

Abstract in Polish

Obecnie otyłość staje się narastającym problemem zdrowotnym, który dotyka zarówno dorosłych, jak i dzieci. Zwiększona objętość tkanki tłuszczowej prowadzi do nasilonego wyrzutu wolnych kwasów tłuszczowych oraz glicerolu do osocza, co z kolei skutkuje akumulacją aktywnych biologicznie lipidów w wątrobie oraz mięśniach szkieletowych. Nagromadzone w tkankach krople tłuszczu korelują z rozwojem insulinooporności oraz cukrzycy typu drugiego. Akwaporyny (AQP) są białkami o charakterze transporterów cząsteczek wody oraz innych małych, obojętnych związków. Pośród nich na uwagę zasługuje obecna w wątrobie AQP9, która jest transporterem nadtlenu wodoru oraz glicerolu. Wstępne badania proteomiczne tkanki wątrobowej pobranej od otyłych donorów bez cukrzycy, z nietolerancją glukozy (IGT) oraz z cukrzycą typu drugiego (T2D) wykazały zwiększoną ekspresję białek powiązanych z akumulacją kropli tłuszczu m. in. FABP4 i FABP5. Ponadto zaobserwowano nadekspresję białek zaangażowanych w odpowiedź antyoksydacyjną, co wskazuje na obecność zwiększonego stresu oksydacyjnego w tkankach donorów z IGT oraz T2D. Dodatkowo, u pacjentów z IGT oraz T2D wykryto zwiększoną ekspresję AQP9, co może sugerować istotną rolę tego białka w patogenezie T2D. Aby zbadać rolę modulacji ekspresji AQP9 w akumulacji lipidów wątrobowych, opracowano model badawczy z wykorzystaniem stymulowanych kwasami tłuszczowymi, glicerolem i insuliną komórek wątrobowych linii HepG2. Wspomniany powyżej model wykazał, iż wyciszenie AQP9 zapobiega akumulacji kropli tłuszczu w komórkach HepG2, co podkreśla kluczową rolę tego białka w tym procesie. Z drugiej strony, nie wykazaliśmy wpływu AQP11 na wewnątrzkomórkową akumulację kropli tłuszczu. Ponadto, nadekspresja AQP9 prowadziła do apoptozy komórek spowodowanej zwiększoną akumulacją lipidów. Nagromadzenie lipidów ogranicza zdolność komórki do transportu nadtlenu wodoru poprzez kanały akwaporynowe oraz prowadzi do nagromadzenia się tego związku w siateczce śródplazmatycznej (ER) i rozwoju stresu oksydacyjnego. Co więcej, poprzez obserwację redukcji HyPer zlokalizowanego w ER, wykazano obecność mechanizmów redukcyjnych. W celu analiz próbek eksperymentalnych oraz klinicznych stworzono dwie strategie niecelowanych analiz DIA. Pierwsza bazuje na bibliotece jonowej stworzonej w oparciu o frakcjonowanie peptydów w środowisku zasadowym (high pH fractionation; HpH-DDA) oraz analizie próbek badanych z wykorzystaniem zmiennej szerokości okien akwizycji (variable window width; VWW-DIA). Metoda ta będąca obecnie złotym standardem w oznaczeniach DIA, jest czaso- i pracochłonna długotrwały proces opracowania biblioteki jonowej. Drugie podejście opiera się głównie na analizie bioinformatycznej, z wykorzystaniem biblioteki jonowej opartej o frakcjonowanie w fazie gazowej (gas-phase fractionation; GPF-Hybrid) oraz analizie próbek z wykorzystaniem nakładających się okien akwizycji (staggered windows; STW DIA). Obie strategie pozwalają uzyskać zbliżone wyniki, jednakże to GPF-Hybrid + 40STW jest bardziej efektywna z punktu widzenia wymaganych zasobów. Analizy DIA przeprowadzone na komórkach HepG2 z zmienioną ekspresją AQP9 potwierdziły zasadniczą rolę tego białka w akumulacji lipidów, sugerując, iż AQP9 może zostać wykorzystana jako potencjalny cel molekularny zabiegający rozwojowi indukowanej lipidami insulinooporności w wątrobie. Podsumowując, w niniejszym badaniu zrealizowano kilka celów. Po pierwsze, określono wpływ AQP9 na akumulację lipidów oraz homeostazę stresu oksydacyjnego w komórkach HepG2. Po drugie opracowano nowatorskie podejście proteomiczne LC/MS do analizy próbek eksperymentalnych oraz klinicznych w aspekcie przeciążonych lipidami hepatocytów.