

**MECHANISMY PŮSOBENÍ  
MASTNÝCH KYSELIN VE STŘEVĚ A JEJICH  
VZTAH K ZÁNĚTLIVÝM A NEOPLASTICKÝM  
ONEMOCNĚNÍM**

**Laboratoř  
cytokinety**

**Biofyzikální ústav AVČR, BRNO**

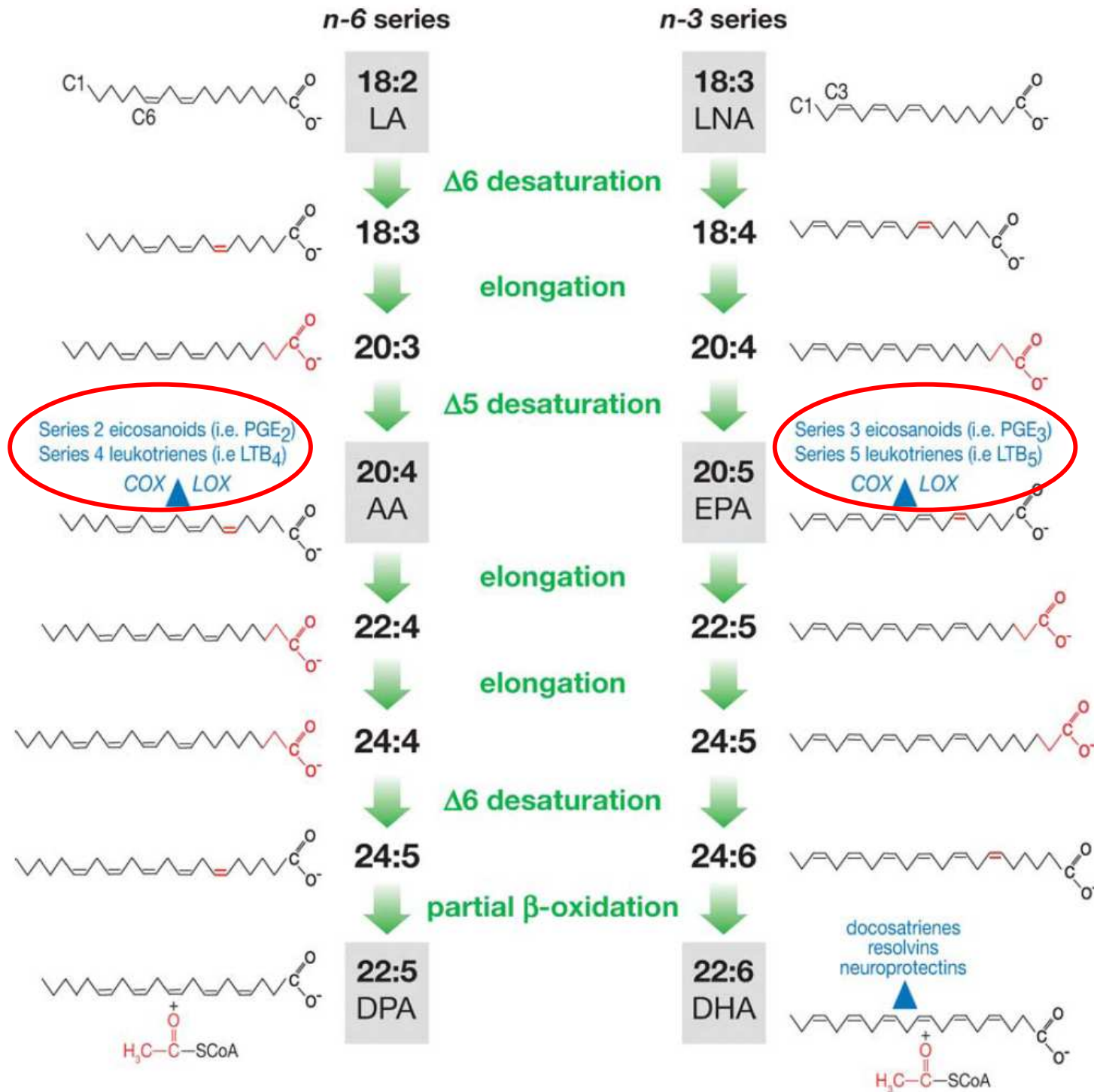
**TUKY Z POTRAVY z potravy ovlivňují počátek a rozvoj řady onemocnění** včetně nádorových. Existují v zásadě dvě úrovně ovlivnění:  
**změny složení mastných kyselin (MK) v buněčných membránách**  
**přímá kontrola procesů v jádře na úrovni transkripce genů**  
**n-3 a n-6 PUFA** jsou metabolicky i funkčně odlišné. Jejich rovnováha je důležitá pro homeostázu a normální vývoj. Efekty jsou pleiotropní.

Zatímco proteiny jsou geneticky determinovány, složení buněčné membrány s ohledem na lipidy (a tím i řada buněčných funkcí jako je aktivita membránových enzymů a přenašečů, vazba hormonů, mechanismy signálové transdukce) je z velké části závislé na příjmu z potravy. n-3 a n-6 PUFA mohou účinně a přímo řídit transkripci specifických genů (např. geny kódující lipogenní proteiny, delta desaturázy atd.).

Tak může příznivý a nepříznivý účinek tuků na různé choroby zahrnovat kombinaci interaktivních regulačních mechanismů:

- ▶ **akutní, rychlá a přímá regulace exprese genů**
- ▶ **dlouhodobá adaptivní modulace složení membrán, která může přímo ovlivnit příjem a přenos signálů hormonů, cytokinů, produkci eikosanoidů apod.**

Během průmyslové revoluce se drasticky poměr n-6:n-3 PUFA. V tzv. západní dietě je dnes místo 1:1 až 10-25:1.



# Složky lipidového metabolismu v buněčných signalizacích

## Mediátory a modulátory

Biofyzikální vlastnosti membrán

### Lipidový metabolismus

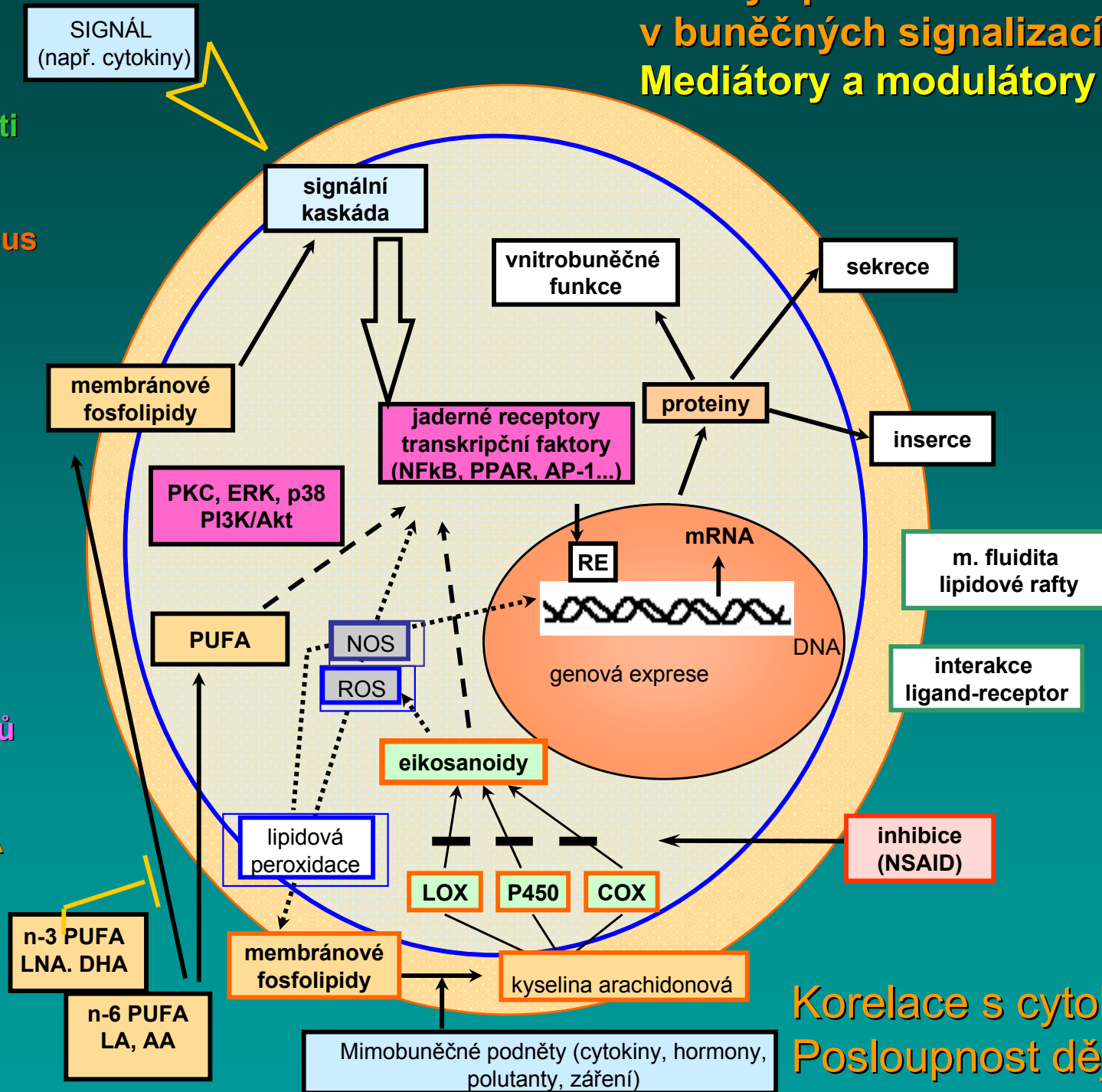
Aktivace fosfolipáz  
Uvolňování a metabolizace AA  
eikosanoidy

Oxidativní metabolismus

### Transdukce signálů

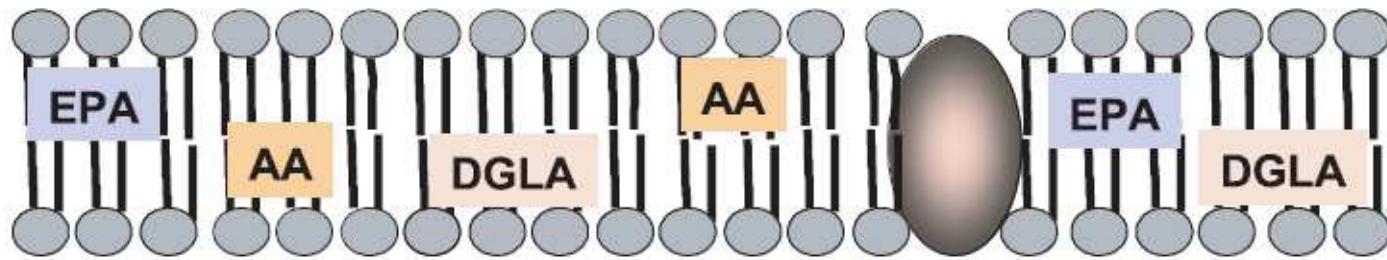
(kinázy, fosfatázy)  
Aktivace membrán. i vnitrobun. receptorů – tr. faktorů

Expres proteinů  
Expres genů - mRNA



Korelace s cytokinetikou  
Posloupnost dějů

membrane bilayer



Phospholipase A2



Cyclooxygenase (COX)

5 and 15 Lipoxygenases

Cyclooxygenase

Cyclooxygenase

5 and 15 lipoxygenases

Prostaglandins series 1

Leukotrienes and Lipoxins series 4

Eicosanoids series 2

Eicosanoids series 3

Leukotrienes and Lipoxins series 5

## Phospholipid structure and the orientation of phospholipids in membrane

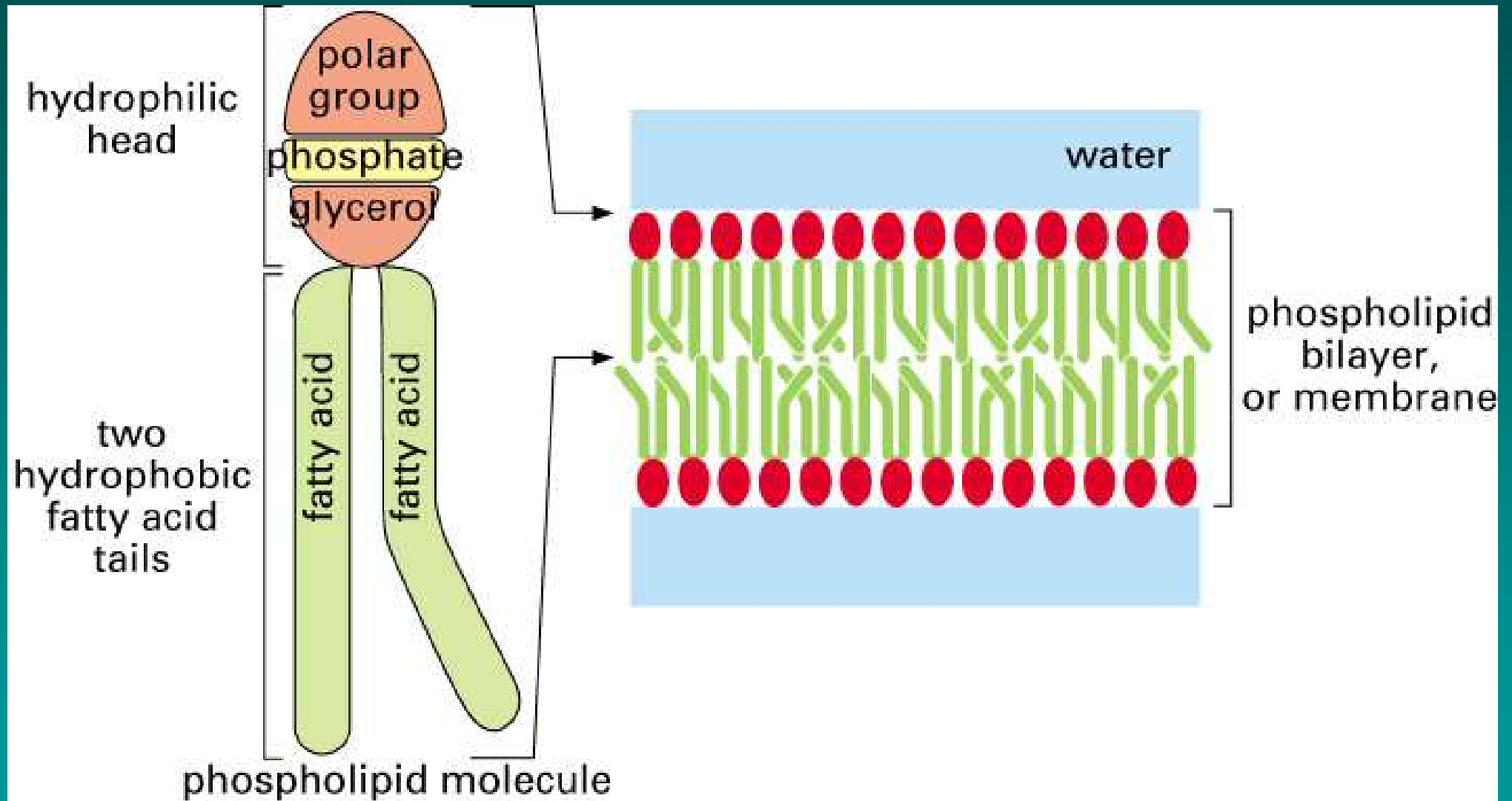
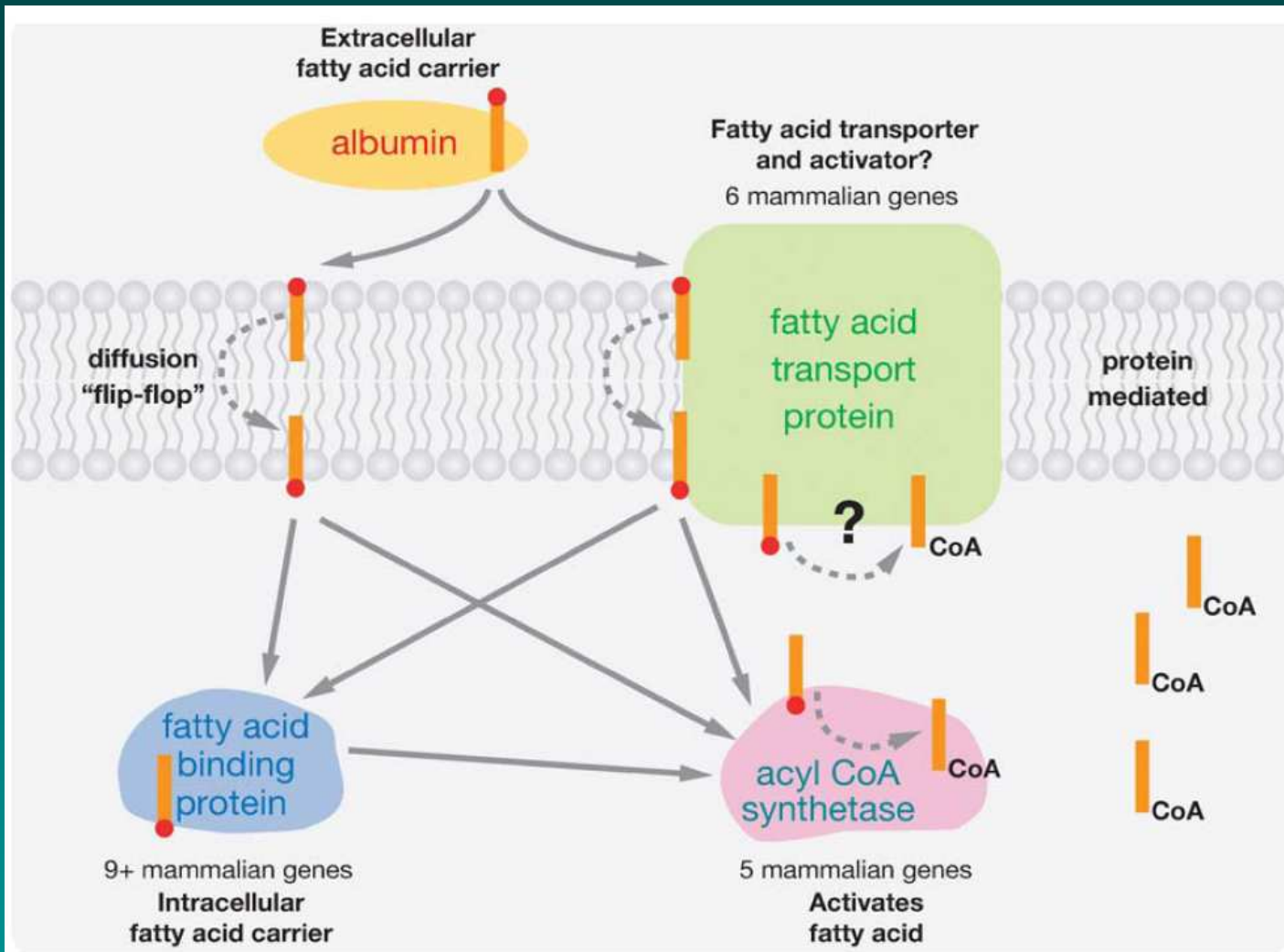


