

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej



**Opracowanie metody oznaczania czasu życia pozytonium
w mikropęcherzykach pochodzących z hodowli komórek
prawidłowych beta-trzustki.**

Julia Nizioł

Nr albumu: 1160270

Praca licencjacka
na kierunku Biofizyka

Praca wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. n. med. Ewy Łucji Stępień
Zakład Fizyki Medycznej

Kraków 2021

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca dyplomowa została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem tytułu zawodowego w wyższej uczelni.

.....

Kraków, dnia

.....

Podpis autora pracy

Oświadczenie kierującego pracą

Potwierdzam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i kwalifikuje się do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie tytułu zawodowego.

.....

Kraków, dnia

.....

Podpis kierującego pracą

*Pragnę przede wszystkim podziękować swojej Promotorce, **prof. Ewie Stepień** za okazaną cierpliwość, ciągłą motywację oraz wiele cennych uwag podczas pisania tej pracy licencjackiej. Dziękuję również **prof. Pawłowi Moskalowi** za możliwość dołączenia do jego grupy badawczej oraz wszelkie okazane wsparcie.*

*Szczególnie wdzięczna jestem za pomoc **dr Eweliny Kubicz**, która wprowadziła mnie w tajniki pracy eksperymentalnej oraz zawsze służyła radą i wspomogła mnie swoim doświadczeniem.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję także do **Pani Cariny Rzącej, dr Szymona Niedźwieckiego i dr Agnieszki Kamińskiej**, za ich bezinteresowną pomoc i poświęcony czas.*

Praca została wykonana w ramach projektów:

TEAM POIR.04.04.00-00-4204/17 Fundacji na rzecz Nauki Polskiej pt. "Jagiellońska pozytonowa emisyjna tomografia: obrazowanie morfometryczne in-vivo za pomocą atomów pozytonium" oraz

OPUS 17 nr 2019/33/B/NZ3/01004 pt. "Zależność między składem molekularnym pęcherzyków zewnątrzkomórkowych śródbłonna i beta trzustki a ich rolą w cukrzycowej dysfunkcji śródbłonna - wpływ na właściwości błony komórek docelowych".

Spis treści

Streszczenie	6
Abstract	6
Lista stosowanych skrótów	8
1 Wstęp	10
1.1 Spektroskopia Czasu Życia Pozytonium	10
1.2 Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe	12
1.3 Wykorzystanie PALS do badań układów koloidalnych i błon biologicznych.	15
2 Cel pracy	17
3 Materiały i metody	18
3.1 Hodowla komórkowa	18
3.2 Izolacja mikropęcherzyków	18
3.3 Układ PALS	21
3.3.1 Źródło pozytonów.	21
3.3.2 Spektrometr czasu życia pozytonium.	22
3.3.3 Analiza sygnałów.	24
3.3.4 Kontrola temperatury w układzie.	26
3.4 Analizator cząstek qNano.	27
4 Wyniki	30
4.1 Kalibracja temperaturowa.	30
4.2 Koncentracja EVs w próbkach.	32
4.3 Pomiary PALS.	33
4.3.1 Parafilm.	33
4.3.2 PBS.	34
4.3.3 Próbkki z EVs.	36
5 Dyskusja	38

6 Wnioski	40
Lista rysunków	41
Lista tabel	43
Literatura	45

Streszczenie

Zjawisko tworzenia się pozytonium w materiale biologicznym niesie za sobą nowe możliwości dla diagnostyki medycznej. W niniejszej pracy zaprezentowano metodę wyznaczania czasu życia pozytonium w mikropęcherzykach wyizolowanych z hodowli komórek beta-trzustki techniką filtracji niskopróżniowej połączonej z ultrawirowaniem. Koncentrację pęcherzyków w przygotowanych próbkach zbadano za pomocą analizatora cząstek qNano, którego działanie opiera się na technologii TRPS (ang. Tunable Resistive Pulse Sensing). Przed przystąpieniem do właściwych pomiarów, spektrometr czasu życia pozytonium odpowiednio dostosowano, m.in. wyposażając go w termostat precyzyjnie kontrolujący temperaturę w układzie. Wykonano serię pomiarów celem sprawdzenia stabilności temperaturowej i otrzymano krzywą kalibracyjną, na podstawie której możliwe jest dokładne określenie temperatury próbki podczas przeprowadzanego pomiaru. Źródło pozytonów dodatkowo zabezpieczono przed przeciekaniem, które może mieć miejsce przy badaniach z próbkami ciekłymi. Wykorzystano w tym celu parafilm, dla którego czas życia pozytonium zmienia się wraz z temperaturą, co zostało uwzględnione w analizie danych.

Zbadano czas życia pozytonium w mikropęcherzykach pochodzących z hodowli prowadzonych w warunkach normoglikemii i hiperglikemii. Wyniósł on odpowiednio 1,80 ns oraz 1,77 ns, tym samym nie różniąc się znacząco od czasu życia wyznaczonego w buforze PBS, w którym mikropęcherzyki były zawieszane ($\tau = 1,80$ ns). Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że do prowadzenia badań nad mikropęcherzykami z wykorzystaniem zaprezentowanej metody konieczne jest, aby próbki charakteryzowały się wyższą koncentracją pęcherzyków.

Abstract

The phenomenon of positronium formation in biological material brings new possibilities for medical diagnostics. This thesis presents a method for determining mean positronium lifetime in microvesicles isolated from the culture of beta-pancreatic cells using low-vacuum filtration technique combined with the ultracentrifugation. The concentration of microvesicles in the prepared samples was tested with qNano particle analyzer, the operation of which is based on the TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing) technology. Before starting the actual measurements, Positron Annihilation Lifetime Spectrometer was adjusted accordingly, e.g. by equipping it with a thermostat which allows to precisely control the temperature in the system. A series of measurements was performed to check the temperature stability and a calibration curve was obtained, on the basis of which it is possible to accurately determine the temperature of the sample during the

measurement. The positron source was additionally secured against leakage, which may occur when testing with liquid samples. Parafilm was used for this purpose, the positronium lifetime in it changes with temperature, what was taken into account in data analysis.

The positronium lifetime in microvesicles cultured under normoglycemic and hyperglycemic conditions was investigated. The values were 1.80 ns and 1.77 ns respectively, thus not significantly different from the lifetime determined in the PBS buffer in which microvesicles were suspended ($\tau = 1.80$ ns). On the basis of the obtained results, it can be concluded that to conduct research with microvesicles using the presented method, it is necessary that the samples have a higher concentration of vesicles.

Lista stosowanych skrótów

DNA	kwask deoksyrybonukleinowy (ang. <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
DPPC	dipalmitoilofosfatydylocholina (ang. <u>d</u> ipalmitoyl <u>p</u> hosphatidyl <u>l</u> choline)
EDTA	kwask etylenodiaminotetraoctowy (ang. <u>e</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etra <u>a</u> cetic <u>a</u> cid)
EVs	mikropęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. <u>e</u> xtracellu <u>l</u> ar <u>v</u> esicles)
FBS	plodowa surowica bydlęca (ang. <u>f</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum)
HG	<u>h</u> iperglikemia
HSP	białka szoku cieplnego (ang. <u>h</u> eat <u>s</u> hock <u>p</u> rotein)
IAPP	wysepkowy polipeptyd amyloidu (ang. <u>i</u> slet <u>a</u> myloid <u>p</u> olypeptide)
ILVs	pęcherzyki będące prekursorami egzosomów (ang. <u>i</u> ntraluminal <u>v</u> esicles)
LVF	niskopróżniowa filtracja na membranach (ang. <u>l</u> ow- <u>v</u> acuum <u>f</u> iltration)
MLVs	wielowarstwowe pęcherzyki (ang. <u>m</u> ulti <u>l</u> ayered <u>v</u> esicles)
MVBs	ciałka wielopęcherzykowe (ang. <u>m</u> ulti <u>v</u> esicular <u>b</u> odies)
NG	<u>n</u> ormoglikemia
o-Ps	orto-Pozytonium (ang. <u>o</u> rtho- <u>P</u> ositronium)
PALS	spektroskopia czasu życia pozytonów (ang. <u>p</u> ositron <u>a</u> nihilation <u>l</u> ifetime <u>s</u> pectroscopy)
PBS	buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PC	fosfatydylocholina (ang. <u>p</u> hosphatidyl <u>l</u> choline)
PE	fosfatydyloetanolamina (ang. <u>p</u> hosphatidyle <u>t</u> hanolamine)
POPC	palmitoilo-oleilo-fosfatydylocholina (ang. <u>p</u> almitoyl <u>o</u> leoyl <u>p</u> hosphatidyl <u>l</u> choline)
p-Ps	para-Pozytonium (ang. <u>p</u> ara <u>P</u> ositronium)
PS	fosfatydyloseryna (ang. <u>p</u> hosphatidyl <u>s</u> erine)

- Ps** pozytonium (ang. positronium)
- RNA** kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid)
- TRPS** technologia wykrywania impulsów wykorzystywana w analizatorze qNano (ang. tunable resistive pulse sensing)

1. Wstęp

1.1 Spektroskopia Czasu Życia Pozytonium

PALS (ang. Positronium Annihilation Lifetime Spectroscopy) to niezwykle precyzyjna, niedestruktywna technika, która umożliwia charakterystykę różnorodnych materiałów w skali nano oraz sub-nano [3].

Źródłem pozytonów w metodzie PALS jest rozpad promieniotwórczy β^+ izotopu ^{22}Na :

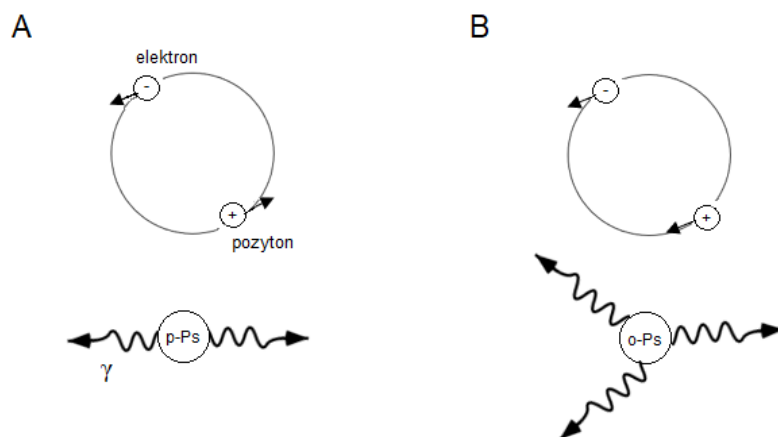


gdzie A - liczba masowa, Z - liczba atomowa, X i Y są pierwiastkami odpowiednio przed oraz po rozpadzie, jako e^+ oznaczono pozyton, natomiast ν_e to neutrino elektronowe.

Tak otrzymane cząstki mogą tworzyć z elektronami ośrodka stan związany – pozytonium (Ps). Jego powstanie można opisać rozważając tzw. 'model kropelkowy' (ang. 'blob model'), w którym pozyton uwięziony zostaje w 'kropli', gdzie dochodzi do oddziaływania poprzez rozpraszanie elastyczne oraz jonizacje otaczających molekuł [3]. Podobnie jak elektron z protonem łączą się tworząc wodór, tak też w wyniku jego połączenia ze swoją antycząstką – pozytonem, powstaje metastabilny atom, dla którego wyróżniamy dwa stany spinowe: singletowy oraz trypletowy. Energia wiązania dla pozytonium jest dwukrotnie mniejsza niż energia wiązania w atomie wodoru, z powodu o połowę mniejszej masy zredukowanej Ps, która w przybliżeniu wynosi $\mu = 4,55 \cdot 10^{-31}$ kg [4]. Dla kolejnych poziomów energetycznych wyznaczyć ją można na podstawie ze wzoru:

$$E_n(Ps) = -\frac{6,8}{n^2} \text{ eV}, \quad (2)$$

gdzie n jest liczbą kwantową oznaczającą poziom energetyczny układu pozytonium [3]. Ze stanem singletowym, nazywanym para-pozytonium (para-Ps; p-Ps), mamy do czynienia gdy spiny obu cząstek są skierowane przeciwnie, dając sumarycznie zerowy kręt. Czas życia p-Pa jest bardzo krótki, w próżni wynosi około 125 ps i tylko nieznacznie się zmienia. Pozytonium w tym stanie rozpada się zwykle na dwa kwanty gamma, rozchodzące się pod kątem 180 stopni (rys.1A). Podobnie przebiegać będzie proces bezpośredniej anihilacji pozytonu z elektronem bez utworzenia stanu związanego:

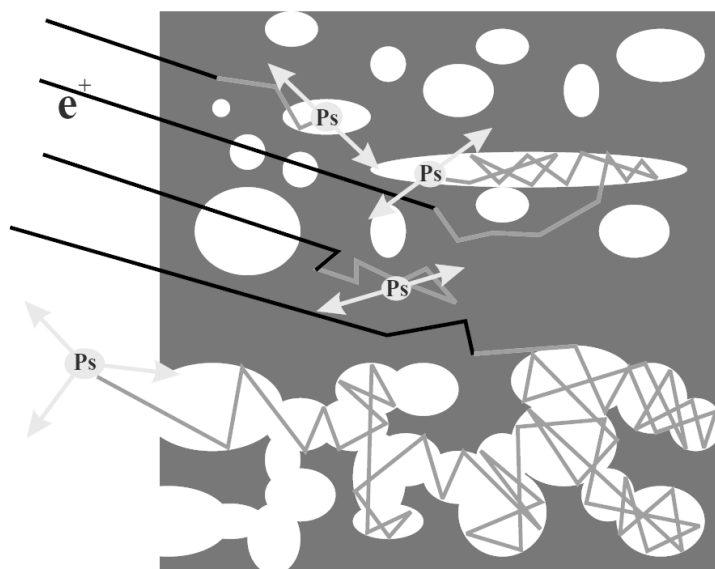


Rysunek 1. Pozytonium w stanie A) para i B) orto. Poniżej schematy rozpadu, odpowiednio na dwa kwanty γ (każdy o energii 511 keV) rozchodzące się pod kątem 180 stopni dla p-Ps oraz trzy kwanty γ w przypadku o-Ps. Energia oraz kąty pomiędzy promieniami γ wynikają z zasad zachowania energii i pędu.



Orto-pozytonium (ortho-Ps; o-Ps), a więc stan trypletowy, charakteryzuje się dłuższym średnim czasem życia, w próżni wynoszącym ok. 142 ns [1]. Wypadkowy spin takiego układu jest niezerowy i wynosi \hbar , a na skutek anihilacji może dojść do emisji trzech kwantów gamma (rys.1B). o-Ps anihiluje głównie poprzez kolizje z otaczającymi elektronami ośrodka, jest to tzw. proces 'pick-off' (ang. pick-off annihilation) [2].

