



Załącznik nr 2A

Autoreferat

***„Nowe aspekty patofizjologii kropeł lipidowych w zapaleniu
izolowanego naczynia krwionośnego”***

Dr inż. Marta Pacia
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET)

Kraków, 2023

*Dane osobowe:***Dr inż. Marta Pacia****Poprzednie nazwisko: Pilarczyk**

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET)
Ul. Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków
e-mail: marta.pacia@uj.edu.pl

Web of Science ID: AAG-9558-2019
ORCID ID: 0000-0002-0391-2502

Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- **07.06.2017:** uzyskany tytuł: **doktor nauk chemicznych** przyznany przez Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego na podstawie obrony pracy doktorskiej pt.: *Wieloparametrowe obrazowanie zmian chemicznych w tkankach ex vivo w mysich modelach chorób cywilizacyjnych*. Promotorem rozprawy doktorskiej była Pani dr hab. Agnieszka Kaczor.
- **04.06.2012:** ukończenie studiów w formie stacjonarnej na kierunku Chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wynikiem bardzo dobrym i uzyskania tytułu zawodowego **magistra**
- **0102.2013:** ukończenie studiów w formie stacjonarnej na kierunku Technologia Chemiczna na Wydziale Energetyki i Paliw Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie z wynikiem plus dobrym i uzyskanie tytułu zawodowego **inżyniera**
- **29.06.2010:** ukończenie studiów w formie stacjonarnej na kierunku Chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wynikiem bardzo dobrym i uzyskania tytułu zawodowego **licencjata**

Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych:

- **10.2021-teraz:** zatrudnienie na stanowisku adiunkta w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET), Uniwersytet Jagielloński
- **12.2017-10.2021:** zatrudnienie na stanowisku asystenta w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET), Uniwersytet Jagielloński
- **01.2020-03.2021:** przerwa naukowa związana z macierzyństwem
- **01.2019-0.4.2019:** staż naukowy w ramach zatrudnienia w grupie Pani Profesor Kristiny Kusche-Vihrog w Instytucie Fizjologii na Uniwersytecie w Lubece, w Niemczech
- **06.2017-05.2018:** przerwa naukowa związana z macierzyństwem

Krótkie podsumowanie dorobku naukowego:

Osiągnięcie będące podstawą postępowania habilitacyjnego:

- Jako podstawę habilitacji Aplikantka wybrała **cykl czterech oryginalnych artykułów** powiązanych tematycznie, **opublikowanych w latach 2020-2023** w recenzowanych czasopismach o międzynarodowym zasięgu (lista A z bazy *Journal Citation Reports*, JRC). We wszystkich artykułach **jestem pierwszym oraz korespondencyjnym autorem**. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (*Impact Factor*; IF) dla tych prac według roku ich wydania to IF=25.374, sumaryczna punktacja MEiN = 560

Dorobek naukowy:

- Sumarycznie Aplikantka jest **współautorką 28 publikacji naukowych** w recenzowanych czasopismach o międzynarodowym zasięgu (lista A z bazy *Journal Citation Reports*, JRC), 13 z nich zostało opublikowanych po uzyskaniu przez Aplikantkę stopnia doktora, a 14 z nich przed uzyskaniem stopnia doktora. **Łącznie w 14 pracach Aplikantka jest pierwszą współautorką.**
- Aplikantka jest **współautorką 9 rozdziałów w monografiach naukowych**, 3 z nich zostały opublikowane po uzyskaniu przez Aplikantkę stopnia doktora, a 6 z nich przed uzyskaniem stopnia doktora.
- Obecnie Aplikantka **kieruje projektem SONATA (2022-2025)** przyznany przez Narodowe Centrum Nauki, Jest to drugi projekt kierowany przez Aplikantkę po uzyskaniu stopnia doktora (poprzednim była SONATINA 2017-2022). Przed uzyskaniem stopnia doktora Aplikantka kierowała projektem PRELUDIUM oraz ETIUDA przyznawanym przez Narodowe Centrum Nauki.
- Łącznie Aplikantka zdobywała nową wiedzę na 6 stażach naukowych, w tym 5 stażach zagranicznych.

Autoreferat:**NOWE ASPEKTY PATOFIZJOLOGII KROPEL LIPIDOWYCH W ZAPALENIU IZOLOWANEGO NACZYNIA KRWIONOŚNEGO****1. WPROWADZENIE**

Podstawą osiągnięcia naukowego zgłaszanego do postępowania habilitacyjnego jest cykl publikacji zatytułowany „**Nowe aspekty patofizjologii kropeł lipidowych w zapaleniu izolowanego naczynia krwionośnego**”. Poniżej zamieszczono omówienie osiągnięć, zawartych w cyklu 4 artykułów naukowych opublikowanych w latach 2020-2023 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (lista A z bazy *Journal Citation Reports*, JRC). Cykl wybranych prac dotyczy patobiologii powstawania kropeł lipidowych w śródbłonku i ścianie naczynia. Wkład pozostałych współautorów został określony w stosownych oświadczeniach. We wszystkich artykułach **jestem pierwszym oraz korespondencyjnym autorem**. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) dla tych prac według roku ich wydania to IF=25.374, sumaryczna punktacja MEiN = 560 (1-4).

H1. Marta Z. Pacia (corresponding author), Natalia Chorazy, Magdalena Sternak, Kamila Wojnar-Lason, Stefan Chlopicki, *Vascular lipid droplets formed in response to TNF, hypoxia or OA: biochemical composition and prostacyclin generation*, *Journal of Lipid Research*, **2023**, 64, 5, 1000355, DOI: doi.org/10.1016/j.jlr.2023.100355
IF=6,676 IF (5-years)= 5,671 MEiN=140 Liczba cytowań: 0

H2. Marta Z. Pacia (corresponding author), Natalia Chorazy, Magdalena Sternak, Benedikt Fels, Michal Pacia, Mariusz Kepczynski, Kristina Kusche-Vihrog, Stefan Chlopicki, *Rac1 regulates lipid droplets formation, nanomechanical, and nanostructural changes induced by TNF in vascular endothelium in the isolated murine aorta*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2022**, 79, 6, 317, DOI: 10.1007/s00018-022-04362-7
IF=9,777 IF (5-years)= 9,761 MEiN=140 Liczba cytowań: 0

H3. Marta Z. Pacia (corresponding author), Magdalena Sternak, Lukasz Mateuszuk, Marta Stojak, Agnieszka Kaczor, Stefan Chlopicki, *Heterogeneity of chemical composition of lipid droplets in endothelial inflammation and apoptosis*, *BBA - Molecular Cell Research*, **2020**, 1867, 6, 1-11, DOI: doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118681
IF= 4,607 IF (5-years)= 5,279 MEiN=140 Liczba cytowań: 13

H4. Marta Z. Pacia (corresponding author), Katarzyna Majzner, Krzysztof Czamara, Magdalena Sternak, Stefan Chlopicki, Malgorzata Baranska, *Estimation of the content of lipids composing endothelial lipid droplets based on Raman imaging*, *(BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **2020**, 1865, 9, 1-10, DOI: doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158758
IF= 4,358 IF (5-years)= 4,960 MEiN=140 Liczba cytowań: 5

2. STRESZCZENIE

Stan zapalny naczyń krwionośnych oraz śródbłonna jest złożonym procesem odpowiedzi komórkowej na czynnik prozapalny. Lepsze poznanie zachodzących procesów, konsekwencji stanu zapalnego, a finalnie skuteczniejszej i bezpieczniejszej farmakologii stanu zapalnego naczyń krwionośnych wymaga nowoczesnej wieloparametrowej metodyki badawczej, skupiającej się nie tylko na pogłębieniu znanych aspektów stanu zapalnego komórek śródbłonna, ale także poszukiwania nowych celów terapeutycznych. W niniejszym cyklu publikacyjnym taki cel terapeutyczny stanowią krople lipidowe jako nieodłączny element stanu zapalnego naczyń krwionośnych.

W niniejszym autoreferacie przedstawiono wyniki wskazujące, że **aktywacja stanu zapalnego w komórkach śródbłonna izolowanej aorty za pomocą różnych czynników, takich jak czynnik martwicy nowotworowej (TNF), lipopolisacharydy (LPS), angiotensyna II (AngII), hipoksja lub nadmiar kwasu oleinowego (OA), prowadzi do powstawania kropli lipidowych i jednoczesnej produkcji prostacykliny (PGI₂)**. Blokowanie działania ATGL (*adipose triglyceride lipase*) zwiększa liczbę kropli lipidowych w komórkach śródbłonna, jednocześnie uniemożliwiając generację PGI₂, co sugeruje istotną rolę ATGL w dynamicznym procesie formowania kropli lipidowych w stanach zapalnych naczyń krwionośnych oraz w produkcji prostacykliny. **Białko Rac1 zostało zidentyfikowane jako kluczowy czynnik łączący powstawanie kropli lipidowych w komórkach śródbłonna z innymi wskaźnikami odpowiedzi zapalnej**, takimi jak zwiększona sztywność śródbłonna, reorganizacja cytoszkieletu, zmiany nanostrukturalne błony komórkowej i wzmożone wydzielanie molekuł adhezyjnych (ICAM-1).

Przedstawione w autoreferacie wyniki wskazują, że **tworzenie kropli lipidowych jest dynamicznie regulowane zarówno przez ATGL, jak i białko Rac1** w zapaleniu śródbłonna wywołanym przez TNF w izolowanej aorcie mysiej, co stanowi nowy aspekt patobiologii i patofizjologii kropli lipidowych w komórkach śródbłonna.

3. CHARAKTERYSTYKA KROPEL LIPIDOWYCH

Krople lipidowe (ang. *lipid droplets*, *LDs*) to kuliste struktury, które występują wewnątrz komórek organizmów eukariotycznych. Centrum kropli lipidowych składa się z lipidów, takich jak triacyloglicerole (TAGi) i cholesterole, które otacza warstwa fosfolipidów (5). Warstwa ta, zwana monowarstwą powierzchniową, zabezpiecza kroplę lipidową przed rozpuszczeniem w wodnym środowisku cytoplazmy komórkowej. Krople lipidowe są w stanie przechowywać duże ilości energii w postaci lipidów, które mogą być uwolnione i wykorzystane przez komórkę w razie potrzeby (6). Oprócz tego, krople lipidowe odgrywają ważną rolę w regulacji metabolizmu lipidów i cholesterolu, a także w reakcjach stresu oksydacyjnego (7).

Biogeneza kropli lipidowych w komórkach odgrywa znaczącą rolę w wielu przypadkach aspektów zdrowia i chorób. Wiadomo, że krople lipidowe regulują funkcje neutrofilii, eozynofili oraz komórek nowotworowych (8-10), i uczestniczą w regulacji metabolizmu lipidów oraz sygnalizacji wewnątrzkomórkowej (11-13).

Krople lipidowe w leukocytach, zwłaszcza w monocytach i makrofagach, odgrywają ważną rolę w procesie fagocytozy, czyli pochłaniania i trawienia patogenów przez komórki układu odpornościowego (8). Krople lipidowe w komórkach leukocytów są magazynami energii, które mogą być szybko uwolnione w trakcie fagocytozy, umożliwiając leukocytom wykonywanie intensywnych działań metabolicznych. Ponadto, krople lipidowe w leukocytach stanowią źródło kwasów tłuszczowych, które są wykorzystywane do syntezy eikozanoidów, takich jak prostaglandyny i leukotrieny (14). Te związki regulują procesy zapalne i mają znaczący wpływ na odpowiedź immunologiczną organizmu (15). Wreszcie, krople lipidowe mogą również wpływać na interakcje między leukocytami a innymi komórkami organizmu, takimi jak komórki śródbłonna. Dzięki temu mogą mieć wpływ na procesy adhezji, migracji i transmisji sygnałów między komórkami układu odpornościowego i innymi tkankami (7).

Pierwszy opis kropli lipidowych w komórkach śródbłonna pochodzi z badań nad rozwojem miażdżycy w naczyniach krwionośnych (16). W początkowej fazie choroby, kiedy dochodzi do uszkodzenia śródbłonna, pojawiają się zmiany w procesach metabolicznych i gromadzeniu się lipidów w komórkach śródbłonna w postaci kropli lipidowych. Zawierają one lipidy, cholesterol i enzymy biorące udział w sygnalizacji komórkowej i odpowiedziach zapalnych (17).