Figure 2-22. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

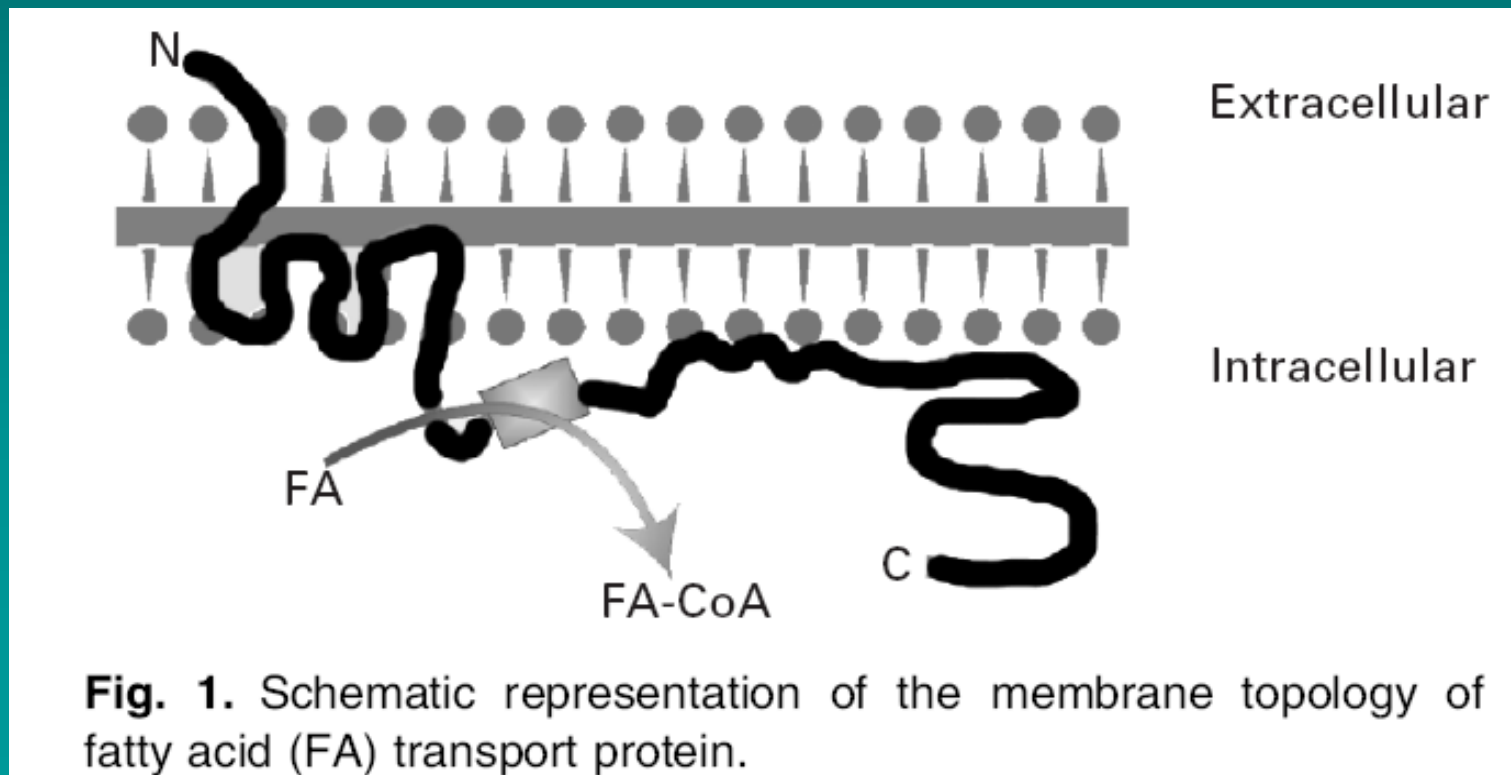


Proposed models for FA internalization in neurons. In the diffusion model of FA internalization, FAs are released from albumin and, owing to their hydrophobicity, partition into the outer leaflet of the plasma membrane. The FAs then "flip-flop" from the outer leaflet to the inner leaflet of the plasma membrane, where they can dissociate or be extracted by FABPs or Acsl proteins. FAs bound to FABPs are ultimately transferred to Acsl proteins, which catalyze the reaction that converts the free FAs to their CoA derivative. The FA-CoA cannot repartition into the membrane owing to the presence of the hydrophilic CoA. Additionally, FA internalization may be mediated by FATPs. FATPs may increase the rate or efficiency of FA "flip-flop" or increase FA stability in the inner leaflet, which increases the opportunity for FAs to interact with either FABPs or Acsl proteins. It remains controversial whether FATPs themselves convert the FAs to their FA-CoA derivative.

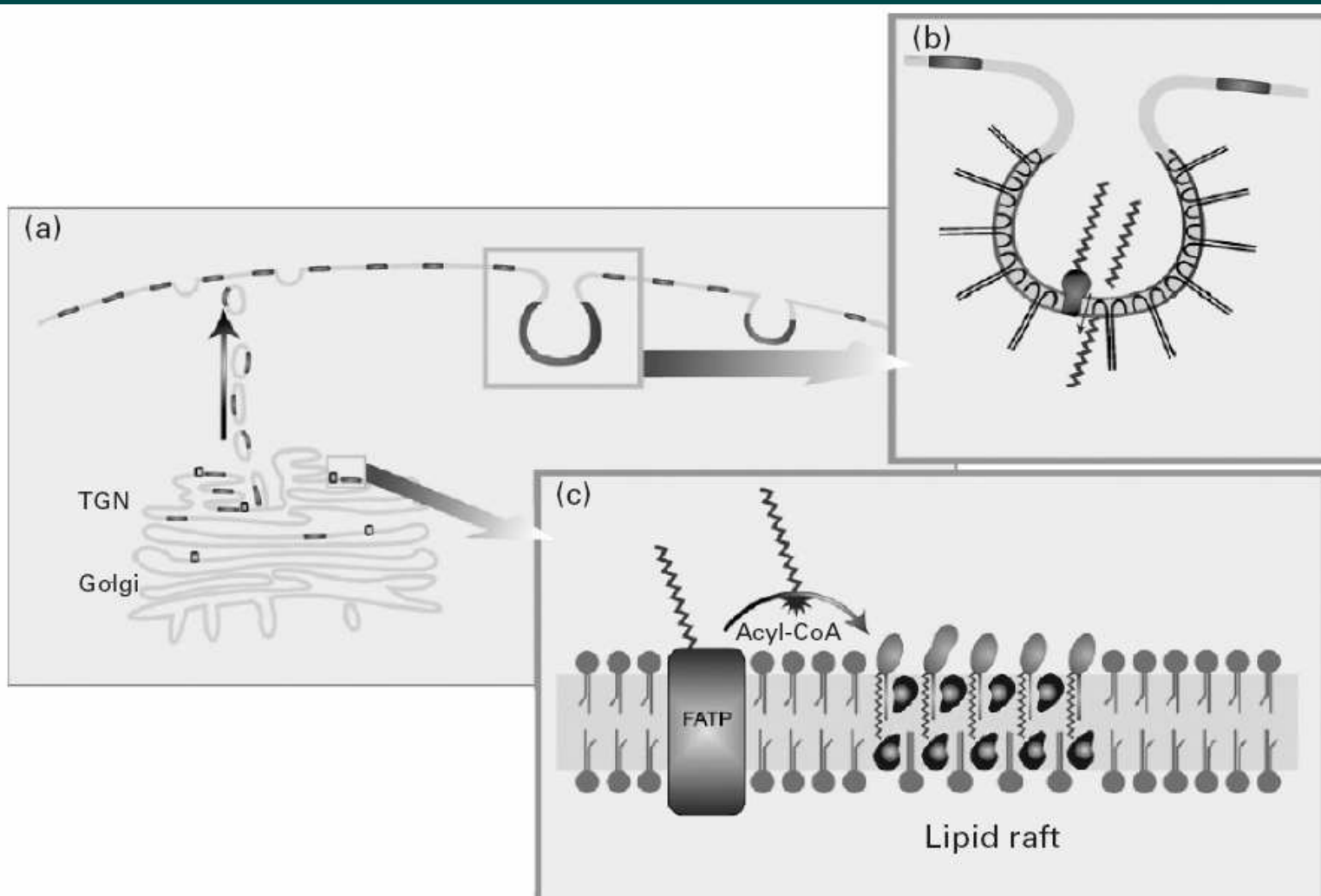
# FATTY ACID TRANSLOCASE (FAT/CD36)

Protein v plasmatické (mitochondriální?) membráně  
CD36 – multifunkční adhezní receptor pro trombospodin a collagen a scavenger receptor pro LDL exprimovaný na plateletech, monocytech ale i jiných typech buněk.

Nově prokázána funkce při transportu VNMK i jeho přítomnost v buňkách gastrointestinálního traktu (Lobo MVT et al., J Histochem Cytochem 2001, Campbell SE et al, J Biol Chem 2004, Drover VA, J Clin Invest 2005)

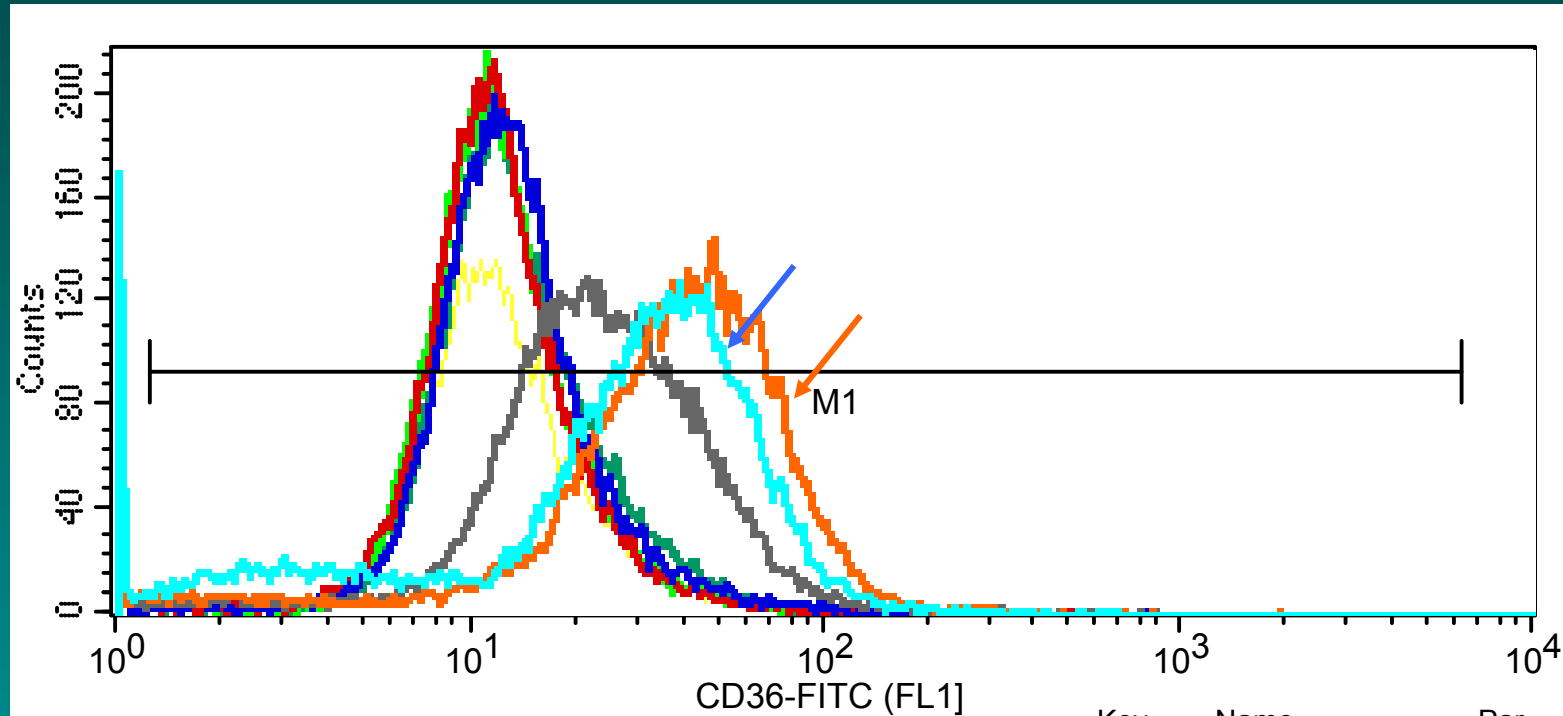






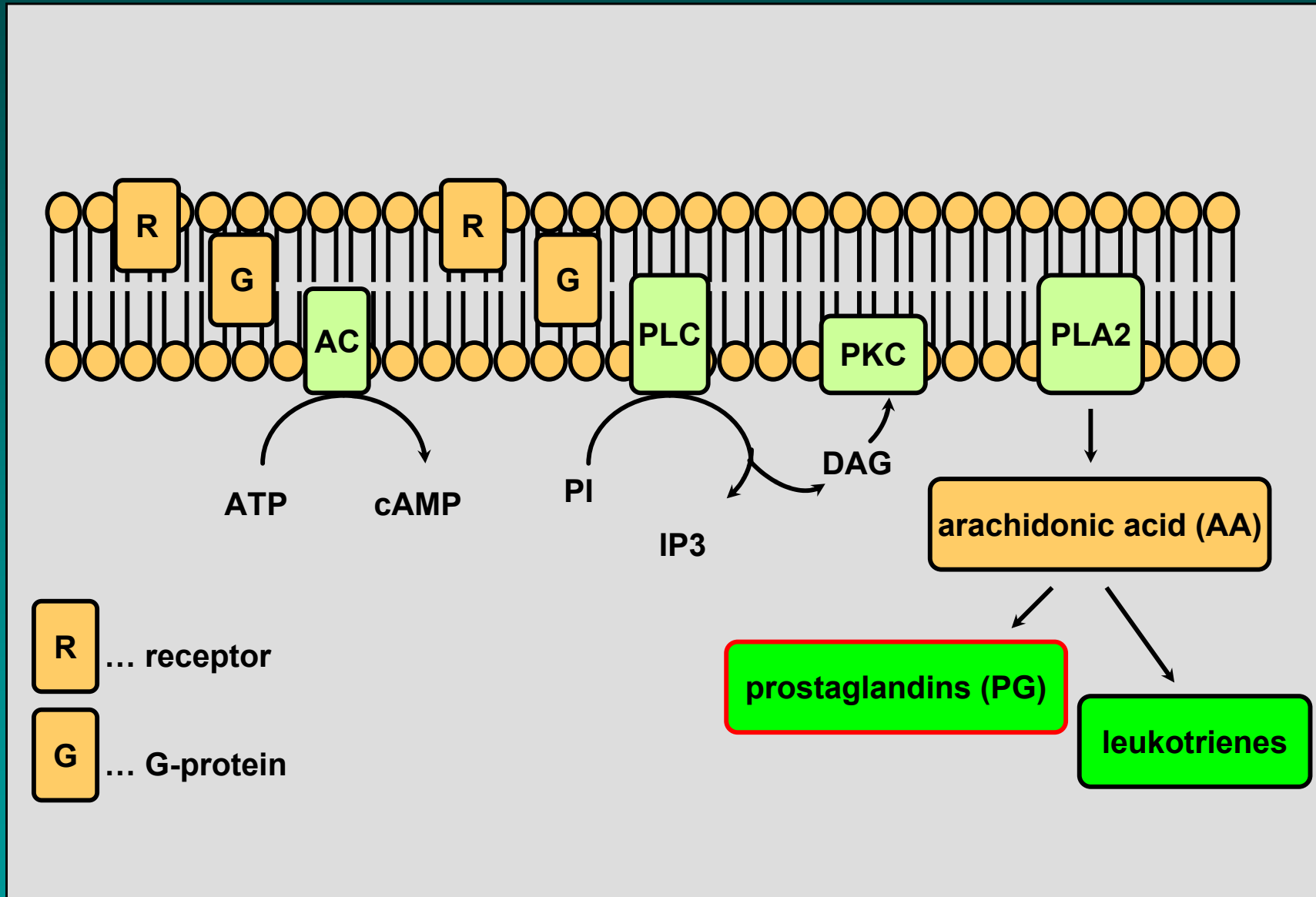
**Fig. 3.** Proposed model for cellular fatty acid uptake. Fatty acid transport protein (FATP, □), stabilization of lipid rafts (—) by acylated very-long-chain fatty acids (VLCFA) and fatty acid translocase (FAT)/CD36 incorporation into lipid rafts could cooperate to facilitate efficient long-chain fatty acid (LCFA) uptake. Intracellular VLCFA are esterified to their acyl-CoA and thereafter bound to sphingolipids in the outer leaflet of the biomembrane of lipid rafts. This process might indirectly facilitate ‘on-demand’ recruitment of FAT/CD36 from an intracellular compartment to lipid rafts located on the plasma membrane and result in augmented uptake of LCFA. TGN, trans-Golgi network; (⌈⌋), caveolins; (●), fat; (~~~~~), fatty acid; (⌈), phospholipid; (●), cholesterol; (⌈), sphingolipid.

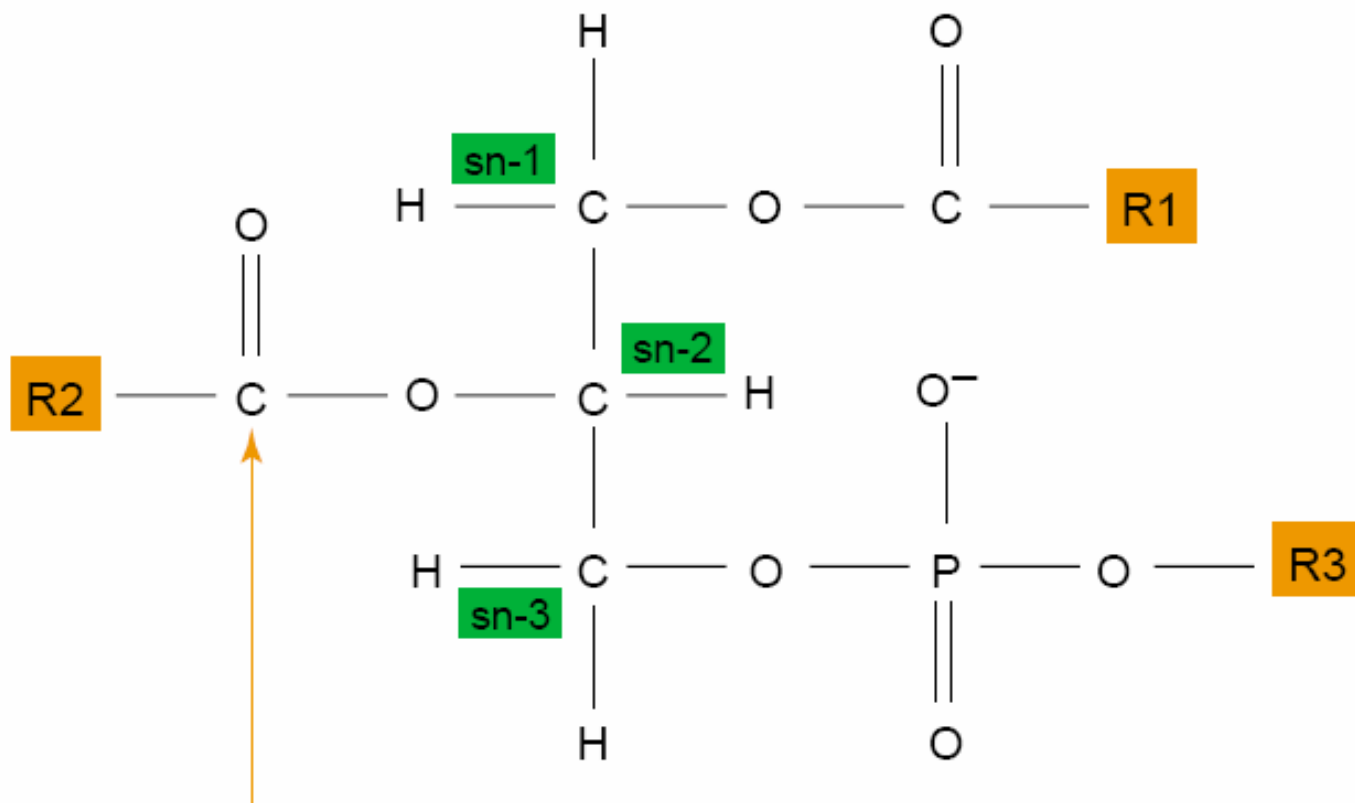
## Expression of CD36 antigen in HCT116 cells after treatment with AA, DHA, NaBt or their combinations



Key	Name	Par
—	iso control	FL1
—	control	FL1
—	control et	FL1
—	AA50	FL1
—	DHA50	FL1
—	NaBt3	FL1
—	AA50+NaBt3	FL1
—	DHA50+NaBt3	FL1