Do utworzenia pozytonium dojść może jedynie w obszarach o małej lub zerowej gęstości elektronowej, czyli w tzw. 'wolnych objętościach' (ang. 'free volumes' lub 'voids') [3]. Czas życia orto-pozytonium jest bezpośrednią miarą wielkości wspomnianych przestrzeni za sprawą występowania procesów 'pick-off', natomiast intensywność o-Ps niesie informacje o ich zagęszczeniu [2]. Spektroskopia Czasu Życia Pozytonium jest techniką często wykorzystywaną do badania materiałów takich jak polimery czy inne tworzywa porowate. Do wytworzenia pozytonium dochodzi również w cieczach, w przypadku próbek biologicznych są to np. roztwory wodne lub błony biologiczne. W przestrzeniach pomiędzy cząsteczkami średni czas życia o-Ps spada do wartości rzędu kilku nanosekund [3]. Zmiana czasu życia pozytonium pozwala na obserwacje nawet bardzo niewielkich zmian w strukturze próbki, co niesie za sobą obiecującą perspektywę wykorzystania opisywanej techniki w badaniach biomedycznych.

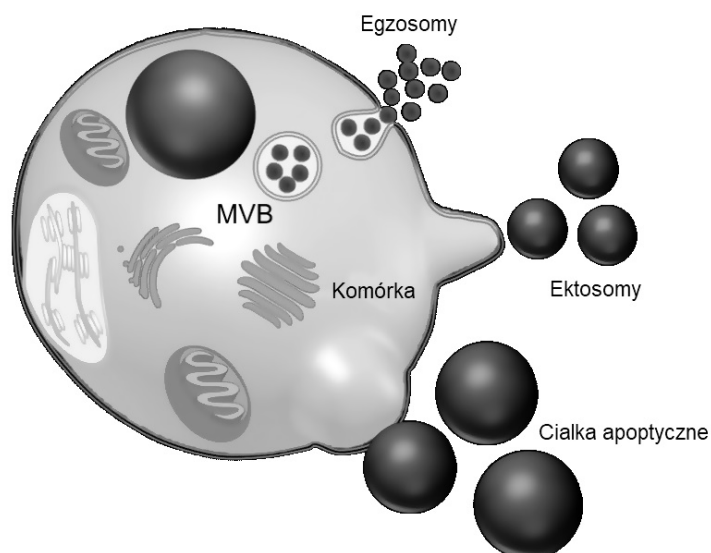


Rysunek 2. Pozytony w polimerach, których struktura charakteryzuje się obecnością pustych przestrzeni, tworzą z elektronami stan quasi-związany, nazywany pozytonium. Na skutek procesów 'pick-off', Ps ostatecznie ulega anihilacji z elektronem sąsiednich atomów, co zachodzi zwykle w czasie kilku ns. Proces ten można skorelować z wielkością promienia pustej przestrzeni korzystając z półempirycznego równania Tao-Eldrup [8].

1.2 Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. Extracellular Vesicles, EVs) to niewielkie (30 nm - 5 μ m) sferyczne struktury, z błoną w postaci dwuwartstwy lipidowej, które są uwalniane przez różne typy komórek. Przez długie lata były niedoceniane, opisywane mianem 'śmieci' lub 'odpadów' komórkowych. Dziś poświęcane jest im wiele uwagi, głównie ze względu na ich udział w komunikacji międzykomórkowej, progresji nowotworów i możliwym zastosowaniu jako biomarkerów lub systemów dostarczania leków [11]. Znaleźć je można w wielu płynach ustrojowych takich jak np.: mocz, krew, ślina, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn owodniowy oraz mleko. Zarówno mechanizm uwalniania, jak i przenoszony przez nie ładunek jest stosunkowo zróżnicowany, co pokazano w tabeli 1. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe możemy grupować na podstawie różnorodnych parametrów, najczęściej stosuje się klasyfikację ze względu na rozmiar. Wyróżniamy w ten sposób egzozomy, ektosomy oraz ciała apoptotyczne (tab.1), jednak w obszarze nazewnictwa nadal pozostaje pewna niejednoznaczność. Pęcherzyki ogółem czasami nazywane są mikropęcherzykami błonowymi i dzielone na egzozomy, mikrofragmenty błonowe i ciała apoptotyczne. Zdarza się również, że zamiennie stosowane są określenia ektosomy i mikropęcherzyki.

Najmniejszymi pęcherzykami są egzozomy, których biogeneza rozpoczyna się procesem endocytozy, tj. wpuklaniem się błony komórkowej do światła komórki. W ten sposób powstają endozomy, które następnie przemieszczają się w głąb komórki zyskując miano późnych endosomów, a



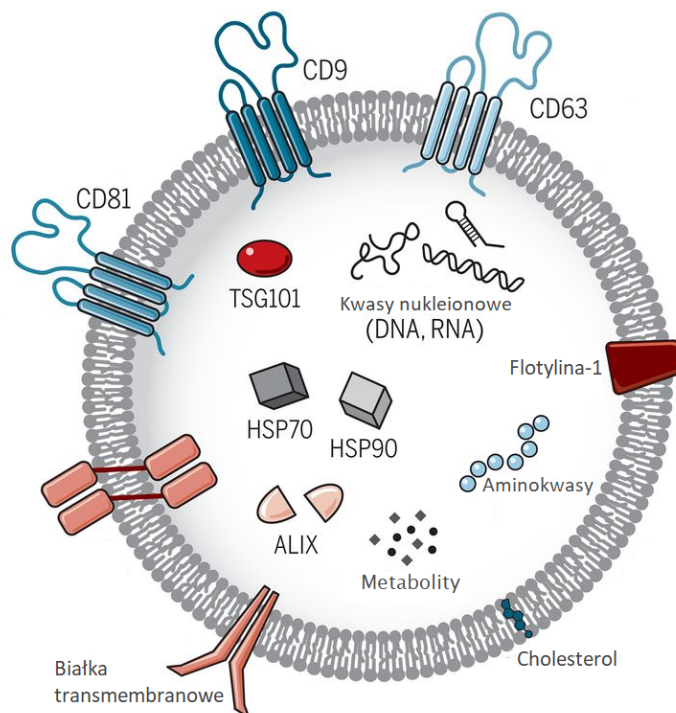
Rysunek 3. Schematycznie zobrazowane mechanizmy powstawania różnych typów EVs [9].

Tabela 1. Charakterystyka populacji EVs ze względu na ich średnicę, biogenezę, rolę fizjologiczną, ładunek i typowe markery [6].

	Egzosomy	Ektosomy	Ciałka apoptyczne
Średnica	30 - 100 (nm)	100 - 1000 (nm)	1000 - 5000 (nm)
Mechanizm uwalniania	pączkowanie do światła późnych endosomów, następnie błona ciałek wielopęcherzykowych ulega fuzji z błoną plazmatyczną	bezpośrednio przez pączkowanie błony plazmatycznej	w wyniku apoptozy komórki
Rola	komunikacja międzykomórkowa	komunikacja międzykomórkowa	ułatwienie fagocytozy
Ładunek	DNA, RNA, białka	DNA, RNA, białka	organelle komórkowe, frakcje jądrowe
Markery	tetraspaniny, CD9, CD63, CD81, Hsp70, Hsp90, Alix, Tsg 101, flotylina	integryny, selektyny, Arf-6	trombospondyna i C3b

ich błona ulega tzw. wewnętrznemu pęcherzykowaniu [7]. Następstwem tego oraz internalizacji w świetle endosomu powstają pęcherzyki ILVs (ang. intraluminal vesicles), które są prekursorami egzosomów [7]. Endosomy gromadzące w swoim wnętrzu pęcherzyki ILVs określa się mianem ciałek wielopęcherzykowych MVBs (ang. multivesicular bodies), a ich błona ulega fuzji z błoną komórki [7]. Zawartość natomiast zostaje uwolniona do przestrzeni zewnątrzkomórkowej -

zachodzi proces egzocytozy. Egzosomy są wzbogacone w białka zawarte w ciałkach wielopęcherzykowych (Alix, TSG101), a także te biorące udział w transporcie błonowym (aneksyny, flotyliny, GTPazy), adhezji komórkowej (integryny) oraz tetraspaniny (CD9, CD63, CD81, CD82) czy białka szoku cieplnego (HSP60, HSP70, HSP90) [6]. W ich składzie możemy wyróżnić także lipidy, co było przyczynkiem do badań w mojej pracy. Są to głównie ceramid, cholesterol, fosfatydyloseryna (PS) i sfingolipidy [6]. Również błona egzosomów zawiera różne typy lipidów, są to: PS (3,63%),



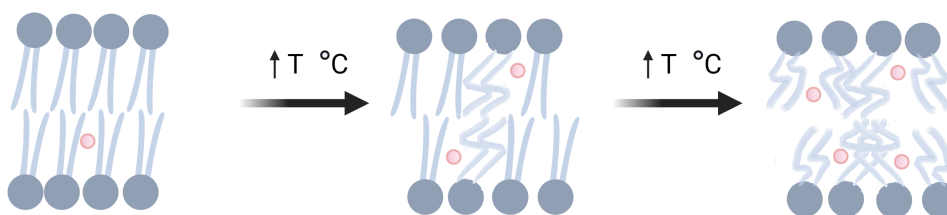
Rysunek 4. Schemat budowy egzosomu, na którym: CD81,CD9,CD63 - różne rodzaje glikoprotein,antygenów; flotylina-1 - białko błonowe; TSG101 - polipeptyd odgrywający ważną rolę w utrzymaniu stabilności genomu i w regulacji cyklu komórkowego; HSP70,HSP90 - białka z rodziny białek szoku cieplnego; ALIX - białko biorące udział w regulacji procesów komórkowych takich jak np. sygnalizacja proapoptotyczna [14][15].

fosfatydylocholina (PC, 59,2%), sfingomielin (20,6%), fosfatydyloetanolamina (PE, 9,4%) i lizofosfolipidy (<2%) [12]. Zarówno w tym przypadku, jak i dla ciałek apoptycznych, mechanizm powstawania jest mniej skomplikowany. Są one uwalniane do środowiska zewnętrznego w procesie pączkowania, a więc szlak ich biogenezy nie obejmuje tworzenia ILVs. Powstawanie i wypełnianie pęcherzyków zachodzi bezpośrednio podczas uwypuklenia błony komórkowej [7]. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pełnią znaczącą rolę w wielu procesach fizjologicznych, w tym komunikacji międzykomórkowej, adhezji, koagulacji, angiogenezie czy przebudowie naczyń krwionośnych [13]. EVs przenoszą swój ładunek do komórek docelowych poprzez interakcję ligand/receptor, fuzję lub internalizację, co chroni ładunek przed enzymatyczną degradacją [5]. Dzięki takim właściwościom, pęcherzyki mogą służyć jako wskaźniki diagnostyczne oraz stanowią obiecującą perspektywę dla usprawnienia sposobu dostarczania leków.

1.3 Wykorzystanie PALS do badań układów koloidalnych i błon biologicznych.

Amfifilowe cząsteczki, które silnie oddziałują zarówno z cząsteczkami rozpuszczalników polarnych (np. wody), jak i niepolarnych (np. węglowodorów), mogą podlegać procesom samoorganizacji tworząc złożone uporządkowane nanostruktury. Powstają w ten sposób struktury o symetrii jedno, dwu lub trójwymiarowej z nieprzecinającymi się, rozdzielonymi domenami hydrofobowymi i hydrofilowymi. Dzięki bogatemu mezomorfizmowi, te samoorganizujące się struktury (micele, lamele, dwuciągłe fazy sześciennie i heksagonalne) są przedmiotem ogólnego zainteresowania i mają duże znaczenie m.in. dla zastosowań farmaceutycznych. Tworzące się struktury (tj. mezomorfizm lub zachowanie fazowe) odzwierciedlają optymalne upakowanie amfifilowych cząsteczek, wynikające z kształtu molekularnego, efektu hydrofobowego i parametrów środowiskowych.

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat, systemy złożone z miceli, pęcherzyków, czy liposomów, w których skład wchodzi endogenne fosfolipidy, były szeroko wykorzystywane do modelowania organizacji błon biologicznych [22][23][24]. Jednym z częściej wybieranych do tych badań fosfolipidem jest DPPC (1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina), który jest głównym składnikiem błon biologicznych i jego diagram fazowy jest dobrze opisany. Zarówno zmiany składu lipidowego, jak i temperatura mogą modyfikować molekularne upakowanie w dwuwarstwie powodując zmiany w płynności układu i rozmieszczeniu wolnych objętości (rys.5) [2].



Rysunek 5. Schemat obrazujący zwiększoną ilość wolnych objętości w dwuwarstwie lipidowej przy podwyższonej temperaturze. Czerwone kółka reprezentują cząsteczki o-Ps (opracowanie własne na podstawie [2]).

Jednym z godnych uwagi artykułów w tej dziedzinie jest praca Sane et al. [22], w której pomiary PALS zestawione z obliczeniami atomistycznymi zostały wykorzystane do pomiaru zmian wolnych objętości w wielowarstwowych pęcherzykach (MLVs) DPPC lub palmitoilooleoilofosopahtydylocholino (POPC) z cholesterolem. Wyniki uzyskane na podstawie czteroskładnikowej

analizy widm PALS dla systemu DPPC-woda sugerują, że rozkłady czasu życia pozytonium dzielą się na dwie różne grupy poniżej i powyżej temperatur przejścia z fazy żelu do fazy płynnej. Dodanie cholesterolu do MLV POPC spowodowało skrócenie czasu życia oPs, co tłumaczono zmniejszeniem frakcji wolnych objętości.

Rozważając wcześniej wspomniane zastosowania EVs m.in. jako systemy dostarczania leków, ważne jest, aby zrozumieć jak rozmiary i rozmieszczenie wolnych objętości zależą od warunków termodynamicznych oraz składu cząsteczkowego próbki. Przepuszczalność oraz dyfuzja małych cząsteczek, takich jak leki, wiąże się z lokalnymi zmianami krzywizny oraz upakowaniem molekularnym cząsteczek dwuwarstwy błony. Spektroskopia czasu życia pozytonium jest w stanie dostarczyć informacji o wynikających z tych zmian wielkościach i rozmieszczeniu pustych przestrzeni *in situ* na poziomie molekularnym [22][23].