Zjawisko biogenezy kropli lipidowych w śródbłonku było także obserwowane w związku ze zwiększoną ilością lipidów w układzie krążenia po posiłku (18,19). Analiza biogenezy kropli lipidowych była prowadzona na komórkach śródbłonna *in vitro* w medium bogatym w kwas oleinowy, oraz w komórkach śródbłonna *ex vivo* w izolowanych naczyniach krwionośnych myszy po dożołądkowym podaniu oliwy z oliwek (18). Proces biogenezy kropli lipidowych w odpowiedzi na nadmiar kwasów tłuszczowych w środowisku był przejściowy i krótko po ich powstaniu, triacyloglicerole w kroplach lipidowych były ponownie metabolizowane, a w konsekwencji kwasy tłuszczowe uwalniane ze śródbłonna, do głębszych warstw naczynia krwionośnego (np. komórki mięśni gładkich) lub z powrotem do układu krążenia. Tym samym, śródbłonek pełni rolę bufora lipidów (18). Jednakże, proces przejściowego tworzenia i rozkładu kropli lipidowych w śródbłonku jest procesem wymagającym energii: każda estryfikacja wymaga konwersji ATP do AMP, podczas gdy proces deestryfikacji nie pokrywa tych kosztów energetycznych. Fakt ten sugeruje, że buforowanie lipidów przez śródbłonek w postaci kropli lipidowych odgrywa ważną rolę regulacyjną, w tym ochronę przed toksycznością wolnych kwasów tłuszczowych poprzez ich estryfikację (18). Ponadto, Autorzy pokazali,

że krople lipidowe nie są tylko rezerwuarem energii komórki, ale aktywnymi organellami, regulującymi glikolizę śródbłonka, dostarczającymi źródło kwasów tłuszczowych dla sąsiednich komórek ściany naczyń oraz chroniącymi śródbłonek przed stresami lipotoksycznymi, które mogą wystąpić w hiperlipidemii poposiłkowej (18,19).

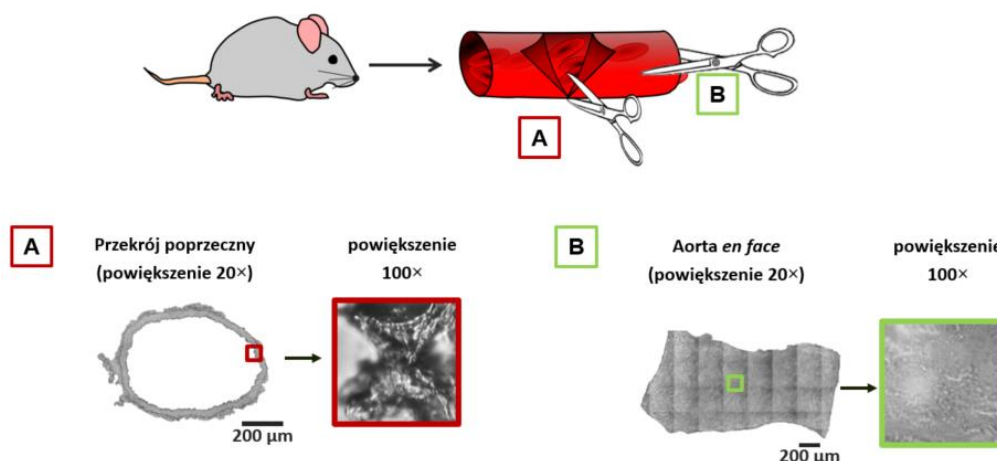
Tworzenie kropeł lipidowych w komórkach śródbłonka *in vitro* w odpowiedzi na nadmiar lipidów znajdujących się w medium zostało scharakteryzowane nie tylko na przykładzie kwasu oleinowego, ale i innych kwasów tłuszczowych: kwasu arachidonowego (AA) (20,21), kwasu eikozapentaenowego (EPA) (20,21) i kwasu dokozaheksaenowego (DHA) (21). W każdym przypadku, nadmiar lipidów w medium powodował zwiększoną biogenezę kropeł lipidowych, a głównym składnikiem kropeł lipidowych były estry kwasu tłuszczowego obecnego w medium.

Krople lipidowe są dynamicznymi organellami, które odgrywają kluczową rolę w homeostazie energetycznej i sygnalizacji komórkowej. W rezultacie rośnie zainteresowanie zrozumieniem farmakologii kropeł lipidowych, szczególnie w kontekście zaburzeń metabolicznych, takich jak otyłość i cukrzyca. Wspomniane powyżej publikacje stanowią ważny wkład w początek drogi nad zrozumieniem znaczenia kropeł lipidowych w chorobach układu krwionośnego, jednakże konieczne są dalsze badania prowadzące do charakterystyki procesu tworzenia się kropeł lipidowych, ich rozkładu, oraz funkcji w stanie zapalnym.

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. IZOLOWANE NACZYNIĘ KRWIONOŚNE

Opisane w cyklu publikacyjnym pomiary komórek śródbłonka odbywały się *in situ* w izolowanych mysich naczyniach krwionośnych. Oznacza to, że po wypreparowaniu aorty, nieutralone fragmenty naczyń krwionośnych umieszczano w medium podtrzymującym funkcjonalność komórek, a następnie poddawane eksperymentom (Rys. 1).



Rys. 1. Schemat przygotowania próbek naczyń krwionośnych. Odpowiednie rozcięcie aorty umożliwia otrzymanie fragmentów (A) przekroju poprzecznego oraz (B) przekroju podłużnego (aorta *en face*) przez naczynie krwionośne.

Śródbłonek w izolowanym naczyniu krwionośnym lepiej zachowuje swoje cechy fenotypowe niż komórki śródbłonka w hodowli. Pomiary komórek śródbłonka w naczyniu krwionośnym zapewniają komórkom śródbłonka ich naturalne środowisko: obecność wewnętrznej błony podstawowej oraz komórek mięśniowych gładkich. Ze względu na fakt, że dynamika kropeł lipidowych w ścianie naczynia krwionośnego obejmuje interakcje między komórkami śródbłonka i mięśniówki gładkiej oraz innymi komórkami naturalnie występującymi w tkance, to badania przeprowadzone na fragmentach ściany naczynia lepiej odzwierciedlają sytuację *in vivo*, jeśli chodzi o tworzenie kropeł lipidowych w aorcie w zapaleniu naczyń krwionośnych w porównaniu z komórkami śródbłonka w hodowli.

Jednakże należy zaznaczyć, że izolowane naczynie krwionośne jest wciąż dalekie od systemu *in vivo*, pozbawione przepływu krwi, obecności krążących komórek krwi, komunikacji ze składnikami krwi, a to także może wpływać na odpowiedź śródbłonka na czynniki prozapalne.

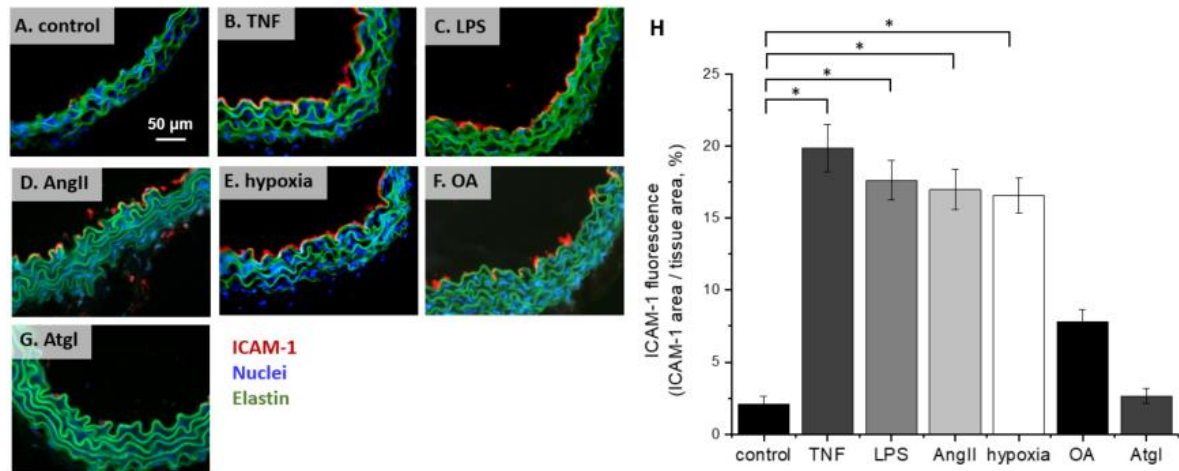
4.2. OBRAZOWANIE FLUORESCENCYJNE I RAMANOWSKIE

Dwoma głównie stosowanymi technikami stosowanymi w badaniach opisanych w cyklu publikacyjnym jest obrazowanie fluorescencyjne preparatów wybarwionych immunohistochemicznie oraz obrazowanie ramanowskie. Obie techniki znajdują zastosowanie w badaniu kropeł lipidowych w śródbłonku. Obrazowanie fluorescencji preparatów wybarwionych w celu wizualizacji kropeł lipidowych oraz granic komórek śródbłonka (CD31) pozwala na globalną analizę obecności i liczności kropeł lipidowych w śródbłonku w izolowanym naczyniu krwionośnym. Obrazowanie ramanowskie pozwala na bez znacznikową detekcję kropeł lipidowych w tkance, określenie precyzyjnej lokalizacji (komórki śródbłonka czy mięśniówki gładkiej), oraz przede wszystkim analizę składu biochemicznego kropeł lipidowych.

5. OMÓWIENIE NAJWAŻNIEJSZYCH WYNIKÓW

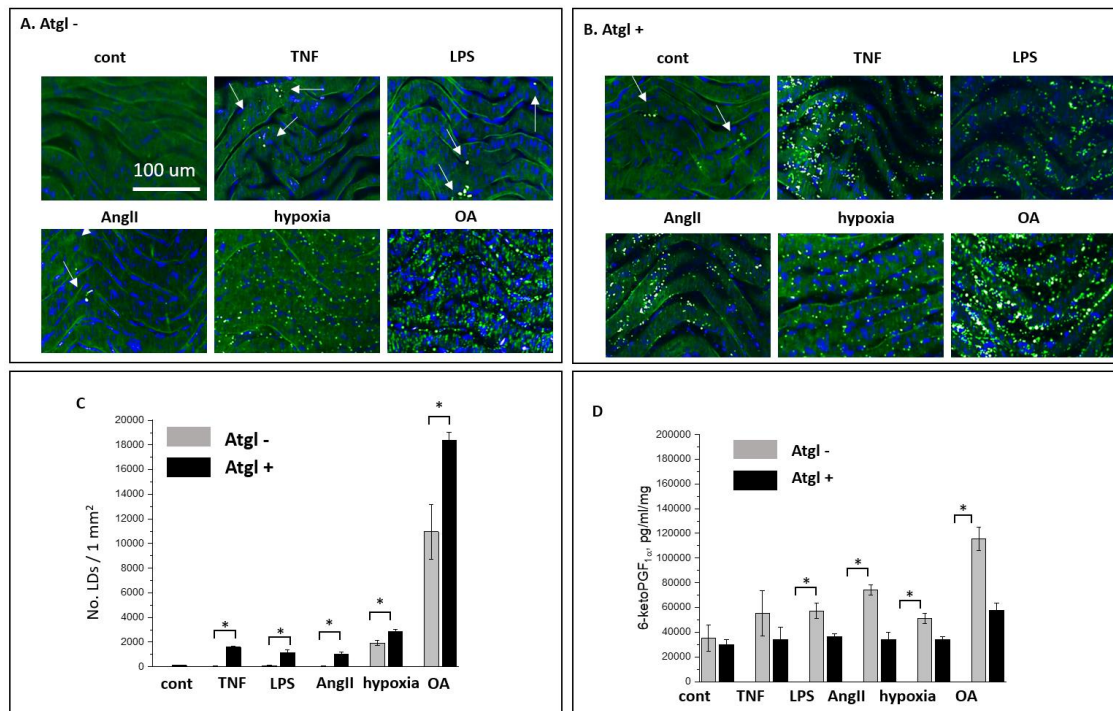
5.1. CHARAKTERYSTYKA KROPEL LIPIDOWYCH W IZOLOWANEJ AORCIE MYSZY W ODPOWIEDZI NA CZYNNIKI PROZAPALNE

Izolowane fragmenty mysiej aorty stymulowano szeregiem czynników prozapalnych: TNF (10 ng/ml, 24 h), LPS (10 μ g/ml, 24 h), AngII (1 μ M, 24 h), hipoksja (5% O₂, 24 h) lub OA (1 mM, 24 h). W rezultacie zaobserwowano zwiększenie ekspresji molekuly adhezyjnej ICAM-1 w przypadku stymulacji fragmentu aorty przez TNF, LPS, AngII, oraz hipoksję w porównaniu do kontroli, co potwierdza odpowiedź prozapalną śródbłonna na te czynniki (Rys. 2).



Rys. 2. Ekspresja białka ICAM-1 w przekroju poprzecznym naczyń krwionośnych w (A) kontrolnej aorcie, oraz aorcie stymulowanej (B) TNF (10 ng/ml, 24 h), (C) LPS (10 μ g/ml, 24 h), (D) AngII (1 μ M, 24 h), (E) hipoksji (5% O₂, 24 h), (F) OA (1 mM, 24 h), lub (G) Atgl (10 μ M, 24 h). Kolor czerwony, niebieski i zielony na obrazach fluorescencyjnych pochodzi odpowiednio od sygnału od ICAM-1, jąder komórkowych i włókien elastynowych. (H) Pomiar ekspresji białka ICAM-1 został obliczony jako pole powierzchni fluorescencji pochodzącej od białka ICAM-1 do powierzchni tkanki. * P < 0,05 (**publikacja H1**).