# Přenos signálu

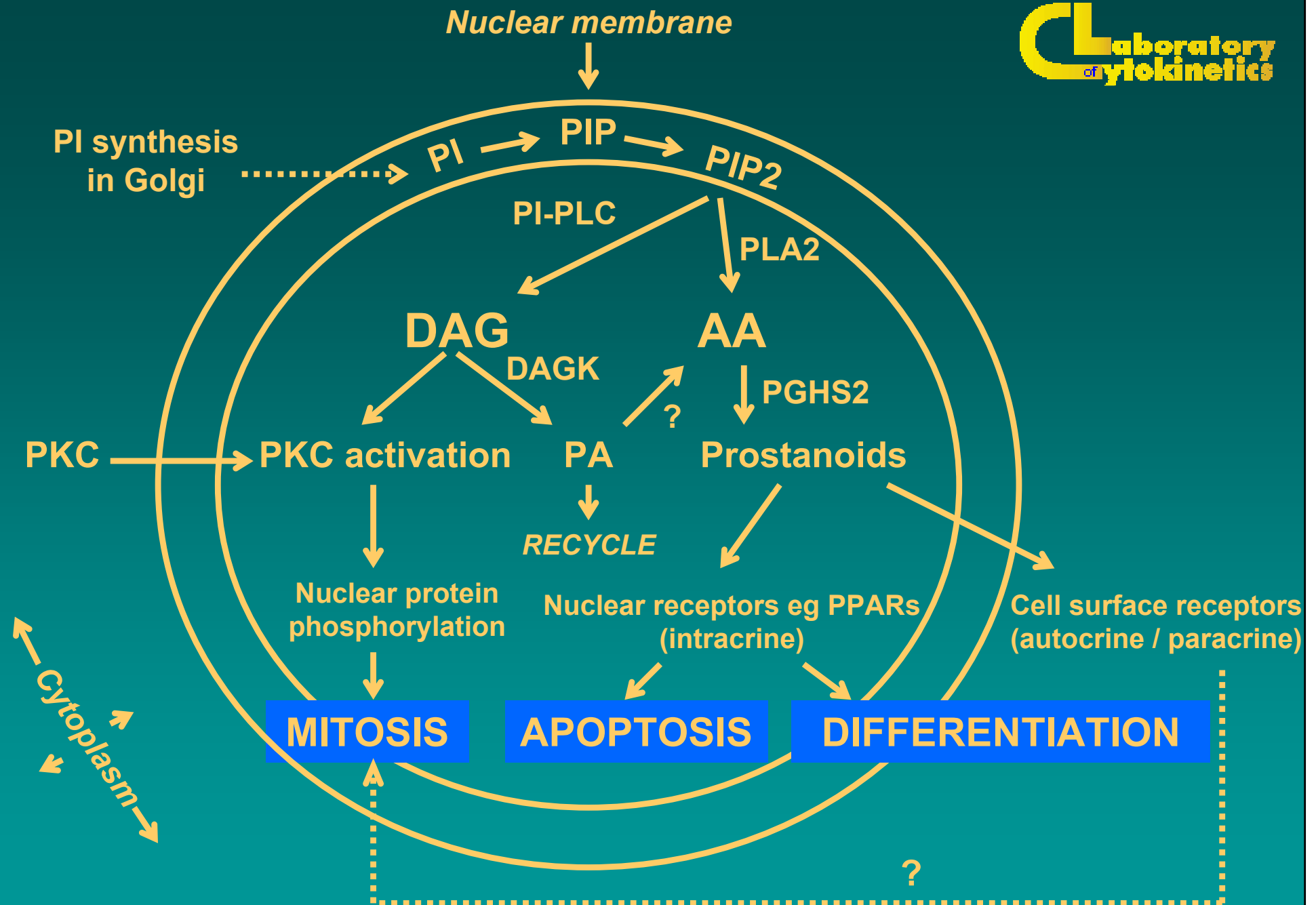




Phospholipase A<sub>2</sub>

*Drug Discovery Today*

**Figure 1.** Phospholipid structure with phospholipase A<sub>2</sub> cleavage site.



**Předpokládaný mechanismus přenosu signálů v jádře**

# Fosfolipáza A2

Enzym účastnící se lipidového metabolismu, důležitý pro řadu buněčných procesů.

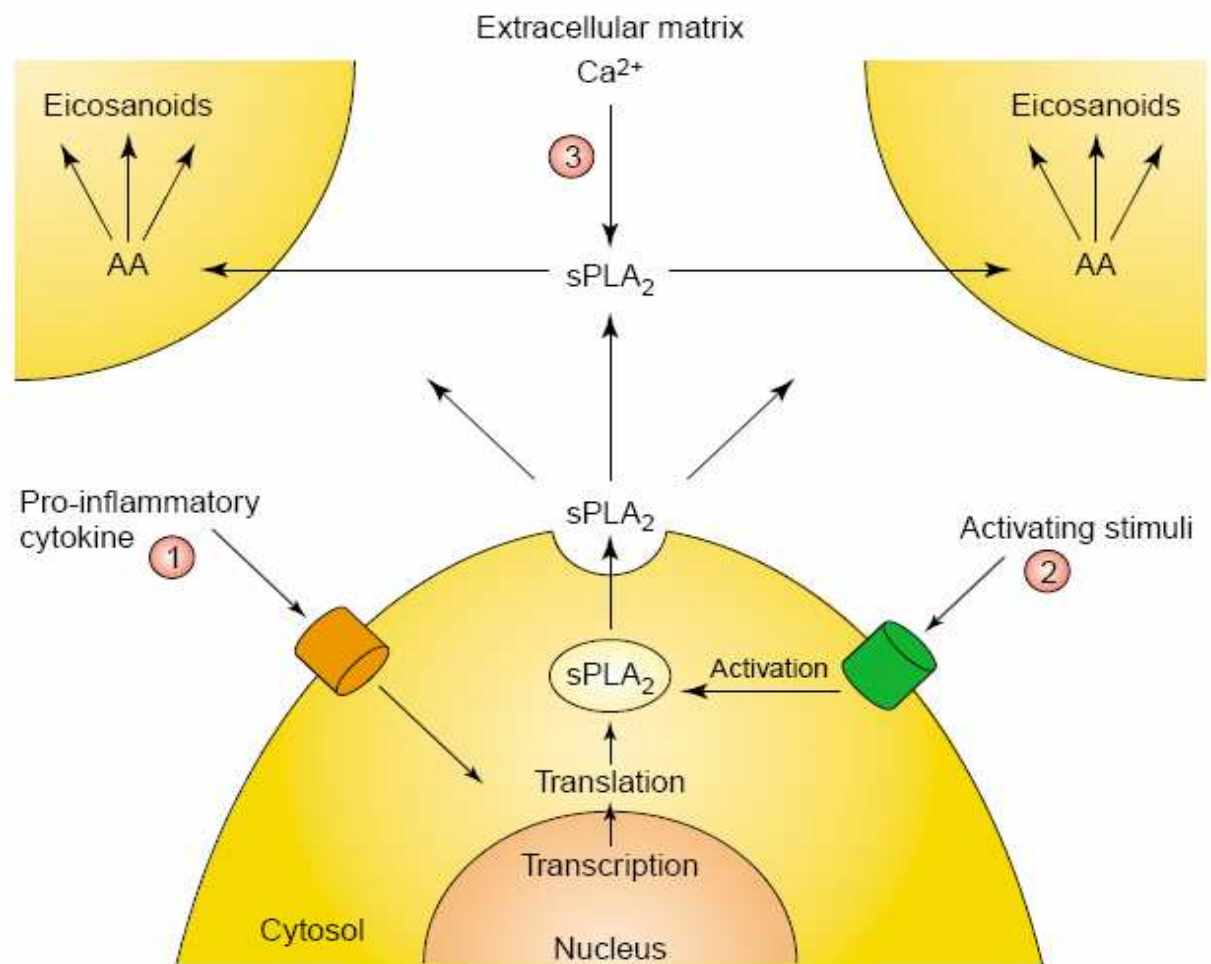
Tři skupiny:

- ▶ sekretovaná PLA2 (sPLA2),
- ▶ na vápníku nezávislá PLA2 (iPLA2),
- ▶ na vápníku závislá cytosolová PLA2 (cPLA2).

Kromě úlohy v buněčném signálování souvisejí PLA2 s různými patologickými stavy, včetně zánětu, tkáňové reparační a nádorů.

U řady nádorů jsou hladiny sPLA2 a cPLA2 zvýšeny.

PLA2 jsou také cílem protinádorové terapie

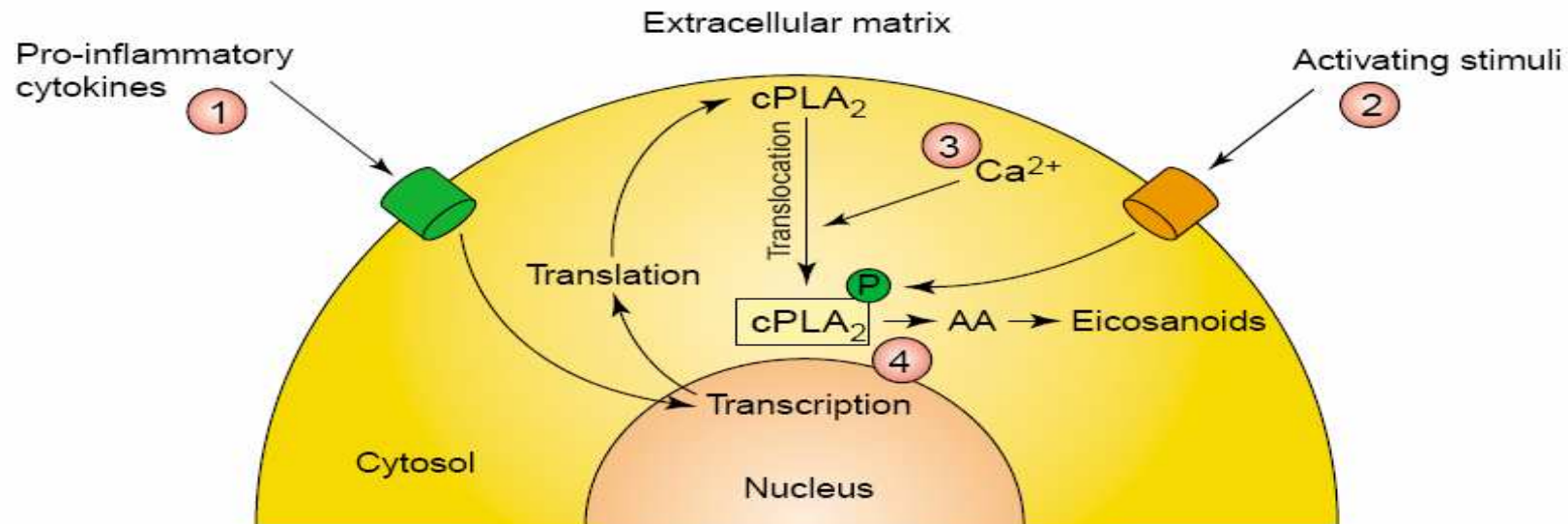


*Drug Discovery Today*

**Figure 2.** sPLA<sub>2</sub> participating in an inflammatory response. (1) Pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) or interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) induce cellular expression of sPLA<sub>2</sub>. (2) Activating factors cause release of sPLA<sub>2</sub> from secretory granules into the extracellular matrix. (3) In the presence of millimolar concentrations of Ca<sup>2+</sup>, sPLA<sub>2</sub> hydrolyzes membrane-bound phospholipids of neighbouring cells. Released fatty acids, such as arachidonic acid, are further metabolized into eicosanoids, generating an inflammatory response in neighbouring cells.

## sPLA<sub>2</sub> v zánětlivé odpovědi

Prozánětlivé cytokiny indukují expresi sPLA<sub>2</sub>. Aktivační faktory uvolňují sPLA<sub>2</sub> ze sekrečních granul do ECM. Za přítomnosti Ca<sup>2+</sup> sPLA<sub>2</sub> hydrolyzuje membránové fosfolipidy sousedních buněk. Uvolnění AA a následná tvorba eikosanoidů indukuje zánět.



*Drug Discovery Today*

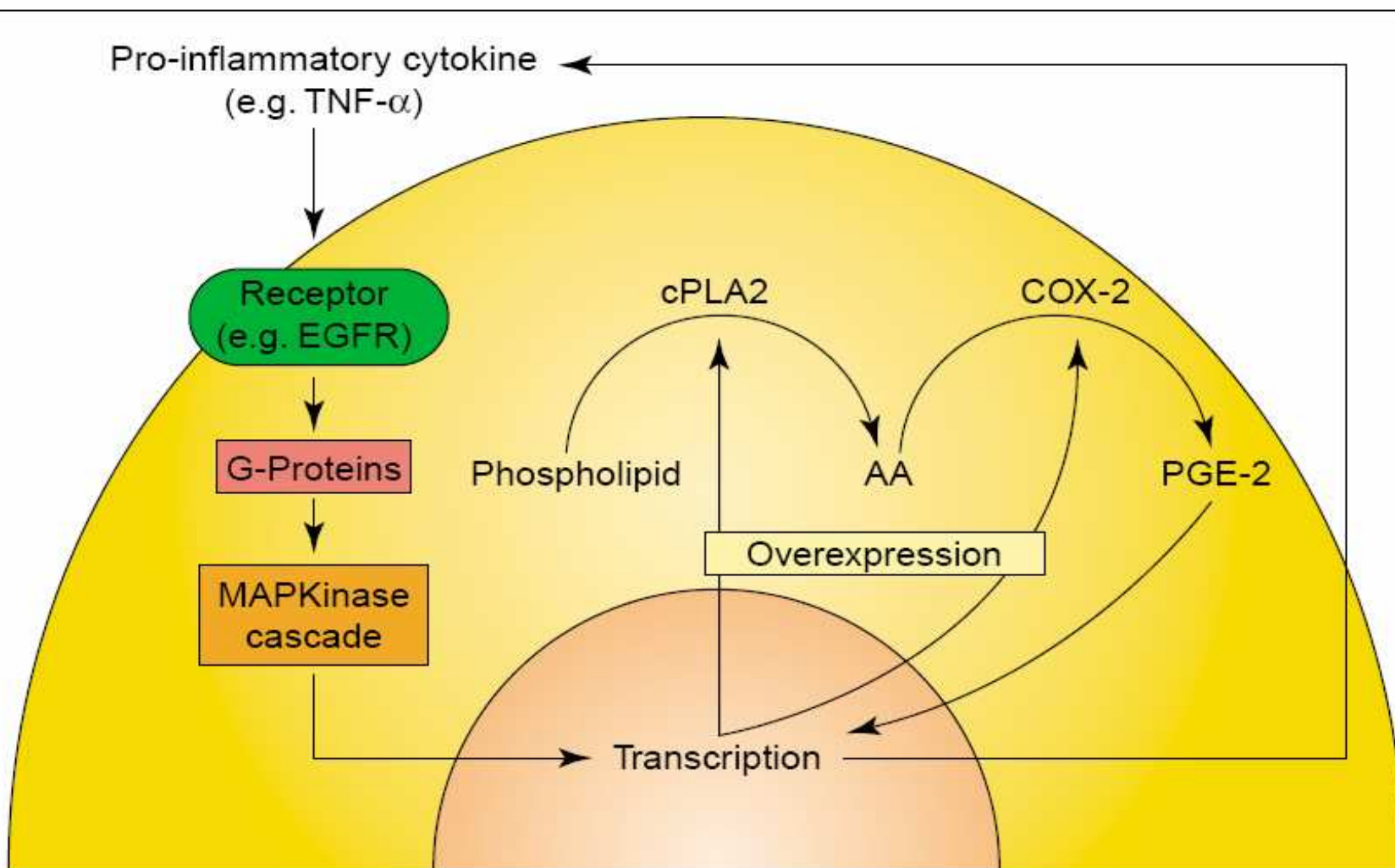
**Figure 3.** Activation of cPLA<sub>2</sub>-α. (1) Pro-inflammatory cytokines including tumour necrosis factor α induce expression of cPLA<sub>2</sub>-α. (2) Activation leads to mitogen-activated protein kinase-pathway-directed phosphorylation of cPLA<sub>2</sub>-α. (3) Extracellular influx or mobilization of intracellular stores of Ca<sup>2+</sup> bring about cPLA<sub>2</sub>-α translocation from the cytosol to perinuclear membranes. This brings cPLA<sub>2</sub>-α in close proximity to both its substrate and enzymes involved with eicosanoid synthesis. (4) Activated cPLA<sub>2</sub>-α lyses membrane phospholipids providing arachidonic acid (AA) to a range of enzymes involved with eicosanoid synthesis, specifically COX and LOX.

### Aktivace cPLA<sub>2</sub>

Prozánětlivé cytokiny indukují expresi cPLA<sub>2</sub>. Následuje fosforylace zprostředkovaná MAP kinázami. Ca<sup>2+</sup> způsobuje translokaci cPLA<sub>2</sub> z cytosolu do perinukleární membrány, kde je také její substrát a enzymy nutné k tvorbě eikosanoidů. Aktivovaná cPLA<sub>2</sub> lyzuje membránové fosfolipidy a uvolňuje AA, která je metabolizovaná COX a LOX.



## Model konstitutivní overexprese cPLA<sub>2</sub> a COX-2 u nádorových buněk



*Drug Discovery Today*

**Figure 4.** Model of constitutive overexpression of cPLA<sub>2</sub> and COX-2 in tumour cells (reviewed in [4]).

# ZMĚNY BIOFYZIKÁLNÍCH VLASTNOSTÍ BUNĚČNÝCH MEMBRÁN

- ▶ provázejí procesy diferenciaci a apoptózy savčích buněk
- ▶ pozorovány rozdíly u
  - nádorových a normálních buněk
  - nádorových buněk senzitivních a rezistentních k cytostatikám
- ▶ souvisejí do značné míry s modulacemi ve složení, struktuře, symetrii a metabolismu buněčných lipidů.

Detekce těchto změn  
a jejich korelace s dalšími parametry  
odrážejícími diferenciaci a apoptózu  
přispívá k objasnění



- posloupnosti a regulace jednotlivých kroků těchto dějů
- rozdílů mezi normálními a nádorovými buňkami
- příčin rezistence nádorových buněk k terapii

# PARAMETRY DETEKOVANÉ v LC

- ◆ strukturální změny lipidů v bun. membránách, tzv. „lipid packing“ (merocyanine 540, FCM)
- ◆ membránový potenciál (DiOC5, FCM)
- ◆ exprese transportního proteinu pro mastné kyseliny - FAT/CD36, MCT1 (FCM)
- ◆ akumulace triglyceridů (lipid droplets) v cytoplazmě buněk (Nile red, FCM)
- ◆ změny mitochondriálního transmembránového potenciálu (TMRE, FCM)
- ◆ produkce reaktivních kyslíkových metabolitů -ROS (DHR-123, FCM)

## CYTOKINETIKA

**Proliferace** - počty buněk, buněčný cyklus, regulační proteiny

**Diferenciace** – aktivita alkalické fosfatázy (ALP), CEA, E-kadherin, F-aktin

**Buněčná smrt (apoptóza)**– viabilita, % plov.buněk, subG0/G1, MMP,

Apo2.7, kaspázy, štěpení PARP, Bcl-2 rodina, morfologie jader (DAPI)...

## DALŠÍ PARAMETRY

- ◆ **Fluidita membrán** – polarizace fluorescence  
TMA-DPH (trimethylammonium diphenylhexatriene)
- ◆ **Analýza fosfolipidů a spektra mastných kyselin**  
Celé buňky, membránová frakce, mitochondrie (kardiolipin)
- ◆ **Detekce specifických typů lipidových molekul**  
(ceramid, eikosanoidy.....)
- ◆ **Lipidový metabolismus** - inhibitory AA, exprese a aktivity spec. enzymů (PLA, COX, LOX,.....),  
Oxidativní metabolismus – produkce ROS, NOS  
peroxidace lipidů,  
glutathion, enzymové aktivity - iNOS, MnSOD atd.