Ważnym aspektem badań jest przeprowadzenie eksperymentu z możliwie jak najmniejszą ingerencją w stan badanego materiału. Stosowane dotychczas techniki są w dużej mierze oparte na sondach, takich jak markery fluorescencyjne, które nieuchronnie wpływają na stan badanej próbki. Alternatywnie, stosowane są także techniki wykorzystujące rozpraszanie promieni rentgenowskich i neutronów. Dostarczają one informacji o gęstości elektronowej, które mogą dać pewien wgląd w rozkład wolnych objętości w próbce, jednak nie charakteryzują ich lokalnego rozmieszczenia co ma decydujące znaczenie w zrozumieniu komórkowych procesów biofizycznych takich jak np. zjawisko dyfuzji [22].

Rozwój modeli matematycznych wykorzystywanych do analizy widm PALS oraz znaczne postępy w badaniach pozwoliły na zwiększenie wiarygodności informacji uzyskiwanych metodą Spektroskopii Czasu Życia Pozytonium. Użyteczność tej techniki w badaniach systemów biologicznych została potwierdzona w wielu publikacjach, jednak nadal pozostaje szeroki, niezbadany zakres potencjalnych zastosowań PALS, m.in. związany z tematyką mikropełcherzyków zewnątrzkomórkowych i ich obiecujących zastosowań.

2. Cel pracy

Celem pracy było opracowanie metody oznaczania czasu życia pozytonium w EVs wyizolowanych z pożywki hodowlanej znad komórek beta-trzustki linii 1.1B4.

EVs są nośnikami wielu aktywnych cząsteczek takich jak np. białka czy lipidy i stanowią główny element komunikacji międzykomórkowej. Ze względu na ich potencjał funkcjonalny oraz możliwość praktycznego wykorzystania w diagnostyce wielu chorób, istotne jest dokładne poznanie tych struktur biologicznych. Technika PALS, której wykorzystanie w tym obszarze badań nie zostało dotąd opisane, stanowi obiecujące narzędzie do bezpośredniego pomiaru tych struktur w skali mikro i nanometrów, pod względem istnienia, koncentracji oraz wielkości wolnych objętości.

3. Materiały i metody

3.1 Hodowla komórkowa

Anatomicznie trzustka zbudowana jest z wysp Langerhansa, które są skupiskami 5 różnych typów komórek endokrynnych wydzielających hormony do krwi. Jednym z nich są komórki beta produkujące insulinę - hormon regulujący poziom glukozy we krwi. Nieprawidłowości związane z ich funkcjonowaniem mogą prowadzić do różnego rodzaju chorób, z których najbardziej powszechną jest cukrzyca.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, będące obiektem badań opisywanych w tej pracy, pozyskano z hodowli komórkowej linii 1.1B4. Linia ta powstała poprzez połączenie metodą elektrofuzji pierwotnej hodowli ludzkich wysepek trzustki z linią komórkową PANC-1 (ludzkiego raka przewodowego trzustki) [10]. Metodą immunocytochemii wykazano, że komórki 1.1B4 wydzielają m.in. insulinę, glukokinazę i IAPP (ang. Islet amyloid polypeptide). Charakteryzuje je również ekspresja transportera glukozy GLUT1 [10].

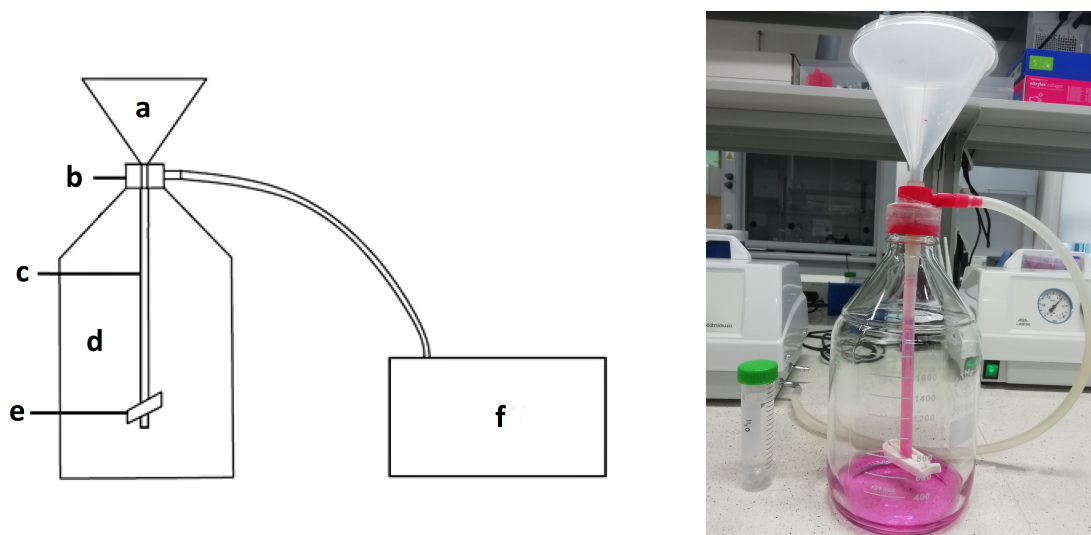
Do hodowli komórkowej stosowano pożywkę RPMI 1640 (nr kat. 21875091 Gibco™) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (nr kat. 10500064 Gibco™), 2 mM L-glutaminy (nr kat. 25030081 Gibco™), 100 U/ml penicyliny i 0,1 g/l streptomycyny (nr kat. 15140122 Gibco™). Komórki wysiewano na szalkę T75cm² i hodowano w 37°C i atmosferze 5% CO₂. Szalki z rosnącymi na podłożu komórkami obserwowano codziennie pod mikroskopem i pasażowano po osiągnięciu około 80% konfluencji. W tym celu, po usunięciu medium, komórki dwukrotnie przemywano PBS bez jonów Ca²⁺, Mg²⁺ (nr kat. 10010015 Gibco™) i inkubowano z 0,25% trypsyną - EDTA (nr kat. 25200072 Gibco™) przez 10 minut. Po uwolnieniu komórek od podłoża, trypsynę inaktywowano poprzez dodanie pożywki z surowicą i zawiesinę komórek przenoszono do probówki, a następnie wirowano z przyspieszeniem odśrodkowym 260 × g przez 10 minut (g - przyspieszenie ziemskie równe 9,80665 $\frac{m}{s^2}$). W kolejnym kroku pelet był zawieszony w świeżej pożywce, komórki liczone z wykorzystaniem barwnika Trypan Blue i licznika automatycznego LUNA II (20 μl barwnika i 20 μl zawiesiny komórek zostało rozpipetowane i przeniesione na płytkę licznika). Następnie komórki wysiano do nowych szalek.

3.2 Izolacja mikropęcherzyków

Aby uzyskać właściwą próbkę do dalszej analizy, EVs należało wyizolować. W tym celu, medium zebrane z nad komórek 1.1B4 umieszczono w probówkach typu falkon o pojemności 50 ml i wirowano przez 10 minut z przyspieszeniem odśrodkowym równym 400 × g w temperaturze 4°C. Następnie zlano nadsącz i wirowano go przez kolejne 25 minut z przyspieszeniem 3100 ×

g, również w temperaturze 4°C. Czynności te składają się na pierwszy etap izolacji, którego celem jest usunięcie z próbki niepożądanego materiału takiego jak luźno zawieszony w medium komórki lub ich fragmenty oraz inne większe zanieczyszczenia.

Kolejnym etapem izolacji była niskopróżniowa filtracja na membranach (ang. low-vacuum filtration, LVF). Schemat oraz zdjęcie układu filtracyjnego przedstawiono na rysunku 6.



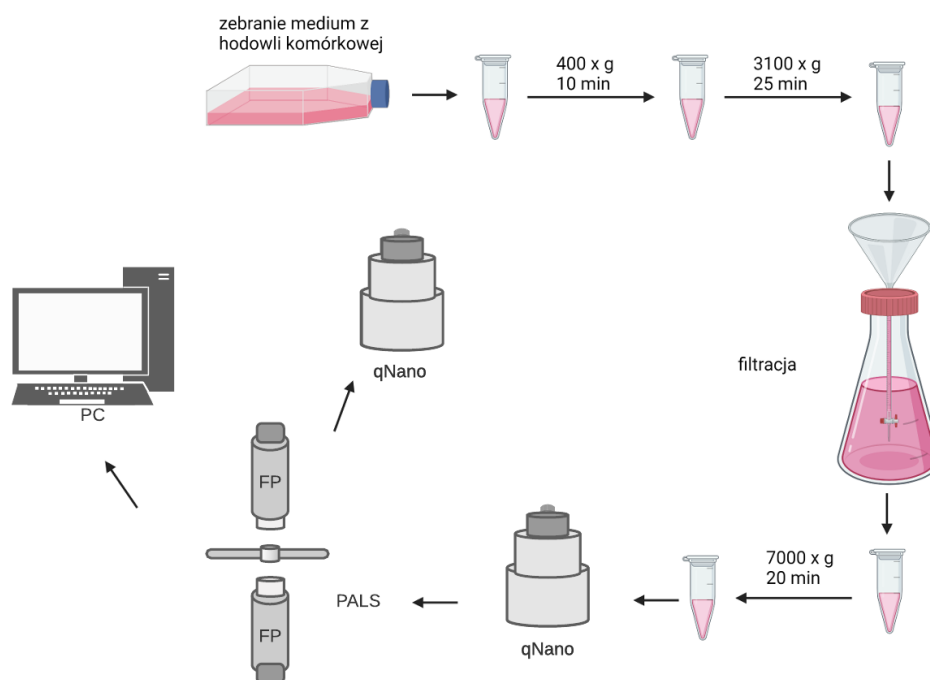
Rysunek 6. Schemat układu do filtracji niskopróżniowej (po lewej) [6] oraz zdjęcie rzeczywistego układu, który był wykorzystywany przy izolacji EVs (po prawej).

Elementy składowe systemu (zgodnie z oznaczeniami na rys.5) to kolejno:

- (a) **zamknięty zbiornik na ciecz**, który pozwala zachować sterylne warunki izolacji; jego objętość można dopasowywać w zależności od ilości próbki
- (b) **łącznik**, będący elementem pośrednim między zbiornikiem cieczy i resztą układu, w tym przede wszystkim membranę dializacyjną
- (c) **membrana dializacyjna**, na której osadzają się izolowane cząsteczki spływające z umieszczonego powyżej zbiornika cieczy; w zależności od dobrania rozmiaru porów membrany, izolowane są wybrane wielkości cząstek
- (d) **komora podciśnieniowa**, stanowiąca również zbiornik magazynujący ciecz przefiltrowaną przez membranę
- (e) **zacisk**, zamykający membranę dializacyjną u dołu

(f) **pompa**, czyli urządzenie zapewniające podciśnienie w układzie, co przyspiesza proces izolacji i pozwala ograniczyć wpływ czasu na zmiany w próbce.

Po wstępnym odwirowaniu medium, próbki umieszczono w pojemniku na ciecz i przesączono przez membranę dializacyjną przy podciśnieniu wynoszącym -0,4 bara. LVF przeprowadzono na membranie dializacyjnej (nr kat. 131486, Spectra / Por Biotech) z MWCO (odcięcie masy cząsteczkowej) 1000 kDa. Średnice porów tej membrany zawierają się w przedziale od 20,59 nm do 51,05 nm [6]. Gdy na końcu membrany pozostała niewielka (ok. 2 ml) ilość cieczy, przemywano ją 10-15 ml wody dejonizowanej, w celu zebrania czystej próbki z EVs (pozbawionej FBS, medium, czy innych zanieczyszczeń, które mogłyby zaburzać późniejszą analizę). Otrzymaną w ten sposób zawartość membrany przeniesiono do probówek wirówkowych typu Ependorff. Próbkę wirowano z przyspieszeniem $7000 \times g$ przez 20 minut (w temperaturze 4°C), w celu pozbycia się ewentualnych odpadów komórkowych, ciałek apoptotycznych itp. Zlany po odwirowaniu nadoszcz, stanowiący właściwą próbkę, przechowywano w temperaturze -80°C do czasu rozpoczęcia dalszej analizy.



Rysunek 7. Schemat opisujący poszczególne kroki preparacji i analizy próbki pochodzącej z hodowli komórek beta trzustki (opracowanie własne na podstawie [6]).

3.3 Układ PALS

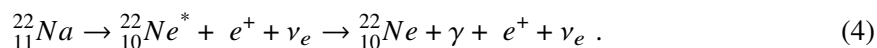
3.3.1 Źródło pozytonów.

Jako źródło pozytonów wykorzystano izotop sodu-22 w postaci roztworu $^{22}\text{NaCl}$, uszczelnionego pomiędzy dwoma arkuszami folii Kapton o grubości $6\ \mu\text{m}$. Aktywność źródła wynosiła $\sim 1,5\ \text{MBq}$. Aby możliwe było badanie próbek ciekłych (pęcherzyki zawieszane w buforze) bez ryzyka przeciekania izotopu przez Kapton, źródło zostało dodatkowo owinięte Parafilmem firmy Bionovo (rys.8). Jest to folia uszczelniająca, która składa się głównie z poliolefin i wosków parafinowych i jest odporna (nawet do 48 godzin) na wiele substancji polarnych, tj. roztwory soli, kwasy nieorganiczne czy roztwory zasadowe.

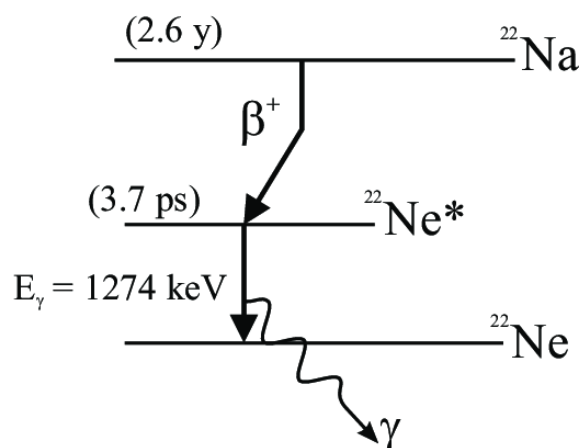


Rysunek 8. Parafilm wykorzystywany do uszczelnienia źródła; folia ta charakteryzuje się dużą plastycznością, dlatego możliwe jest rozciągnięcie jej nawet do bardzo cienkiej warstwy.