Ważnym krokiem eksperymentalnym była ocena biogenezy kropeł lipidowych w naczyniu krwionośnym w stanie zapalnym naczyń krwionośnych. W tym celu zanalizowano ilość kropeł lipidowych w aorcie *en face* z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. W aorcie stymulowanej przez TNF, LPS lub AngII, zaobserwowano pojedyncze krople lipidowe, podczas gdy w warunkach hipoksji oraz nadmiaru kwasu oleinowego obserwowane były liczne krople lipidowe (Rys. 3A, C). Jedną z możliwych hipotez wyjaśniających różnice w ilości kropeł lipidowych była szybka degradacja nowo powstałych kropeł lipidowych w odpowiedzi na klasyczne czynniki prozapalne: TNF, LPS lub AngII. W celu weryfikacji tej hipotezy zablokowano lipolizę lipidów budujących krople lipidowe przez inhibicję ATGL (ang. *adipose triglyceride lipase*). Blokada ATGL, z wykorzystaniem atglistatyny (Atgl, 10 μ M) spowodowała zwiększenie liczby kropeł lipidowych w aorcie stymulowanej TNF, LPS lub AngII, podczas gdy sama atglistatyna w grupie kontrolnej nie spowodowała wzrostu kropeł lipidowych. Podobnie, w warunkach hipoksji lub stymulacji OA, obecność Atgl istotnie zwiększyła liczbę kropeł lipidowych (Rys. 3B, C). Wyniki te sugerują, że hamowanie lipolizy przez Atgl opóźniło degradację kropeł lipidowych w aorcie niezależnie od użytego czynnika stymulującego (**publikacja H1**).

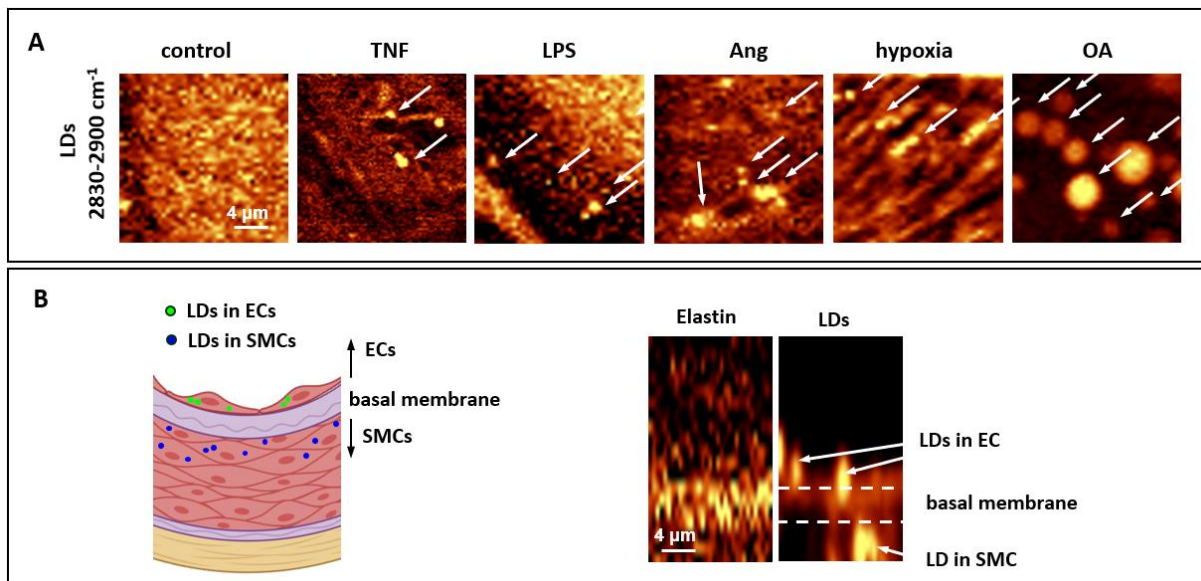


Rys. 3. Ocena obecności i liczności kropli lipidowych w aorcie en face grupy kontrolnej oraz stymulowanej TNF (10 ng/ml, 24 h), LPS (10 µg/ml, 24 h), AngII (1 µM, 24 h), hipoksji (5% O₂, 24 h), oraz OA (1 mM, 24 h) w warunkach (A) bez atglistatyny, oraz w (B) obecności atglistatyny (Atgl, 10 µM, 24h). (C) Ilość kropli lipidowych została ilościowo określana na podstawie obrazów fluorescencyjnych (zielona i niebieska fluorescencja pochodząca odpowiednio z kropli lipidowych i jądra komórkowego). (D) Poziom 6-ketoPGF_{1α} w medium po inkubacji krążków aort z czynnikami stymulującymi bez obecności i w obecności atglistatyny. *P < 0,05 (**publikacja H1**).

Dodatkowo, w ramach pracy wykazano, że wraz ze wzrostem ilości kropli lipidowych w stanie zapalnym obserwowane jest zwiększone wydzielanie prostacykliny (mierzonej jako jej stabilny metabolit 6-keto-PGF_{1α} w medium komórkowym po inkubacji fragmentów aorty). Prostacyklina (PGI₂), lub inaczej lipidowy mediator zapalenia, jest wytwarzana przez komórki śródbłonna, a jej rola w stanie zapalnym polega na hamowaniu aktywacji płytek krwi, rozszerzaniu naczyń krwionośnych oraz zmniejszaniu adhezji leukocytów do śródbłonna (22). W obecności Atgl wydzielanie PGI₂ przez aortę stymulowaną przez TNF, LPS, AngII, niedotlenienie lub OA było znacząco zmniejszone w porównaniu z poziomem PGI₂ w medium po inkubacji aort bez Atgl, co sugeruje, że generacja PGI₂ jest zależna od ATGL (Rys. 3D).

Znając generalny obraz obecności kropli lipidowych w naczyniach krwionośnych w warunkach różnych stymulacji, wykonano pomiary obrazowania ramanowskiego dla następujących grup badawczych: kontrola, TNF+Atgl, LPS+Atgl, Ang+Atgl, a także dla grupy hipoksja i OA zarówno bez jak i w obecności atglistatyny (Rys. 4A). Podczas stymulacji tkanki czynnikiem prozapalnym biogeneza kropli lipidowych przebiega zarówno w śródbłonnku jak i w komórkach mięśniówki gładkiej. Granicą oddzielającą te dwie warstwy jest błona podstawna zbudowana głównie z elastyny: białka o charakterystycznym sygnale ramanowskim. Wykorzystując obrazowanie ramanowskie 3D w głąb tkanki zwiualizowano położenie błony podstawnej, a w konsekwencji wskazano dokładną lokalizację kropli lipidowych w komórkach naczynia krwionośnego (Rys. 4B). Do dalszej analizy spektroskopowej

wykorzystano widma ramanowskie wyekstrahowane z kroplek lipidowych zlokalizowanych wyłącznie w śródbłonku Rys. 5A (**publikacja H1**).



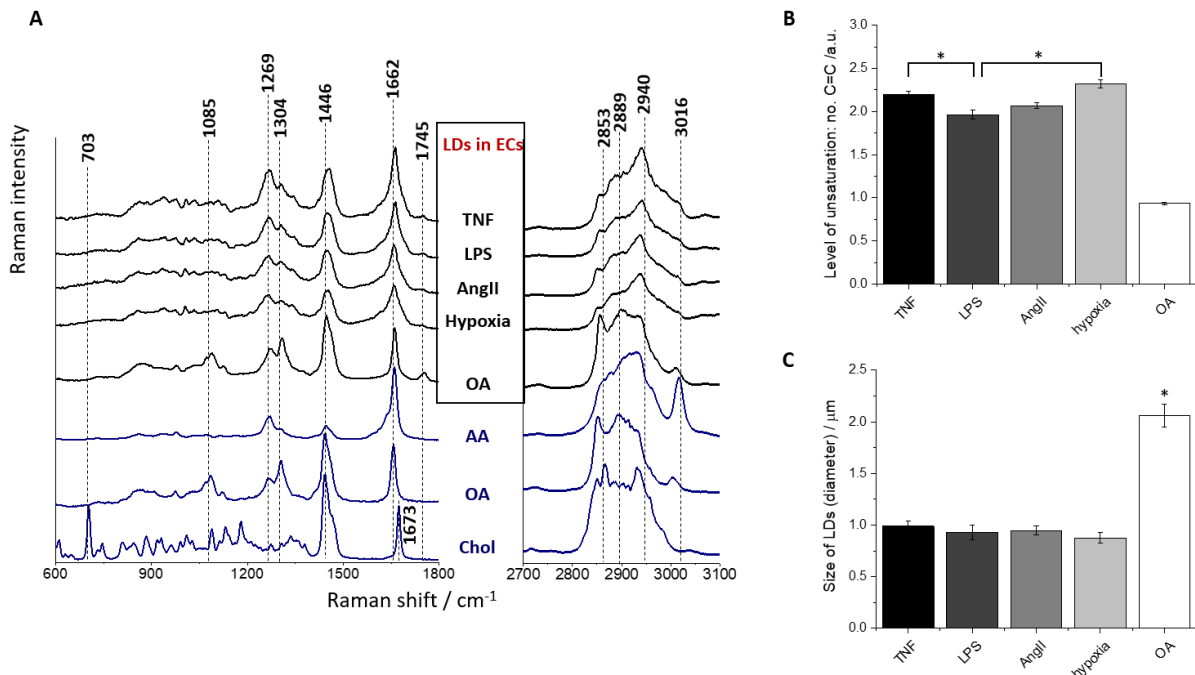
Rys. 4. (A) Przykładowe obrazy ramanowskie przedstawiające krople lipidowe w aorcie *en face* grupy kontrolnej oraz stymulowanej TNF (10 ng/ml, 24 h), LPS (10 μg/ml, 24 h), AngII (1 μM, 24 h), hipoksji (5% O₂, 24 h), oraz OA (1 mM, 24 h) w warunkach obecności atglistatyny (Atgl, 10 μM, 24h). Białe strzałki wskazują na krople lipidowe. (B) Obrazowanie 3D, pozwalające na precyzyjne określenie lokalizacji kroplek lipidowych i rozróżnienie kroplek znajdujących się w śródbłonku lub w komórkach mięśniówki gładkiej (**publikacja H1**).

W celu analizy składu biochemicznego kroplek lipidowych powstałych w komórkach śródbłonka po stymulacji z TNF, LPS, AngII, hipoksją lub OA, widma ramanowskie kroplek lipidowych zestawiono z widmami ramanowskimi kwasu arachidonowego (AA), kwasu oleinowego (OA) i cholesterolu (Chol; Fig. 5A). Obecność następujących pasm na widmach ramanowskich: 1269, 1662 i 3016 cm⁻¹, przypisywanych do drgań zginających w płaszczyźnie C=C-H, rozciągających C=C, oraz rozciągających =C-H (23), wskazywały na nienasycony charakter lipidów budujących krople lipidowe w komórkach śródbłonka w preparatach aorty *en face*. Dodatkowo, obecność pasma 1745 cm⁻¹, przypisywanego do drgań rozciągających ugrupowania karbonylowego trójglicerydów, estrów cholesterolu oraz fosfolipidów (23), wskazuje, że podstawowym składnikiem kroplek lipidowych są trójglicerydy, a nie wolne kwasy tłuszczowe (**publikacja H1**).

Widma kroplek lipidowych powstałych w skutek stymulacji fragmentów naczynia krwionośnego różnymi czynnikami prozapalnymi: TNF, LPS, AngII, oraz hipoksją (Rys. 5A) wykazują wiele podobnych cech spektroskopowych. Wszystkie zawierają sygnał wskazujący na obecność wysoko nienasyconych triacylogliceroli, a brak wyraźnego pasma ramanowskiego 703 cm⁻¹, sugeruje znikomą zawartość cholesterolu w kroplach lipidowych. Podobieństwo spektralne kroplek powoduje, że nie można ich pogrupować wedle czynnika stymulującego, przy zastosowaniu metody chemometrycznej hierarchicznej analizy skupień (2). Ponadto, obliczono stosunek intensywności integralnej odpowiednich pasm ramanowskich 1662/1446 cm⁻¹, przypisywanych drganiom n(C=C)/n(CH₂) w celu ilościowego określenia stopnia nienasyconienia lipidów budujących krople lipidowe (Rys. 5B). Wyniki wykazały nieco niższy średni poziom nienasyconienia lipidów w kroplach lipidowych w śródbłonku

stymulowanych przez LPS ($1,97 \pm 0,05$) w porównaniu z TNF ($2,20 \pm 0,04$) lub hipoksją ($2,3 \pm 0,05$). Jednocześnie nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między poziomem nienasyceń lipidów budujących krople lipidowe w śródbłonku stymulowanym przez TNF, AngII ($2,1 \pm 0,03$), lub hipoksję (**publikacja H1**).

Krople lipidowe obserwowane w ramach odpowiedzi śródbłonka na stymulację medium z nadmiarem kwasu oleinowego zawierały zdecydowanie bardziej nasycone lipidy (średnia liczba wiązań C=C wynosiła $0,93 \pm 0,02$) niż krople lipidowe powstające w odpowiedzi na inne czynniki stymulujące (Rys. 5B).