# MEROCYANIN 540 (MC540)

- ▶ Lipofilní, negativně nabitý heterocyklický chromofor m. v. 570 D, používán ve fotodynamické terapii
- ▶ Váže se preferenčně na biologické membrány a lipozomy a je citlivý ke strukturálním změnám lipidů
- ▶ Rozsah vazby a následně intenzita fluorescence je ovlivňována
  - změnou tzv. „lipid packing“
  - membránovým potenciálem
  - přítomnosti séra, pH a iontovou silou

# VYUŽITÍ MC540

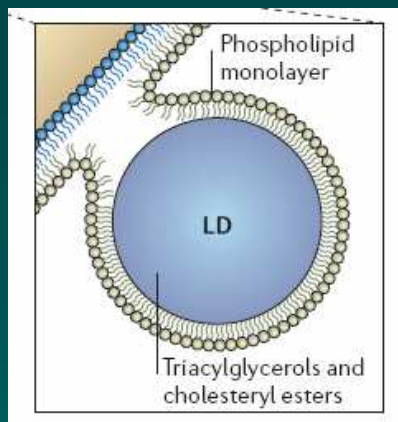
Pomocí MC540 lze monitorovat

- ▶ strukturální změny membránových fosfolipidů (změny asymetrie) během proliferace, diferenciace a apoptózy
- ▶ jemné rozdíly membránových lipidů u podobných buněk (nádorové vs. nenádorové, senzitivní vs. rezistentní)

FL-2

"looser lipid packing" (rozvolňování) ↑ zvýšená fluorescence

"more tight packing" (upevňování) ↓ snížená fluorescence



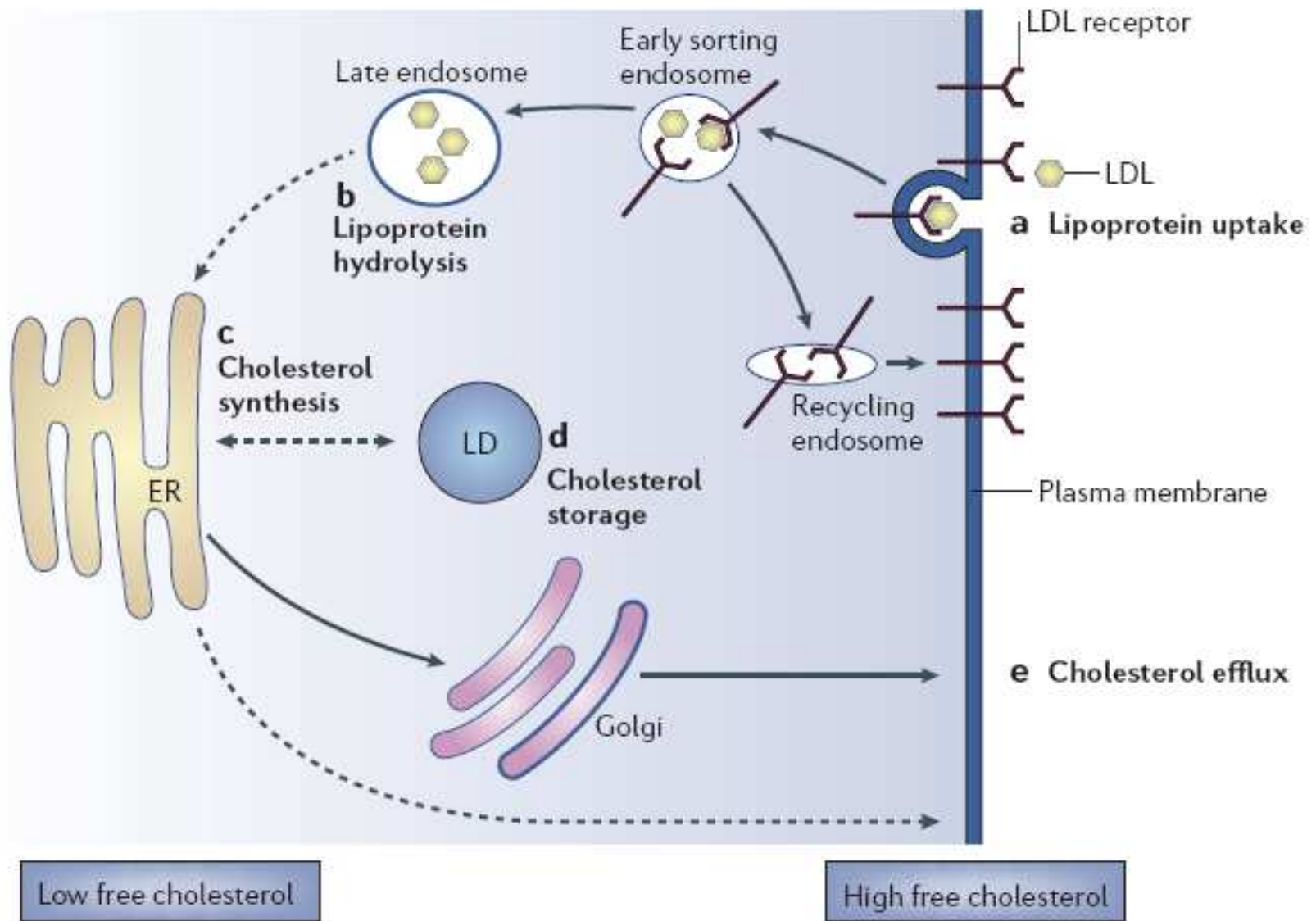
## „LIPID DROPLETS“

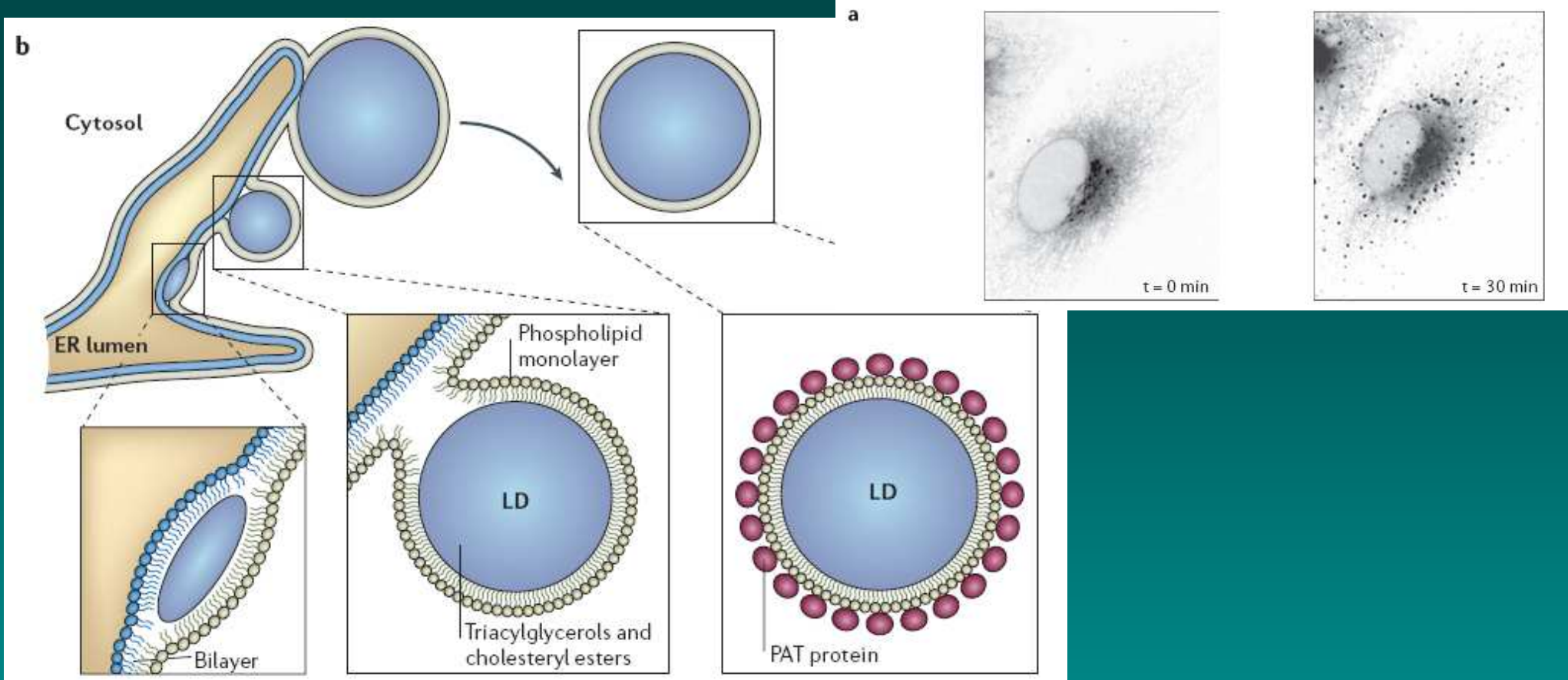
### AKUMULACE LIPIDŮ V CYTOPLAZMĚ Nile Red

- ▶ akumulace lipidových kapének (lipid droplets) v cytoplazmě buněk (působení lipidových látek, indukce diferenciace a apoptózy )
- ▶ obsahují neutrální lipidy (obvykle triacylglyceroly nebo estery cholesterolu)  
za normálních podmínek - zásobárna energie a cholesterolu
- ▶ souvislost s regulací procesů diferenciace a apoptózy není zcela objasněna
- ▶ fluorescenční barvivo Nile Red (FL-1 a FL-3) citlivé vitální barvení lipidových kapének



Box 2 | Intracellular cholesterol regulation





**Figure 1 | The formation of lipid droplets. a** | The formation of lipid droplets (LDs) as monitored by the use of a caveolin-truncation-mutant-green-fluorescent-protein fusion protein (Cav3<sup>DGV</sup>-GFP). Before fatty acid addition (t = 0 min), Cav3<sup>DGV</sup>-GFP localizes to the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi region (the image has been inverted to show dark staining for GFP). After fatty acid addition, LDs appear throughout the cell within minutes (the t = 30 min image is shown here). For a movie of this process, see the Further information. **b** | In the current model of LD formation, neutral lipids are synthesized between the leaflets of the ER membrane. The mature LD is then thought to bud from the ER membrane to form an independent organelle that is bounded by a limiting monolayer of phospholipids and LD-associated proteins. Some of the best understood LD-associated proteins are members of the PAT (perilipin, ADRP and TIP47-related protein)-domain family of proteins. Part a modified with permission from REF. 8 © (2004) The American Society for Cell Biology.

# EXPERIMENTÁLNÍ CÍLE

Detekce změn vlastností buněčných membrán a metabolismu lipidů

po působení

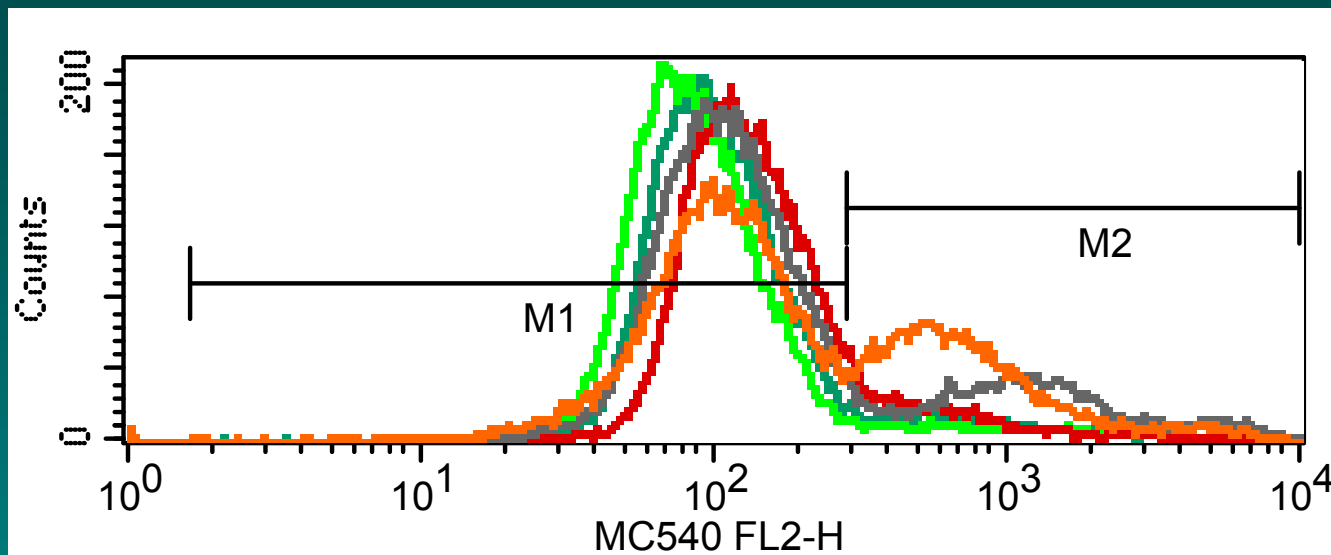
vysoce nenasycených mastných kyselin (AA, DHA),  
butyrátu sodného (NaBt)

V souvislosti s procesy proliferace, diferenciaci a apoptózy

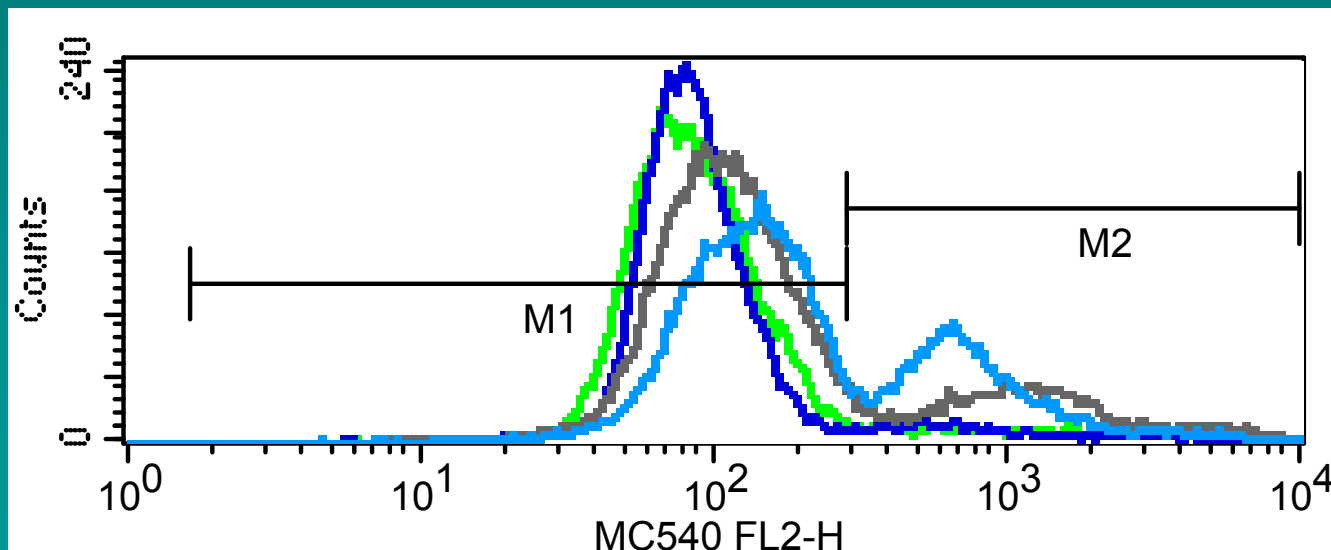
Průtoková cytometrie

FACSCalibur (Beckton Dickinson), argonový laser 488nm  
CellQuest (BD)

# Lipid packing in HCT116 cells after treatment with AA, DHA, NaBt or their combinations



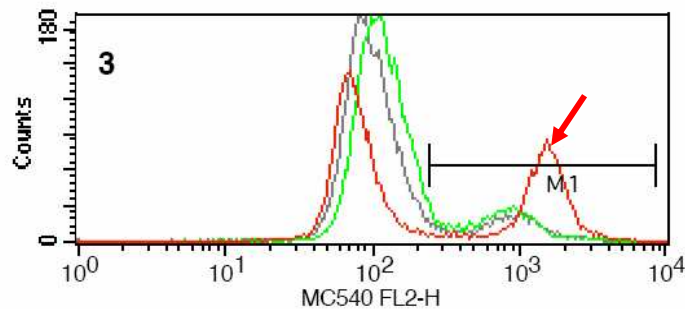
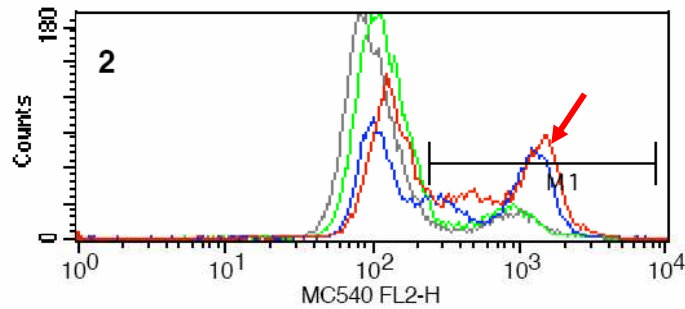
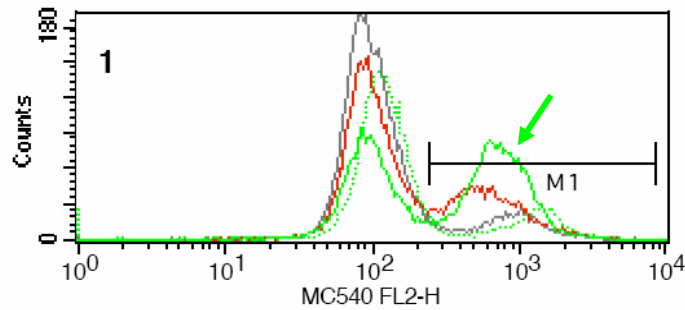
Key	Name	Parameter
—	control	FL2-H
—	control et	FL2-H
—	AA50	FL2-H
—	NaBt3	FL2-H
—	AA+NaBt3	FL2-H



Key	Name	Parameter
—	control et	FL2-H
—	DHA50	FL2-H
—	NaBt3	FL2-H
—	DHA+NaBt3	FL2-H

# Kombinace MK s TNF a CH11

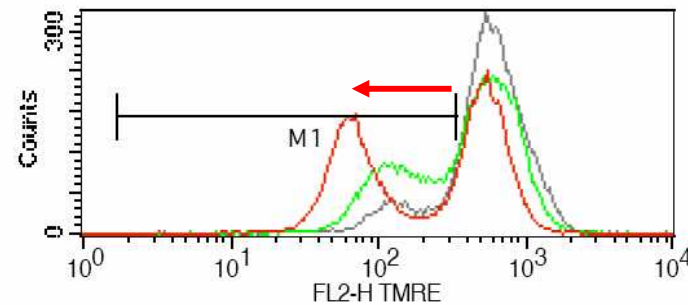
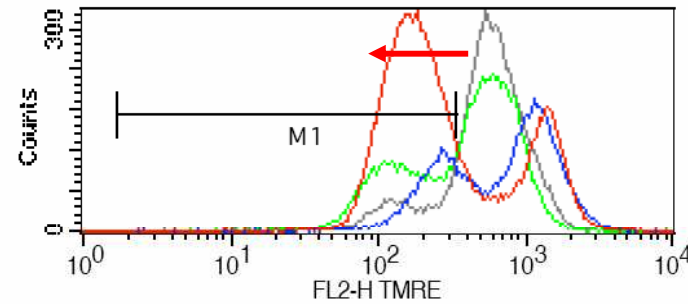
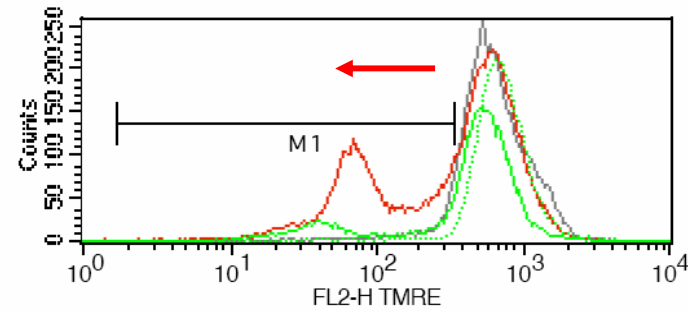
## LIPID PACKING (MC540)



Key	Name
—	control
—	CH11 100
.....	AA100
—	AA+CH11

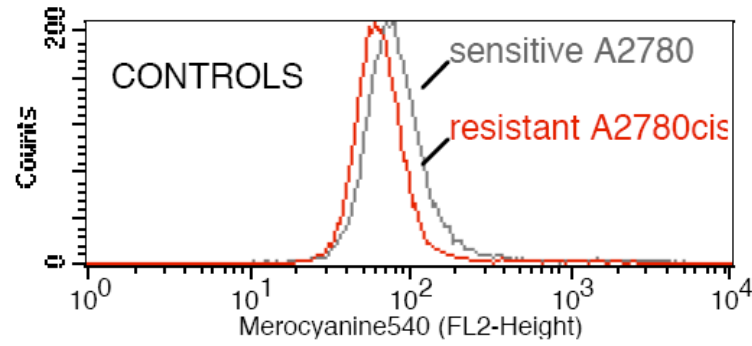
Key	Name
—	control
—	TNF15
—	NaBt5
—	TNF+NaBt