^{22}Na jest izotopem o okresie półtrwania wynoszącym 2,6 roku, który rozpada się poprzez rozpad β^+ do neonu-22 w stanie wzbudzonym, z jednoczesną emisją pozytonu oraz neutrino elektronowego. Izotop ten jest powszechnie stosowany w badaniach PALS, ponieważ oprócz pozytonu, emituje również kwant gamma o energii 1274 keV, czyli kwant deekscytacyjny (rys.9), zgodnie z łańcuchem reakcji:



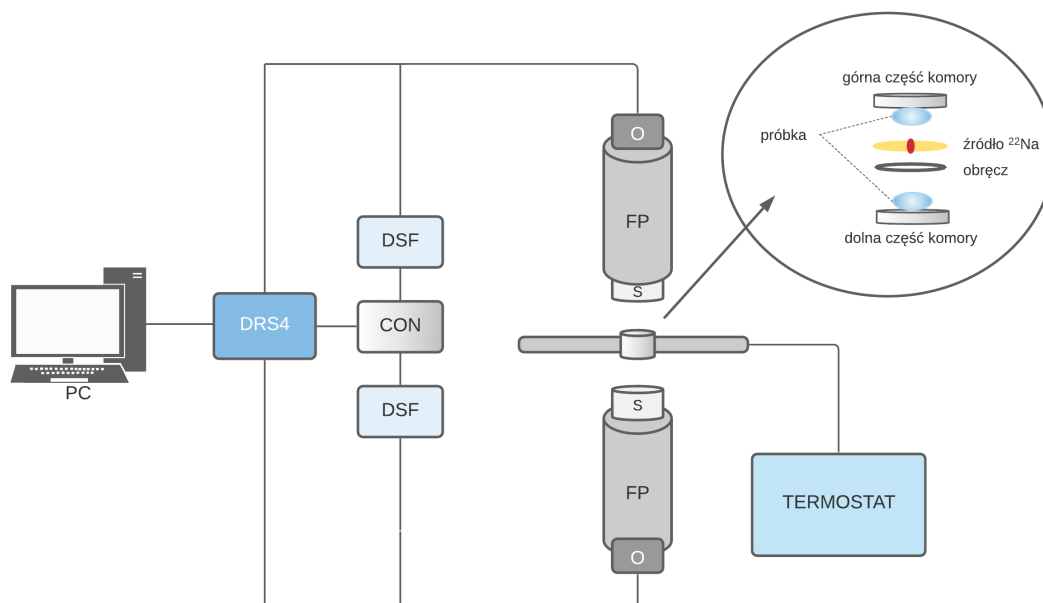
Kwenty gamma, pochodzące z deekscytacji $^{22}_{10}\text{Ne}^*$, wysyłane są średnio 3,7 ps po emisji pozytonu [16]. Ponieważ emisja kwantu gamma 1274 keV następuje niemalże jednocześnie z produkcją pozytonu, czas ten przyjmuje się jako moment rozpoczęcia tworzenia się pozytonium.



Rysunek 9. Uproszczony schemat rozpadu ^{22}Na [17].

3.3.2 Spektrometr czasu życia pozytonium.

Badania materiału biologicznego wymagają specyficznych warunków, dlatego też układ pomiarowy musiał zostać odpowiednio zmodyfikowany i różni się od standardowego spektrometru PAL, wykorzystywanego do badań materiałowych. Do opracowania metody oznaczania czasu życia pozytonium w mikropęcherzykach wykorzystano układ, którego schemat przedstawiono na rysunku 10. Jego składowe elementy to przede wszystkim dwa fotopowielacze (FP) H3378-51

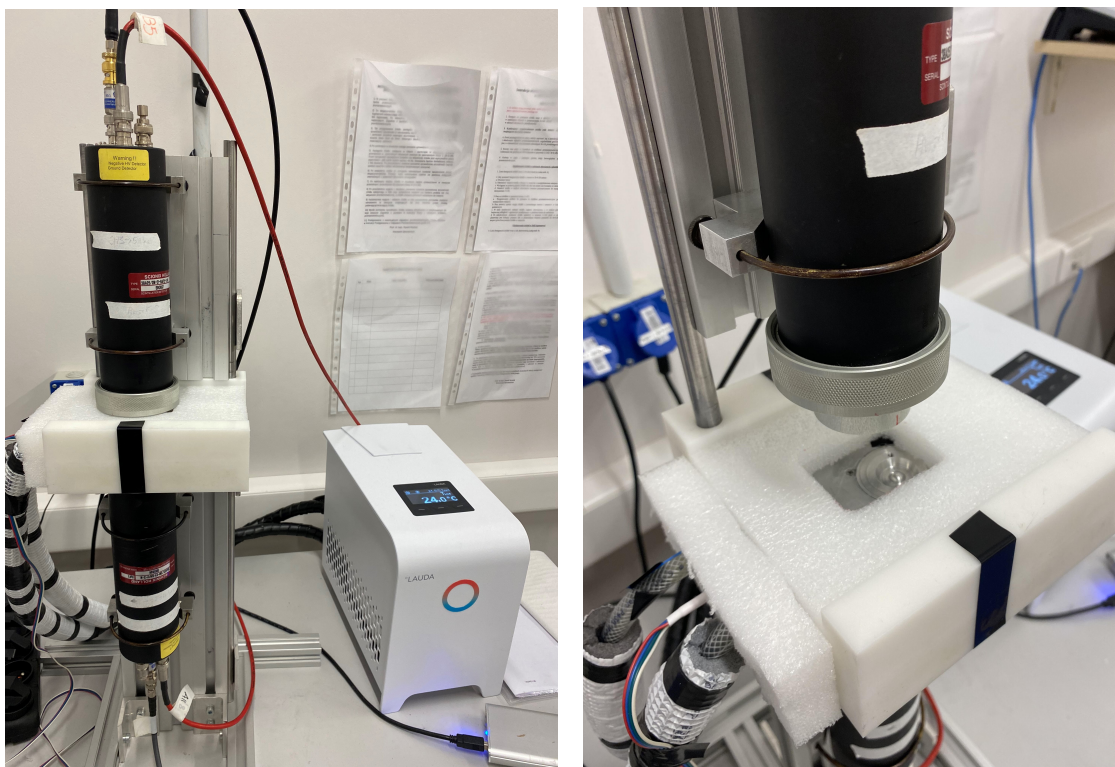


Rysunek 10. Schemat układu PALS oraz konstrukcji komory pomiarowej.

Hammamatsu i scyntylatory cylindryczne BaF_2 (S) o średnicy 38 mm i wysokości 25 mm firmy Scionix, zasilane z zasilacza wysokiego napięcia CAEN SY4527.

Sygnaly z fotopowielaczy są tłumione (co na schemacie oznaczone zostało literą O) i dostarczane do dyskryminatora stałej frakcji LeCroy 608C (DSF), w którym dla sygnałów z różnych detekto-

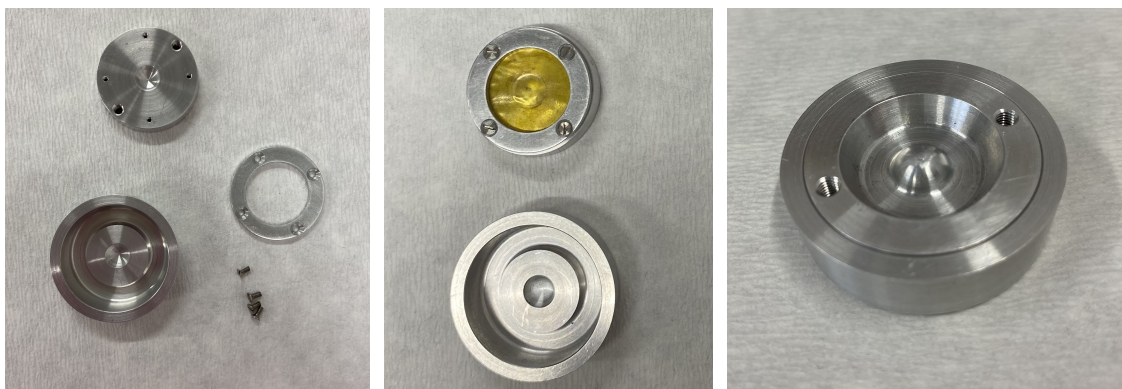
rów ustawione są odpowiednie progi. Na pierwszym detektorze stosowany jest wysoki próg, aby zarejestrować tylko kwant gamma o energii 1274 keV (sygnał START). W przypadku drugiego, niski próg pozwala zarejestrować kwant anihilacyjny (sygnał STOP). Na module koincydencji LeCroy 622 (CON) ustawione zostało okno czasowe koincydencji wynoszące 110 ns. Dane zbierane są za pośrednictwem płyty ewaluacyjnej DRS4 (ang. digitised evaluation board). Detektory ustawione są równoległe (pod kątem 180 stopni), co pozwala na uzyskanie wysokiej statystyki rejestrowanych kwantów gamma zarówno o energii 511 keV, jak i 1274 keV. Ponadto, podczas



Rysunek 11. Zdjęcie układu podczas pomiaru (na lewo); odsunięty górny detektor odsłaniający komorę umieszczoną w podstawce (na prawo). Temperatura podstawki kontrolowana jest przy pomocy termostatu oraz systemu przewodów doprowadzających chłodziwo.

pomiaru źródło jest przesunięte względem osi środka pomiędzy detektorami o odległość większą niż promień scyntylatora, co geometrycznie uniemożliwia rejestrację kwantów anihilacyjnych przez oba detektory i pozwala rejestrować jedynie pary kwantów gamma (deekscytacji i anihilacji).

Komora pomiarowa została specjalnie skonstruowana tak, aby możliwe było przeprowadzenie pomiaru nawet z niewielką ilością próbki, co ma duże znaczenie przy badaniach mikropęcherzyków, których izolacja w większej skali jest kosztowna i czasochłonna. Zdjęcia komory przedstawiono na rysunku 12. Ma ona kształt sferyczny o promieniu 7mm, a całkowita pojemność komory wynosi 200 μm (100 μm próbki umieszczone jest w części dolnej, kolejne 100 μm wprowadzone zostaje do części górnej).



Rysunek 12. Komora pomiarowa; rozmontowana z widocznymi poszczególnymi elementami: część górna i dolna komory, obręcz oraz śruby mocujące (po lewej); źródło przymocowane do górnej części komory (środek); całkowicie zmontowana komora po nałożeniu części górnej na dolną (po prawej).

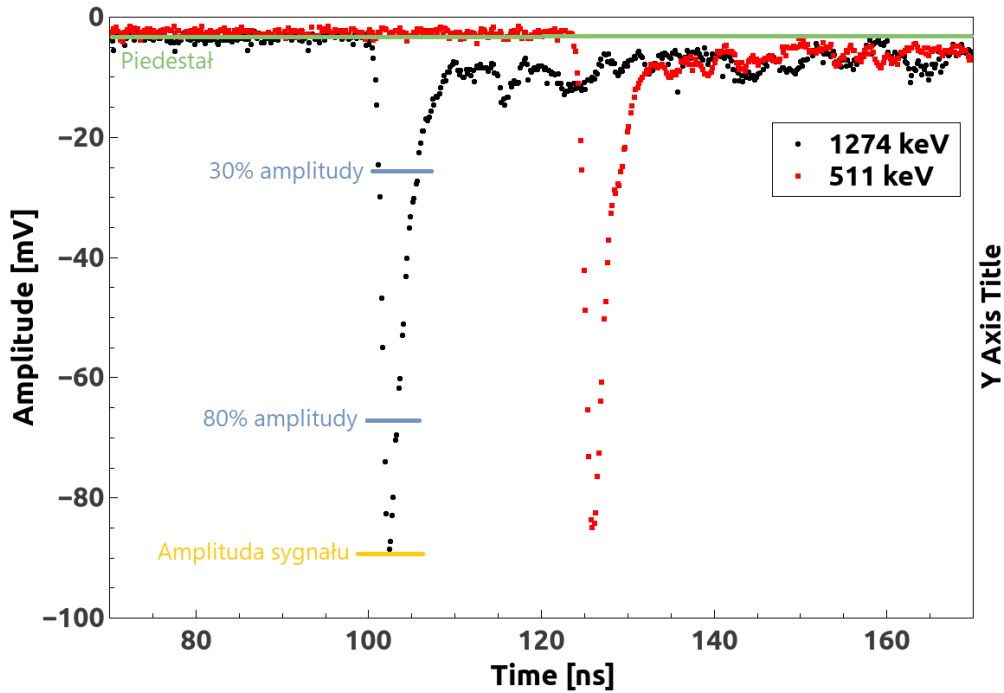
3.3.3 Analiza sygnałów.

Fotopowielacze konwertują fotony ze scyntylatorów w sygnał elektryczny będący zależnością napięcia od czasu na danym kanale oscyloskopu. Z wykorzystaniem autorskiego programu "Read Binary" (K. Dulski, J-PET collaboration), na podstawie pojedynczego sygnału obliczany jest zdeponowany ładunek oraz amplituda sygnału. Wielkości te są niezbędne do rozróżnienia kwantów gamma anihilacji i deekscytacji, a także do wyznaczania różnicy czasu między sygnałami pochodzącymi z dwóch fotopowielaczy, a zatem czasu życia pozytonium. Sygnały są próbkowane w dyskretnych punktach, tak jak to przedstawiono na rysunku 13. Piedestał sygnału obliczany jest jako wartość średnia z 10 punktów, pomijając pierwsze 20 punktów od lewej strony widma. Amplituda jest obliczana jako minimalna wartość sygnału. W celu oszacowania czasu przy danym napięciu do krawędzi sygnału dopasowywana jest funkcja liniowa w zakresie od 30% do 80% amplitudy. Czas (t) wyznacza się jako przecięcie dopasowanej linii z poziomem napięcia odpowiadającym 10% amplitudy. Pole powierzchni pod sygnałem determinuje wartość zdeponowanego ładunku zgodnie z zależnością:

$$Q = \int \frac{U(t)dt}{R}, \quad (5)$$

gdzie $U(t)$ to napięcie sygnału, a R jest rezystancją danego kanału na płycie DRS4, która jest stała dla wszystkich pomiarów i wynosi 50Ω . W celu zwiększenia statystyki we właściwym obszarze, stosowane są różne progi wyzwalania. Dla detektora przypisanego do rejestracji kwantu gamma deekscytacji, próg wynosi -67 mV , a dla detektora przeznaczonego do rejestracji kwantu gamma anihilacji, próg jest ustawiony na -22 mV . Wartości progowe oszacowano eksperymentalnie na podstawie pomiarów widm sodu w pełnym zakresie energii [25].

Czas życia pozytonium jest wyznaczany przy pomocy programu "PALSAvalanche"(K. Dulski,



Rysunek 13. Przykładowa para sygnałów z obu detektorów. Kolorem zielonym oznaczono piedestał sygnału, żółta linia wskazuje amplitudę sygnału, a niebieskie linie wyznaczają wysokość sygnału dla 30% i 80% amplitudy.