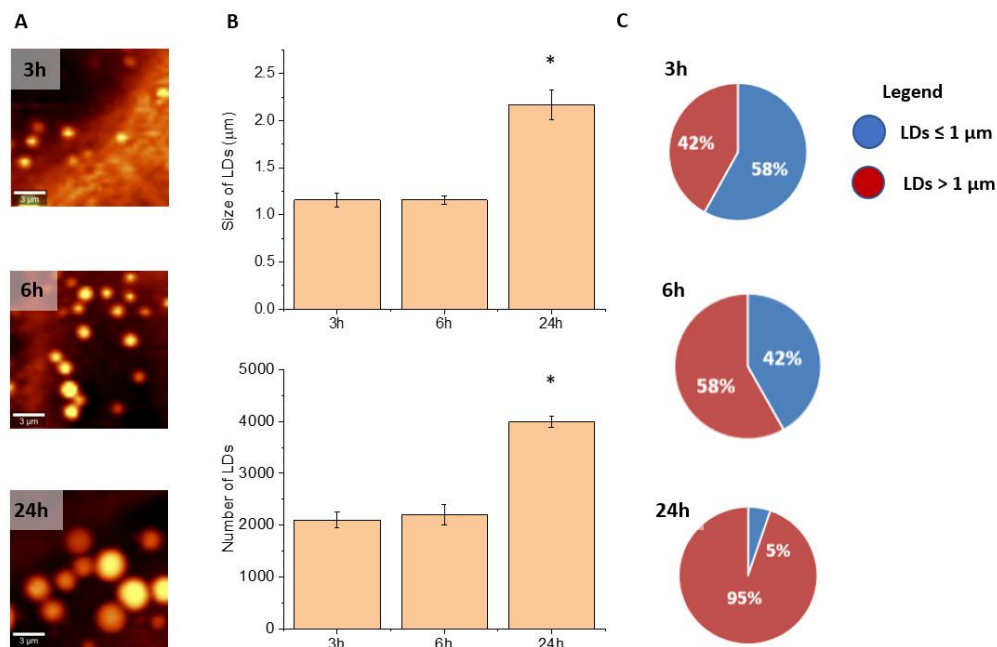


Rys. 5. (A) Porównanie średnich widm ramanowskich kroplek lipidowych powstałych w komórkach śródbłonka w aorcie en face grupy kontrolnej oraz stymulowanej TNF (10 ng/ml, 24 h), LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 24 h), AngII (1 μM , 24 h), hipoksji (5% O_2 , 24 h), oraz OA (1 mM, 24 h) w warunkach obecności atglistatyny (Atgl, 10 μM , 24h), wraz z porównaniem tych widm do widm standardów: kwasu arachidonowego, kwasu oleinowego oraz cholesterolu. (B) Porównanie stopnia nienasyceń lipidów budujących krople lipidowe w śródbłonku, oraz (C) porównanie wielkości śródbłonkowych kroplek lipidowych w aorcie en face stymulowanej różnymi czynnikami. * $P < 0,05$, (**publikacja H1**).

5.2. CHARAKTERYSTYKA KROPEL LIPIDOWYCH W IZOLOWANEJ AORCIE MYSZY W ODPOWIEDZI NA KWAS OLEINOWY

Odmiennej charakter kropeł lipidowych powstających w odpowiedzi na nadmiar lipidów w środowisku stanowił motywację do charakterystyki spektralnej kropeł lipidowych zarówno w hodowlanych komórkach śródbłonna jak i w komórkach śródbłonna w izolowanej mysiej aorcie (**publikacja H4**).

Kinetyka powstawania kropeł lipidowych w komórkach śródbłonna w izolowanej mysiej aorcie w odpowiedzi na nadmiar kwasu oleinowego (OA) wskazuje, że zarówno liczba kropeł lipidowych, jak i ich rozmiar zwiększają się wraz z czasem inkubacji (Rys. 6A-B). Zarówno liczba, jak i rozmiar kropeł lipidowych są istotnie większe po 24h inkubacji aorty w medium z OA w porównaniu z 6 godzinami inkubacji, a wzrost wynosi odpowiednio 87% i 81%. Taka obserwacja prowadzi do pytania, czy wzrost wielkości kropeł lipidowych jest wynikiem powiększania się już istniejących kropeł lipidowych czy odbywa się na podstawie fuzji już istniejących kropeł lipidowych. Podczas procesu fuzji kropeł lipidowych, liczba kropeł lipidowych powinna się zmniejszać, jednocześnie zwiększając ich rozmiar, więc prawie równomierne zwiększenie zarówno liczby jak i rozmiaru kropeł lipidowych sugeruje, że fuzja kropeł lipidowych nie jest decydującym procesem prowadzącym do zwiększenia ich rozmiaru. Ponadto, przy dłuższym czasie inkubacji tkanki z OA (24 godziny), histogram rozmiaru kropeł lipidowych zmienia się w porównaniu do krótszych czasów (Fig. 6C). Po 24 godzinach inkubacji 95% wszystkich kropeł lipidowych jest większych niż 1 μm , co sugeruje wzrost rozmiaru już istniejących kropeł lipidowych wraz z upływem czasu bez tworzenia nowych, małych kropeł lipidowych. W związku z tym nasze dane sugerują, że rozmiar kropeł lipidowych, powstałych w środowisku bogatym w OA, jest modulowany przez powiększanie już istniejących kropeł lipidowych, a nie przez proces fuzji kropeł lipidowych (*dane nie opublikowane*).

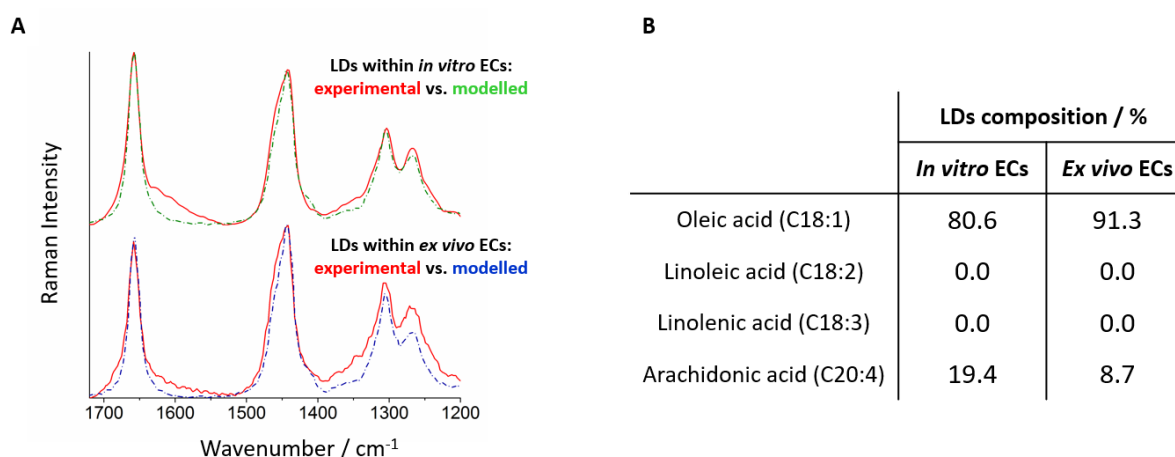


Rys. 6. (A) Obrazy ramanowskie przedstawiające obecność, wielkość i licznosc kropeł lipidowych w aorcie en face grupy stymulowanej OA (1 mM) przez 3h, 6h lub 9h. (B) Analiza zmian rozmiaru i ilości kropeł lipidowych w zależności od czasu inkubacji tkanki w medium z kwasem oleinowym. (C)

Histogramy wielkości kropeł lipidowych w zależności od czasu inkubacji tkanki w medium z kwasem oleinowym z podziałem na krople o średnicy mniejszej lub większej niż 1 μm (dane nie opublikowane).

Drugą istotną kwestią charakterystyki kropeł lipidowych w komórkach śródbłonka w izolowanych naczyniach krwionośnych pod wpływem OA jest analiza ich składu biochemicznego z wykorzystaniem spektroskopii ramanowskiej. Poprzednio wspomniano o sposobie określania średniego stopnia nienasycenia lipidów budujących krople lipidowe na podstawie stosunku intensywności odpowiednich pasm ramanowskich. Wykorzystując tę technikę obliczono średni stopień nienasycenia: $1,40 \pm 0,19$ oraz $0,95 \pm 0,12$, odpowiednio dla kropeł lipidowych utworzonych wewnątrz komórek śródbłonka stymulowanych OA *in vitro* oraz *ex vivo* (publikacja H4).

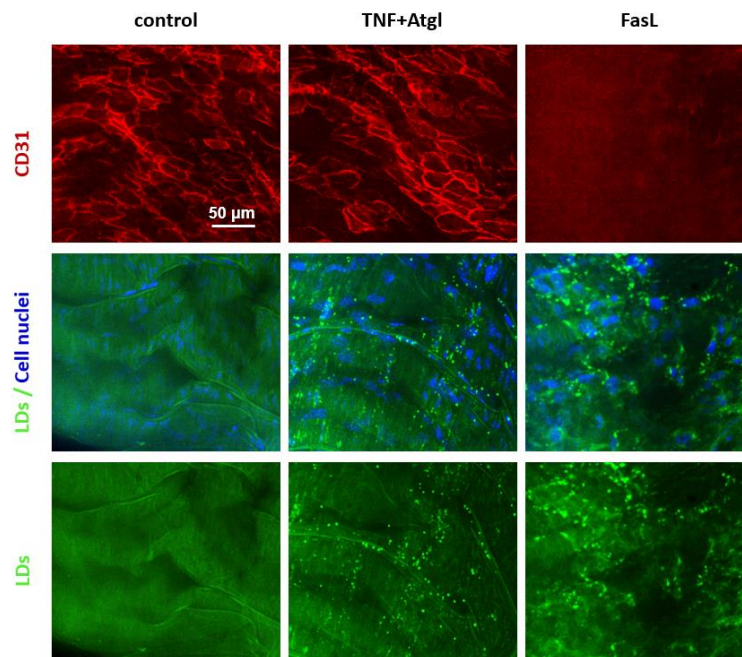
Jednakże obliczony stopień nienasycenia lipidów budujących krople lipidowe w śródbłonku daje tylko ogólny obraz składu lipidowego śródbłonkowych kropli lipidowych. W celu lepszej oceny zawartości poszczególnych składników budujących krople lipidowe w śródbłonku *in vitro* i *ex vivo*, wykorzystano modelowanie widm ramanowskich. Analiza polegała na wygenerowaniu modelowego widma ramanowskiego jak najbardziej zbliżonego podobieństwem do doświadczalnego widma ramanowskiego kropeł lipidowych, a następnie określeniu udziału poszczególnych kwasów tłuszczowych, które posłużyły do modelowania (Rys. 7A) Modelowanie widm ramanowskich w oparciu o widma standardów kwasów tłuszczowych umożliwiło oszacowanie składu kropeł lipidowych i pokazało, że w obu przypadkach, w śródbłonku *in vitro* i *ex vivo*, krople lipidowe zawierały mieszaninę tych samych lipidów, ale w różnych proporcjach, tj. odpowiednio 80,6% OA + 19,4% AA i 91,3% OA + 8,7% AA. (Rys. 7B) . Należy tu nadmienić, że wygenerowane modelowe widma ramanowskie nie odwzorowują idealnie widm eksperymentalnych (Rys. 7A), co może być związane z udziałem sygnału białkowego w widmie kropeł lipidowych, zwłaszcza dla kropeł rejestrowanych w izolowanym naczyniu krwionośnym (publikacja H4).



Rys. 7. (A) Porównanie eksperymentalnych widm ramanowskich kropli lipidowych powstałych w komórkach śródbłonka *in vitro* oraz *ex vivo* z widmami modelowymi. (B) Skład procentowy komponentów widm modelowych o najlepszym dopasowaniu do danych eksperymentalnych (publikacja H4).

5.3. CHARAKTERYSTYKA KROPEL LIPIDOWYCH W IZOLOWANEJ AORCIE MYSZY W ODPOWIEDZI NA CZYNNIKI APOPTOTYCZNE

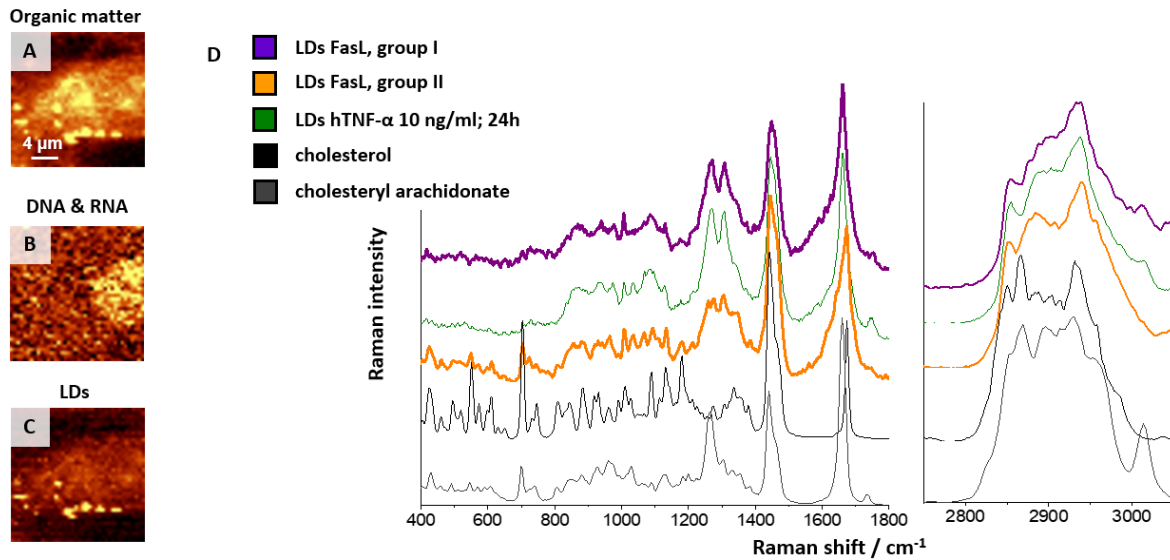
Aktywacja szlaku zapalnego w komórkach śródbłónka uruchamia naturalną odpowiedź śródbłónka na bodziec prozapalny, w tym biogenezę kropeł lipidowych. Jednocześnie warstwa komórek śródbłónka pozostaje nienaruszona, co przedstawiają obrazy połączeń międzykomórkowych warstwy śródbłónka w izolowanym naczyniu krwionośnym (obraz CD31; Rys. 8). Inaczej wygląda obraz dysfunkcyjnego śródbłónka w stanie apoptozy pod wpływem FasL, gdzie obserwowane jest zniszczenie ciągłości warstwy śródbłónka z jednoczesną biogenezą kropeł lipidowych (Rys. 8).