## MITOCHONDRIAL POTENTIAL (TMRE)

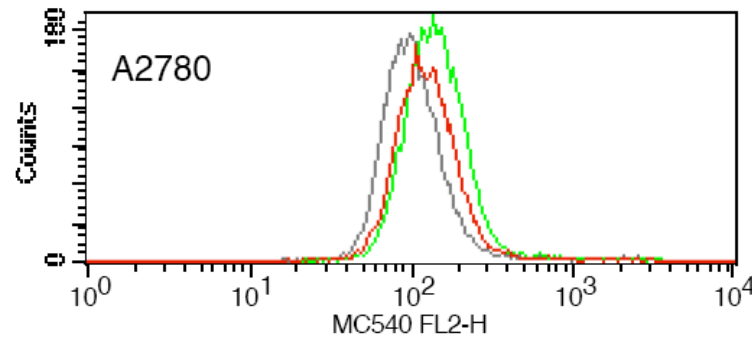


Key	Name
—	control
—	TNF15
—	TNF+CX

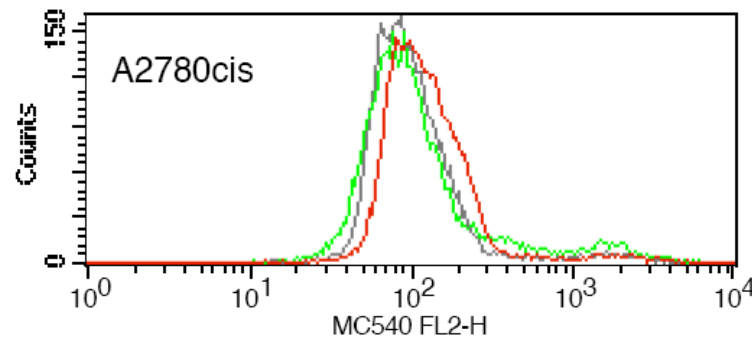
### LIPID PACKING (MC540)



Key	Name
—	A2780_MC540
—	A2780cis_MC540

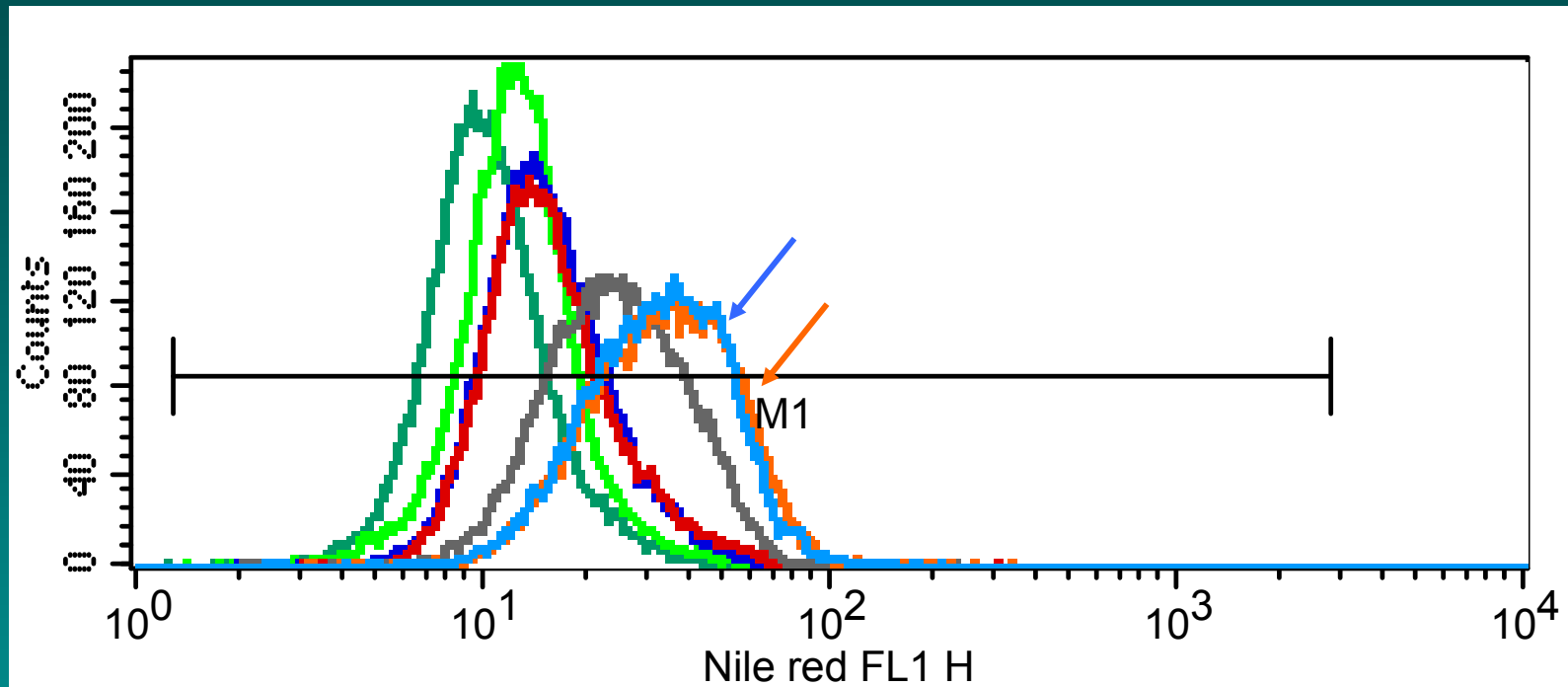


Key	Name
—	A control
—	A CDDP
—	A LA12



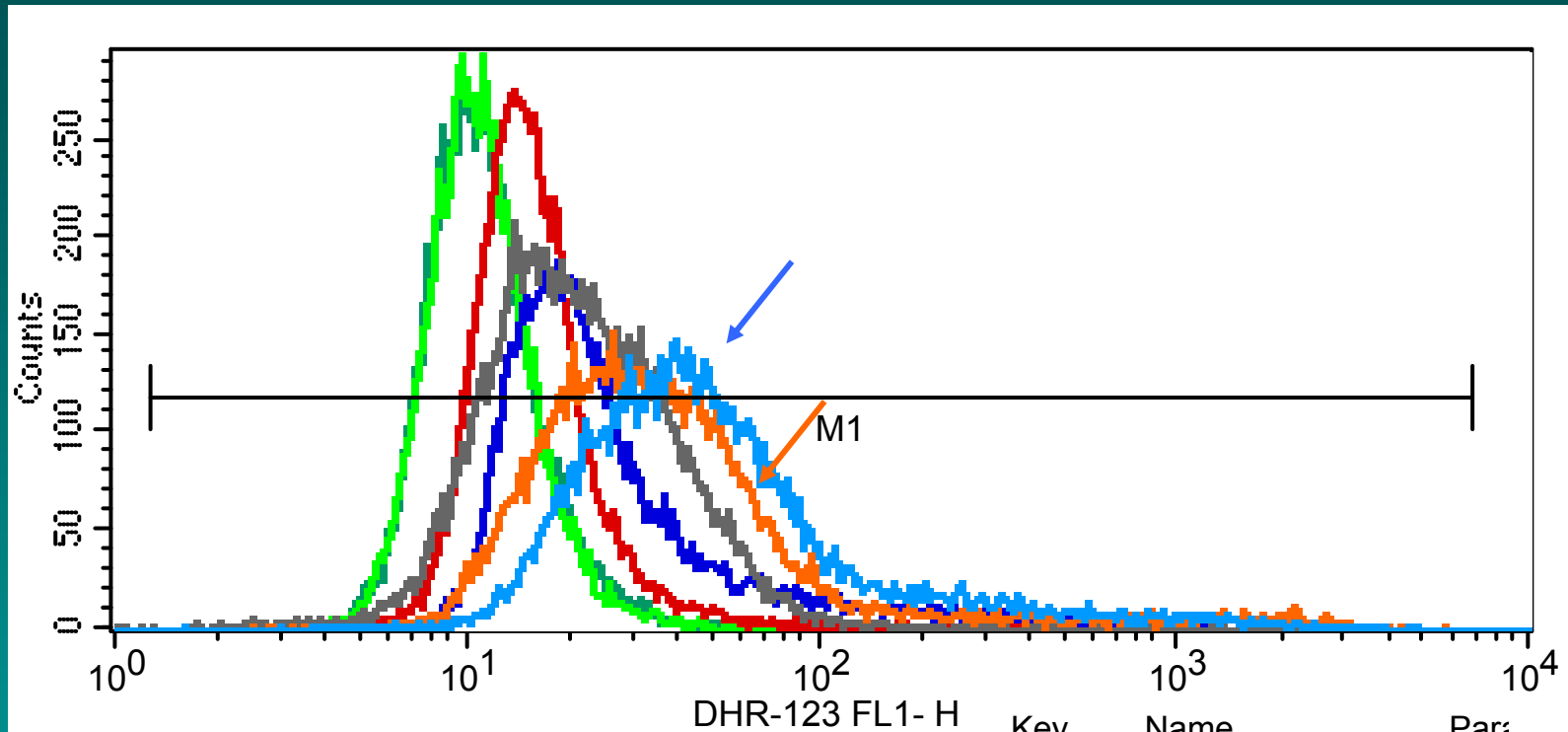
Key	Name
—	Acis control
—	Acis CDDP
—	Acis LA12

# Accumulation of lipid droplets in HCT116 cells after treatment with AA, DHA, NaBt or their combinations



Key	Name	Parame
—	control	FL1-H
—	control et	FL1-H
—	DHA50	FL1-H
—	AA50	FL1-H
—	NaBt3	FL1-H
—	AA50+NaBt3	FL1-H
—	DHA50+NaBt3	FL1-H

# Production of reactive oxygen species in HCT116 cells after treatment with AA, DHA, NaBt or their combinations



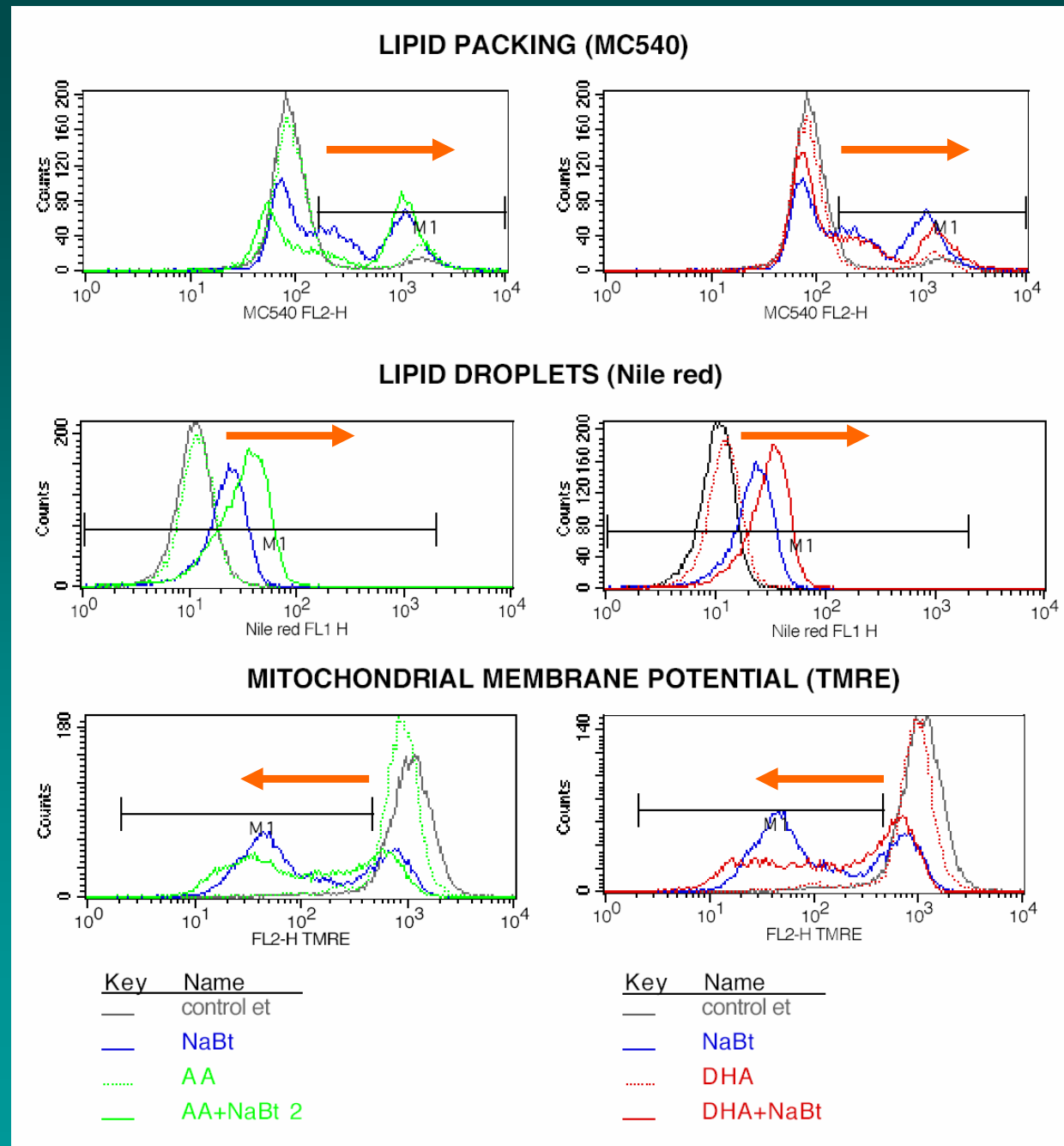
Key	Name	Para
—	control	FL1-
—	control et	FL1-
—	AA50	FL1-
—	DHA50	FL1-
—	NaBt3	FL1-
—	AA50+NaBt3	FL1-
—	DHA50+NaBt3	FL1-



Buňky karcinomu kolonu (HT-29)

Účinky AA, DHA, NaBt a jejich kombinací (48h)

# Apoptóza



# Účinky lipidových emulzí na buňky lidské leukemické línie HL-60

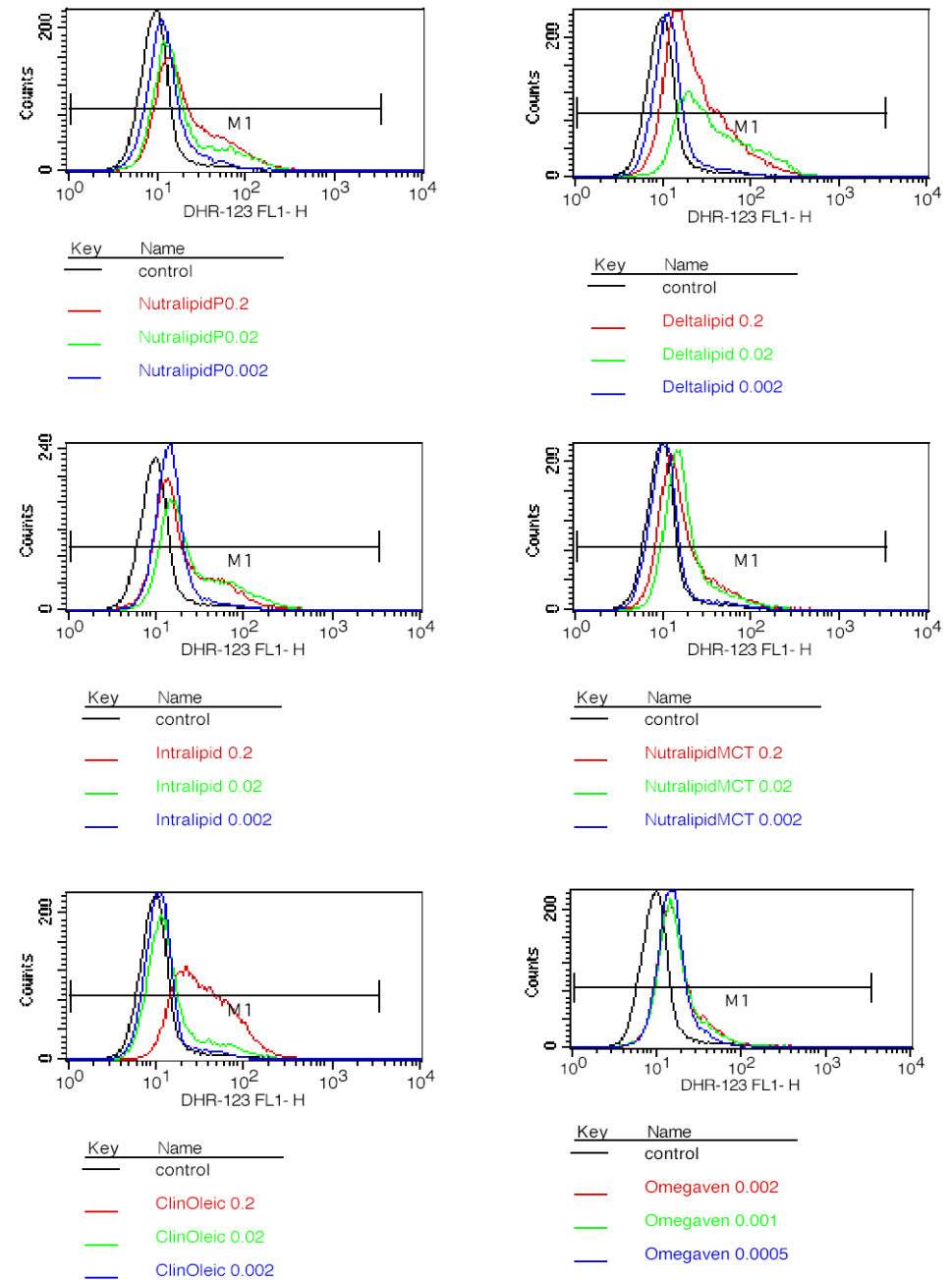
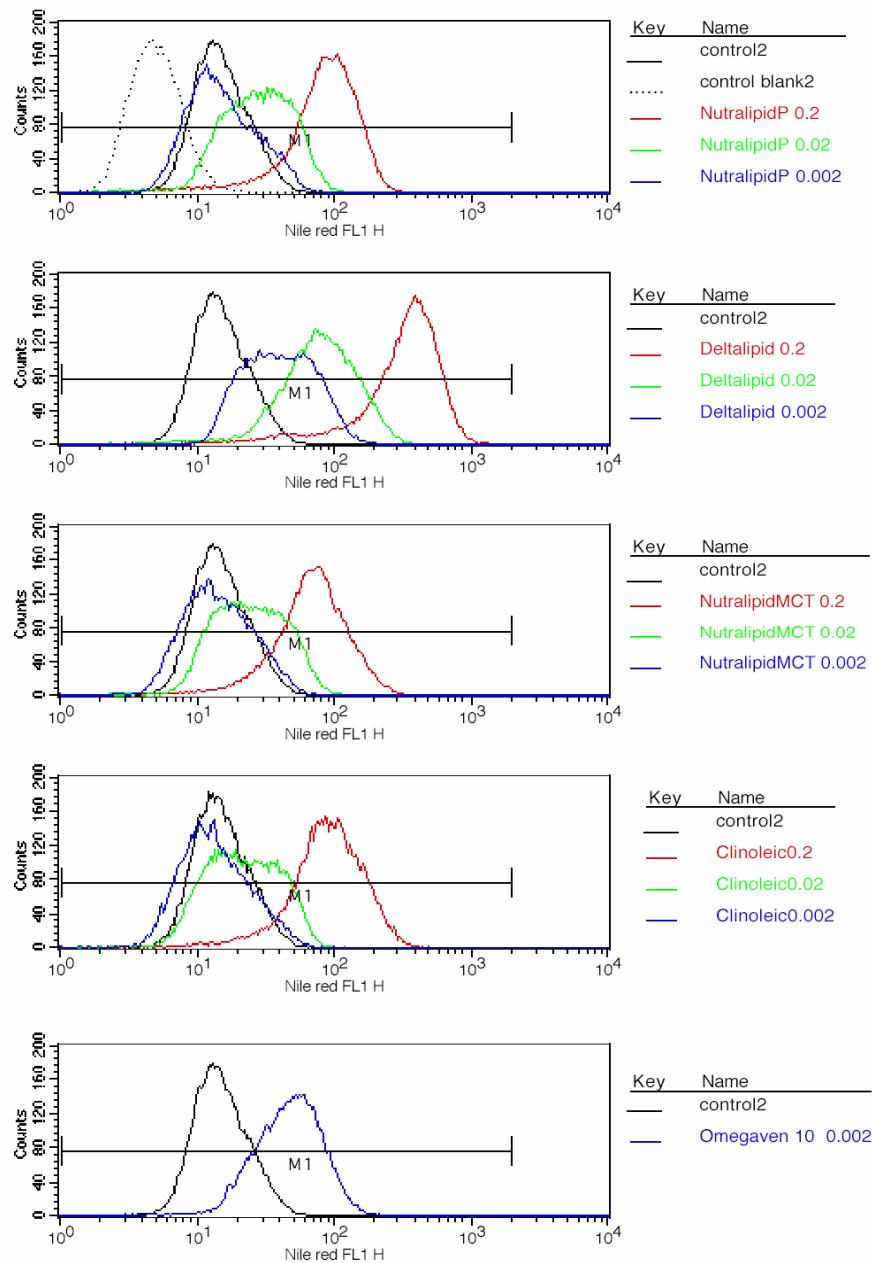
Koncentračně (0,2 – 0,001%) a časově (24-72 h) závislé