J-PET collaboration). Eksperymentalny rozkład widma czasu życia pozytonium w przypadku pojedynczej składowej (τ), można aproksymować funkcją:

$$F(t; \tau, t_0, \sigma) = \frac{1}{2\tau} \exp\left(\frac{\sigma^2}{2\tau^2} - \frac{t-t_0}{\tau}\right) \left(\operatorname{erf}\left(\frac{t-t_0 - \frac{\sigma^2}{\tau}}{\sqrt{2}\sigma}\right) - \operatorname{erf}\left(\frac{-t_0 - \frac{\sigma^2}{\tau}}{\sqrt{2}\sigma}\right) \right), \quad (6)$$

gdzie t_0 – przesunięcie (offset) czasu detektora, σ - rozdzielczość aparatu, t - różnica czasu między detektorami, τ - średni czas życia pozytonium, a erf jest funkcją błędu zdefiniowaną:

$$\operatorname{erf}(t) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp(-s^2) ds. \quad (7)$$

Do widma dopasowywano cztery podstawowe składowe ($n_\tau = 4$) odpowiadające czasowi życia i intensywności:

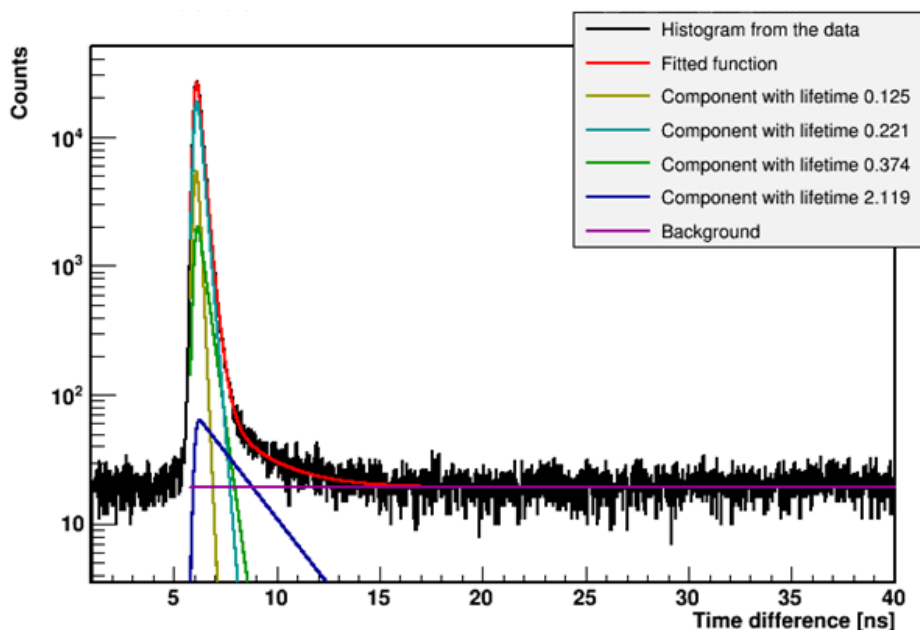
τ_1, I_1 - anihilacja para-Pozytonium

τ_2, I_2 - anihilacja wolnych pozytonów w próbce

τ_s, I_s - anihilacja pozytonów w materiale źródła (folia Kapton)

τ_3, I_3 - anihilacja orto-Pozytonium.

W celu określenia rozkładu średniego czasu życia pozytonium należy założyć dyskretny rozkład wolnych przestrzeni (a więc dyskretny udział poszczególnych składników o średnim czasie życia)



Rysunek 14. Przykładowe widmo czasu życia pozytonium w poszerzonej skali. Nałożone linie oznaczają rozkłady poszczególnych składowych wynikające z dopasowania równania (8). Kolorem czerwonym oznaczono dopasowaną funkcję, zielonym rozkład p-Ps, żółtym – anihilacje w materiale źródłowym, turkusowym – anihilacje wolnych pozytonów w próbce, niebieskim – anihilacje o-Ps, a kolorem fioletowym zaznaczono poziom tła.

i dopasować następująca funkcje:

$$f(t) = y_0 + \sum_{i=1}^{n_\tau} I_i \cdot F(t; \tau_i; t_0; \sigma), \quad (8)$$

gdzie y_0 - poziom tła, n_τ - liczba składników, I_i - intensywność i-tej składowej, τ_i - średni czas życia i-tej składowej, a $F(t; \tau_i, t_0, \sigma)$ jest funkcją wyrażoną równaniem (6).

Czas życia oraz intensywność składnika związanego z anihilacjami w materiale źródła (τ_s, I_s) oraz czas życia p-Ps zostały stale ustalone w analizie i odpowiadają im wartości odpowiednio 0,374 ns, 10% i 0,125 ns [3]. Wszystkie pozostałe komponenty zostały potraktowane jako wolne parametry w dopasowaniu równania (8) do danych eksperymentalnych. Na rys. 14 przedstawiono przykładowe widmo czasu życia pozytonium z dopasowaniem odpowiednich funkcji.

3.3.4 Kontrola temperatury w układzie.

Układ wyposażony został również w termostat Lauda LOOP L100, pozwalający na sterowanie temperaturą próbki w zakresie 4-80°C z dokładnością do 0,1°C. Za pośrednictwem tego urządzenia oraz systemu przewodów, do izolowanego termicznie uchwytu, w którym umieszczona jest komora z próbką, doprowadzane jest chłodziwo (rys.11). Przeprowadzono precyzyjną

kalibrację temperaturową z wykorzystaniem multimetru cyfrowego Rigol DN3064 i czujnika rezystancyjnego PT100, który umieszczany był w uchwycie oraz wewnątrz komory testowej wypełnionej wodą destylowaną (skonstruowanej na wzór właściwej komory pomiarowej, lecz umożliwiającej wprowadzenie do jej wnętrza czujnika). Czujnik PT100 wykonany jest z pla-



Rysunek 15. Układ do testów stabilności temperaturowej oraz pomiarów kalibracyjnych; całość układu, w tym spektrometr PAL oraz wykorzystywany miernik Rigol DN3064 (po lewej); termostat Lauda LOOP L100 (środek); zblizenie na uchwyt, w którym umieszczono komorę testową z czujnikiem podłączonym do miernika (po prawej).

tyny, której oporność wynosi 100 omów (w temperaturze 0°C). Płatyna charakteryzuje się dodatnim współczynnikiem temperaturowym oporności: oporność wzrasta wraz temperaturą. Zmiana oporności jest funkcją temperatury ($0,39 \Omega/1^\circ\text{C}$) [18]. Zdjęcia układu do testów stabilności temperaturowej oraz pomiarów kalibracyjnych przedstawiano na rysunku 15.

Przed przystąpieniem do właściwych pomiarów kalibracyjnych, dokładnie sprawdzona została stabilność temperaturowa układu. Gdy wyeliminowano wpływ otoczenia na temperaturę w komorze, wykonano serię pomiarów umożliwiających stworzenie krzywej kalibracyjnej, która pozwala precyzyjnie określić temperaturę próbki przy danych ustawieniach termostatu. Wyniki stabilności temperaturowej układu oraz kalibracji przedstawiono w kolejnym rozdziale.

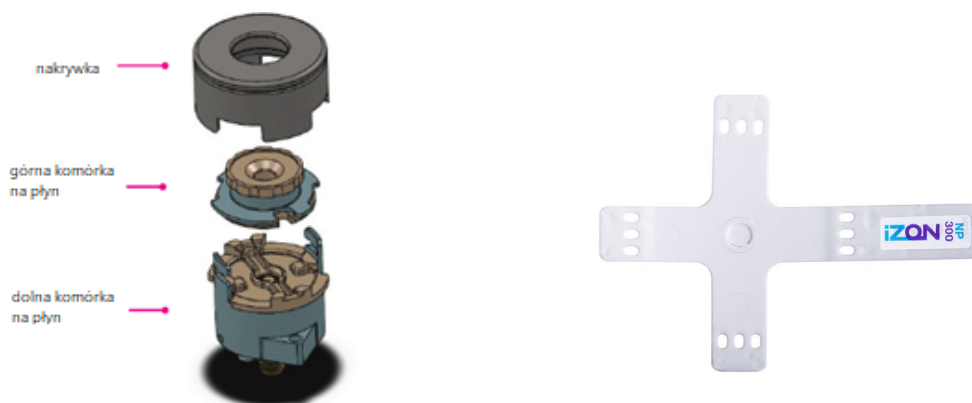
3.4 Analizator cząstek qNano.

Do wyznaczenia koncentracji próbki z wyizolowanymi EVs wykorzystano urządzenie działające na zasadzie TRPS (ang. Tunable Resistive Pulse Sensing). Technologia TRPS opiera się na pomiarze zmiany rezystancji podczas przechodzenia badanego obiektu przez por o rozmiarze w skali nano lub mikro, który umieszczony jest w membranie wykonanej z poliuretanu (rys.17) [20].

Badane cząstki przechodzą przez por dzięki zastosowaniu kombinacji napięcia i ciśnienia. Każdy przechodzący obiekt powoduje wystąpienie tzw. blokady, która jest rozpoznawana przez oprogramowanie. Na podstawie odpowiednich parametrów tej blokady wyznaczane są własności



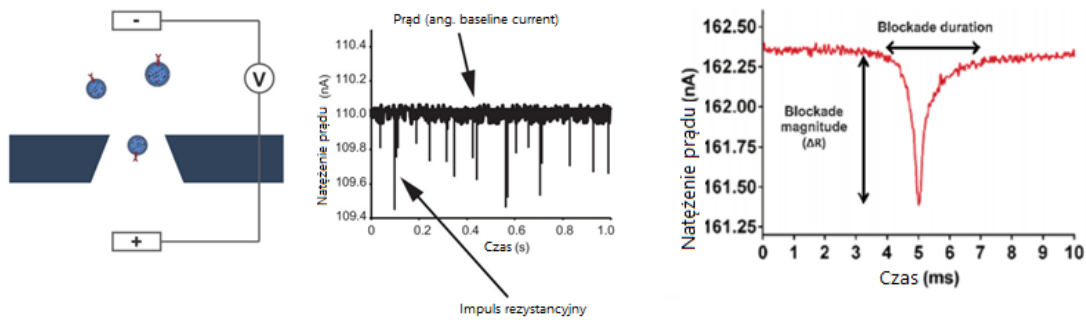
Rysunek 16. Wykorzystywany analizator cząstek qNano firmy IZON.



Rysunek 17. Budowa komory analizatora (po lewej); przykładowy nanopor umieszczony na poliuretanowej membranie (po prawej) [21].

cząstek takie jak wielkość, ładunek na powierzchni czy koncentracja badanych cząstek.

Nieprzewodzący elastyczny nanopor oddziela górną komórkę od dolnej. Podając napięcie przez pory przebite w nanoporze, wytwarzany jest prąd elektryczny. Gdy pęcherzyki zewnątrzkomórkowe przemieszczają się przez nanopor, zmienia się przepływ jonów co wykrywane jest jako impuls rezystancyjny (rys. 18). Rozmiar otworu w nanoporze można regulować poprzez rozciąganie, zwiększając lub zmniejszając odległość między przeciwległymi ramionami instrumentu. Wiel-



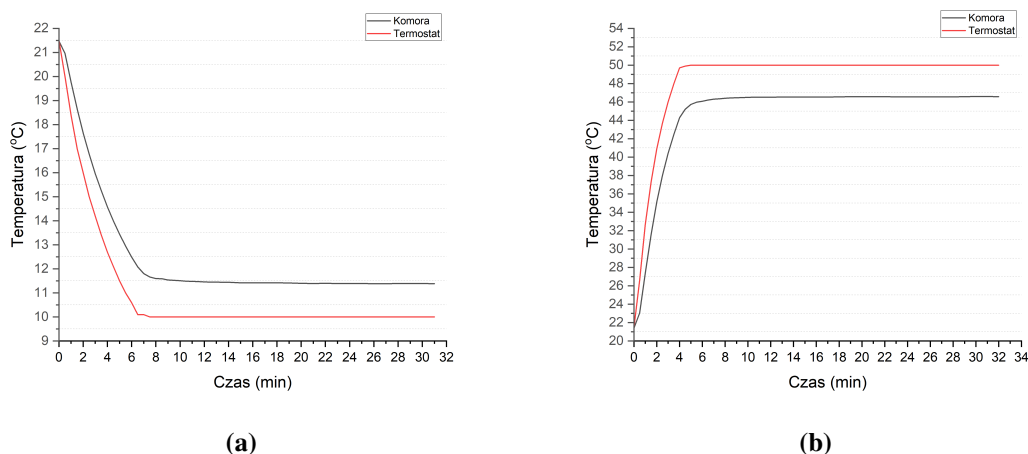
Rysunek 18. Cząstki przechodzą przez nanopor pod wpływem przyłożonego napięcia; techniką qNano mierzone są trzy parametry: wysokość sygnału (ang. blockade magnitude) – proporcjonalna do objętości mierzonej cząstki, szerokość sygnału (ang. blockade duration) – wykorzystywana do obliczenia ładunku na powierzchni każdej cząstki, częstotliwość sygnałów (ang. blockade frequency) – wykorzystywana do określenia koncentracji (pokazane na podstawie przykładowych wyników qNano) [19][20].

kość pojedynczego impulsu rezystancyjnego jest proporcjonalna do objętości cząstki (większe impulsy oznaczają większe cząstki), natomiast częstotliwość pojawiania się impulsów niesie informacje o koncentracji próbki.

4. Wyniki

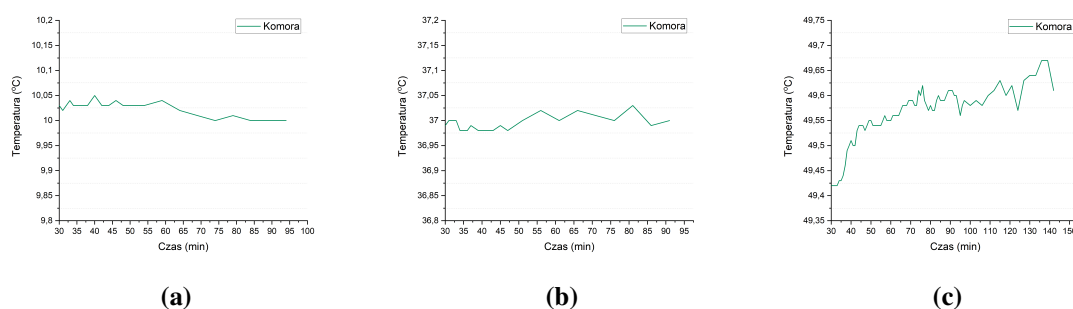
4.1 Kalibracja temperaturowa.