Rys. 8. Porównanie obrazów aorty en face dla grupy kontrolnej, oraz stymulowanej czynnikiem prozapalnym TNF (10 ng/ml, 48 h), oraz czynnikiem proapoptotycznym Fas ligand (100 ng/ml, 48 h). Kolor czerwony, niebieski i zielony na obrazach fluorescencyjnych pochodzi odpowiednio od sygnału od CD31, jąder komórkowych i kropeł lipidowych (**publikacja H3**).

Analiza spektroskopowa danych ramanowskich wykazała znaczną heterogeniczność kropeł lipidowych powstałych w warunkach apoptozy wywołanej czynnikiem Fas ligand (FasL) w izolowanym naczyniu krwionośnym. Na podstawie widm ramanowskich, śródbłónkowe krople lipidowe powstałe w skutek apoptozy wywołanej FasL można podzielić na dwie grupy: krople lipidowe z bardziej nienasyconymi lipidami, zawierające również niewielkie ilości cholesterolu i fosfolipidów, oraz krople lipidowe z bardziej nasyconymi lipidami, o charakterystyce spektralnej przypominającej cholesterol (**publikacja H4**).

Widma ramanowskie kropli lipidowych zaliczonych do pierwszej grupy (Rys. 9D, fioletowe widmo) były bardzo podobne do widm kropeł obserwowanych po stymulacji aorty innym czynnikiem o działaniu proapoptotycznym: ludzkim TNF (Rys. 9D, zielone widmo). Natomiast widma ramanowskie kropeł lipidowych zaliczonych do drugiej grupy (Rys. 9D, pomarańczowe widmo) było zgodne z widmem standardów cholesterolu (Rys. 9D, czarne widmo) oraz cholesterylu arachidonianu (Rys. 9D, szare widmo).



Rys. 9. Obrazy ramanowskie przedstawiające dystrybucję: (A) materii organicznej (integracja pasm w zakresie 2800–3100 cm⁻¹), (B) DNA i RNA (778–808 cm⁻¹) oraz (C) kropeł lipidowych (2830–2900 cm⁻¹). (D) Średnie widma ramanowskie kropeł lipidowych powstałych pod wpływem stymulacji aorty *en face* czynnikiem proapoptotycznym FasL (dwie grupy: widmo fioletowe i pomarańczowe), wraz z zestawieniem ich z widmem cholesterolu i (czarne widmo) i cholesterylu arachidonianu (szare widmo) (**publikacja H3**).

Na podstawie analizy widm ramanowskich zidentyfikowano wysoko nienasycone lipidy w kroplach lipidowych w stanie zapalnym wywołanym mysim TNF (z zablokowaną lipolizą), stan pośredni wywołany przez ludzki TNF-α prowadzący do silnego stanu zapalnego i apoptozy, z małymi kroplami lipidowymi zawierającymi nienasycone lipidy, jak również większymi kroplami lipidowymi o bardziej nasyconych lipidach. Obie grupy zawierają sygnały pochodzące od cholesterolu i fosfolipidów. Finalnie, w śródbłonku poddanym działaniu FasL zidentyfikowano krople lipidowe cechujące się nienasyconymi lipidami, bogatymi w cholesterol (**publikacja H3**).

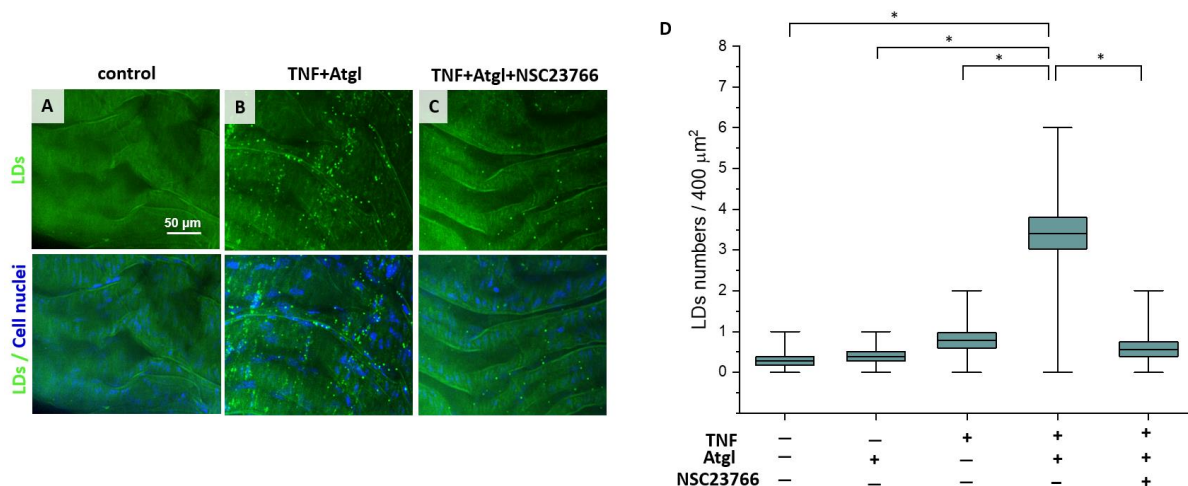
Skład kropeł lipidowych różni się w zależności od stosowanych czynników stymulujących: TNF lub FasL, a ich charakterystyka spektroskopowa może być przypisana do patofizjologicznie różnych procesów stanu zapalnego lub apoptozy komórek śródbłonka. Heterogeniczność w składzie chemicznym kropeł lipidowych w dysfunkcyjnym śródbłonku sugeruje bardziej złożoną patofizjologiczną rolę kropeł lipidowych śródbłonka niż dotychczas uważano, a pełne zrozumienie ich znaczenia wymaga dalszych badań (**publikacja H3**).

5.4. FARMAKOLOGIA STANU ZAPALNEGO NACZYŃ KRWIONOŚNYCH

Stan zapalny komórek śródbłonna jest kluczowy podczas rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego. Aktywacja prozapalna komórek śródbłonna przez TNF charakteryzuje się powstawaniem kropeł lipidowych, zwiększoną sztywnością błony komórkowej komórek śródbłonna oraz zmianami nanostrukturalnymi błony komórkowej, jednakże w dotychczasowych badaniach brakowało wglądu w mechanizm łączący te odpowiedzi. Poniżej scharakteryzowano proces biogenezy kropeł lipidowych, nanomechaniczne oraz nanostrukturalne odpowiedzi w modelu zapalenia naczyniowego aktywowanego przez TNF w izolowanej aorcie mysiej przy użyciu szeregu technik badawczych: spektroskopii ramanowskiej, obrazowania fluorescencyjnego, mikroskopii sił atomowych (AFM) i skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).

Białko Rac1 to jedno z kluczowych białek należących do rodziny białek Rho GTPazowych. Odgrywa istotną rolę w regulacji różnych procesów komórkowych, takich jak migracja, adhezja, kształtowanie cytoszkieletu i sygnalizacja (24,25). Białko Rac1 pełni również ważną funkcję w procesach zapalnych i odgrywa istotną rolę w regulacji migracji komórek zapalnych do miejsca zapalenia (26). Ponadto, białko Rac1 jest zaangażowane w produkcję reaktywnych form tlenu (27) oraz regulację aktywności czynników transkrypcyjnych i mediatorów zapalnych, co przyczynia się do utrzymania stanu zapalnego w organizmie (28). Przeprowadzone badania Aplikantki wykazały, że obecność inhibitora białka Rac w warunkach stymulacji aort przez TNF redukuje stan zapalny oceniany na podstawie zmniejszonej ekspresji białka ICAM w grupie TNF+ NSC23766 w porównaniu do grupy TNF (**publikacja H2**).

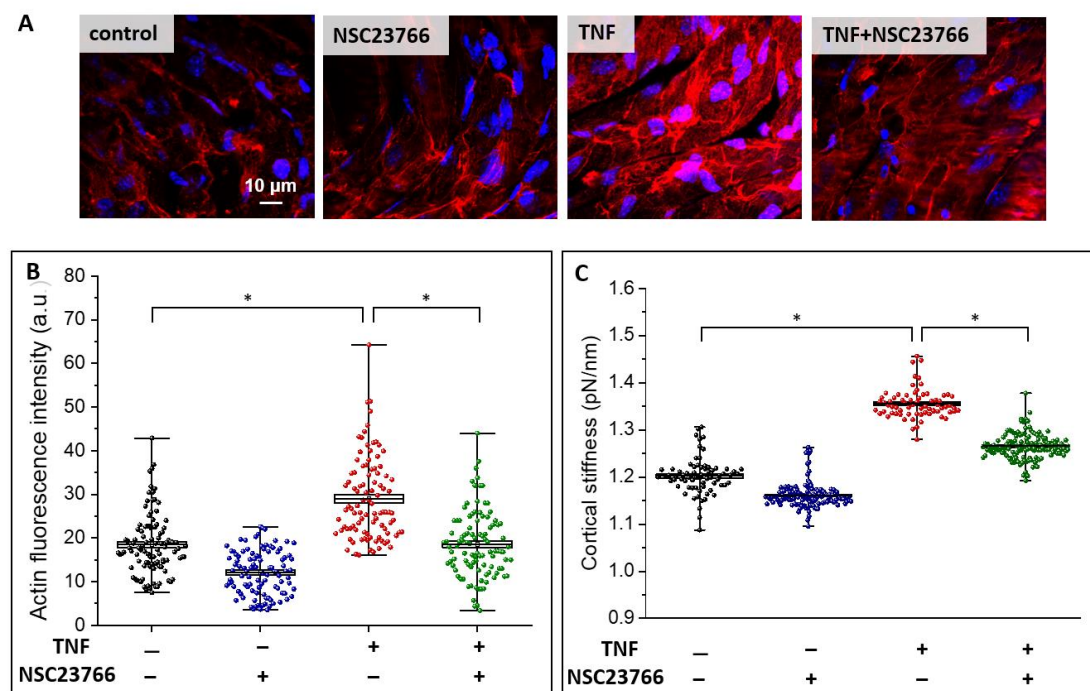
W celu oceny wpływu inhibicji białka Rac1 (grupa TNF+Atgl+NSC23766) na ilość kropeł lipidowych w aorcie *en face* w stanie zapalnym wykorzystano mikroskopię fluorescencyjną. Zablokowanie aktywności Rac1 przez NSC23766 spowodowało znaczne obniżenie ilości kropeł lipidowych powstałych w stanie zapalnym na skutek aktywacji komórek śródbłonna w izolowanym naczyniu krwionośnym przez TNF z jednoczesną blokadą lipolizy z wykorzystaniem atglistatyny (Rys. 10). Pomiar z wykorzystaniem spektroskopii ramanowskiej wykazały, że krople lipidowe zawierają głównie wyskokonienasycone lipidy, ze średnią liczbą wiązań C=C w zakresie od 1,39 do 3,07 (średnia wartość wynosiła $2,4 \pm 0,1$), oraz z niewielką zawartością cholesterolu i fosfolipidów (**publikacja H2**).



Rys. 10. Obrazy fluorescencyjne przedstawiające obecność i ilość kropeł lipidowych w aorcie *en face* w grupie (A) kontrolnej, oraz aorty traktowanej (B) TNF+Atgl (10 ng/ml i 10 μM, odpowiednio, 48 h), oraz aorty traktowanej (C) TNF+Atgl+NSC23766 (10 ng/ml, 10 μM i 50 μM, odpowiednio, 48 h). (D) Obliczenia ilości kropeł lipidowych w aorcie *en face* na jednostkę powierzchni (**publikacja H2**).