- ◆ zvýšení akumulace triglyceridů v cytoplazmě
- ◆ zvýšení produkce RMK
- ◆ snížení počtů buněk
- ◆ zvýšení množství buněk v subG0/G1 populaci
- ◆ snížená viabilita

Nejcitlivěji reagovaly buňky na působení Omegavenu (rybí olej)

# Akumulace lipidů flow cytometrie – Nile Red

# Produkce RMK flow cytometrie-DHR-123



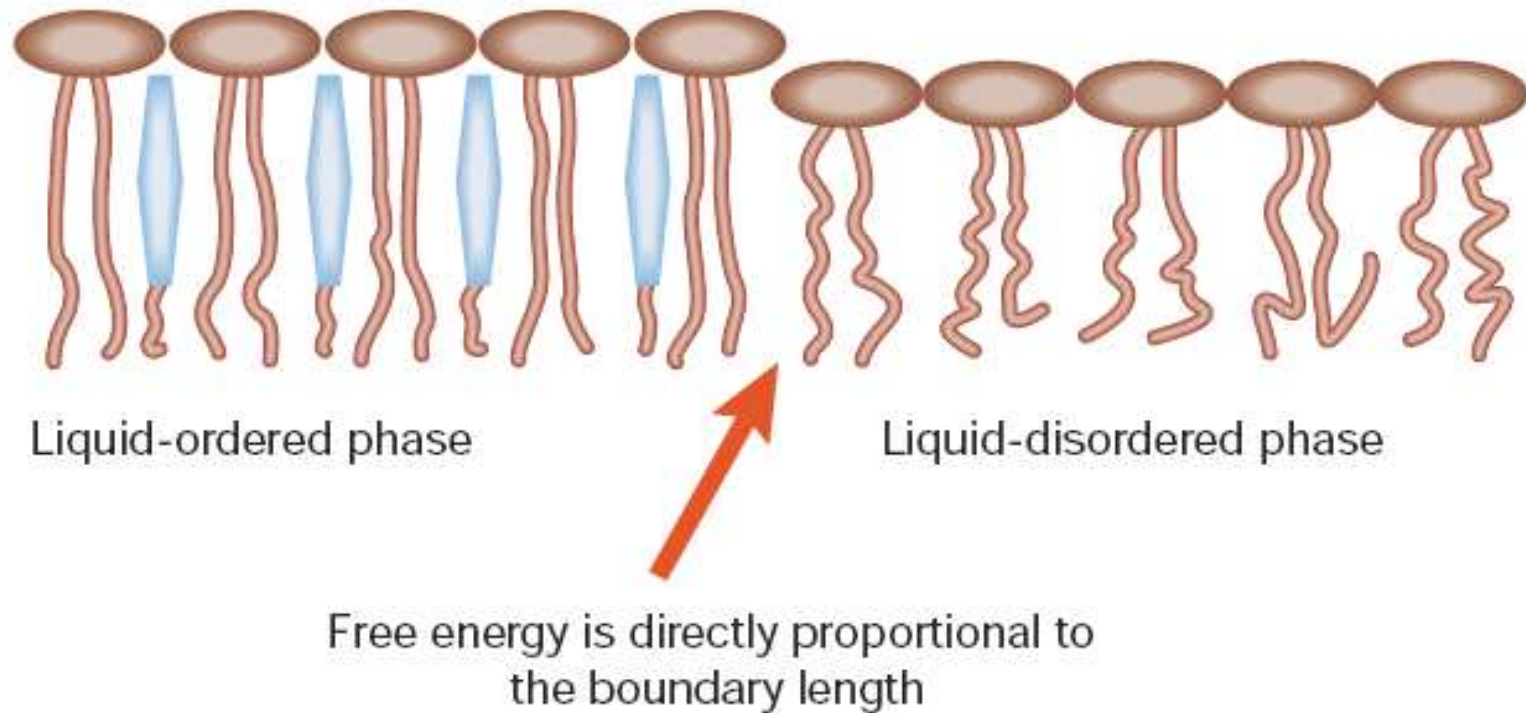
# LIPIDOVÉ RAFTY

malé oblasti proteinů a lipidů v membráně s unikátním složením lipidů – bohaté na cholesterol.

Tyto struktury jsou funkčně zahrnuty v kompartmentalizaci, modulaci a integraci buněčných signálů a tak modulují důležité procesy jako buněčný růst, přežití a adhezi.

VNMK jsou základní složkou lipidových raftů a předpokládá se, že např. DHA může částečně působit zvýšením fázové separace lipidů v membráně.

Strukturální integrita LR a caveolae jsou základní pro příjem VNMK. Caveolin-1 a FAT/CD36 jsou vázány v LR



**Fig. 2** | Mismatch of hydrated phospholipids and the intercalation of cholesterol as a driving force for a phase separation into liquid-ordered and -disordered phases. (Figure courtesy of P. Kinnunen.)

# Modulace lipidů (DHA)– lipidové rafty – modulace signálů TNFR

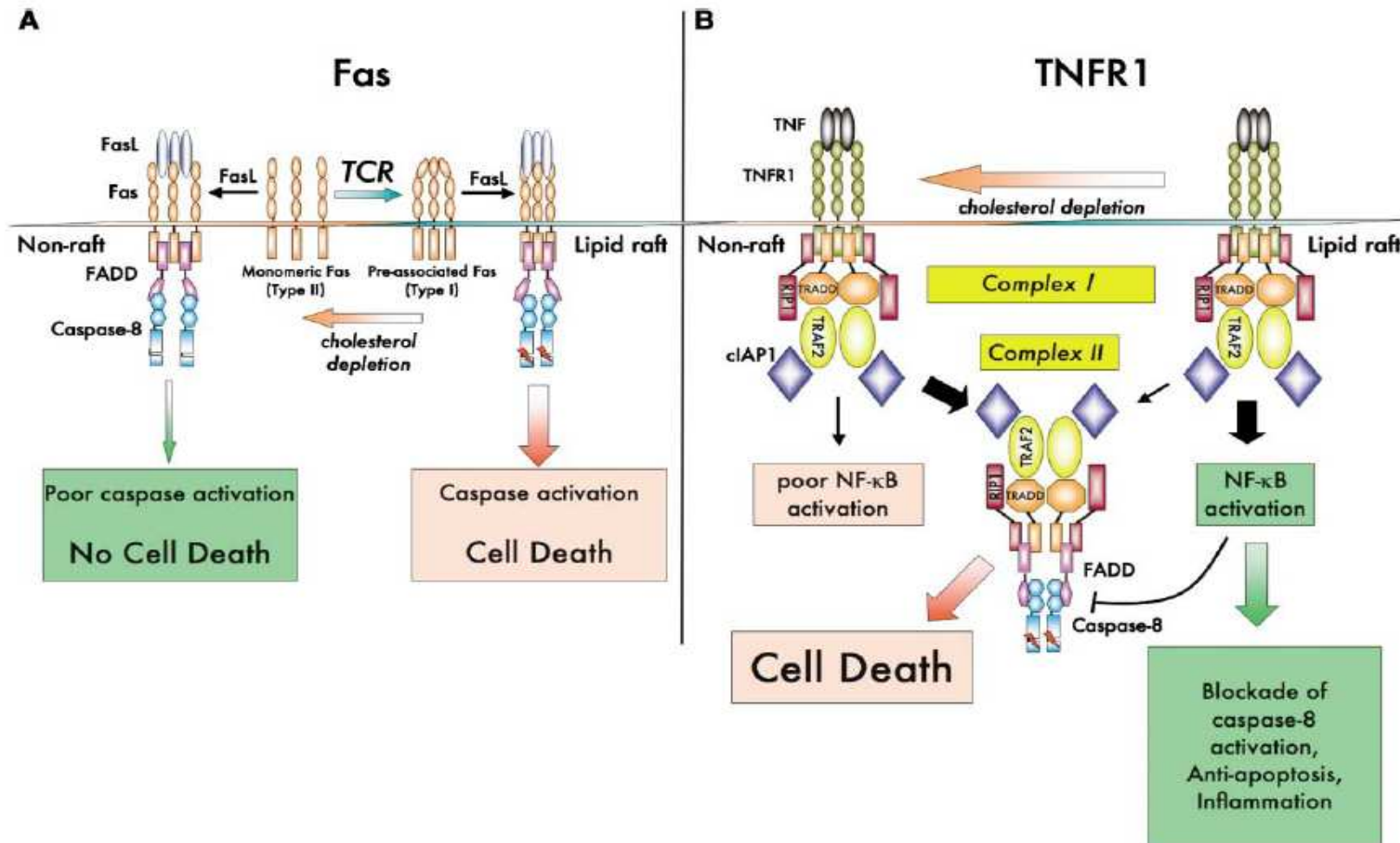


Figure 2. Examples of How Lipid Rafts Can Modify Early Events in TNFR Family Signaling

(A) In activated CD4<sup>+</sup> T cells, Fas is excluded from lipid rafts. Outside of lipid rafts, Fas is likely to be monomeric. After engagement by FasL, although FADD and caspase-8 are recruited to Fas, they do not signal efficiently for death. Upon TCR restimulation, Fas translocates into lipid rafts where it tends to preassociate. Within lipid rafts, upon FasL binding, FADD and caspase-8 are recruited to Fas where caspase-8 can autoactivate and trigger cell death.

(B) Upon TNF binding, TNFR1 translocates into lipid rafts wherein complex I formation takes place and results in the activation of NF-κB. Through mechanisms described in Figure 1, NF-κB can inhibit caspase activation within complex II. When cholesterol is depleted, lipid raft structure is disrupted and complex I forms outside of lipid rafts and cannot signal efficiently for NF-κB and therefore cannot inhibit death induced by complex II. The thickness of the arrows indicates relative efficiency of each signaling pathway.

## DĚJE NA MITOCHONDRIÍCH A OXIDATIVNÍ METABOLISMUS

**VNMK fyzicky interagují s mitochondriální membránou**, mění její permeabilitu otevíráním MTP (membrane permeability pores) a snižují tak membránový potenciál.

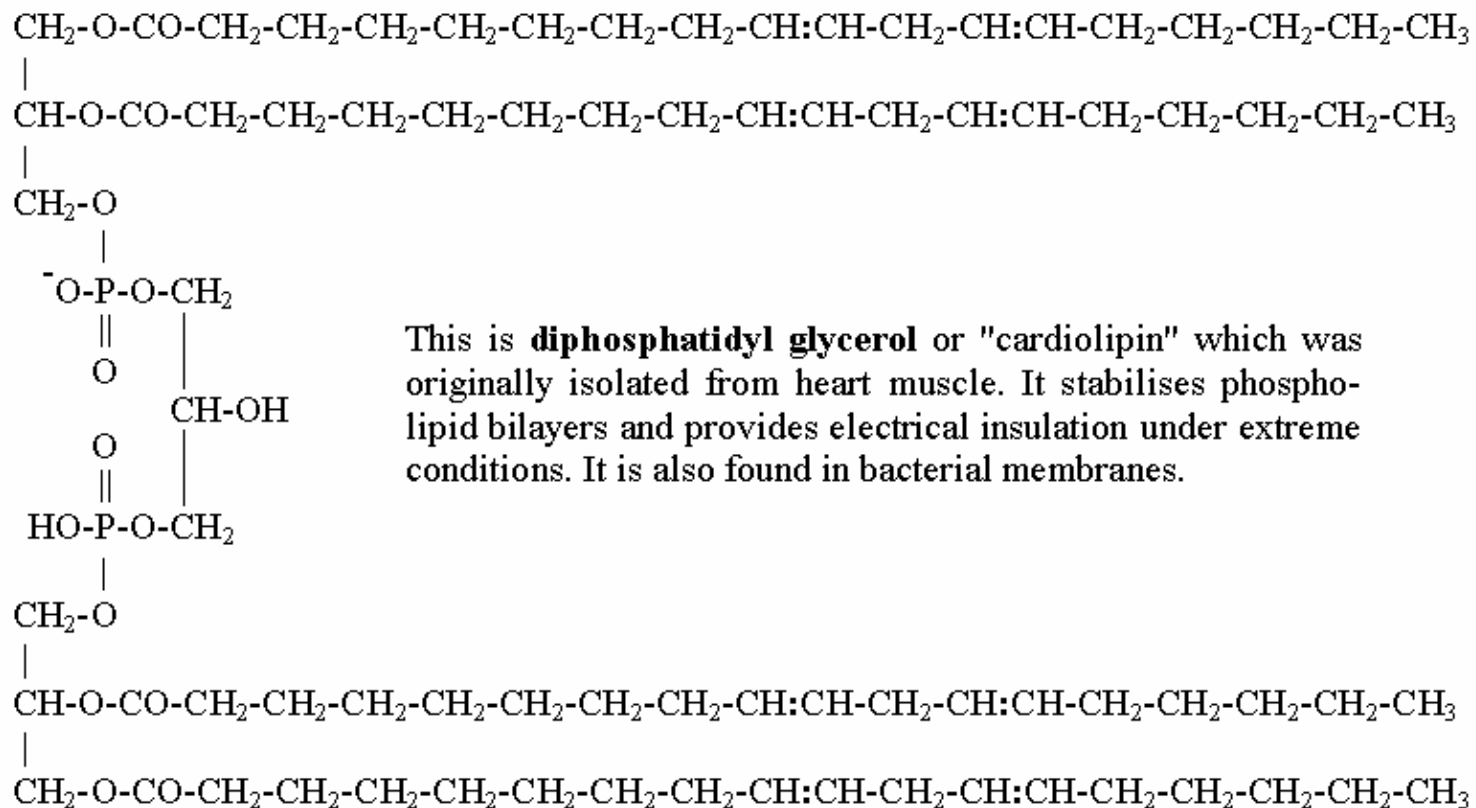
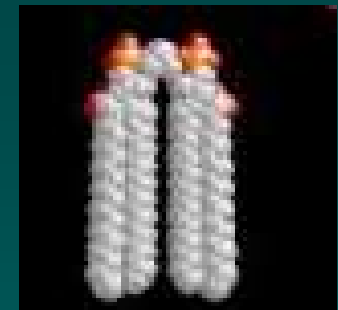
**DHA je přednostně inkorporována do kardiolipinu**, fosfolipidu vnitřní mitoch. membrány. To souvisí se stupněm nenasycenosti, indukci oxidativního stresu, uvolněním cytochromu c a apoptózou.

**VNMK modulují hladinu proteinů rodiny Bcl-2** (Bid, Bcl-2), které interagují s lipidy mit. membrány. Kardiolipin je označován jako „lipid receptor“ pro Bid.

**Zvýšené množství VNMK vyvolává oxidativní stres** (produkce ROS, NOS a lipidová peroxidace)

# Kardiolipin

-Difosfatidyl glycerol, glycerolfosfolipid



This is **diphosphatidyl glycerol** or "cardiolipin" which was originally isolated from heart muscle. It stabilises phospholipid bilayers and provides electrical insulation under extreme conditions. It is also found in bacterial membranes.

sn-1 – SFAs – LA, OA

sn-2 – PUFAs - DHA

- dimer

- negativně nabitý PL



## Kardiolipin v mitochondriích

- asymetrická distribuce na vnitřní membráně mitochondrií
  - ze 60% lokalizován na vnitřní straně IMM
  - důležitost translokací (apoptóza! – analogie: fosfatidylserin v plazmatické membráně)
- významný cíl oxidací
  - důvody: časté dvojně vazby v molekule, lokalizace v mt (vysoká produkce ROS)
  - oxidace CL – změny struktury a funkce mají dalekosáhlé důsledky! (významné ovlivnění funkce mitochondrií, úloha v apoptóze – souvislost mj. s vylitím cytochromu c atd.)

## Změny v množství/lokalizaci kardiolipinu:

- Apoptóza – translokace na vnější část vnitřní membrány mitochondrií
- Oxidace CL – poškození nebo degradace CL
- měření množství mitochondrií v buňce (zdravá, neapoptotická)

## Měření množství kardiolipinu v buňkách:

- NAO – nonyl acridine orange

# Omega-3 VNMK v prevenci nádorových onemocnění

**Epidemiologické studie** – snížená incidence nádorů kolonu v populacích konzumujících velké množství  $\omega$ -3 VNMK z mořské stravy

**Experimentální studie** –  $\omega$ -3 VNMK inhibují karcinogeny-indukovanou karcinogenezi a redukuje růst transplantovaných nádorů u laboratorních zvířat a snižují proliferaci a indukují apoptózu u nádorových buněk kolonu in vitro.

**Klinické studie** – EPA a DHA inhibují proliferaci epiteliálních buněk kolonu u pacientů s adenomy a vysokým rizikem nádorového onemocnění;  
Dodávání rybího oleje snižuje proliferaci v epitelu přiléhajícímu k chirurgicky odstraněné nádorové tkáni.

Důležité!!!