Pierwszym krokiem przed wyznaczeniem krzywej kalibracyjnej było zbadanie procesów narastania oraz obniżania temperatury w układzie. Wyniki pomiarów obniżania temperatury za pośrednictwem termostatu do $T_{termo} = 8^{\circ}\text{C}$ oraz podwyższania temperatury do $T_{termo} = 50^{\circ}\text{C}$ startując od $T = 21,5^{\circ}\text{C}$ (\approx temp. pokojowa), przedstawiono na rysunku 19.



Rysunek 19. Wykresy zależności temperatury na termostacie oraz wewnątrz komory pomiarowej od czasu przy: (a) obniżaniu temperatury od $T_{termo} = 21,5^{\circ}\text{C}$ do $T_{termo} = 8^{\circ}\text{C}$ oraz (b) podwyższaniu temperatury od $T_{termo} = 21,5^{\circ}\text{C}$ do $T_{termo} = 50^{\circ}\text{C}$.

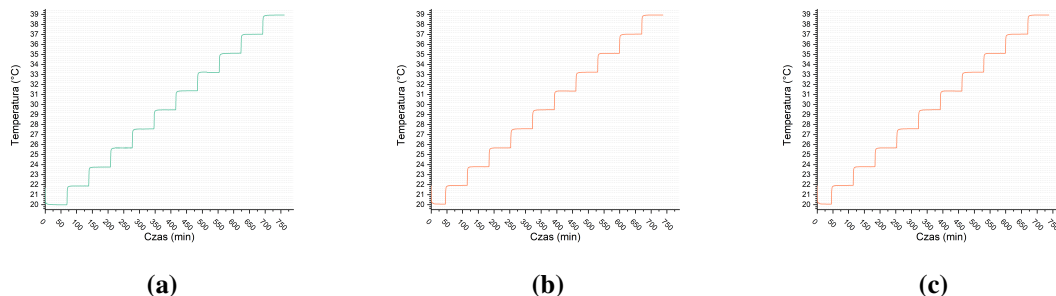
Ponadto dla temperatur komory w okolicach 10°C , 37°C oraz 50°C przeprowadzono dłuższe pomiary (po uprzedniej stabilizacji), celem sprawdzenia stabilności temperaturowej układu. Wyniki przedstawione zostały na rysunku 20.



Rysunek 20. Wykresy prezentujące stabilność temperatury wewnątrz komory pomiarowej w obszarze temperatur bliskich 10°C , 37°C oraz 50°C , którym odpowiadają ustawienia termostatu odpowiednio: (a) $8,3^{\circ}\text{C}$, (b) $39,1^{\circ}\text{C}$, (c) $53,0^{\circ}\text{C}$.

Kolejne wykresy przedstawiają właściwe pomiary (rys.21), na podstawie których wyznaczono ostateczną krzywą kalibracyjną (rys.22). W tabeli 2 zestawiono wartości liczbowe średnich temperatur osiągniętych w komorze po ustabilizowaniu oraz maksymalne różnice temperatur dla

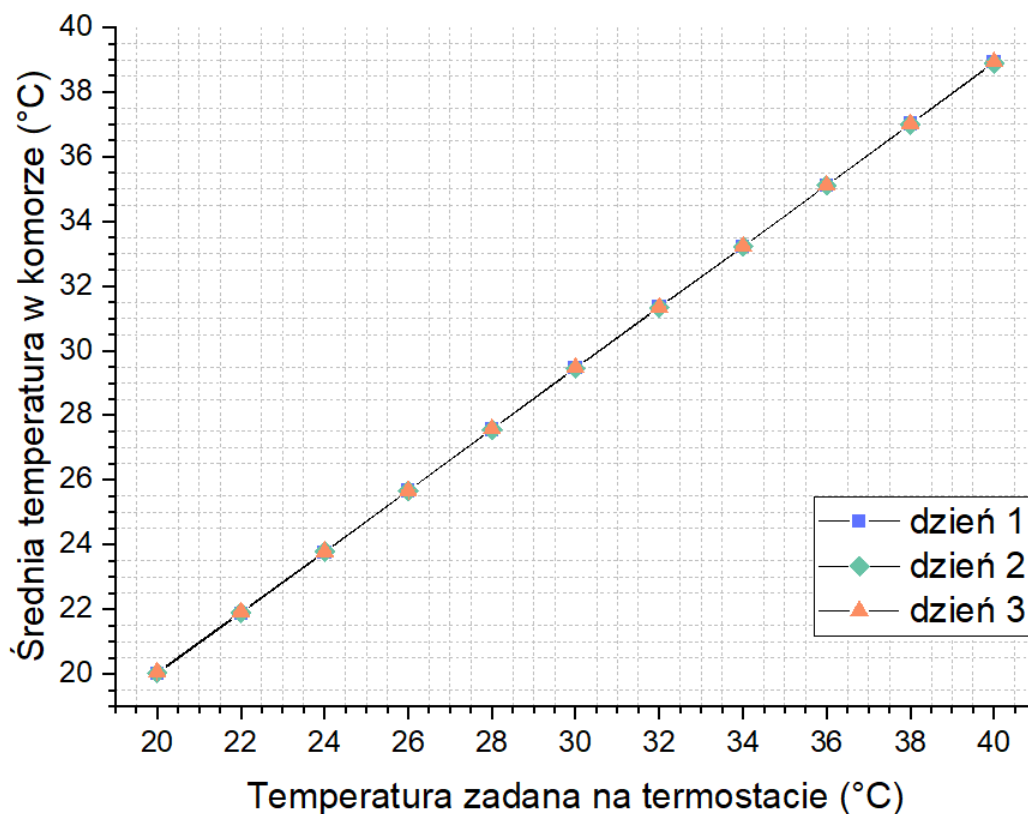
danych ustawień termostatu pomiędzy pomiarami przeprowadzonymi w trzech różnych dniach. Za każdym razem, temperaturę w komorze wypełnionej wodą destylowaną mierzono w sposób ciągły przez ponad 12 godzin w odstępach 30 sekundowych. Co 70 minut temperaturę na termostacie zmieniano o 2 stopnie, zaczynając od 20°C i kończąc na 40°C.



Rysunek 21. Wykresy przedstawiające wyniki pomiarów temperatury wewnątrz komory pomiarowej wypełnionej wodą destylowaną przeprowadzone w trzech różnych dniach. Co 70 minut temperaturę na termostacie podwyższano o 2 stopnie, zaczynając od 20°C i kończąc na 40°C.

Tabela 2. Średnie wartości temperatury osiągniętej wewnątrz komory pomiarowej dla zadanych na termostacie wartości z przedziału 20-40°C; wyniki na podstawie pomiarów przeprowadzonych w trzech różnych dniach. W każdym kroku średnia obliczana była na podstawie n=120 pomiarów.

Temperatura zadana na termostacie [°C]	Średnia temperatura w komorze [°C]						Maks. różnica pomiędzy dniami
	DZIEŃ 1		DZIEŃ 2		DZIEŃ 3		
	Temp.	Odchyl. st.	Temp.	Odchyl. st.	Temp.	Odchyl. st.	
20	19,999	0,012	20,029	0,016	20,062	0,004	0,063
22	21,872	0,002	21,905	0,011	21,927	0,005	0,055
24	23,754	0,004	23,788	0,007	23,788	0,003	0,034
26	25,670	0,015	25,670	0,006	25,674	0,003	0,004
28	27,563	0,008	27,565	0,009	27,581	0,005	0,017
30	29,472	0,004	29,445	0,006	29,480	0,007	0,035
32	31,372	0,005	31,331	0,010	31,348	0,004	0,041
34	33,216	0,016	33,218	0,003	33,229	0,008	0,013
36	35,119	0,010	35,111	0,005	35,112	0,004	0,008
38	37,017	0,005	37,000	0,009	37,025	0,009	0,025
40	38,932	0,006	38,900	0,009	38,932	0,006	0,032



Rysunek 22. Krzywa kalibracyjna wykreślona na podstawie powtarzalnego pomiaru (rys.21), opisująca zależność temperatury osiągniętej wewnątrz komory pomiarowej dla zadanej na termostacie wartości.

4.2 Koncentracja EVs w próbkach.

Badano dwie próbki EVs zawieszonych w PBS:

1. pęcherzyki pochodzące z hodowli komórek prawidłowych beta-trzustki prowadzonej w warunkach normoglikemii - NG,
2. pęcherzyki pochodzące z hodowli komórek prawidłowych beta-trzustki prowadzonej w warunkach hiperglikemii - HG.

W drugim przypadku (HG), próbka o pierwotnej koncentracji została rozcieńczona (PBS) i podzielona na trzy oddzielne próbki o niższej koncentracji, przeznaczone do pomiarów PALS.

Uśrednione wyniki pomiarów qNano (z trzech powtórzeń w przypadku każdej próbki) zestawiono w tabelach 3 i 4.

Tabela 3. Wyniki qNano dla próbek NG i HG przed pomiarem PALS.

	NG	HG
Średnia koncentracja EVs (cząstki/ml)	9×10^{10}	$6,9 \times 10^{10}$
Średnia średnica pęcherzyka (nm)	187	185

Tabela 4. Wyniki qNano dla próbek NG i HG po pomiarze PALS.

	NG	HG_1	HG_2	HG_3
Średnia koncentracja EVs (cząstki/ml)	$3,3 \times 10^{10}$	$4,5 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^{10}$
Średnia średnica pęcherzyka (nm)	300	278	280	289

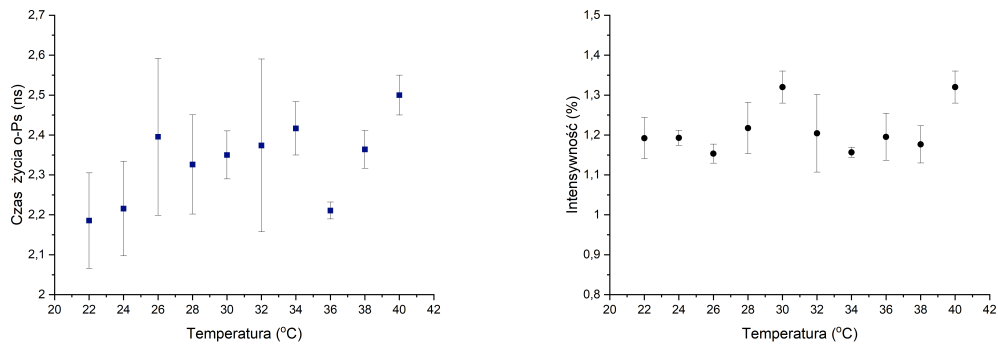
4.3 Pomiary PALS.

4.3.1 Parafilm.

Uśrednione na podstawie trzech powtórzeń wyniki pomiarów czasu życia oraz intensywności dla parafilmu zaprezentowano w tabeli 5. Zależność czasu życia o-Ps i intensywności tej składowej od temperatury obrazuje wykres przedstawiony na rys. 23. Przykładowe widmo z tych pomiarów zostało już wcześniej zaprezentowane na rys. 14. Czas trwania pojedynczego pomiaru to ok. 60 min (dla statystyki 1 mln zdarzeń). Przedstawione niepewności pomiarowe są odchyleniem standardowym dla średniej z trzech pomiarów. Czas życia oraz intensywność składnika związanego z anihilacjami w materiale źródła (τ_s, I_s), jak również czas życia p-Ps (τ_1), zostały stale ustalone w analizie. Ich wartości to odpowiednio $\tau_s = 0,374$ ns, $I_s = 10\%$ oraz $\tau_1 = 0,125$ ns. Intensywność anihilacji p-Ps (I_1) w przypadku każdego pomiaru wynosiła średnio ok. 20%. Pomiary przeprowadzono w temperaturach z zakresu 22-40°C, w komorze znajdowało się jedynie źródło owinięte parafilmem (brak próbki).

Tabela 5. Średnie wartości czasu życia pozytonium oraz intensywności wraz z niepewnościami pomiarowymi na podstawie pomiarów parafilmu w różnych temperaturach.

Temperatura (°C)	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Wolne pozytony τ_2 (ns)	0,219	0,221	0,220	0,220	0,222	0,220	0,219	0,219	0,220	0,221
Niepewność pom.	0,002	0,001	0,001	0,003	0,001	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002
Intensywność I_2 (%)	84,2	81,4	82,8	82,2	80,2	82,2	82,6	83,2	82,3	82,6
Niepewność pom.	2,4	1,4	2,0	2,4	0,9	2,6	2,1	2,2	0,7	1,5
Czas życia o-Ps τ_3 (ns)	2,23	2,22	2,40	2,33	2,35	2,37	2,42	2,21	2,36	2,50
Niepewność pom.	0,12	0,12	0,20	0,12	0,06	0,22	0,07	0,02	0,05	0,05
Intensywność I_3 (%)	1,19	1,19	1,15	1,22	1,32	1,20	1,16	1,20	1,18	1,32
Niepewność pom.	0,05	0,02	0,02	0,06	0,04	0,10	0,01	0,06	0,05	0,04



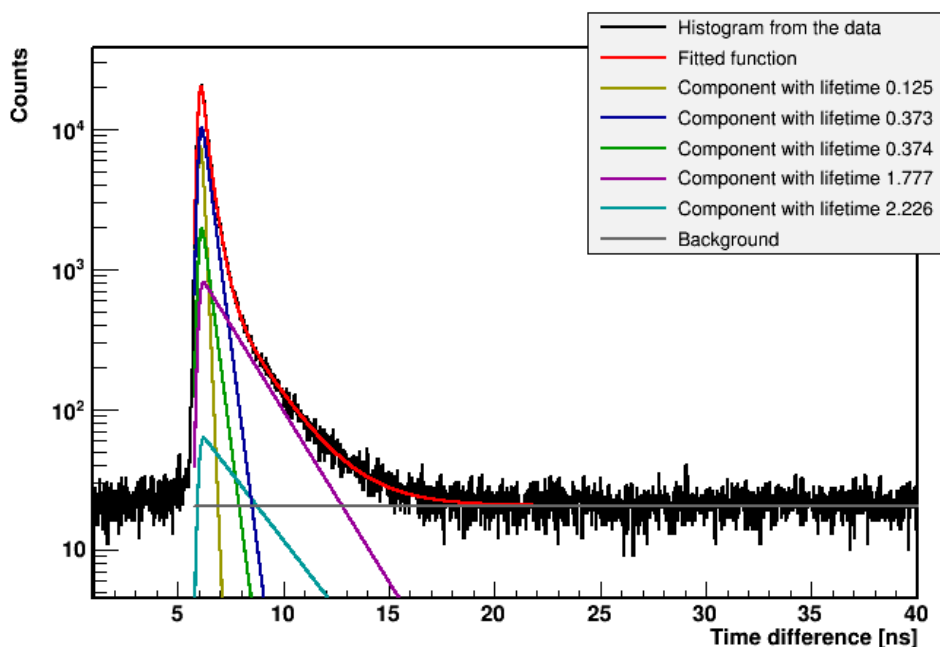
Rysunek 23. Wykresy przedstawiające czas życia o-Ps (na lewo) i intensywność tej składowej (na prawo) w funkcji temperatury.

