

mgr Aneta Moskalik

**Fenotyp makrofagów serca myszy w zespole metabolicznym
oraz oddziaływanie makrofagów na komórki śródbłónka
naczyń chłonnych in vitro**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Anna Ratajska

Katedra Patomorfologii

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2022

Aneta Moskalik
Anna Ratajska

Streszczenie w języku polskim

Zespół metaboliczny to termin określający współwystępowanie czynników związanych z zaburzeniami metabolicznymi, których objawem jest otyłość brzuszna, insulinooporność, cukrzyca typu II, dyslipidemia, nadciśnienie tętnicze. Czynniki te prowadzą do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych oraz powikłań neurologicznych. Jednym z głównych skutków zespołu metabolicznego jest niewydolność serca, spowodowana jego przebudową czynnościową i strukturalną. Przebudowa naczyń chłonnych miokardium jako potencjalny element przyczyniający się do niewydolności serca nie była dotąd przedmiotem badań naukowych ani obserwacji klinicznych. Badania naszego zespołu wykazały, iż w zespole metabolicznym dochodzi do zmian strukturalnych i funkcjonalnych w obrębie naczyń chłonnych serca, co przyczynia się do powstania obrzęku, zmian w macierzy pozakomórkowej oraz skutkuje zwłóknieniem mięśnia sercowego. Przypuszczamy, że makrofagi tkankowe, które pełnią różnorodne funkcje w utrzymywaniu homeostazy narządowej oraz podczas progresji chorób układu sercowo-naczyniowego, a także wykazują się plastycznością i zdolnością odpowiedzi na zmiany mikrośrodowiska, mogą również oddziaływać na naczynia chłonne. Jednak fenotyp makrofagów serca w zespole metabolicznym nie został do tej pory poznany. Badania zespołu naukowego, w których uczestniczyłam dowiodły, że makrofagi serc myszy db/db wykazują wysoką ekspresję miR-31, który potencjalnie reguluje szlaki sygnałowe związane z budową i funkcją naczyń chłonnych oraz procesem włóknienia.

Celem pracy była ocena fenotypu makrofagów serca myszy db/db jako zwierzęcego modelu zespołu metabolicznego oraz zbadanie wpływu makrofagów modyfikowanych miR-31 na komórki śródbłonna naczyń chłonnych *in vitro*.

Pierwszą część badań przeprowadzono na samcach myszy BKS.Cg-Dock7^m+/+Lepr^{db}/J (db/db); kontrolę stanowił szczep C57BL/6J. Dokonano pomiarów masy ciała, masy serca, stężenia glukozy we krwi oraz triglicerydów w surowicy krwi. W 21. tygodniu życia zwierzęta uśmiercono. Liczebność i fenotyp makrofagów serca oceniano w mikroskopie konfokalnym na skrawkach serc znakując komórki swoistymi przeciwciałami oraz w zawiesinie komórek izolowanych i znakowanych do badań przy użyciu cytometrii przepływowej. Następnie wysortowano dwie populacje makrofagów serc myszy db/db i zdrowych o fenotypach: CD45⁺CD11b⁺CD64⁺Ly6C^{-low} i CD45⁺CD11b⁺CD64⁺Ly6C^{+hi}, w których oceniono profil ekspresji miRNA. Na podstawie analizy bioinformatycznej i analizy baz danych wyselekcjonowano miR-31 do kolejnych eksperymentów. Druga część

badania została wykonana w warunkach *in vitro*. Badania te były przeprowadzone na linii komórkowej makrofagów RAW 264.7 i pierwotnych komórkach śródbłonna naczyń chłonnych skóry (LEC) i obejmowały transfekcje miR-31 do tych komórek oraz hodowlę LEC z supernatantem z RAW 264.7 modyfikowanych miR-31. Poziom ekspresji mRNA dla genów związanych z limfangiogenezą, regulacją fenotypu LEC, przebudową składników kotwiczących LEC do macierzy pozakomórkowej i procesem włóknienia badano w miokardium myszy oraz materiale z hodowli komórkowych za pomocą metody qRT-PCR. Wybrane wyniki potwierdzono na poziomie białka testem ELISA lub techniką Western Blot.

Myszy db/db charakteryzowały się znacznie większą masą ciała, wysokim stężeniem glukozy i triglicerydów, zmniejszeniem masy serca oraz obfitą tkanką tłuszczową osierdza i wokół narządów jamy brzusznej w porównaniu do tych parametrów i cech u myszy zdrowych. Najliczniejsza populacja w sercu myszy db/db o fenotypie Ly6C^{low} wykazywała ekspresję markerów o profilu przeciwzapalnym, a także charakteryzowała się wysoką ekspresją miR-31. Mniejsza liczebnie populacja Ly6C^{hi} ulegała polaryzacji w kierunku prozapalnym. Natomiast całkowita liczba makrofagów w sercu myszy db/db była obniżona w porównaniu do ich liczby w sercu zdrowej myszy. Makrofagi modyfikowane miR-31 wydelały więcej VEGF-C i TGF- β oraz mniej IGF-1 w stosunku do RAW 264.7 kontrolnych. Supernatant z RAW 264.7 modyfikowanych miR-31 zmniejszał w LEC ekspresję mRNA dla genów związanych z regulacją limfangiogenezy, utrzymaniem prawidłowej struktury i funkcji LEC oraz włóknieniem.

Podsumowując, potwierdzono, że myszy db/db stanowią zwierzęcy model doświadczalny, który posiada cechy zespołu metabolicznego. W niniejszej pracy po raz pierwszy oceniono fenotyp makrofagów serca myszy db/db. Wykazano obecność dwóch głównych populacji tych komórek, liczniejsza charakteryzowała się fenotypem przeciwzapalnym, zaś mniej liczna fenotypem prozapalnym. W sercu myszy db/db występuje również populacja makrofagów o niejednoznacznym fenotypie. Mniejsza liczba makrofagów w sercach myszy db/db względem liczby tych komórek u myszy kontrolnych może wskazywać na występowanie zaburzeń odpowiedzi immunologicznej, a w konsekwencji na brak możliwości efektywnego przeciwdziałania negatywnym skutkom zespołu metabolicznego w sercu. Makrofagi pod wpływem miR-31 wykazują potencjał związany z hamowaniem włóknienia, jednak mogą również negatywnie wpływać na limfangiogenezę, strukturę i funkcje LEC.