EPA a DHA neměnily homeostázu v normálních kryptách kolonu u krys

**Výzkum molekulárních mechanismů**

# Účinek různých typů olejů na růst nádorů tlustého střeva u atymových myší

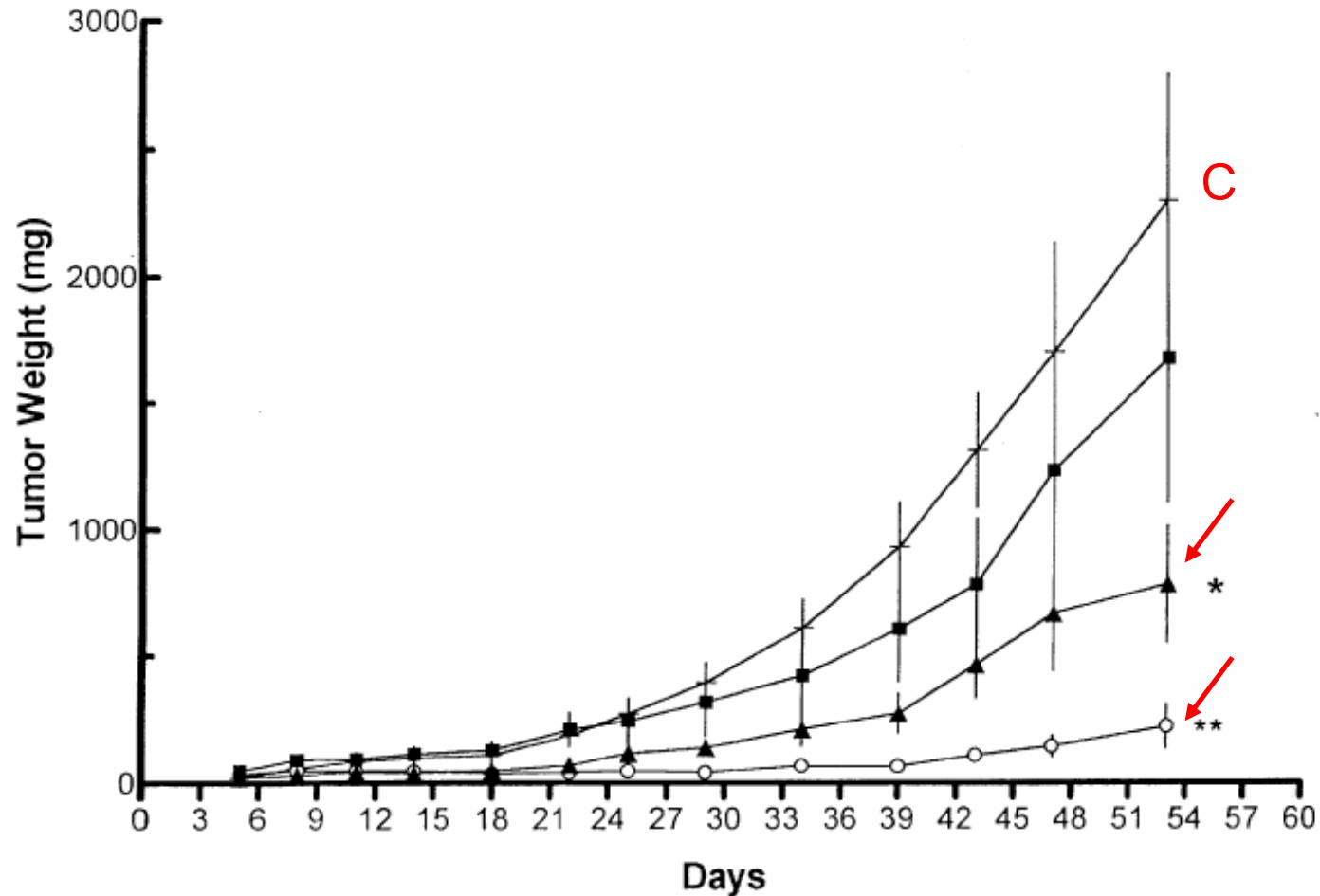


Fig. 1. Effect of dietary fatty acids (corn oil, menhaden oil, golden algae oil) on the growth of WiDr tumor in athymic mice. Tumor weights were estimated using the formula (tumor weight in mg =  $A \times B \times C/2$ ) where  $A$ ,  $B$ ,  $C$  represent the three perpendicular diameters of the tumor in millimeters. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM from 5 to 6 animals.  $P$ -values were compared to 24% corn oil. Label keys: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  at day 53; -, 24% corn oil treated; ■, 8% corn oil treated; ▲, 8% corn oil and 16% menhaden oil treated; ○, 8% corn oil and 16% golden algae oil treated.

# MECHANISMY na tkáňové a buněčné úrovni

- ▶ **Modulační efekty na cytokinetiku** (proliferaci, diferenciaci a apoptózu)
- ▶ **Pozitivní účinky na patologii nádorů** – inhibice metastáz a angiogeneze, redukce kachexie a vedlejších účinků chemoterapeutik.
- ▶ **N-3 VNMK zcitlivují různé typy nádorů** (prsu, sarkomy, leukemie) u exp. zvířat i různých typů nádorových buněk v kultuře k působení protinádorových léků (např. doxorubicin, 5-FU, CTP).

**ω-3 PUFA**

složení mastných kyselin v membránových fosfolipidech  
molekuly membránových fosfolipidů  
třídy membránových fosfolipidů

**fluidita membrán**

interakce ligand - receptor → funkce G-proteinu → funkce fosfolipáz A2, C, D ↔ funkce tyrosin kináz, fosfatáz

IP<sub>3</sub>      PUFA      molekuly DAG      molekuly fosfatidové kyseliny

hladiny intracelulárního Ca → funkce protein kináz např. PKC → funkce proteinových fosfatáz

další signální systémy např. přes cAMP, cGMP

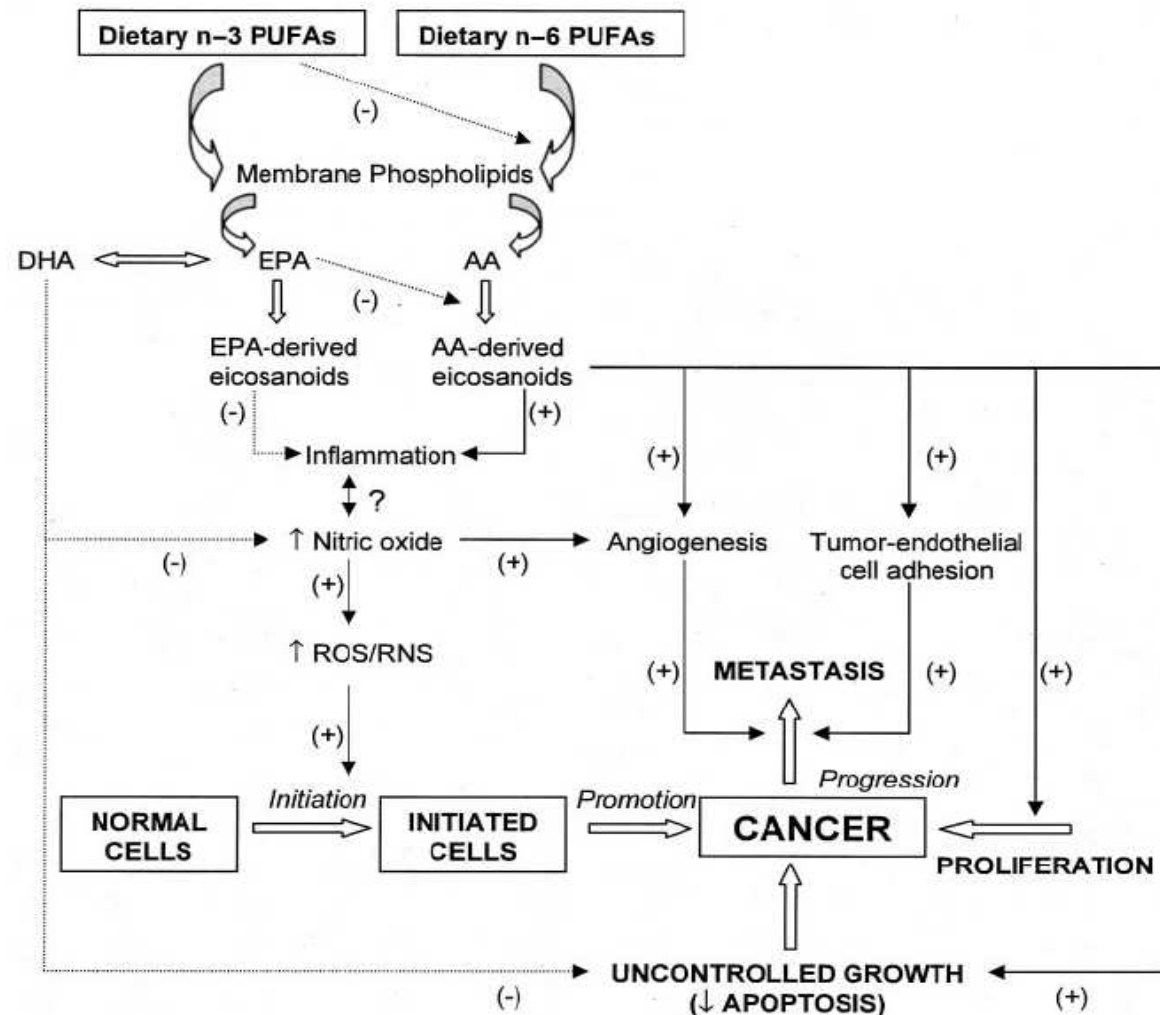
**funkce transkripčních faktorů**

**steroidní hormony**



**Mechanismus imunomodulačních a protizánětlivých účinků  
 $\omega$ -3 mastných kyselin**

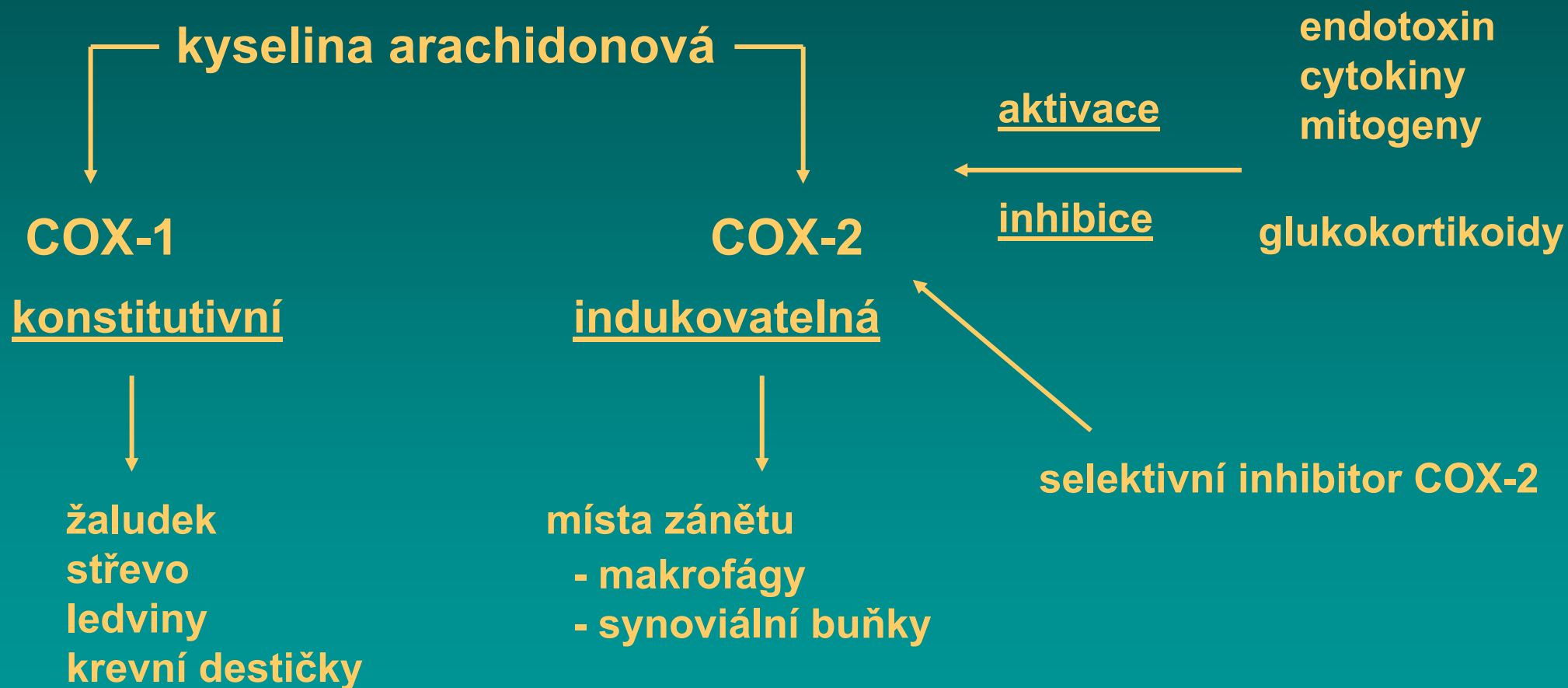
# Potenciální mechanismy promoce a suprese karcinogeneze $\omega$ -6 a $\omega$ -3 VNMK

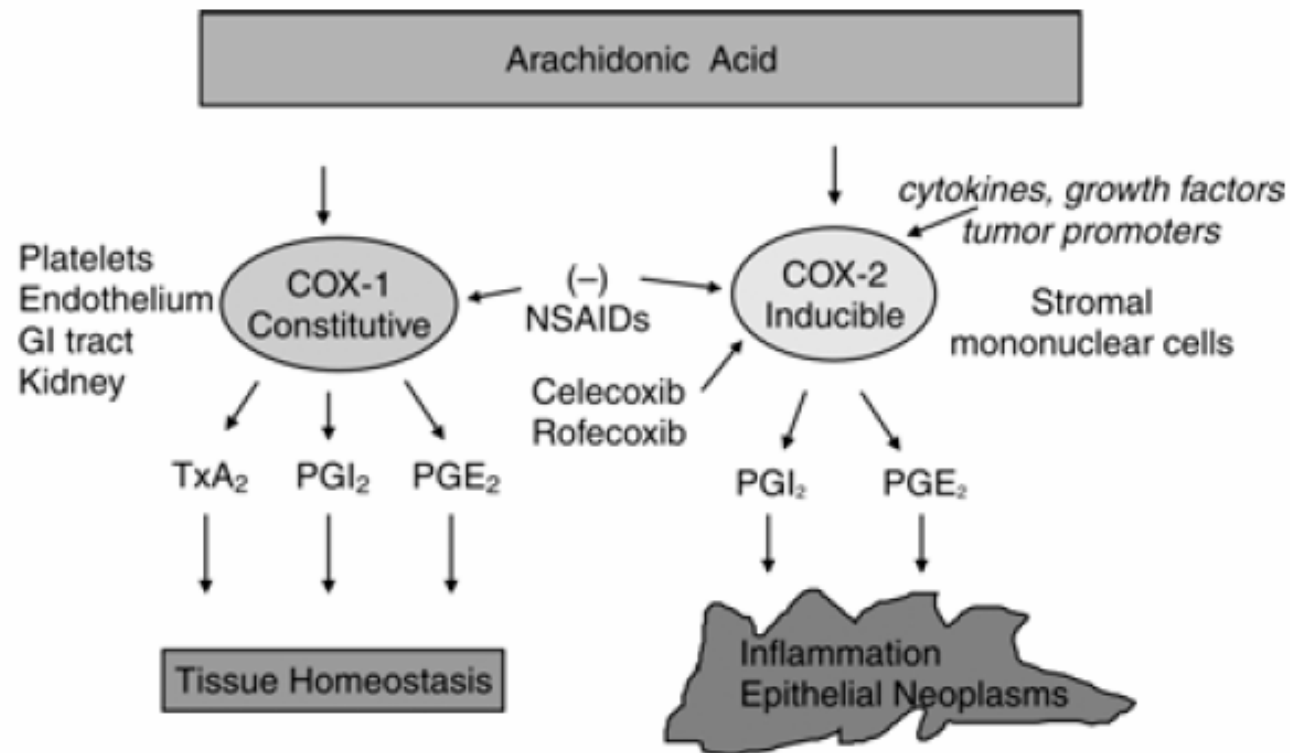


**FIGURE 2.** Hypothetical scheme showing potential mechanisms whereby n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and n-3 PUFAs may promote and suppress carcinogenesis, respectively. In initiated tumor cells, phospholipase A<sub>2</sub>, cyclooxygenase 2, and lipoxygenases are often overexpressed, which leads to overproduction of arachidonic acid (AA, 20:4n-6)-derived eicosanoids that augment inflammation. Nitric oxide, which is elevated in inflammation, is implicated in both the initiation and the progression stages of carcinogenesis. Nitric oxide may stimulate tumor growth and metastasis by enhancing the angiogenic and migratory abilities of tumor cells. Dietary n-3 PUFAs reduce the desaturation and elongation of linoleic acid (18:2n-6) to AA, the incorporation of AA into membranes, and the biosynthesis of AA-derived eicosanoids; suppress inflammation; stimulate apoptosis; up-regulate the expression of genes coding for antioxidant enzymes; and thus inhibit tumor growth and metastasis. + and solid arrows, stimulation; - and dashed arrows, suppression; ↑, increase. EPA, eicosapentaenoic acid (20:5n-3); DHA, docosahexaenoic acid (22:6n-3); ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species.