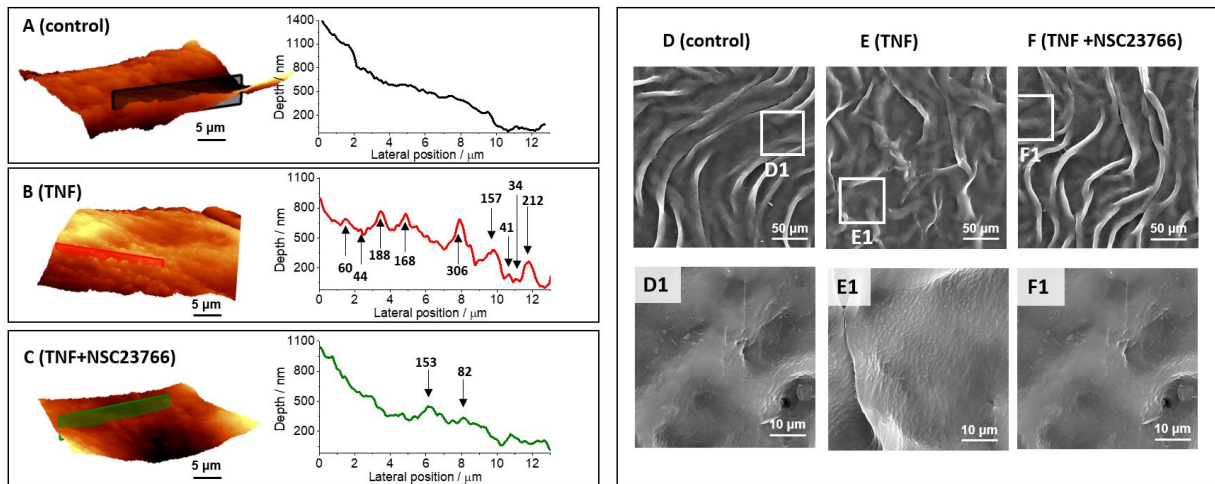
Nanomechanika komórek śródbłonna opiera się na badaniu zmian w sztywności/elastyczności komórek śródbłonna w odpowiedzi na różne bodźce. Za zmiany we właściwościach nanomechanicznych odpowiada głównie reorganizacja architektury cytoszkieletu, i polimeryzacja/depolimeryzacja jego mikrofilamentu: F-aktyny. Wykorzystując obrazowanie fluorescencyjne aort *en face* wykazano polimeryzację F-aktyny pod wpływem TNF w porównaniu do kontroli (Fig. 11A-B). Następstwem polimeryzacji F-aktyny jest zwiększona sztywność komórek śródbłonna pod wpływem TNF w porównaniu do kontroli (Fig. 11C), co wykazano na podstawie pomiarów z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (**publikacja H2**).

W celu weryfikacji, czy białko Rac1 jest zaangażowane w zmiany nanomechaniczne komórek śródbłonna w izolowanych naczyniach krwionośnych w odpowiedzi na TNF, aktywność Rac1 została zablokowana przez inhibitor NSC23766, co spowodowało znaczący spadek sztywności błony komórkowej śródbłonna po wpływie TNF+NSC23766 ($1,26 \pm 0,03$ pN/nm), w porównaniu z samym TNF ($1,35 \pm 0,03$ pN/nm), a także spowodowało znaczący spadek intensywności fluorescencji aktyny w śródbłonku pod wpływem TNF+NSC23766 ($18,50 \pm 0,75$ a.u.), w porównaniu do samego TNF ($28,98 \pm 0,94$ a.u.); (**publikacja H2**).



Rys. 11. (A) Obrazy fluorescencyjne przedstawiające zmiany w reorganizacji cytoszkieletu komórek śródbłonna w aorcie *en face* w grupie kontrolnej, oraz aorty traktowanej NSC23766 (50 μM, 24 h), TNF (10 ng/ml, 24 h), oraz aorty traktowanej TNF+NSC23766 (10 ng/ml i 50 μM, odpowiednio, 24 h). Czerwona i niebieska fluorescencja pochodzi odpowiednio od F-aktyny i jąder komórkowych. (B) Ilościowe porównanie intensywności fluorescencji pochodzącej od F-aktyny. (C) Zmiany w sztywności komórek śródbłonna w aorcie *en face* w grupie kontrolnej, oraz aorty traktowanej NSC23766 (50 μM, 24h), TNF (10 ng/ml, 24 h), oraz aorty traktowanej TNF+NSC23766 (10 ng/ml i 50 μM, odpowiednio, 24 h) z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych. * $P < 0,05$, (**publikacja H2**).

Mikroskopia sił atomowych została także wykorzystana do obrazowania powierzchni komórek śródbłonna w izolowanym naczyniu krwionośnym. Obrazy topografii wskazywały na występowanie wypukłości o wysokości około 20-400 nm (Rys. 12B) na powierzchni komórek śródbłonna stymulowanego TNF, jednakże były one nieobecne w komórkach stymulowanych TNF w obecności inhibitora Rac1 (NSC23766; Rys. 12C). Obserwacje o zmianach nanostrukturalnych powierzchni komórek śródbłonna zostały także potwierdzone obrazowaniem aort en face z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (Rys. 12 D-F); (**publikacja H2**).



Rys. 12. Obrazy topografii komórek śródbłonna w aorcie en face w grupie (A) kontrolnej, oraz aorty traktowanej TNF (B; 10 ng/ml, 24 h), oraz aorty traktowanej TNF+NSC23766 (C, 10 ng/ml i 50 μ M, odpowiednio, 24 h), wraz z przekrojem poprzecznym przez topografię. Obrazy SEM komórek śródbłonna w aorcie en face w grupie (D) kontrolnej, oraz aorty traktowanej TNF (E; 10 ng/ml, 24 h), oraz aorty traktowanej TNF+NSC23766 (F, 10 ng/ml i 50 μ M, odpowiednio, 24 h); (**publikacja H2**).

5.5 Dyskusja i Podsumowanie

W niniejszym autoreferacie przedstawiono wyniki wskazujące, że **aktywacja prozapalna komórek śródbłonna w izolowanej aortce za pomocą różnych bodźców, takich jak TNF, LPS, AngII, hipoksja lub OA, prowadzi do biogenezy kropli lipidowych i jednoczesnej generacji PGI₂**. Hamowanie ATGL zwiększa liczbę śródbłonkowych kropli lipidowych i jednocześnie uniemożliwia generację PGI₂, co sugeruje kluczową rolę ATGL w dynamicznym tworzeniu kropli lipidowych w zapaleniu naczyń oraz w generacji prostacykliny. Ponadto wykazano, że **białko Rac1 jest centralnym elementem łączącym tworzenie kropli lipidowych w śródbłonku z innymi markerami odpowiedzi prozapalnej śródbłonna**, w tym ze zwiększoną sztywnością śródbłonna oraz reorganizacją cytoszkieletu, zmianami nanostrukturalnymi błony komórkowej śródbłonna oraz zwiększoną ekspresję ICAM-1.

Stan zapalny komórek śródbłonna jest objawem towarzyszącym patologii naczyń krwionośnych w chorobach układu krążenia, a wieloparametrowa charakterystyka zmian na poziomie biochemicznym, mechanicznym i strukturalnym, które zachodzą w śródbłonku w stanach zapalnych naczyń, jest kluczowa dla zrozumienia mechanizmów chorób układu sercowo-naczyniowego. Stan zapalny komórek śródbłonna może być wywołany przez czynniki prozapalne, np. czynnik martwicy nowotworowej (TNF), lipopolisacharydy (LPS) lub angiotensynę II (AngII), oraz czynniki stresowe np. zmniejszoną dostępność tlenu, nadmiar lipidów w układzie krążenia, oraz inne. W odpowiedzi na stan zapalny, komórki śródbłonna mogą zmieniać ilość wydzielanych substancji biologicznie czynnych, regulować transport substancji przez ścianę naczynia, regulować zachowanie komórek mięśniowych gładkich, oraz napięcie ścian naczyń krwionośnych (22).

Pomimo że zjawisko biogenezy kropli lipidowych w śródbłonku zostało wcześniej wykazane w hodowanych komórkach śródbłonna w odpowiedzi na TNF (29), LPS (30) lub OA (3,18), ich rola nie zostało do końca zbadana. W przeciwieństwie do badań z wykorzystaniem izolowanej aorty, krople lipidowe powstające w hodowanych komórkach pod wpływem czynników prozapalnych były stabilne i nie wymagały użycia Atgl, co wskazuje na różnicę w tworzeniu i degradacji kropli lipidowych w linii komórkowej w porównaniu z izolowanym naczyniem krwionośnym. Wyniki te sugerują, że dynamika kropli lipidowych w ścianie naczyniowej zależy od interakcji między komórkami śródbłonna a komórkami mięśni gładkich, oraz innymi komórkami występującymi naturalnie w tkance. Śródbłonek w izolowanym naczyniu krwionośnym zachowuje swoje fenotypowe cechy, dlatego badania przeprowadzone na fragmentach ściany naczynia mogą lepiej odwzorowywać warunki *in vivo*, w kontekście tworzenia kropli lipidowych w zapaleniu naczyń krwionośnych w porównaniu z hodowanymi komórkami śródbłonna (2).

Prowadzone badania nad biogenezą kropli lipidowych w śródbłonku w izolowanym naczyniu krwionośnym wymagały opracowania i zastosowania multiparametrowej metodyki. Wśród wykorzystywanych technik, poza mikroskopią fluorescencyjną, mikroskopią sił atomowych, mikroskopią elektronową, oraz testów immunoenzymatycznych, wykorzystano technikę spektroskopii ramanowskiej. Jednoznaczna detekcja kropli lipidowych w naczyniu krwionośnym (ze względu na duży przekrój czynniki na rozpraszanie ramanowskie dla lipidów) umożliwiła bez inwazyjną i bez znacznikową charakterystykę kropli lipidowych: ocenę ich ilości, wskazania dokładnej lokalizacji między komórkami śródbłonna a komórkami mięśniówki gładkiej, oraz co najważniejsze, analizę składu biochemicznego kropli lipidowych. Analiza położenia oraz intensywności integralnej pasm ramanowskich przypisywanych do drgań poszczególnych ugrupowań lipidów pozwoliła na określenie średniego stopnia nienasylenia lipidów budujących krople lipidowe (**publikacja H1-H4**).

Znaczącym osiągnięciem naukowym, przedstawionym w niniejszym autoreferacie, było wykazanie, że sygnalizacja Rac1 bierze udział w tworzeniu kropeł lipidowych. W poprzednich doniesieniach literaturowych biogeneza kropeł lipidowych było związane z generacją PGI₂ (4,18,30), i uważa się, że krople lipidowe w śródbłonku mogą stanowić rezerwuuar substratów do produkcji eikozanoidów, podobnie jak to jest w przypadku leukocytów (8,15). Szczególnie, że wykorzystując spektroskopię ramanowską wykazano, że lipidy budujące krople lipidowe w śródbłonku w stanie zapalnym są wysoko nienasycone. Warto zauważyć, że wpływ Rac1 na przemiany kwasu arachidonowego (AA) poprzez aktywację fosfolipazy A2 (PLA₂) w odpowiedzi na różnego rodzaju bodźce, w tym cytokiny, został opisany w literaturze (31-34). Tym samym, przedstawiane wyniki sugerują, że Rac1 odgrywa kluczową rolę w tworzeniu kropli lipidowych w śródbłonku, co również jest związane ze zwiększoną generacją eikozanoidów w śródbłonku, której regulacja jest zależna od szlaku RhoA-Rac1-Cdc42 (35).

Zwiększona sztywność komórek śródbłonka, zależna od reorganizacji struktury cytoszkieletu (36) jest uważana za cechę charakterystyczną dysfunkcji śródbłonka (37,38) i została odnotowana w literaturze w odpowiedzi m.in. na stan zapalny wywołany przez TNF (39). Polimeryzacja F-aktyny, a w konsekwencji zwiększona sztywność komórek śródbłonka aktywowanego przez TNF jest zależna od aktywności Rac1, co wykazały prowadzone badania. **Chociaż związek między zwiększeniem sztywności błony komórek śródbłonka poprzez reorganizację cytoszkieletu a Rac1, był już wcześniej znany w literaturze, prace Aplikantki pozwoliły skorelować tę odpowiedź z tworzeniem kropeł lipidowych, sugerując centralną rolę Rac1 w tworzenia kropeł lipidowych równoległe z nanomechanicznymi i nanostrukturalnymi zmianami komórek śródbłonka w izolowanych naczyniach krwionośnych pod wpływem stanu zapalnego wywołanego przez TNF (1).**

Zarówno tworzenie kropeł lipidowych, jak i zwiększona sztywność błony komórkowej w aktywowanych przez TNF komórkach śródbłonka, były skorelowane z nanostrukturalnymi zmianami na powierzchni komórek śródbłonka, co zbadano z wykorzystaniem mikroskopii siła atomowych oraz skaningowej mikroskopii elektronowej. Na obrazach topografii AFM obserwowano wypukłości na powierzchni śródbłonka o wysokości około 20–400 nm, które były nieobecne dla komórek śródbłonka stymulowanych TNF w obecności inhibitora Rac1 (NSC23766). Wcześniejsza literatura wskazywała na powstawanie wypukłości na powierzchni hodowanych komórek śródbłonka za pomocą AFM i definiowała je jako skupiska służące do kotwiczenia leukocytów podczas stanów zapalnych, bogate m.in. w ICAM-1 (40). Jest to zgodne z uzyskanymi wynikami zwiększonej ekspresji ICAM-1 w komórkach śródbłonka podczas stanu zapalnego wywołanego TNF, a także zmniejszeniem ekspresji ICAM-1 w odpowiedzi na hamowanie Rac1 przez NSC23766 (1). Przypuszcza się, że mechanizm regulacyjny Rac1 dotyczący ekspresji ICAM-1 w śródbłonku może być podobny do działania TNF na komórki nabłonka dróg oddechowych płuc przez kaskadę Rac1–ROS–NF-κB–ICAM-1 (28).

