest skuteczna, zaś jej zaawansowany rozwój sprawił, iż jest coraz częściej stosowana do badań biologicznych, gdzie wykorzystywana jest przede wszystkim do analizy lipidów oraz protein.

Bibliografia:

1. Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil. P.A., *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Wydanie VII, Warszawa 2018, str. 622-628.
2. Grzybowska A., Lorenc T., Olejarz W., Nowicka G., *Egzosomy jako nośniki informacji w komunikacji między komórkami nowotworowymi*, Biul. Wydz. Farm. WUM, 2019, 2, 6-13.
3. Kłuszejko-Stefanowicz L., *Cytobiochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002, str. 236-240.
4. Wójtowicz A., Baj-Krzyworzeka M., Baran J., *Characterization and biological role of extracellular vesicles*, Postepy Hig Med Dosw, 2014, 68: 1421-1432.
5. Stępień E., Kamińska A., Drożdż A., *Mikropęcherzyki pochodzenia komórkowego – nowe perspektywy dla diagnostyki i terapii*, Centrum Transferu Technologii CITTRU, Uniwersytet Jagielloński, <https://biotechnologia.pl/biotechnologia/mikropecherzyki-pochodzenia-komorkowego-nowe-perspektywy-dla-diagnostyki-i-terapii,17650>, [15.01.2018].
6. Kweczlich M., *Wpływ ektosomów uwalnianych przez metastatyczne komórki nowotworowe na właściwości migracyjne mniej inwazyjnych komórek*, Praca magisterka, Wydział Biologii UJ, Repozytorium Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2019.
7. Drożdż A., Kamińska A., Surman M., Gonet – Surówka A., Jach R., Huras H., Przybyło M., Stępień E., *Low-Vacuum Filtration as an Alternative Extracellular Vesicle Concentration Method: A Comparison with Ultracentrifugation and Differential Centrifugation*, Pharmaceutics, 2020 Sep; 12(9): 872.
8. *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*, Journal of Extracellular Vesicles, 2018 Nov 23; 7(1): 1535750.
9. Dragovic R., Gardiner Ch., Brooks A., Tannetta D., Ferguson D., Hole P., Carr B., Redman Ch., Harris A., Dobson P., Harrison P., Sargent I., *Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, December 2011; 7(6): 780-788.
10. Villas BH., *Flow cytometry: an overview*, The Journal of Analytical Morphology, 01 Jan 1998, 5(1): 56-61.
11. Song Y., Zhang J., Li D., *Microfluidic and Nanofluidic Resistive Pulse Sensing: A Review*, 2017, 8(7): 207.
12. Lee A., *Biological membranes: the importance of molecular detail*, Trends in Biochemical Sciences, September 2011, 36(9): 493-500.

13. Skotland T., Sagini K., Sandvig K., Llorente A., *An emerging focus on lipids in extracellular vesicles*, Department of Molecular Cell Biology, Institute for Cancer Research, Oslo University Hospital, The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway, 2020, 159: 308-321.
14. Denbigh J. L., Lockyer N. P., *ToF-SIMS as a tool for profiling lipids in cancer and other diseases*, Materials Science and Technology, 2015, 31(2): 137-147.
15. *Elektrochemia Membran Lipidowych, Skład membran lipidowych*, Katedra Chemii, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, <http://www.uwm.edu.pl/kchem/badania/blm/blm1.html>, [13.12.2020].
16. Marzec M., *Analiza profili lipidowych wybranych układów biologicznych metodą spektrometrii masowej TOF-SIMS*, Praca doktorska, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, luty 2018.
17. Aime C., Coradinn T., *Bionanocomposites: Integrating Biological Processes for Bioinspired Nanotechnologies*, Paris, France, 2017 Sept, str. 34.
18. Bruce C., Tall A. R., *Cholesteryl ester transfer proteins, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis*, Curr Opin Lipidol, 1995 Oct, 6(5): 306-31.
19. Różański H., *Naturalne substancje anaboliczne, Fitosterole*, <http://luskiewnik.strefa.pl/fitosterole/sterole/pages/p6.htm>, [21.01.2020].
20. Sosnowski P., *Obrazowanie tkanek metodą spektrometrii mas MALDI-MSI*, Praca doktorska, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa 2015.
21. Passarelli M., K., Winograd N., *Lipid Imaging with Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS)*, Biochim Biophys Acta, 2011 Nov, 1811(11): 976-990.
22. Ayciriex S., Touboul D., Brunelle A., Laprevote O., *Time of flight secondary ion mass spectrometer: A novel tool for lipid imaging*, Clinical Lipidology, 2011, 6(4): 437-445.
23. Simonen P., Gylling H., Howard A. N., Miettinen T. A., *Introducing a new component of the metabolic syndrome: low cholesterol absorption*, Am J Clin Nutr, 2000 Jul, 72(1): 82-88.
24. Simonen P., Gylling H., Howard A. N., Miettinen T. A., *Diabetes Contributes to Cholesterol Metabolism Regardless of Obesity*, 2002 Sep, 25(9): 1511-1515.
25. Bitzur R., Cohen H, Kamari Y., Shaish A., Harats D., *Triglycerides and HDL Cholesterol*, Diabetes Care, 2009 Nov, 32 (suppl 2): 383-377.
26. Farbstein D., Levy A., *HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments*, Expert Rev Cardiovasc Ther. 2012 Mar, 10(2): 353-36.
27. Jain A., Jain V., *Vitamin E, Its Beneficial Role in Diabetes Mellitus (DM) and Its Complications*, J Clin Diagn Res., 2012 Dec, 6(10): 1624-1628.

- 28.** Manning P., Sytherland W., Walker R., Williams S., Jong S., Ryalls A., Berry E., *Effect of High-Dose Vitamin E on Insulin Resistance and Associated Parameters in Overweight Subjects*, *Diabetes Care*, 2004 Sep, 27(9): 2166-2171.
- 29.** Metcalfe L., Smith G., Turner N., *Defining lipid mediators of insulin resistance: controversies and challenges*, Department of Pharmacology, School of Medical Sciences, UNSW Sydney, New South Wales, Australia, 2018 Aug, JME-18-0023.
- 30.** Record M., Silvente-Poirot S., Poirot M., Wakelam M., *Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions*, University of Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France and Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom, 2018 Aug, 59(8): 1316-1324.