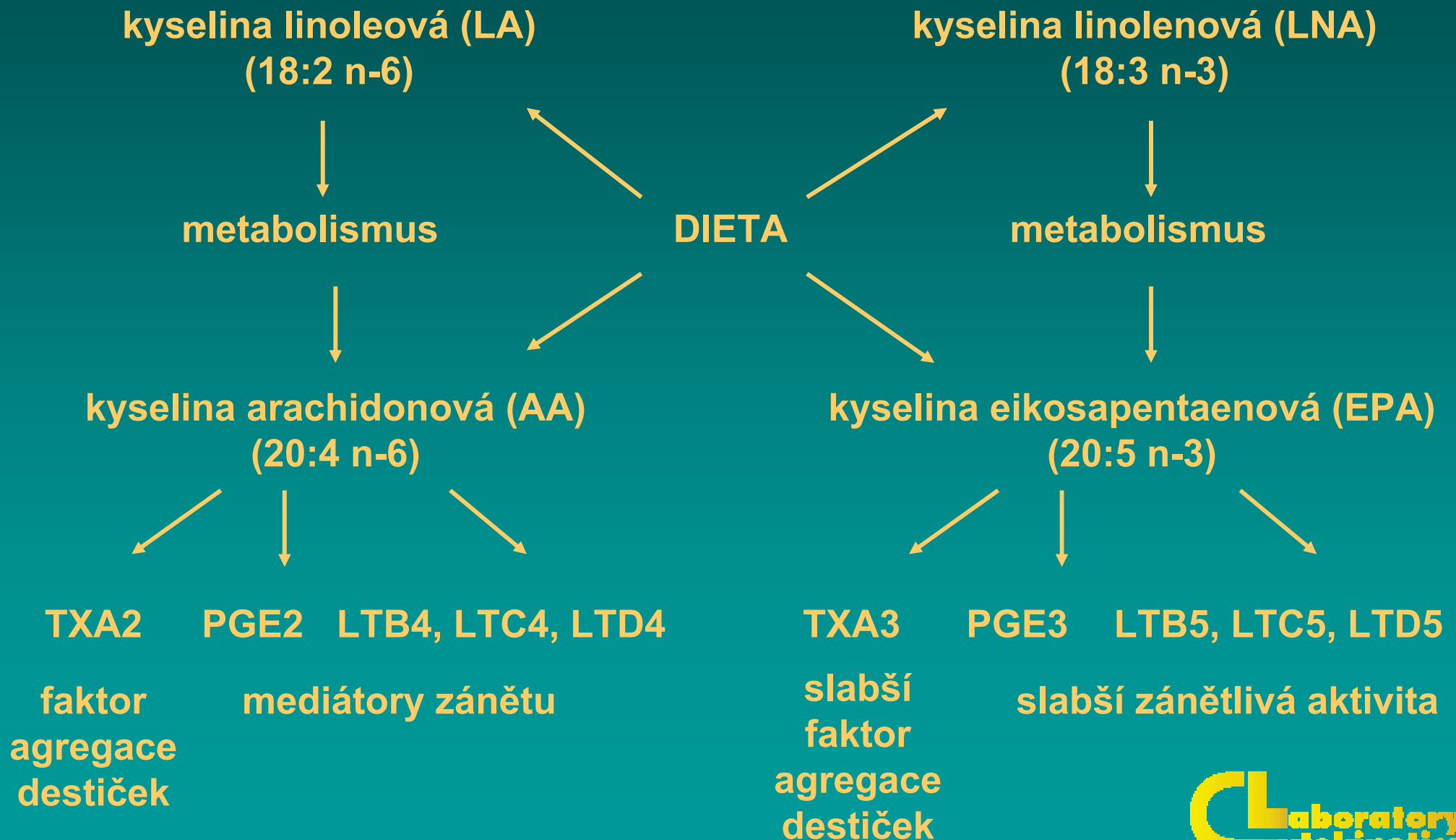
# Cyklooxygenázové dráhy



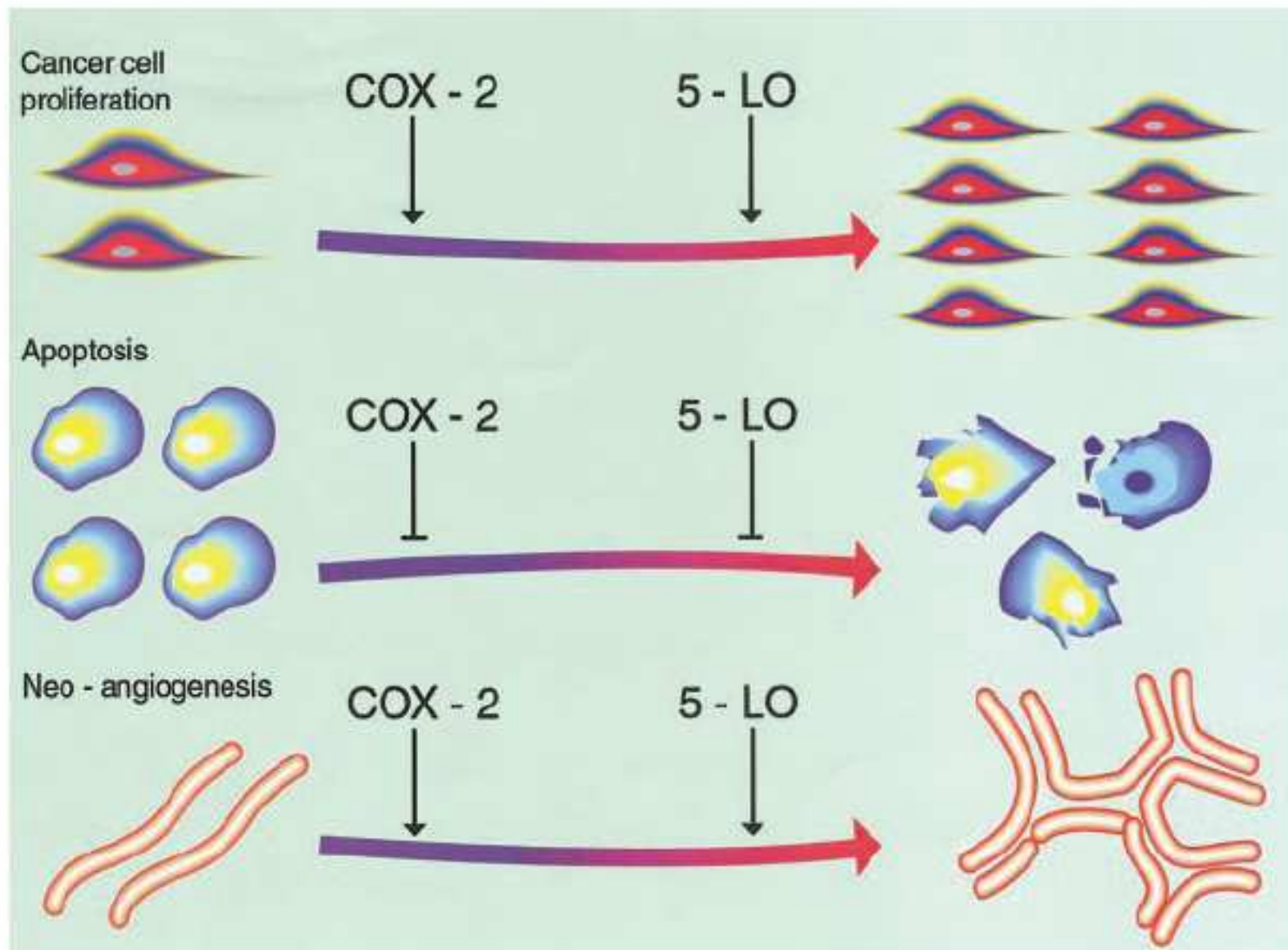


*Figure 1.* COX isoforms include constitutive COX-1 which is involved in normal tissue homeostasis and inducible COX-2 which is upregulated at sites of inflammation and in colorectal neoplasms. NSAID inhibit both COX isoforms, whereas COX-2 inhibitors are selective for the COX-2 enzyme. TxA<sub>2</sub> = -thromboxane.

# Interakce n-3 PUFAs s AA při syntéze eikosanoidů s prozánětlivou aktivitou



# COX-2 i 5-LPO stimulují buněčnou proliferaci, inhibují apoptózu a indukují neoangiogenezi



# Molekulární mechanismy COX-2 a NSAIDs

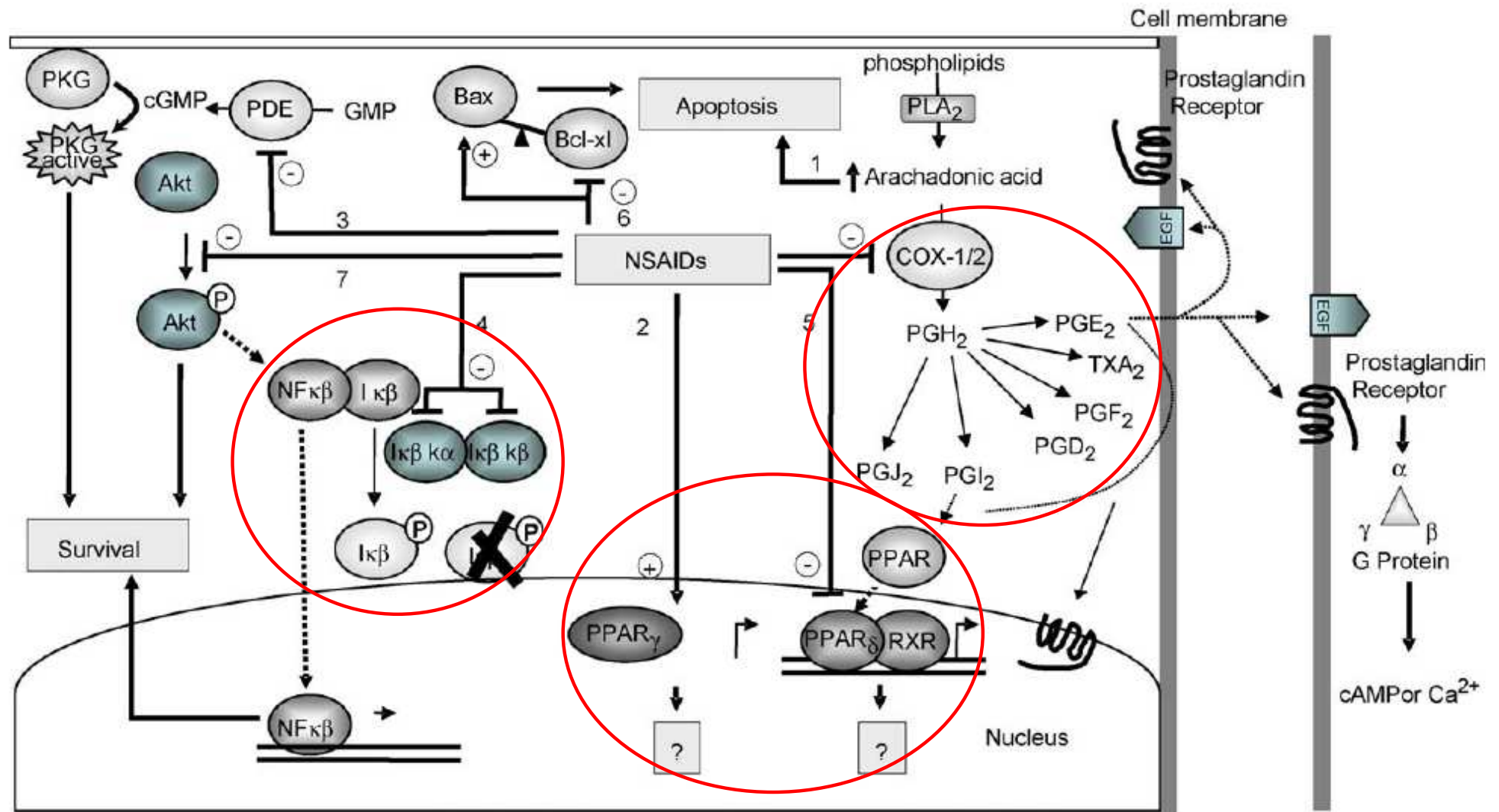
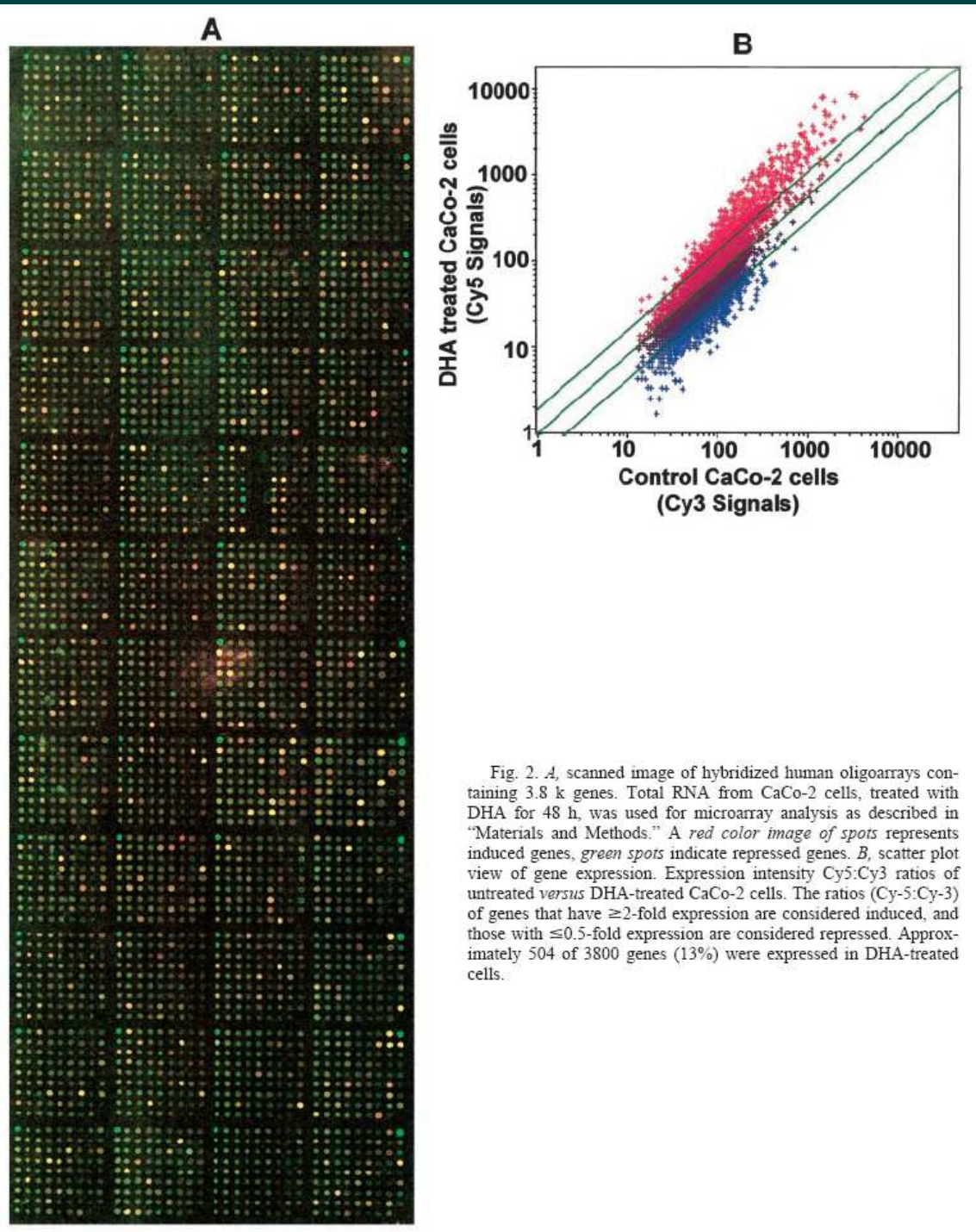


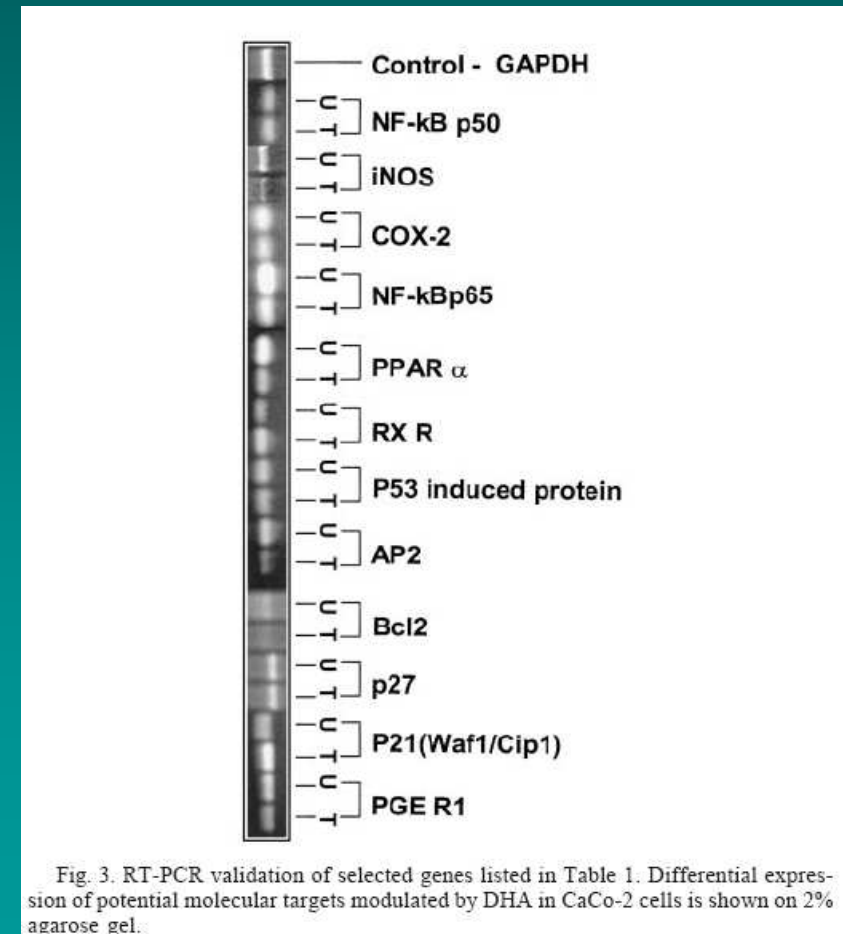
Fig. 4. Molecular mechanisms for COX-2 and NSAIDs. The right part of the model illustrates the prostaglandin synthesis pathway as well as the subsequent receptor signaling—the specific prostaglandin receptors as well as the non-canonical EGF receptor pathway. As the result of inhibiting COX enzymes, accumulation of arachadonic acid would directly promote apoptosis and attenuation of positive feedback to proliferation and survival through receptors. The rest of the figure demonstrates several COX-2 independent mechanisms proposed for NSAIDs. Since, not all NSAIDs are able to act through these mechanisms in every cell type, a brief table is attached to summarize the particular NSAIDs used in each experiment as well as the cell lines involved.



## Microarray analýza CaCo-2 buněk po působení DHA (48h)

Indukované geny

Reprimované geny



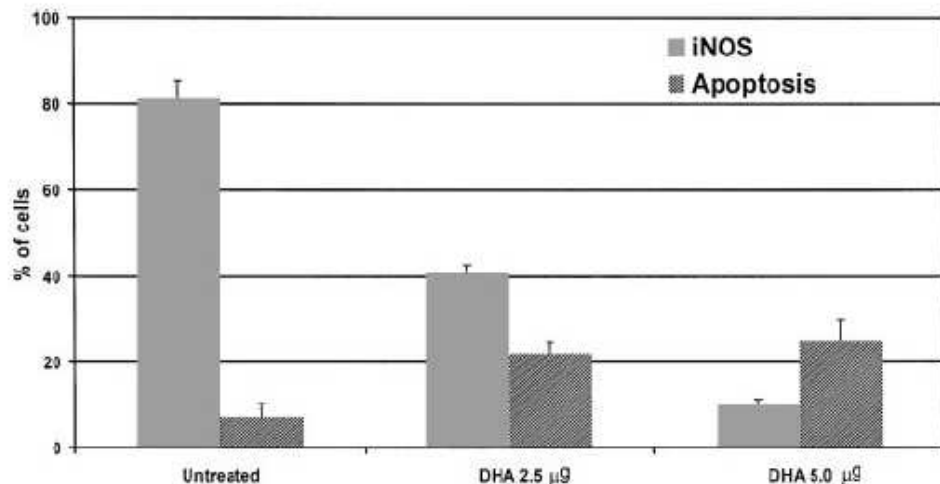
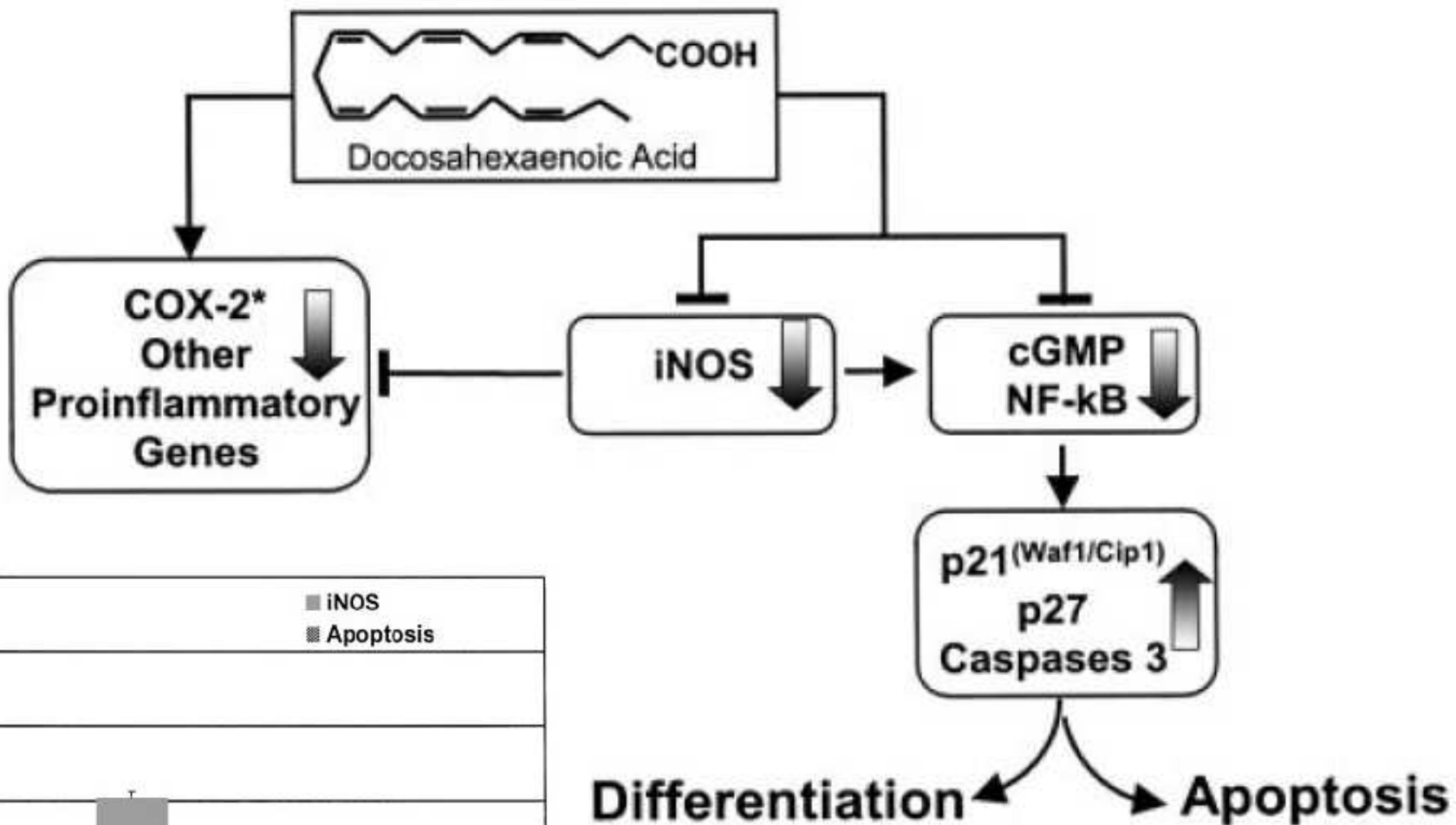


Fig. 6. Effect of DHA on iNOS-positive and apoptotic cells. Percentage of apoptotic cells was determined by DAPI staining. DAPI-positive cells with characteristic nuclear condensation and DNA strand breaks for apoptosis were counted from 10 identical fields using a fluorescence microscope (Olympus) with  $\times 40$  magnification; bars,  $\pm$ SD.

Potenciální molekulární mechanismy působení DHA na nádorové buňky kolonu

Vše, co chcete vědět o lipidech

<http://www.cyberlipid.org/>