4.3.2 PBS.

Przed przystąpieniem do pomiarów z właściwymi próbkami zbadano czas życia oraz intensywność o-Ps w buforze PBS, w którym zawieszono były EVs (tab.6). Pomiar przeprowadzono w temperaturze 22°C. Tak jak poprzednio, czas życia oraz intensywność składnika związanego z anihilacjami w materiale źródła oraz czas życia p-Ps, zostały stale ustalone w analizie. Dodatkowo, jako wartość stałą przyjęto składowe τ_p oraz I_p pochodzące od anihilacji w parafilmie. Zgodnie z tabelą 5, dla $T = 22^\circ\text{C}$ wynoszą one odpowiednio 2,23 ns i 1,19%. Intensywność składowej anihilacji p-Ps wynosiła ok. 20% w każdym pomiarze.

Tabela 6. Średnie wartości czasu życia pozytonium oraz intensywności wraz z niepewnościami pomiarowymi na podstawie pomiarów PBS w temperaturze 22°C.

Wolne pozytony τ_2 (ns)	0,376
Niepewność pom.	0,010
Intensywność I_2 (%)	61,45
Niepewność pom.	2,06
Czas życia o-Ps τ_3 (ns)	1,80
Niepewność pom.	0,02
Intensywność I_3 (%)	16,21
Niepewność pom.	0,95



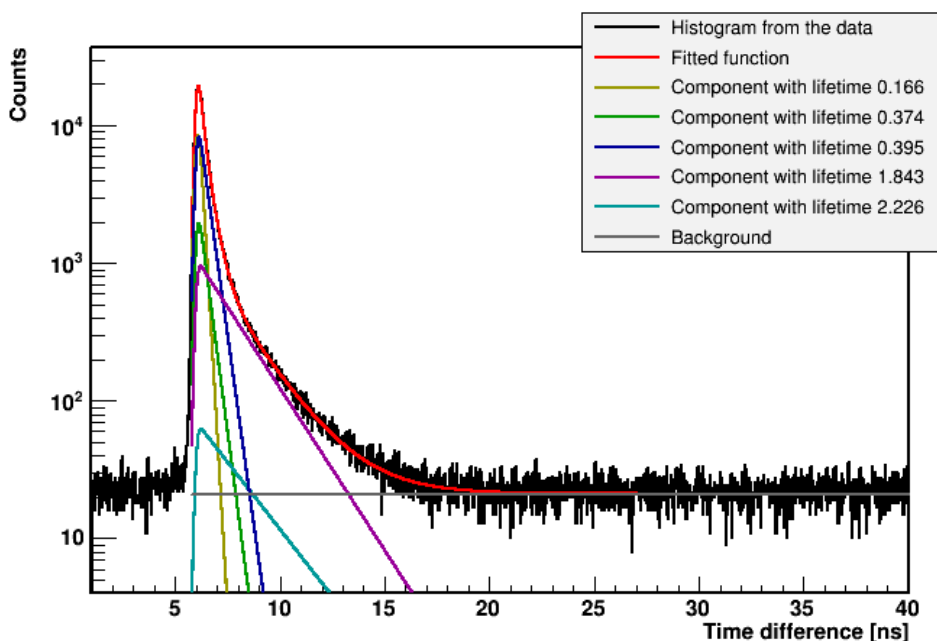
Rysunek 24. Przykładowe widmo czasu życia pozytonium dla buforu PBS z nałożonymi liniami oznaczającymi rozkłady poszczególnych składowych wynikających z dopasowania równania (8). Kolorem czerwonym oznaczono dopasowaną funkcję, zielonym rozkład p-Ps, granatowym - anihilacje wolnych pozytonów, żółtym – anihilacje w materiale źródłowym, turkusowym – anihilacje w parafilmie, fioletowym – anihilacje o-Ps, a kolorem szarym zaznaczono poziom tła.

4.3.3 Próbki z EVs.

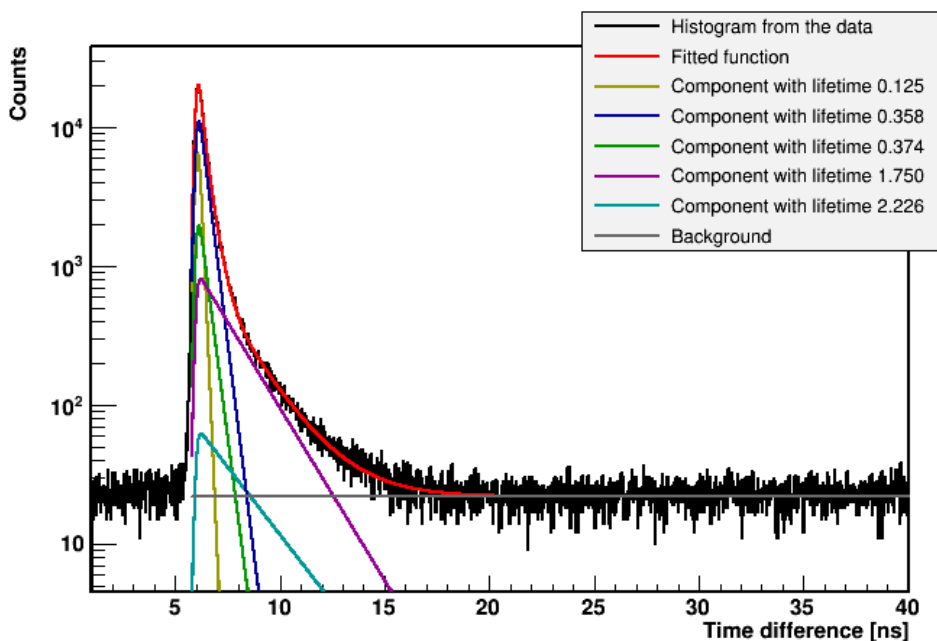
Dla próbki NG o pierwotnej koncentracji 9×10^{10} cząstek/ml, pochodzącej z hodowli prowadzonej w warunkach normoglikemii, pomiar przeprowadzono w $T = 22^\circ\text{C}$ i powtórzono go dwukrotnie (bez otwierania komory). Próbkę HG, o pierwotnej koncentracji $6,9 \times 10^{10}$ cząstek/ml rozcieńczono i podzielono na 3 oddzielne próbki o koncentracji $2,1 \times 10^{10}$ cząstek/ml. Dla każdej z nich przeprowadzono pojedynczy pomiar w $T = 22^\circ\text{C}$. Uśrednione wyniki dla EVs wyizolowanych z hodowli w warunkach NG oraz HG zawarto w tabeli 7. Czas życia oraz intensywność składnika związanego z anihilacjami w materiale źródła, czas życia p-Ps oraz składowe pochodzące od anihilacji w parafilmie były stale ustalone podczas analizy, identycznie jak w przypadku pomiaru PBS. Intensywność składowej anihilacji p-Ps dla tych pomiarów wynosiła ok. 23% .

Tabela 7. Średnie wartości czasu życia pozytonium oraz intensywności wraz z niepewnościami pomiarowymi na podstawie pomiarów próbek wyizolowanych EVs zawieszonych w PBS.

Próbka	NG	HG
Wolne pozytony τ_2 (ns)	0,356	0,363
Niepewność pom.	0,004	0,003
Intensywność I_2 (%)	57,74	61,22
Niepewność pom.	0,15	0,92
Czas życia o-Ps τ_3 (ns)	1,802	1,77
Niepewność pom.	0,002	0,02
Intensywność I_3 (%)	19,31	15,40
Niepewność pom.	0,18	0,37



Rysunek 25. Przykładowe widmo czasu życia pozytonium dla próbki NG z nałożonymi liniami oznaczającymi rozkłady poszczególnych składowych wynikających z dopasowania równania (8). Kolorem czerwonym oznaczono dopasowaną funkcję, zielonym rozkład p-Ps, granatowym - anihilacje wolnych pozytonów, żółtym – anihilacje w materiale źródłowym, turkusowym – anihilacje w parafilmie, fioletowym – anihilacje o-Ps, a kolorem szarym zaznaczono poziom tła.



Rysunek 26. Przykładowe widmo czasu życia pozytonium dla próbki HG z nałożonymi liniami oznaczającymi rozkłady poszczególnych składowych wynikających z dopasowania równania (8). Kolorem czerwonym oznaczono dopasowaną funkcję, zielonym rozkład p-Ps, granatowym - anihilacje wolnych pozytonów, żółtym – anihilacje w materiale źródłowym, turkusowym – anihilacje w parafilmie, fioletowym – anihilacje o-Ps, a kolorem szarym zaznaczono poziom tła.

5. Dyskusja

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody oznaczania czasu życia pozytonium w EVs pochodzących z hodowli komórek prawidłowych beta-trzustki i cel ten w znacznym stopniu udało się zrealizować.

Uzupełnienie układu PALS o termostat Lauda wiązało się z koniecznością przeprowadzenia serii pomiarów celem sprawdzenia stabilności temperaturowej układu oraz wyznaczenia krzywej kalibracyjnej. Temperatura osiągnięta wewnątrz komory pomiarowej różniła się od tej zadanej na termostacie, w szczególności dla temperatur dalekich od temperatury pokojowej. Dłuższe pomiary (rys.20) pokazały jednak, że po osiągnięciu danej temperatury, utrzymywała się ona na stabilnym poziomie nawet przez czas przekraczający długość trwania pojedynczego pomiaru PALS (~60 min). Pomiary stabilności w temperaturach bliskich 10 oraz 37 stopniach Celsjusza (trwające ok. 90 minut) pokazały, że wahania temperatury w komorze wynoszą mniej niż 0,1°C. Dla dłuższego pomiaru (ok. 150 min) w okolicy temperatury 50°C, wahania wyniosły około 0,2°C. Dobrą stabilność temperaturową układu potwierdzają również niewielkie różnice pomiędzy temperaturami osiągniętymi wewnątrz komory w różnych dniach, co zaprezentowano w tabeli 2. Dla całej serii pomiarów przeprowadzonych w trzech różnych dniach, różnice pomiędzy konkretnymi temperaturami wynoszą mniej niż 0,1°C.

Pomiary z wykorzystaniem analizatora qNano pozwoliły określić koncentrację oraz średnią wielkość EVs w badanych próbkach. Wyniki pomiarów przeprowadzonych bezpośrednio po izolacji pęcherzyków (tab.3) wykazały standardową koncentrację EVs w próbce przeznaczonej do dalszych badań, porównywalną z koncentracjami próbek opisywanych przez dr A. Kamińską w [5]. W przypadku próbki HG, która została rozdzielona na trzy osobne próbki o koncentracji $2,1 \times 10^{10}$ cząstek/ml (wartość ta została obliczona z proporcji, bazując na tab.3), jeden wynik po pomiarze wskazuje na wyższą koncentrację EVs niż wyznaczona rachunkowo koncentracja przed pomiarem. Przyczyną tego było prawdopodobnie nieprawidłowe rozmieszczenie próbki przed pomiarem qNano, co mogło spowodować sfałszowanie wyniku. Pozostałe wyniki qNano dla próbek odzyskanych po pomiarach PALS (tab.4) cechują się niższą wartością koncentracji w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla próbek przed pomiarem PALS. Różnice te wynikają najprawdopodobniej z trudności w precyzyjnym zebraniu całości próbki z wnętrza komory pomiarowej. W przypadku obu próbek, spadek koncentracji jest niewielki i nie powoduje zmiany rzędu wielkości średniej liczby pęcherzyków zawieszonych w 1 ml PBS.

Podczas wstępnych pomiarów parafilmu techniką PALS zaobserwowano zależność czasu życia o-Ps od temperatury. Aby odpowiednio dopasować stałą wartość tego składnika w analizie widm pomiarowych właściwych próbek, przeprowadzono serię pomiarów, które potwierdziły tendencję do wzrostu wartości czasu życia o-Ps w parafilmie wraz z rosnącą temperaturą (rys. 23). Punkty pomiarowe nie tworzą jednak idealnie liniowej zależności. W temperaturach 36°C i 38°C czas życia jest nieoczekiwanie niski. Intensywność składowej pochodzącej od anihilacji o-Ps w parafilmie utrzymuje się na względnie stałym poziomie niezależnie od temperatury. Jej wartość jest bardzo niska, wynosi ok. 1,2%, co świadczy o dobrym rozciągnięciu parafilmu i uzyskaniu bardzo cienkiej warstwy pokrywającej źródło.

Czas życia o-Ps dla próbek z EVs pochodzącymi z hodowli prowadzonej w warunkach NG i HG wyniósł odpowiednio 1,802(002) ns oraz 1,77(02) ns i nie różni się znacząco od czasu życia o-Ps zbadanego w czystym buforze PBS, gdzie wartość ta wyniosła 1,80(02) ns. Zgodnie z wynikami opisanymi w pracy [26], jest to czas życia charakterystyczny dla czystej wody. Całkowity czas życia jest silnie związany z procentem wagowym wody w próbce i może to skutkować tym, że czas życia mierzony w rozcieńczonych substancjach rozpuszczonych będzie zbliżony do czasu życia mierzonego w czystej wodzie (~1,8 ns).

6. Wnioski

Bazując na pomiarach temperaturowych omówionych w poprzednich rozdziałach możemy wnioskować poprawność krzywej kalibracyjnej przedstawionej na rysunku 22 i z dobrą dokładnością określić temperaturę próbki znajdującej się w komorze podczas trwania pełnego pomiaru PALS. Zaproponowanym uzupełnieniem techniki PALS był analizator cząstek qNano. W ramach tej pracy pokazano możliwość precyzyjnego wyznaczania koncentracji wyizolowanych EVs w badanych próbkach. Było to szczególnie ważne, ponieważ koncentracja EVs okazała się być ważnym parametrem, od którego zależy możliwość poprawnego zbadania czasu życia pozytonium w mikropęcherzykach. Dodatkowo, sprawdzając koncentracje próbki zarówno przed, jak i po pomiarze PALS, pokazano, że jest to technika niedestruktywna względem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

Na podstawie uzyskanych wyników nie można jednoznacznie stwierdzić, czy otrzymane wartości czasu życia o-Ps w badanych próbkach pochodzą od EVs, czy zaobserwowano jedynie sygnał od buforu PBS. Dla ustalenia tego konieczne jest przeprowadzenie dalszych pomiarów, z próbkami o wyższej koncentracji EVs.

