

Streszczenie

Proces metylacji cytozyny, katalizowany przez metylotransferazy DNA, jest kluczowym procesem epigenetycznym, którego markerem jest 5-metylocytozyna. Proces aktywnej demetylacji DNA, w części kontrolowany przez białka Tet, odpowiada za hipometylację DNA. Uważa się, że globalna hipometylacja, jak również hipermetylacja niektórych obszarów DNA, może przyczyniać się do odpowiednio: aktywacji proto-onkogenów oraz wyciszenia genów supresorowych w komórkach nowotworowych.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące poziomu 2-ketoglutaranu (2-KG), L-, D-2-hydroksyglutaranu (L-, D-2-HG) oraz witaminy C, potencjalnych modulatorów aktywności białek Tet, z wykorzystaniem modelu chorób jelita grubego. Model ten wybrano ze względu na możliwość przeanalizowania progresji zmian klinicznych od przewlekłych stanów zapalnych, poprzez łagodne zmiany rozrostowe (polipy) do nowotworu (colorectal cancer, CRC). W literaturze brak jest wyników badań eksperymentalnych testujących możliwość zastosowania ilościowych oznaczeń 2-KG/2-HG w osoczu/moczu jako markera chorób jelit.

Do zrealizowania celów badawczych opracowano, zwalidowano oraz zoptymalizowano metody ilościowe do analiz poziomu metabolitów w osoczu, moczu oraz homogenatach tkankowych (fragment guza oraz margines chirurgiczny), z wykorzystaniem ultrasprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV, MS/MS.

Niniejsza praca doktorska w sposób ilościowy charakteryzuje dorosłe osoby, pod kątem „fizjologicznego” poziomu 2-ketoglutaranu i witaminy C w osoczu oraz L-, D-2-hydroksyglutaranu w osoczu i moczu. Zachodzi słaba korelacja na poziomie $r=0.3992$, $p=0.012$, $n=39$, pomiędzy zawartością 2-KG w guzie i tkance zdrowej, brak natomiast jakiegokolwiek zależności pomiędzy osoczymym a wewnątrzkomórkowym poziomem 2-KG, który może być własnością osobniczą. Obniżony istotnie poziom 2-KG w osoczu pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit względem pozostałych grup badanych może mieć związek z jego nadmiernym zużyciem w obliczu zmian jakie zachodzą w przebiegu cyklu Krebsa w warunkach hipoksji oraz przewlekłego stanu zapalnego.

O ile poziom D-2HG w osoczu/moczu nie różni się istotnie między badanymi grupami, i można uznać, że zmierzono jego fizjologiczne stężenie, które pozostaje w zgodzie z danymi literaturowymi (z wyjątkiem dwóch pacjentów z polipem i CRC, którzy wykazują jego spektakularny poziom, i u których można podejrzewać występowanie mutacji w obrębie genów *IDH* lub *2-HGDH*), to stwierdzono istotnie wyższe stężenie L-2HG w moczu i osoczu pacjentów z CRC w odniesieniu do grupy kontrolnej. Zachodzi silna

dotatnia korelacja pomiędzy poziomem L-2HG w osoczu i moczu $r=0.6084$, $p<0.001$, $N=82$ oraz umiarkowana dodatnia korelacja pomiędzy poziomem L-2HG i D-2HG, zarówno w osoczu ($r=0.4516$, $p<0.001$, $N=82$), jak i w moczu ($r=0.5746$, $p<0.001$, $N=82$). Poziom witaminy C w osoczu najwyższy stwierdzono w grupie kontrolnej, a najniższy u pacjentów z CRC.

Na podstawie doniesień literaturowych można przypuszczać, że rola D-2HG sprowadza się wyłącznie do słabej inhibicji kompetycyjnej 2-ketoglutaro-zależnych dioksygenaz (2-KGDO), jak np. enzymy Tet lub PHDs. L-2HG oprócz pełnienia funkcji słabego inhibitora 2-KGDO, można przypisać dodatkową funkcję w adaptacji komórek do warunków hipoksji polegającej na stabilizowaniu HIF1 poprzez hamowanie PHDs. Całkiem prawdopodobne, że łatwiej „uchwycić” hamujący wpływ D-2HG na enzymy z rodziny Tet, aniżeli L-2HG, którego działanie jest wielokierunkowe.

Po wycięciu z DNA, zmodyfikowane zasady/nukleozydy są uwalniane do krwioobiegu i ostatecznie pojawiają się w moczu. W odniesieniu do onkometabolitu 2-HG, zachodzi silna ujemna korelacja pomiędzy stężeniem D-2HG w osoczu a poziomem 5-hmCyt w moczu, zarówno dla kontroli jak i CRC (odpowiednio $r=-0.6357$, $p=0.001$, $N=23$ oraz $r=-0.6064$, $p=0.037$, $N=12$).

Im wyższe stężenie D-2-HG w osoczu, który prawdopodobnie zostaje „uwolniony” z komórek do krążenia, tym mniej 5-hmCyt pojawia się w moczu. Wskazuje to na hamowanie przez D-2-HG/konkurowanie 2-HG z 2-KG o miejsce aktywne enzymów Tet odpowiedzialnych za utlenienie 5-mCyt do 5-hmCyt. Do krążenia uwalniane jest w wyniku naprawy mniej 5-hmCyt, co znajduje odzwierciedlenie w poziomie tego parametru w moczu.

Słowa kluczowe: choroby jelita grubego, epigenetyka, aktywna demetylacja DNA, metabolity komórkowe, UPLC-MS/MS/UV.

diaryjne doświadczenia