

lek. Wojciech Graboń

**Wpływ hipoksji i normoksji tkankowej na efekt Warburga
w komórkach raka jelita grubego**

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

Promotor: prof. dr hab. Anna Barańczyk-Kuźma

Katedra i Zakład Biochemii

Wydział Lekarski

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2020

STRESZCZENIE

Powszechną cechą wielu komórek nowotworowych jest zjawisko zwane „efektem Warburga” czyli synteza dużych ilości mleczanu pomimo wystarczającego zaopatrzenia w tlen. Ponieważ powszechnie przyjmuje się, że mleczan jest syntetyzowany z glukozy w szlaku glikolizy, stąd innym określeniem tego zjawiska jest „glikoliza tlenowa”. Wiadomo także, że w szybko dzielących się komórkach mleczan może powstawać w zależnym od tlenu szlaku glutaminolizy, jednak nie wiadomo jak dostępność tlenu wpływa na ten proces.

Rozprawę stanowią dwie publikacje, których celem było omówienie dotychczasowego stanu wiedzy na temat mechanizmów i regulacji tego zjawiska przez tlen (**praca pogładowa**), oraz zbadanie wpływu tlenu na efekt Warburga w komórkach raka jelita grubego (**praca doświadczalna**).

W **pracy pogładowej** (*Graboń i wsp. Wpływ tlenu na efekt Warburga: czy w komórkach nowotworowych mleczan powstaje tylko z glukozy? Postępy Hig Med Dośw, 2018; 72: 481-490*) przedstawiono obecny stan wiedzy na temat występowania efektu Warburga w komórkach nowotworowych. Omówiono wpływ stężenia tlenu na syntezę mleczanu w odniesieniu do aktywności czynników transkrypcyjnych HIF-1 i c-myc. Hipoksja, często występująca w litych guzach nowotworowych, powoduje wzrost aktywności czynnika transkrypcyjnego HIF-1, który pobudza syntezę mleczanu przez aktywację genów transporterów glukozy i enzymów glikolizy z jednoczesnym hamowaniem mitochondrialnego metabolizmu pirogronianu. W wyższych stężeniach tlenu, kiedy HIF-1 jest mniej aktywny i nie pobudza glikolizy, czynnikiem nasilającym efekt Warburga (wzrost stężenia mleczanu) jest czynnik transkrypcyjny c-myc, który przejmuje rolę HIF-1 w aktywacji glikolizy oraz pobudza szlak glutaminolizy będący drugim źródłem mleczanu. Glutaminoliza jest szlakiem przebiegającym z udziałem części enzymów cyklu Krebsa, a więc dostępność tlenu ma istotny wpływ na syntezę mleczanu w tym szlaku.

Należy zaznaczyć, że dotychczasowe badania efektu Warburga prowadzono na komórkach nowotworowych w 21% stężeniu tlenu. Uzyskiwane w tych warunkach wyniki nie muszą jednak odzwierciedlać rzeczywistego przebiegu tego procesu, ponieważ stężenie tlenu nigdy nie osiąga tak wysokich wartości *in vivo*.

Dlatego w pracy doświadczalnej (Graboń i wsp. *Lactate Formation in Primary and Metastatic Colon Cancer Cells at Hypoxia and Normoxia. Cell Biochem Funct.*, 2016; 34: 483-490) oceniano efekt Warburga w komórkach raka jelita grubego (pierwotnego; SW480 i przerzutowego; SW620) hodowanych w fizjologicznych stężeniach tlenu, tj. 1% hipoksji i 10% normoksji tkankowej, oraz dla porównania w 21% normoksji atmosferycznej. Wszystkie hodowle prowadzono bez i w obecności L-Ser - produktu pośredniego glikolizy i L-Asp - produktu glutaminolizy. Poza glukozą i glutaminą podłoża hodowlane nie zawierały innych substratów do syntezy mleczanu. Stwierdzono, że w komórkach SW480 synteza mleczanu była większa w normoksji tkankowej niż w hipoksji, natomiast w komórkach SW620 była zbliżona. W obu fizjologicznych stężeniach tlenu (1% i 10%) proporcje mleczan/glukoza były podobne w obu liniach komórkowych, natomiast w 21% normoksji atmosferycznej zarówno synteza mleczanu, jak i proporcja mleczan/glukoza były znacząco niższe. L-Asp istotnie zwiększał syntezę mleczanu w obu liniach komórkowych w 10% normoksji, jednak proces ten był bardziej nasilony w komórkach SW620 niż w SW480. W obecności L-Asp proporcja mleczan/glukoza była znacząco wyższa w obu liniach komórkowych tylko w 10% normoksji. W przeciwieństwie do L-Asp, L-Ser nie miała wpływu na efekt Warburga w żadnym z badanych stężeń tlenu, co więcej, w 10% normoksji hamowała wpływ wywierany przez L-Asp.

Podsumowując, wykazano, że efekt Warburga jest bardziej nasilony w komórkach raka pierwotnego niż przerzutowego. Większa synteza mleczanu w normoksji tkankowej niż w hipoksji wskazuje, że tlen w zakresie stężeń występujących *in vivo* jest czynnikiem zwiększającym efekt Warburga. W obu typach komórek raka jelita grubego, w 1% hipoksji mleczan jest syntetyzowany głównie z glukozy w glikolizie, natomiast w 10% normoksji tkankowej także z L-Asp w szlaku glutaminolizy. L-Asp nasilając syntezę mleczanu zwiększa więc efekt Warburga w warunkach tlenowych *in vivo*. Uzyskane wyniki wykazały także, że w normoksji atmosferycznej (21%) tlen jest czynnikiem zmniejszającym efekt Warburga. Dlatego, tak wysokie, нефизјологічне стężenie tlenu nie powinno być stosowane w badaniach tego zjawiska.

Anna Kuczyńska-Kunin

Graboń