Podsumowując, w ramach badań potwierdzono **centralną i kluczową rolę Rac1 w zapaleniu śródbłonka wywołanym przez TNF w izolowanej aorcie mysiej.** Przedstawione wyniki wskazują, że **tworzenie kropeł lipidowych jest dynamicznie regulowane zarówno przez Rac1, jak i ATGL.** Aktywacja Rac1 stanowi centralną ścieżkę kierującą biogeneza kropeł lipidowych z nanomechanicznymi i nanostrukturalnymi zmianami w zapaleniu wywołanym przez TNF w komórkach śródbłonka w izolowanych naczyniach krwionośnych, co może stanowić cel terapeutyczny w redukcji zapalenia naczyń krwionośnych.

7. PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH OSIĄGNIĘĆ ZAPREZENTOWANYCH W PRZEDŁOŻONYM CYKLU PUBLIKACYJNYM

Podstawą osiągnięcia naukowego zgłoszonego do postępowania habilitacyjnego jest cykl publikacji zatytułowany „*Nowe aspekty patofizjologii kropeł lipidowych w zapaleniu izolowanego naczynia krwionośnego*”. Na cykl ten składają się 4 artykuły opublikowane w latach 2020-2023 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (łączny IF=25,48, łącznie pkt. MEiN=560). Publikacje włączone do cyklu prezentują spójny temat badawczy koncentrujący się na nowych aspektach patobiologii kropeł lipidowych w stanie zapalnym komórek śródbłonka w izolowanych naczyniach krwionośnych. Definicja mikroskopowych i spektroskopowych markerów zapalenia naczyń umożliwiła na odkrycie nowych aspektów patobiologii kropeł lipidowych w śródbłonku i ścianie naczynia krwionośnego. Biologia naczyniowych kropeł lipidowych (ang. *lipid droplets*) jest niejednoznaczna: z jednej strony powstawanie kropeł lipidowych umożliwia buforowanie nadmiaru lipidów z układu krążenia i chroni naczynia krwionośne przed niekorzystnymi skutkami hiperlipemii, jednakże nadmiar kropeł lipidowych i blokowanie ich lipolizy pogarsza funkcjonalność naczyń krwionośnych, co wskazuje na bardziej złożoną rolę patofizjologiczną kropeł lipidowych niż dotychczas uważano. Ponadto, wykazano, że powstawanie kropeł lipidowych, zmiany nanomechaniczne śródbłonka, uszkodzenie glikokaliksu i zapalenie naczyń są ściśle powiązane i mają wspólny mechanizm, który może stanowić cel farmakoterapeutyczny. Biorąc pod uwagę, że większość chorób układu sercowo-naczyniowego jest związana z zapaleniem naczyń, przedstawione badania mają potencjał translacyjny.

Poniżej przedstawiono kluczowe osiągnięcia naukowe prezentowanej rozprawy habilitacyjnej:

1. Zastosowanie unikatowej metodyki opartej na kombinacji metod: obrazowania ramanowskiego, obrazowania z użyciem mikroskopii sił atomowych (AFM) oraz obrazowania fluorescencyjnego preparatów barwionych immunohistochemicznie do charakterystyki kropeł lipidowych w izolowanym naczyniu krwionośnym.
2. Charakterystyka procesu tworzenia kropeł lipidowych wraz z oceną heterogeniczności składu biochemicznego kropeł lipidowych w śródbłonku w izolowanym naczyniu krwionośnym w kontekście stanu zapalnego (wywoływanego TNF, LPS, Ang II, hipoksja), apoptozy (FasL) oraz nadmiaru lipidów (OA) w środowisku, co stanowi nowy aspekt patobiologii kropeł lipidowych w komórkach śródbłonka.
3. Wykazanie kluczowej roli lipazy trójglicerydów tkanki tłuszczowej (ATGL, adipose triglyceride lipase) w rozkładzie naczyniowych kropeł lipidowych niezależnie od czynnika zewnętrznego powodującego biogenezę kropeł lipidowych.
4. Wykazanie centralnej roli białka Rac1 w procesie biogenezy kropeł lipidowych w stanie zapalnym komórek śródbłonka, oraz ścisły związek tworzenia kropeł lipidowych ze zmianami nanostrukturalnymi i nanomechanicznymi komórek śródbłonka

6. PERSPEKTYWY KONTYNUACJI BADAŃ ZAPREZENTOWANYCH W OSIĄGNIĘCIU HABILITACYJNYM

Zagadnienie tworzenia i funkcjonowania kropeł lipidowych w naczyniach krwionośnych może stanowić potencjalną farmakologiczną strategię zmniejszającą stan zapalny i poprawiającą stan układu sercowo-naczyniowego. Z tego powodu Aplikantka planuje zastosować ustaloną metodologię badawczą w celu opracowania terapii farmakologicznych dla kropeł lipidowych w naczyniach krwionośnych pod wpływem stanu zapalnego, uwzględniając zmiany biochemiczne, nanostrukturalne i funkcjonalne w izolowanych naczyniach krwionośnych. Do przeprowadzenia takich badań zostanie wykorzystana kombinacja technik, w tym mikroskopii fluorescencyjnej, spektroskopii Ramanowskiej i testów biochemicznych ELISA oraz pomiarów funkcjonalności aorty za pomocą miografu.

Ostatnie, nieopublikowane badania Aplikantki wykazały, że zwiększenie liczby kropeł lipidowych w stanie zapalnym naczyń krwionośnych można zahamować, stosując leki z grupy inhibitorów ko-transportera sodowo-glukozowego (ang. *sodium glucose co-transporters inhibitors SGLT2-I*). SGLT2-I to nowa klasa doustnych leków przeciwcukrzycowych, które zmniejszają poziom glukozy u pacjentów przez blokowanie zwrotnego wchłaniania glukozy z moczu i zwiększania jej wydalania. Leki te odniosły sukces w leczeniu cukrzycy typu 2 i zmniejszeniu ryzyka hospitalizacji z powodu niewydolności serca (41). Jednakże wielokierunkowe działanie SGLT2-I na układ krążenia, a w szczególności mechanizm przeciwzapalnego działania tej grupy leków nie są w pełni poznane pomimo obszernych badań.

W przyszłych planach Aplikantka zamierza przeprowadzić szereg badań mających na celu wyjaśnienie mechanistycznego związku między biogenezą kropeł lipidowych a inhibitorami SGLT2. Istotność kierunku prowadzonych badań potwierdza fakt, że skuteczna farmakoterapia cukrzycy typu 2 nie powinna skupiać się wyłącznie na obniżeniu poziomu cukru we krwi, ale również na zmniejszeniu poziomu lipidów. Celowanie w farmakologię kropeł lipidowych w naczyniach krwionośnych jest kluczowe, ponieważ akumulacja lipidów w postaci kropeł lipidowych jest często obserwowana w chorobach układu krążenia, takich jak cukrzyca, otyłość i miażdżyca (42,43).

Obecnie prowadzone badania są realizowane w ramach projektu *Multimodalne podejście do kompleksowej oceny (dys)funkcjonalnego fenotypu śródbłonna w izolowanych naczyniach krwionośnych*, Instytucja finansująca: NCN (**SONATA-17**, DEC-2021/43/D/ST4/02311, **2022-2025**), którego Aplikantka jest kierownikiem.

8. LITERATURA

- (1) Pacia, M. Z.; Chorazy, N.; Sternak, M.; Fels, B.; Pacia, M.; Kepczynski, M.; Kusche-Vihrog, K.; Chlopicki, S. *Cellular Molecular Life Sciences* **2022**, *79*, 317.
- (2) Pacia, M. Z.; Chorazy, N.; Sternak, M.; Wojnar-Lason, K.; Chlopicki, S. *Journal of Lipid Research* **2023**, 100355.
- (3) Pacia, M. Z.; Majzner, K.; Czamara, K.; Sternak, M.; Chlopicki, S.; Baranska, M. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Biology of Lipids* **2020**, *1865*, 158758.
- (4) Pacia, M. Z.; Sternak, M.; Mateuszuk, L.; Stojak, M.; Kaczor, A.; Chlopicki, S. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research* **2020**, *1867*, 118681.
- (5) Guo, Y.; Cordes, K. R.; Farese Jr, R. V.; Walther, T. C. *Journal of cell science* **2009**, *122*, 749-752.
- (6) Ibrahim, A.; Arany, Z. *Circulation Research* **2017**, *120*, 1219-1221.
- (7) Pereira-Dutra, F. S.; Bozza, P. T. *Expert Review of Proteomics* **2021**, *18*, 809-825.
- (8) Bozza, P. T.; Magalhães, K. G.; Weller, P. F. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Biology of Lipids* **2009**, *1791*, 540-551.
- (9) Melo, R. C.; D'Avila, H.; Wan, H.-C.; Bozza, P. T.; Dvorak, A. M.; Weller, P. F. *Journal of Histochemistry Cytochemistry* **2011**, *59*, 540-556.
- (10) Weller, P. F.; Ryeom, S. W.; Picard, S. T.; Ackerman, S. J.; Dvorak, A. M. *The Journal of cell biology* **1991**, *113*, 137-146.
- (11) Arrese, E. L.; Saudale, F. Z.; Soulages, J. L. *J Lipid insights* **2014**, *7*, LPI. S11128.
- (12) Ducharme, N. A.; Bickel, P. E. *Endocrinology* **2008**, *149*, 942-949.
- (13) Zweytick, D.; Athenstaedt, K.; Daum, G. *Biochimica et Biophysica Acta -Reviews on Biomembranes* **2000**, *1469*, 101-120.
- (14) Weller, P. F. *Transactions of the American Clinical Climatological Association* **2016**, *127*, 328.
- (15) Bozza, P. T.; Bakker-Abreu, I.; Navarro-Xavier, R. A.; Bandeira-Melo, C. *J Prostaglandins, leukotrienes essential fatty acids* **2011**, *85*, 205-213.
- (16) Lang, P. D.; Insull, W. *The Journal of clinical investigation* **1970**, *49*, 1479-1488.
- (17) Lupu, F.; Danaricu, I.; Simionescu, N. *Atherosclerosis* **1987**, *67*, 127-142.
- (18) Kuo, A.; Lee, M. Y.; Sessa, W. C. *Circulation research* **2017**, *120*, 1289-1297.
- (19) Kuo, A.; Lee, M. Y.; Yang, K.; Gross, R. W.; Sessa, W. C. *Journal of Biological Chemistry* **2018**, *293*, 973-983.
- (20) Majzner, K.; Chlopicki, S.; Baranska, M. *Journal of Biophotonics* **2016**, *9*, 396-405.
- (21) Majzner, K.; Tott, S.; Roussille, L.; Deckert, V.; Chlopicki, S.; Baranska, M. *Analyst* **2018**, *143*, 970-980.
- (22) Pober, J. S.; Sessa, W. C. *Nature Reviews Immunology* **2007**, *7*, 803-815.
- (23) Czamara, K.; Majzner, K.; Pacia, M. Z.; Kochan, K.; Kaczor, A.; Baranska, M. *Journal of Raman spectroscopy* **2015**, *46*, 4-20.
- (24) Hall, A. *J Biochemical Society Transactions* **2012**, *40*, 1378-1382.
- (25) Heasman, S. J.; Ridley, A. J. *J Nature reviews Molecular cell biology* **2008**, *9*, 690-701.
- (26) Wójciak-Stothard, B.; Entwistle, A.; Garg, R.; Ridley, A. J. *J. o. c. p. Journal of cellular physiology* **1998**, *176*, 150-165.
- (27) Chen, X.-L.; Zhang, Q.; Zhao, R.; Medford, R. M.; Physiology, C. *J American Journal of Physiology-Heart* **2004**, *286*, H1001-H1007.
- (28) Kim, H.; Hwang, J.-S.; Woo, C.-H.; Kim, E.-Y.; Kim, T.-H.; Cho, K.-J.; Seo, J.-M.; Lee, S.-S.; Kim, J.-H. *Experimental molecular medicine* **2008**, *40*, 167-175.
- (29) Czamara, K.; Majzner, K.; Selmi, A.; Baranska, M.; Ozaki, Y.; Kaczor, A. *Scientific reports* **2017**, *7*, 40889.
- (30) Czamara, K.; Stojak, M.; Pacia, M. Z.; Zieba, A.; Baranska, M.; Chlopicki, S.; Kaczor, A. *Cells* **2021**, *10*, 1403.
- (31) Cui, X.-L.; Douglas, J. G. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94*, 3771-3776.
- (32) Kim, B.-C.; Kim, J.-H. *FEBS letters* **1997**, *407*, 7-12.