Lista rysunków

- 1 Pozytonium w stanie A) para i B) orto. Poniżej schematy rozpadu, odpowiednio na dwa kwanty γ (każdy o energii 511 keV) rozchodzące się pod kątem 180 stopni dla p-Ps oraz trzy kwanty γ w przypadku o-Ps. Energia oraz kąty pomiędzy promieniami γ wynikają z zasad zachowania energii i pędu. 11
- 2 Pozytony w polimerach, których struktura charakteryzuje się obecnością pustych przestrzeni, tworzą z elektronami stan quasi-związany, nazywany pozytonium. Na skutek procesów 'pick-off', Ps ostatecznie ulega anihilacji z elektronem sąsiednich atomów, co zachodzi zwykle w czasie kilku ns. Proces ten można skorelować z wielkością promienia pustej przestrzeni korzystając z półempirycznego równania Tao-Eldrup [8]. 12
- 3 Schematycznie zobrazowane mechanizmy powstawania różnych typów EVs [9]. 13
- 4 Schemat budowy egzosomu, na którym: CD81,CD9,CD63 - różne rodzaje glikoprotein,antygenów; flotylina-1 - białko błonowe; TSG101 - polipeptyd odgrywający ważną rolę w utrzymaniu stabilności genomu i w regulacji cyklu komórkowego; HSP70,HSP90 - białka z rodziny białek szoku cieplnego; ALIX - białko biorące udział w regulacji procesów komórkowych takich jak np. sygnalizacja proapoptotyczna [14][15]. 14
- 5 Schemat obrazujący zwiększoną ilość wolnych objętości w dwuwarstwie lipidowej przy podwyższonej temperaturze. Czerwone kółka reprezentują cząsteczki o-Ps (opracowanie własne na podstawie [2]). 15
- 6 Schemat układu do filtracji niskopróżniowej (po lewej) [6] oraz zdjęcie rzeczywistego układu, który był wykorzystywany przy izolacji EVs (po prawej). 19
- 7 Schemat opisujący poszczególne kroki preparacji i analizy próbki pochodzącej z hodowli komórek beta trzustki (opracowanie własne na podstawie [6]). 20
- 8 Parafilm wykorzystywany do uszczelnienia źródła; folia ta charakteryzuje się dużą plastycznością, dlatego możliwe jest rozciągnięcie jej nawet do bardzo cienkiej warstwy. 21
- 9 Uproszczony schemat rozpadu ^{22}Na [17]. 22
- 10 Schemat układu PALS oraz konstrukcji komory pomiarowej. 22
- 11 Zdjęcie układu podczas pomiaru (na lewo); odsunięty górny detektor odsłaniający komorę umieszczoną w podstawce (na prawo). Temperatura podstawki kontrolowana jest przy pomocy termostatu oraz systemu przewodów doprowadzających chłodziwo. 23
- 12 Komora pomiarowa; rozmontowana z widocznymi poszczególnymi elementami: część górna i dolna komory, obręcz oraz śruby mocujące (po lewej); źródło przymocowane do górnej części komory (środek); całkowicie zmontowana komora po nałożeniu części górnej na dolną (po prawej). 24

13	Przykładowa para sygnałów z obu detektorów. Kolorem zielonym oznaczono piedestał sygnału, żółta linia wskazuje amplitudę sygnału, a niebieskie linie wyznaczają wysokość sygnału dla 30% i 80% amplitudy.	25
14	Przykładowe widmo czasu życia pozytonium w poszerzonej skali. Nałożone linie oznaczają rozkłady poszczególnych składowych wynikające z dopasowania równania (8). Kolorem czerwonym oznaczono dopasowaną funkcję, zielonym rozkład p-Ps, żółtym – anihilacje w materiale źródłowym, turkusowym – anihilacje wolnych pozytonów w próbce, niebieskim – anihilacje o-Ps, a kolorem fioletowym zaznaczono poziom tła.	26
15	Układ do testów stabilności temperaturowej oraz pomiarów kalibracyjnych; całość układu, w tym spektrometr PAL oraz wykorzystywany miernik Rigol DN3064 (po lewej); termostat Lauda LOOP L100 (środek); zbliżenie na uchwyt, w którym umieszczono komorę testową z czujnikiem podłączonym do miernika (po prawej). . . .	27
16	Wykorzystywany analizator cząstek qNano firmy IZON.	28
17	Budowa komory analizatora (po lewej); przykładowy nanopor umieszczony na poliuretanowej membranie (po prawej) [21].	28
18	Cząstki przechodzą przez nanopor pod wpływem przyłożonego napięcia; techniką qNano mierzone są trzy parametry: wysokość sygnału (ang. blockade magnitude)–proporcjonalna do objętości mierzonej cząstki, szerokość sygnału (ang. blockade duration)– wykorzystywana do obliczenia ładunku na powierzchni każdej cząstki, częstotliwość sygnałów (ang. blockade frequency) – wykorzystywana do określenia koncentracji (pokazane na podstawie przykładowych wyników qNano) [19][20].	29
19	Wykresy zależności temperatury na termostacie oraz wewnątrz komory pomiarowej od czasu przy: (a) obniżaniu temperatury od $T_{termo} = 21,5^{\circ}C$ do $T_{termo} = 8^{\circ}C$ oraz (b) podwyższaniu temperatury od $T_{termo} = 21,5^{\circ}C$ do $T_{termo} = 50^{\circ}C$	30
20	Wykresy prezentujące stabilność temperatury wewnątrz komory pomiarowej w obszarze temperatur bliskich $10^{\circ}C$, $37^{\circ}C$ oraz $50^{\circ}C$, którym odpowiadają ustawienia termostatu odpowiednio: (a) $8,3^{\circ}C$, (b) $39,1^{\circ}C$, (c) $53,0^{\circ}C$	30
21	Wykresy przedstawiające wyniki pomiarów temperatury wewnątrz komory pomiarowej wypełnionej wodą destylowaną przeprowadzone w trzech różnych dniach. Co 70 minut temperaturę na termostacie podwyższano o 2 stopnie, zaczynając od $20^{\circ}C$ i kończąc na $40^{\circ}C$	31
22	Krzywa kalibracyjna wykreślona na podstawie powtarzalnego pomiaru (rys.21), opisująca zależność temperatury osiągniętej wewnątrz komory pomiarowej dla zadanej na termostacie wartości.	32

23	Wykresy przedstawiające czas życia o-Ps (na lewo) i intensywność tej składowej (na prawo) w funkcji temperatury.	34
24	Przykładowe widmo czasu życia pozytonium dla buforu PBS z nałożonymi liniami oznaczającymi rozkłady poszczególnych składowych wynikających z dopasowania równania (8). Kolorem czerwonym oznaczono dopasowaną funkcję, zielonym rozkład p-Ps, granatowym - anihilacje wolnych pozytonów, żółtym – anihilacje w materiale źródłowym, turkusowym – anihilacje w parafilmie, fioletowym – anihilacje o-Ps, a kolorem szarym zaznaczono poziom tła. 35	35
25	Przykładowe widmo czasu życia pozytonium dla próbki NG z nałożonymi liniami oznaczającymi rozkłady poszczególnych składowych wynikających z dopasowania równania (8). Kolorem czerwonym oznaczono dopasowaną funkcję, zielonym rozkład p-Ps, granatowym - anihilacje wolnych pozytonów, żółtym – anihilacje w materiale źródłowym, turkusowym – anihilacje w parafilmie, fioletowym – anihilacje o-Ps, a kolorem szarym zaznaczono poziom tła. 37	37
26	Przykładowe widmo czasu życia pozytonium dla próbki HG z nałożonymi liniami oznaczającymi rozkłady poszczególnych składowych wynikających z dopasowania równania (8). Kolorem czerwonym oznaczono dopasowaną funkcję, zielonym rozkład p-Ps, granatowym - anihilacje wolnych pozytonów, żółtym – anihilacje w materiale źródłowym, turkusowym – anihilacje w parafilmie, fioletowym – anihilacje o-Ps, a kolorem szarym zaznaczono poziom tła. 37	37

Lista tabel

1	Charakterystyka populacji EVs ze względu na ich średnicę, biogenezę, rolę fizjologiczną, ładunek i typowe markery [6].	13
2	Średnie wartości temperatury osiągniętej wewnątrz komory pomiarowej dla zadanych na termostacie wartości z przedziału 20-40°C; wyniki na podstawie pomiarów przeprowadzonych w trzech różnych dniach. W każdym kroku średnia obliczana była na podstawie n=120 pomiarów.	31
3	Wyniki qNano dla próbek NG i HG przed pomiarem PALS.	32
4	Wyniki qNano dla próbek NG i HG po pomiarze PALS.	33
5	Średnie wartości czasu życia pozytonium oraz intensywności wraz z niepewnościami pomiarowymi na podstawie pomiarów parafilmu w różnych temperaturach.	33
6	Średnie wartości czasu życia pozytonium oraz intensywności wraz z niepewnościami pomiarowymi na podstawie pomiarów PBS w temperaturze 22°C.	35

7	Średnie wartości czasu życia pozytonium oraz intensywności wraz z niepewnościami pomiarowymi na podstawie pomiarów próbek wyizolowanych EVs zawieszonych w PBS. . . .	36
---	---	----

Literatura

- [1] Z. Bura, K. Dulski, E. Kubicz, P. Małczak, M. Pędziwiatr, M. Szczepanek, E.Ł. Stępień, P. Moskal, Studies of the ortho-Positronium lifetime for cancer diagnostics. *Acta Phys. Pol. B* 51, 377 (2020).
- [2] C. Fong, A. W. Dong, A. J. Hill, B. J. Boyd, C. J. Drummond, Positron annihilation lifetime spectroscopy (PALS): A probe for molecular organisation in self-assembled biomimetic systems. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 17527-17540 (2015).
- [3] E. Kubicz, Doctoral Thesis, Biomedical applications of Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy: nanostructural characterization of normal and cancer cells and tissues (2020).
- [4] Z. Bura, Praca Licencjacka, Badanie czasu życia pozytonium pod kątem diagnostyki nowotworowej za pomocą tomografu J-PET (2018).
- [5] A. Kamińska, Doctoral Thesis, Molecular characteristics of platelet and urinary extracellular vesicles and their possible applications in nanomedicine (2019).
- [6] A. Drożdż, A. Kamińska, M. Surman, A. Gonet-Surówka, R. Jach, H. Huras, M. Przybyło and E. Ł. Stępień, Low-Vacuum Filtration as an alternative extracellular vesicle concentration method: A comparison with Ultracentrifugation and Differential Centrifugation (2020).
- [7] A. Grzybowska, T. Lorenc, W. Olejarz, G. Nowicka, Egzosomy jako nośniki informacji w komunikacji między komórkami nowotworowymi, *Biul. Wydz. Farm. WUM*, 2, 6-13 (2019)
- [8] D. W. Gidley, H-G. Peng and R. S. Vallery, Positron Annihilation as a method to characterize porous materials. *Annu Rev Mater Res* 2006;36:49–79. doi:10.1146/annurev.matsci.36.111904.135144 (2006).
- [9] <http://everzom.com/extracellular-vesicles/>
- [10] J. T. McCluskey, M. Hamid, H. Guo-Parke, N. H. McClenaghan, R. Gomis, P. R. Flatt, Development and Functional Characterization of Insulin-releasing Human Pancreatic Beta Cell Lines Produced by Electroporation, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 286, Issue 25 (2011).

- [11] M. Surman, A. Drożdż, E. Stępień, M. Przybyło, Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems - Methods of Production and Potential Therapeutic Applications, *Current Pharmaceutical Design*, Volume 25, Number 2, pp. 132-154(23) (2019).
- [12] A. M. Weerheim, A. M. Kolb, A. Sturk, R. Nieuwland, Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography, *Anal Biochem.* ;302:191–198 (2002).
- [13] E. Stępień, M. Durak-Kozica, A. Kamińska, M. Targosz-Korecka, M. Libera, G. Tylko, A. Opalińska, M. Kapusta, B. Solnica, A. Georgescu, M. Costa, A. Czyżewska-Buczyńska, W. Witkiewicz, M. Małecki, F. Enguita, Circulating ectosomes: Determination of angiogenic microRNAs in type 2 diabetes, *The-ranostics*; 8(14):3874-3890 (2018).
- [14] R. Kalluri, V. S. LeBleu, The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science*: Vol. 367, Issue 6478 (2020).
- [15] G. Odorizzi, The multiple personalities of Alix, *J Cell Sci* 119 (15): 3025–3032 (2006).
- [16] National Nuclear Data Center, [http://http://www.nndc.bnl.gov](http://www.nndc.bnl.gov)
- [17] C. Palacio, Some effects on polymers of low-energy implanted positrons (2008).
- [18] <https://www.epicsensors.com/pl/faq/jak-dziala-czujnik-pt100/>
- [19] S. L. Maas, J. De Vrij, M. Broekman, Quantification and Size-profiling of Extracellular Vesicles Using Tunable Resistive Pulse Sensing (2014).
- [20] <http://mvs.if.uj.edu.pl> - Tunable Resistive Pulse Sensing.
- [21] IZON: qNano User Manual.
- [22] P. Sane, E. Salonen, E. Falck, J. Repakova, F. Tuomisto, J. M. Holopainen, I. Vattulainen, Probing Biomembranes with Positrons (2008).
- [23] A. W. Dong, C. Fong, L. J. Waddington, A. J. Hill, B. J. Boyd and C. J. Drummond, Packing and mobility of hydrocarbon chains in phospholipid lyotropic liquid crystalline lamellar phases and liposomes: characterisation by positron annihilation lifetime spectroscopy (2015).

- [24] A. Wenjing Dong, Doctoral Thesis, Application of Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy (PALS) to the Characterization of Nanostructure in Ordered Self-assembled Systems (2012).
- [25] K. Dulski, Masters Thesis, Assembly and calibration of apparatus for Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy (2016).
- [26] P. Sane, F. Tuomisto, S. K. Wiedmer, T. Nyman, I. Vattulainen, J. M. Holopainen, Temperature-induced structural transition in-situ in porcine lens — Changes observed in void size distribution (2010).