

“Analiza metabolomiki wpływu czasu i tlenu na linię komórek fibrosarkomy (HT1080) - badania modelowe”

Streszczenie

Wpływ tlenu molekularnego na metabolizm komórek nowotworowych jest przedmiotem zainteresowania od kilku dziesięcioleci, począwszy od eksperymentów Louisaa Pasteura i jego rozumienia fermentacji glukozy. W latach 30 XX wieku Otto Warburg przyszedł z nowym zrozumieniem biologii nowotworów, wprowadzając zmiany metabolizmu komórek nowotworowych w obecności lub braku cząsteczek tlenu, poprzez zwiększenie przyswajania glukozy i produkcję mleczanu na drodze glikolizy aerobowej (efekt Warburga). Od ponad 100 lat naukowcy publikują różne badania, próbując pełniej zrozumieć efekt Warburga i efekt reprogramowania metabolicznego hipoksji na postępowanie komórek nowotworowych. Jednak do tej pory wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Na przykład, dlaczego komórki wybierają mniej wydajny sposób produkcji ATP i tracą atomy węgla w postaci mleczanu, który jest potrzebny do procesów biosyntetycznych. Jakie są dokładne proporcje działalności komórek nowotworowych między glikolizą a cyklem TCA?

A najciekawsze pytania brzmią jaka jest rola składników stromalnych w mikrośrodowisku. Czy istnieją najnowocześniejsze technologie, aby odpowiedzieć na te wszystkie pytania? Dzięki platformie metabolomiki, w tym spektrometrii masowej (MS), spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) i metodom chemometrii, analizując dużą liczbę metabolitów obecnych w próbkach linii komórek nowotworowych, można uzyskać więcej informacji dotyczących identyfikacji patologicznych ścieżek biochemicznych.

Rozdział 1

Rozpoczyna się od przedstawienia aktualnego stanu wiedzy o biologii nowotworów, metabolizmie oraz procesie progresji nowotworów, najnowszych rozważań na temat efektu Warburga związanych z reprogramowaniem metabolizmu i progresją nowotworów. Ponadto podkreśla rolę niektórych aminokwasów niezbędnych w metabolizmie komórek

nowotworowych. Dodatkowo opisano ważność cząsteczek tlenu dla metabolizmu komórek nowotworowych oraz ich stężenia w terminologii *in vitro* i *in vivo*. Krótki wstęp obejmuje również wkład spektroskopii NMR w analizę metabolomu *in vitro* wraz z analizą chemometryczną jako nieocenioną technologią badania metabolomu linii komórek hodowanych *in vitro*.

Rozdział 2

W tym fragmencie pracy skupiono się na badaniach z wykorzystaniem metody 1D ^1H NMR w badaniach metabolomu *in vitro* linii komórek HT1080, przy wybranych stężeniach tlenu jako hipoksja 1%, normoksja 6% i hiperoksja 21% na podstawie ekstraktów komórek (metabolomu wewnątrzkomórkowego) oraz płynów pochodzących (metabolomu zewnątrzkomórkowego), włącznie z próbkowaniem w czasie inkubacji w odstępach czasowych. Ostatnie doniesienia literaturowe sugerują, że w różnych typach nowotworów po ocenie ich stopnia hipoksji za pomocą zestawu genetycznych markerów hipoksji stwierdzono dużą różnorodność między nimi. Ponadto termin normoksja jest używany względem 21% stężenia tlenu w badaniach *in vitro*. Stężenie to jest znacznie wyższe niż fizjologiczne stężenie tlenu. Z tego względu istnieje potrzeba opracowania nowej metodologii do symulowania fizjologicznego ciśnienia tlenu w tkankach, które mogłyby wskazać różnice między nasyceniem środowiska tlenem (hipoksja ≤ 1 i normoksja 6% i hiperoksja 21%). Dlatego też, przeprowadzono badania profilu metabolicznego linii komórek fibrosarcomy za pomocą spektroskopii 1D ^1H NMR z uwzględnieniem interwałów czasowych inkubacji (12h, 24, i 36h w odniesieniu do próbek kontrolnych), włącznie z analizą metabolitów wewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowych. Zastosowano analizy chemometryczne, aby określić „potencjał metabolitów” do celów dyskryminacji między interwałami inkubacji. Poza tym, zwiększając zawartość tlenu, a przez to możliwości zmian w szlakach biochemicznych można było przeprowadzić badania metabolomiczne w warunkach hipoksji przy 1% O_2 , normoksji przy 6% O_2 i hiperoksji przy 21% O_2 .

Rozdział 3

To zastosowanie nowego podejścia do indukcji *in vitro* modeli typu hipoksja-reoksygenacja i normoksja-deoksygenacja, z zastosowaniem linii komórek HT1080 oraz analizą metabolomu ekstracellularnego i intracellularnego. Zgodnie z obowiązującą

koncepcją, hipoksja nowotworu wynika z szybkiej i niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych, prowadząc do zwiększonego pozyskiwania składników odżywczych i tlenu w celu wypełnienia wymagań energetycznych procesów kancerogeny. Jednak szybka proliferację komórek nowotworowych powoduje utrudniony dostęp do zaopatrzenia w tlen i składniki odżywcze. Oznacza to, że dochodzi do przejścia komórek z dostatecznym dostarczaniem tlenu i składników odżywczych do warunków hipoksji z niedostatecznym dostarczaniem tlenu i składników odżywczych (normoksja-deoksygenacja). Z drugiej strony, region hipoksyczny wewnątrz guzów generuje różne strategie pozyskiwania odpowiedniej ilości tlenu i składników odżywczych dla progresji nowotworu. Na przykład, indukuje produkcję białek angiogennych, aby budować nowe naczynia dla przepływu krwi i ruchu komórek nowotworowych poprzez przejście epithelialno-mezenchymalne (EMT) i metastazę. W ten sposób komórki nowotworu stają się komórkami normoksycznymi z dostatecznym dostarczaniem tlenu i składników odżywczych (hipoksja-reoksygenacja). Oba te pojęcia rozwijają różne fenotypy metaboliczne komórek nowotworu. W związku z tym zostało przeprowadzone połączenie analiz metabolitów wewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowych, w tym komórek normoksycznych i denormoksycznych (DNC) oraz komórek hipoksycznych i reoksygenowanych hipoksycznych (RHC) przez przeprowadzenie eksperymenty w czasie.