- (33) Kim, J.-H.; Kwack, H.-J.; Choi, S.-E.; Kim, B.-C.; Kim, Y.-S.; Kang, I.-J.; Kumar, C. C. *FEBS letters* **1997**, *406*, 93-96.
- (34) Piomelli, D. *Current opinion in cell biology* **1993**, *5*, 274-280.
- (35) Schmeck, B.; Brunsch, M.; Seybold, J.; Krüll, M.; Eichel-Streiber, C. v.; Suttorp, N.; Hippenstiel, S. *Inflammation* **2003**, *27*, 89-95.
- (36) Prasain, N.; Stevens, T. *Microvascular research* **2009**, *77*, 53-63.
- (37) Fels, J.; Kusche-Vihrog, K. *Antioxidants Redox Signaling* **2019**, *30*, 945-959.
- (38) Maase, M.; Rygula, A.; Pacia, M. Z.; Proniewski, B.; Mateuszuk, L.; Sternak, M.; Kaczor, A.; Chlopicki, S.; Kusche-Vihrog, K. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology Medicine* **2019**, *16*, 97-105.
- (39) Szczygiel, A. M.; Brzezinka, G.; Targosz-Korecka, M.; Chlopicki, S.; Szymonski, M. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **2012**, *463*, 487-496.
- (40) Franz, J.; Brinkmann, B. F.; König, M.; Hüve, J.; Stock, C.; Ebnet, K.; Riethmüller, C. *PLoS One* **2016**, *11*, e0146598.
- (41) Braunwald, E. *European Heart Journal* **2022**.
- (42) Marzec, K. M.; Wrobel, T. P.; Rygula, A.; Maslak, E.; Jaształ, A.; Fedorowicz, A.; Chlopicki, S.; Baranska, M. *Journal of biophotonics* **2014**, *7*, 744-756.
- (43) Pilarczyk, M.; Mateuszuk, L.; Rygula, A.; Kepczynski, M.; Chlopicki, S.; Baranska, M.; Kaczor, A. *PLoS One* **2014**, *9*, e106065.

AKTYWNOŚĆ NAUKOWA

1. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

W dotychczasowej karierze naukowej odbyłam łącznie **7 staży naukowych: 1 w krajowym ośrodku naukowym** w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN im. Jerzego Habera,, oraz **6 staży naukowych w zagranicznych ośrodkach**: National Institute of Nuclear Physics (Frascati National Laboratories, Frascati, Rome, Italy, 5-23.09.2012), Institute of Polymer Science (Johannes Kepler University, Linz, Austria, 14.07-5.08.2013), Institute of Physiology (Medical Faculty University of Münster, Germany, 1-28.02.2015), The Leibniz Institute of Photonic Technology (IPHT, Jena, Germany, 01.01-31.03.2016), Institute of Physiology (University of Lubeck, Lubeck, Niemcy, 14.01-14.04.2019).

Na szczególną uwagę zasługuje staż podoktorski w Instytucie Fizjologii (Lubecka 2019) pod opieką Pani Profesor Kristiny Kusche-Vihrog, gdzie szkoliłam się z zakresu wiedzy i umiejętności prowadzenia pomiarów krzywych siła –odległość mikroskopii sił atomowych komórek śródbłonna w ich naturalnym środowisku (w naczyniu krwionośnym), oraz określeniu zmian sztywności funkcjonalnych komórek śródbłonna podczas stanu zapalnego. Metodyka badań sztywności funkcjonalnych komórek śródbłonna w naczyniu krwionośnym techniką mikroskopii sił atomowych jest skomplikowana, dlatego staż naukowy w ośrodku naukowym o odpowiednim doświadczeniu i możliwościach w tej materii był nieodzownym krokiem do podjęcia takich badań w ramach projektu SONATINA1 (NCN). Wymiernym rezultatem współpracy są trzy manuskrypty opublikowane w uznanych międzynarodowych czasopismach:

- Marta Z. Pacia, Natalia Chorazy, Magdalena Sternak, Benedikt Fels, Michal Pacia, Mariusz Kepczynski, Kristina Kusche-Vihrog, Stefan Chlopicki, *Rac1 regulates lipid droplets formation, nanomechanical, and nanostructural changes induced by TNF in vascular endothelium in the isolated murine aorta*, Cellular and Molecular Life Sciences, 2022, 79, 6, 317, DOI: 10.1007/s00018-022-04362-7
- Zülfü C. Cosgun, Magdalena Sternak, Benedikt Fels, Anna Bar, Grzegorz Kwiatkowski, **Marta Z. Pacia**, Lisbeth Herrnböck, Martina Lindemann, Johannes Stegbauer, Sascha Höges, Stefan Chlopicki, Kristina Kusche-Vihrog, *Rapid shear stress-dependent ENaC membrane insertion is mediated by the endothelial glycocalyx and the mineralocorticoid receptor*, Cellular and Molecular Life Sciences, **2022**, 79, 5, 235
- Martina Maase, Anna Rygula, **Marta Z. Pacia**, Bartosz Proniewski, Lukasz Mateuszuk, Magdalena Sternak, Agnieszka Kaczor, Stefan Chlopicki, Kristina Kusche-Vihrog, *Combined Raman- and AFM-based detection of biochemical and nanomechanical features of endothelial dysfunction in aorta isolated from ApoE/LDLR-/- mice*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2019, 16, 97-105

Badania, które złożyły się na mój dorobek naukowy, wykonywane były w dużej części bezpośrednio przeze mnie, ale także częściowo w ramach następujących współprac naukowych z:

- Zespołem Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów, Zakładu Chemii Fizycznej i Elektrochemii Wydziału Chemii UJ w zakresie obrazowania fluorescencyjnego próbek z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego. Wyniki współpracy z Profesorem dr hab. Mariuszem Kępczyńskim stanowią część publikacji: **Marta Z. Pacia**, Natalia Chorazy, Magdalena Sternak, Benedikt Fels, Michal Pacia, **Mariusz Kepczynski**, Kristina Kusche-Vihrog, Stefan Chlopicki, *Rac1 regulates lipid droplets formation, nanomechanical, and nanostructural changes induced by TNF in vascular endothelium in the isolated murine aorta*, Cellular and Molecular Life Sciences, **2022**, 79, 6, 317, DOI: 10.1007/s00018-022-04362-7
- Pracownią Mikroskopii Elektronowej Wydziału Chemii UJ w zakresie obrazowania z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej. Wyniki współpracy z dr inż. Michałem Pacią stanowią część publikacji: **Marta Z. Pacia**, Natalia Chorazy, Magdalena Sternak, Benedikt Fels, **Michal Pacia**, Mariusz Kepczynski, Kristina Kusche-Vihrog, Stefan Chlopicki, *Rac1 regulates lipid droplets formation, nanomechanical, and nanostructural changes induced by TNF in vascular endothelium in the isolated murine aorta*, Cellular and Molecular Life Sciences, **2022**, 79, 6, 317, DOI: 10.1007/s00018-022-04362-7

2. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków UJ (JCET, UJ), którego jestem pracownikiem, stanowi pozawydziałową jednostkę Uniwersytetu Jagiellońskiego o charakterze centrum badawczego. Celem działalności Jagiellońskiego Centrum Rozwoju Leków UJ jest działalność naukowa, a działalność ściśle dydaktyczna nie jest prowadzona w JCET. Jedynie prowadzona jest opieka kadry badawczej JCET nad studentami prowadzącymi badania do pracy magisterskiej we współpracy z Wydziałami UJ lub doktorantami realizującymi prace doktorskie w JCET w ramach Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych.

PROWADZENIE PRAC DYPLOMOWYCH

- rola **promotora pomocniczego doktoratu** realizowanego w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych MCB-JCET-Solaris od roku akademickiego 2022/2023 Pani Natalii Chorąży. Głównym promotorem jest Pan Prof. dr hab. Stefan Chlopicki
- rola **opiekuna naukowego pracy magisterskiej** Pani Natalii Chorąży w roku akademickim 2021/2022. Promotorem pracy magisterskiej była Pani dr hab. Agnieszka Kaczor, a praca pt.: *W poszukiwaniu znaczenia kropli lipidowych w aktywowanym śródbłonku – obrazowanie zmian chemicznych z użyciem spektroskopii ramanowskiej i mikroskopii fluorescencyjnej* stała się podstawą nadania tytułu magistra na Wydziale Chemii, Kierunku Chemia Medyczna
- rola **opiekuna naukowego pracy licencjackiej** Pani Marty Karpiel w roku akademickim 2019/2020. Promotorem pracy magisterskiej była Pani dr Katarzyna Majzner, a praca pt.: *Wychwyt kwasów tłuszczowych przez komórki śródbłonka w izolowanych naczyniach*

krwionośnych – badania z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej i spektroskopowej stała się podstawą nadania tytułu licencjata na Wydziale Chemii, Kierunku Chemia Medyczna

- rola **opiekuna naukowego pracy licencjackiej** Pani Natalii Chorąży w roku akademickim 2019/2020. Promotorem pracy magisterskiej była Pani dr hab. Agnieszka Kaczor, a praca pt.: *Charakterystyka stanu zapalnego komórek śródbłonna w izolowanych naczyniach krwionośnych z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej i spektroskopowej* stała się podstawą nadania tytułu licencjata na Wydziale Chemii, Kierunku Chemia Medyczna

DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA

- Współorganizacja ćwiczeń dla studentów programu Advanced Spectroscopy in Chemistry (Wydział Chemii UJ). Ćwiczenie zatytułowane: *Fluorescence imaging for the detection of substructures in endothelial cells in vitro* (rok akademicki: 2019/2020)
- Prowadzenie seminarium i ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów szkoły doktorskiej MCB-JCET- Solaris. Seminarium/ ćwiczenia: Methodology of isolated functional blood vessels studies with the use of Raman imaging (GRANT) (rok akademicki: 2019/2020)

DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA

- Udział w Komitecie Naukowym konferencji międzynarodowej: 28th Kraków Conference on Endotelium & 10th Cardiovascular Reserach Days, 12-14.12.2022 Krakow, Poland
- Pełnienie roli prowadzącej sesji (chairperson) podczas konferencji 28th Kraków Conference on Endotelium & 10th Cardiovascular Reserach Days, 12-14.12.2022 Krakow, Poland
- Udział w Zespole Wykonawczym Priorytetowego Obszaru Badawczego BioS – biologia strukturalna i translacyjna, jednego z siedmiu obszarów wyodrębnionych w Uniwersytecie Jagiellońskim w związku z wdrożeniem w życie programu IDUB (Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza) na Uniwersytecie Jagiellońskim.
- Udział w lokalnym Komitecie organizacyjnym konferencji 11th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy 23-26.08.2021, Krakow Recenzowanie abstraktów nadesłanych podczas konferencji ICAVS (11th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy 23-26.08.2021, Krakow)
- Pełnienie roli prowadzącej sesji (chairperson) podczas konferencji ICAVS (11th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy 23-26.08.2021, Krakow)
- Udział w lokalnym Komitecie organizacyjnym seminarium organizowanego przez Zespół Obrazowania Ramanowskiego na Wydziale Chemii UJ (Seminar Programme Nano and Fast Vibrational Spectroscopy) 17-18.06.2019
- Pełnienie roli prowadzącej sesji (chairperson) podczas seminarium organizowanego przez Zespół Obrazowania Ramanowskiego na Wydziale Chemii UJ (Seminar Programme Nano and Fast Vibrational Spectroscopy) 17-18.06.2019

DZIAŁALNOŚĆ POPULARYZUJĄCA NAUKĘ

- Prowadzenie pokazów popularnonaukowych oraz organizacja wydarzenia Welcome Day w ramach szkoły doktorskiej JCET MCR Solaris 3.10.2019
- Prowadzenie pokazów popularnonaukowych w pracowni Spektroskopii Ramanowskiej w JCET w ramach Małopolskiej Nocy Naukowców 28.09.2018 oraz 27.09.2019. Pokazy pt „Jak wygląda naczynie krwionośne od środka? – pokaz pomiarów ramanowskich”
- Prowadzenie pokazów popularnonaukowych oraz organizacja wydarzenia „Dni Otwarte JCET” 25.10.2018 oraz 12.06.2019

3. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

- Stypendium towarzystwa **European Biophysical Societies' Association** uzyskane w otwartym konkursie dla młodych naukowców, pokrywające koszty w kongresie EBSA-2023, który odbędzie się w Sztokholmie w terminie 31.07-4.08.2023
- Laureatka programu **START 2019 Fundacji na rzecz Nauki Polskiej**: roczne stypendium dla wybitnych młodych uczonych na początku kariery naukowej posiadających udokumentowane osiągnięcia w swojej dziedzinie badań
- Laureatka **stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego** dla wybitnych młodych naukowców w 2018 roku: stypendium dla wybitnych młodych naukowców wykazujących się znaczącymi osiągnięciami w działalności naukowej
- **Nagroda Polskiego Towarzystwa Chemicznego** za wyróżnioną rozprawę doktorską w 2017 roku (Decyzja Komisji Nagród oraz Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Chemicznego)
- **Stypendium Rektora UJ** dla najlepszych studentów studiów III stopnia przyznane pięciokrotnie w 2012, 2013, 2014, oraz 2015 roku
- **Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego** dla studentów za wybitne osiągnięcia naukowe, przyznane dwukrotnie w 2010 i 2011 roku

Marta Pacia