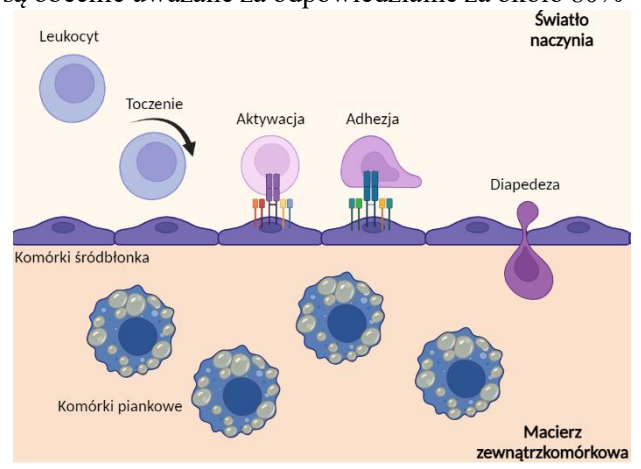


Raman4Cell2Cell: Odkrywanie wzajemnych interakcji leukocytów i komórek śródbłonka za pomocą (stymulowanego) obrazowania ramanowskiego

Nasze ciało zachowuje się jak orkiestra muzyczna z różnymi sekcjami instrumentalnymi, które można przypisać do różnych układów (krążenia lub limfatycznego) w ludzkim ciele. Odpowiednie współdziałanie i komunikacja wszystkich układów jest bardzo ważna dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Wraz z rozwojem cywilizacji zmienia się środowisko, które może wpływać na naszą orkiestrację w ciele, powodując pewne zaburzenia, zwane chorobami cywilizacyjnymi. Dotykają one bardzo dużego odsetka populacji i są obecnie uważane za odpowiedzialne za około 80% przedwczesnych zgonów ludzi. Rozwój chorób cywilizacyjnych związany jest z przewlekłym stanem zapalnym komórek, w którym kluczowe znaczenie ma komunikacja między leukocytami (Leu) a komórkami śródbłonka (ECs). Te interakcje komórka-komórka w stanie zapalnym odbywają się nie tylko poprzez wysyłanie sygnałów międzykomórkowych, ale w wielu przypadkach również poprzez bezpośredni kontakt między tymi komórkami, a proces ten nazywany jest transmigracją. Proces ten jest bardzo złożony i można go podzielić na kilka etapów: różnicowanie komórek macierzystych w wybrane podtypy Leu, toczenie, aktywację, adhezję do ECs i migrację do narządów przez warstwę komórek śródbłonka (ryc. 1). Głównym celem tego projektu jest wyjaśnienie interakcji i wzajemnego wpływu leukocytów i komórek śródbłonka podczas stanu zapalnego przy użyciu technik spektroskopii ramanowskiej in situ (RS).



Rys 1. Schemat transmigracji leukocytu (Created with BioRender.com).

Leu odgrywają kluczową rolę w układzie odpornościowym, zarówno adaptacyjnym, jak i wrodzonym. Aby stały się one w pełni funkcjonalnymi komórkami zdolnymi do walki z komórkami docelowymi, konieczna jest ich aktywacja w odpowiedzi na czynniki odpowiedzi immunologicznej. Obecnie aktywacja limfocytów T została zaproponowana w terapii CAR-T, która jest wysoce zaawansowaną i spersonalizowaną formą immunoterapii nowotworów. Różne subpopulacje Leu są zaangażowane w różne odpowiedzi zapalne, np. limfocyty T w miażdżycy, a monocyty w chorobie wieńcowej, i w tych procesach prowokowana jest ich migracja przez śródbłonek do miejsc zapalnych. Śródbłonek to pojedyncza warstwa komórek wyściełająca wnętrze naczyń, pełniąc wiele funkcji i zadań. Wszelkie zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu ECs wpływają na funkcjonowanie całego układu krwionośnego, ponieważ wiele chorób, takich jak rak, cukrzyca czy miażdżycy, jest ściśle powiązanych z dysfunkcją śródbłonka. Co więcej, aktywowany stanem zapalnym Leu może wpływać na stan ECs, co w dłuższej perspektywie może prowadzić do upośledzenia funkcjonowania układu krążenia. Lipidy i karotenoidy są szczególnie ważnymi substancjami zaangażowanymi w procesy zapalne, a ich rola w tych procesach jest dobrze znana. Niemniej jednak ich zmiany metaboliczne nadal pozostają niewyjaśnione.

Hipotezy postawione w ramach tego projektu są następujące: **i/** stymulacja stanu zapalnego in vitro w modelach ECs chorób cywilizacyjnych aktywuje wybrane Leuk, a ich aktywacja zachodzi na różne sposoby; **ii/** obecność karotenoidów w komórkach Leu zmienia wydajność ich transmigracji przez ECs; **iii/** wydajność transmigracji Leu różni się w komórkach prawidłowych i komórkach narażonych na egzogenne tłuszcze. Hipotezy są również silnie skorelowane z **określonymi celami**, które obejmują: **1/** zbudowanie Spektroskopowego Atlasu Leukocytów - wybrane zostaną unikalne markery spektroskopowe dla wybranych podtypów Leu; **2/** zidentyfikowanie spektroskopowych markerów aktywacji Leu i zmian biochemicznych w procesie adhezji/transmigracji przez ECs w stanach zapalnych; **3/** określenie zmian w procesie aktywacji Leu indukowanych stanem zapalnym w ECs; **4/** śledzenie zmian w wymianie karotenoidów i lipidów pomiędzy Leu i ECs w procesie transmigracji z wykorzystaniem RS.

Obecnie do badania interakcji komórka-komórka wykorzystuje się wiele technik, takich jak mikroskopia fluorescencyjna, transmisyjna mikroskopia elektronowa, cytometria przepływowa czy spektrometria mas. Jednak, co warto podkreślić, metody te dostarczają informacji jedynie o globalnych zmianach w komórkach, takich jak lipidowość komórek czy obecność białek/receptorów na powierzchni komórek. Aby w pełni zrozumieć te procesy, wymagane są pełne informacje molekularne, morfologiczne i metabolomiczne. Taki zestaw informacji można uzyskać za pomocą szeregu technik ramanowskich in situ (RS, stymulowane rozpraszanie ramanowskie - SRS, koherentna anty-Stokesowska spektroskopia ramanowska - CARS) w połączeniu z innymi uznanymi metodami (mikroskopia fluorescencyjna i cytometria przepływowa). W projekcie zaplanowano charakterystykę 3M Raman (molekularną, morfologiczną i metaboliczną) zarówno Leu, jak i ECs podczas ich komunikacji. Oceniana będzie zdolność do wymiany i transportu substancji (karotenoidów i lipidów) pomiędzy Leu i ECs, a także ocena zmian jakościowych w znakowanych lipidach. Spektroskopia Ramana dostarcza szczegółowych informacji o składzie i pozwala śledzić zmiany w czasie w pojedynczych komórkach.

Badania nad komunikacją międzykomórkową między Leu i ECs, w tym transportem międzykomórkowym, są innowacyjnym podejściem, które przyczyni się do lepszego zrozumienia mechanizmu procesów zapalnych związanych z wybranymi chorobami cywilizacyjnymi. Może to przyczynić się do opracowania nowych strategii leczenia, szczególnie w przypadku przewlekłych stanów zapalnych, które nadal stanowią wyzwanie w leczeniu.