

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

NÁDORY KOLOREKTA (CRC)

Výskyt

industrializované země (životní styl, výživa)

ČR (třetí nejčastější příčina úmrtí na rakovinu)

věková distribuce (muži nárůst případů od 60 let; ženy od 70 let)

Epitel kolorekta

střevní krypty (část proliferační a diferenciací)

výměna epitelu (zrání buněk, odumírání apoptózou-anoikis (detachment-induced apoptosis))

koncentrace růstových faktorů v kryptách (v proliferační části více buněk produkujících GF)

Kolorektální karcinogeneze

porušení rovnováhy mezi proliferací a diferenciací v kryptě
hyperproliferativní krypta, adenom, adenokarcinom,
karcinom, metastázy

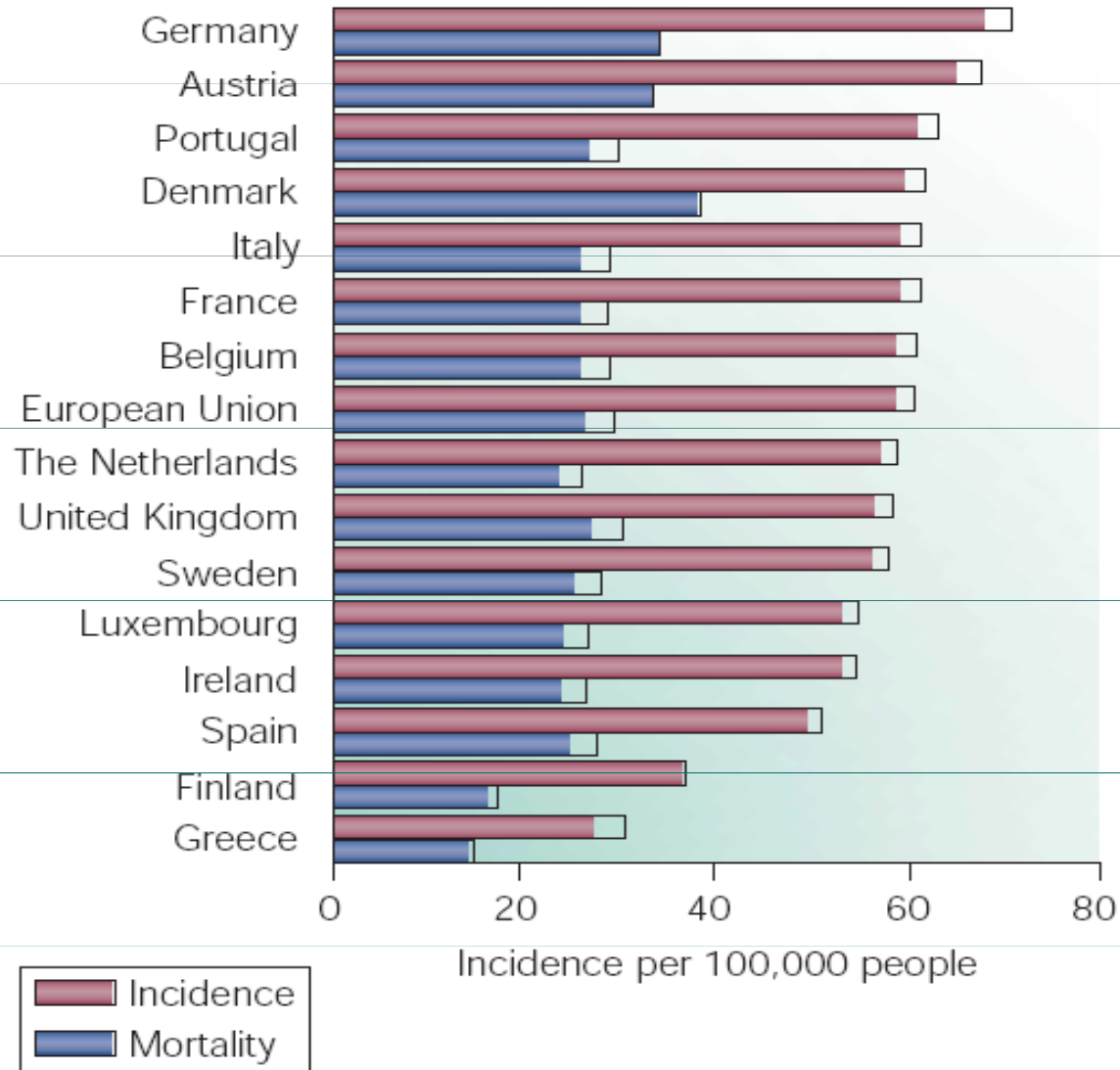
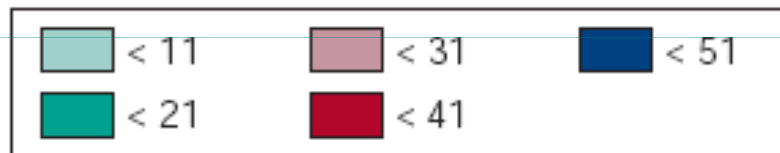
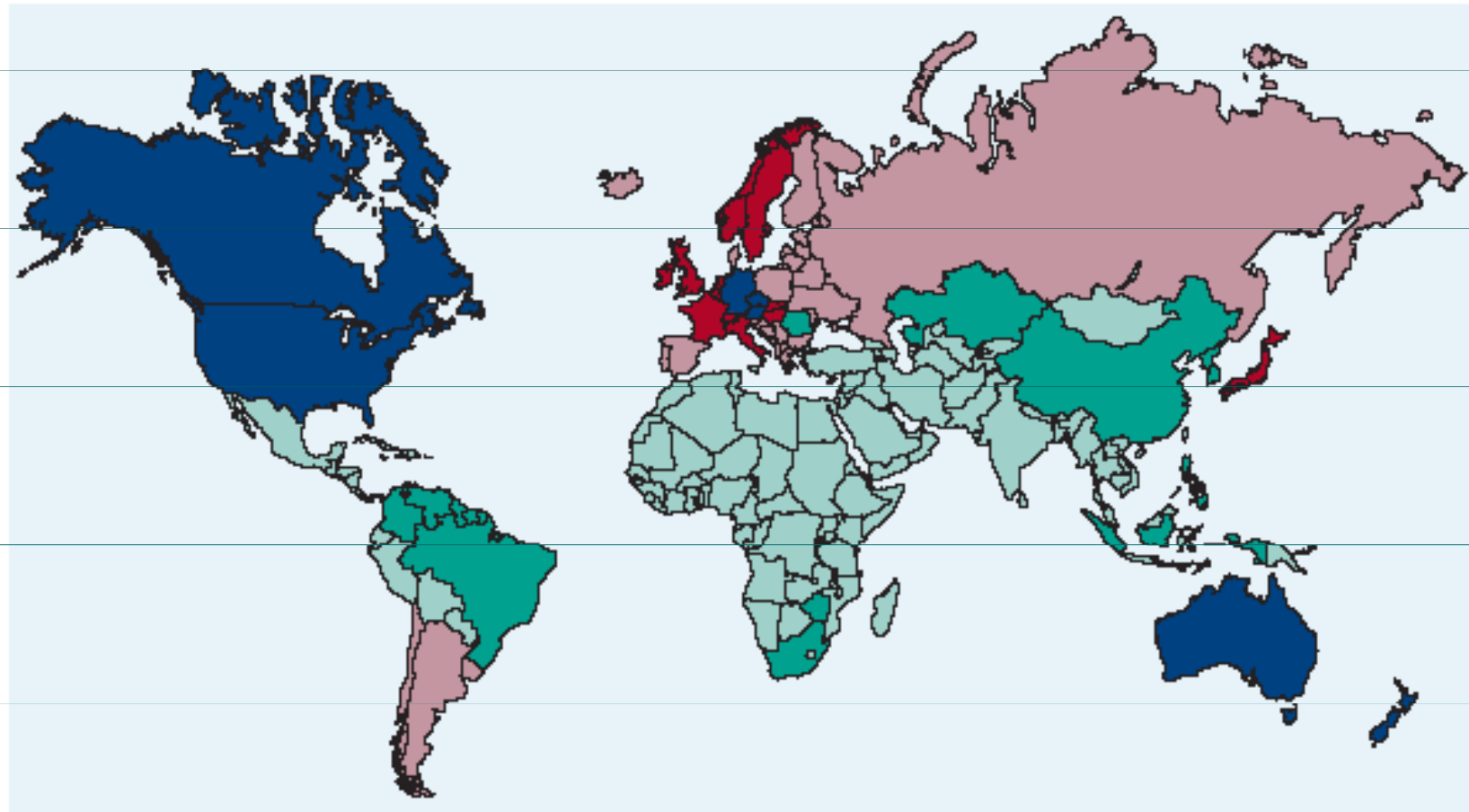
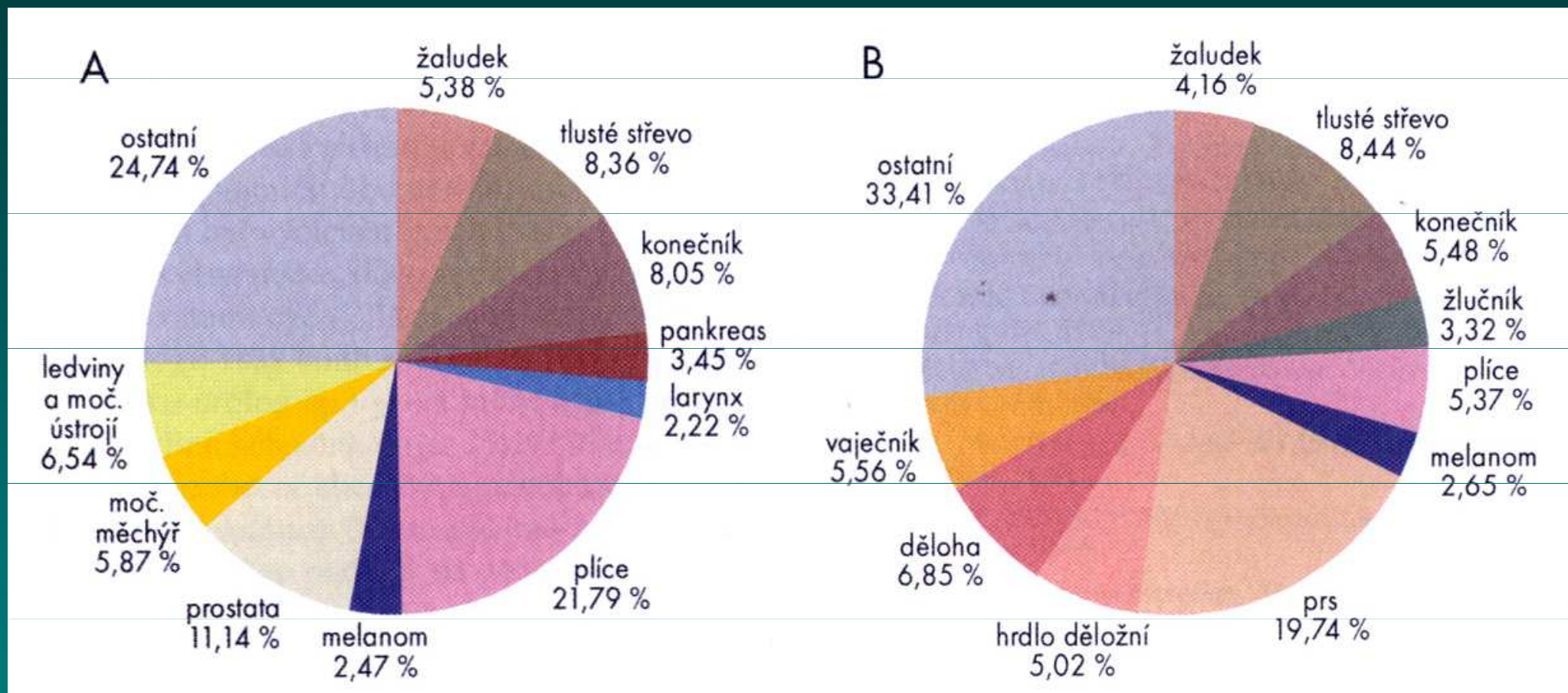


Figure 1 | **Colorectal cancer incidence in males in the European Union.** Rates of colorectal cancer by incidence, per 100,000 people, and mortality during 1996. Data were collected from Eucan — a service that provides data on the incidence and mortality of 24 key cancers in 15 member states of the European Union².

a Incidence rates of colorectal cancer





Struktura hlášených onemocnění novotvary bez dg. C44. A – muži; B – ženy (podle ÚZIS)

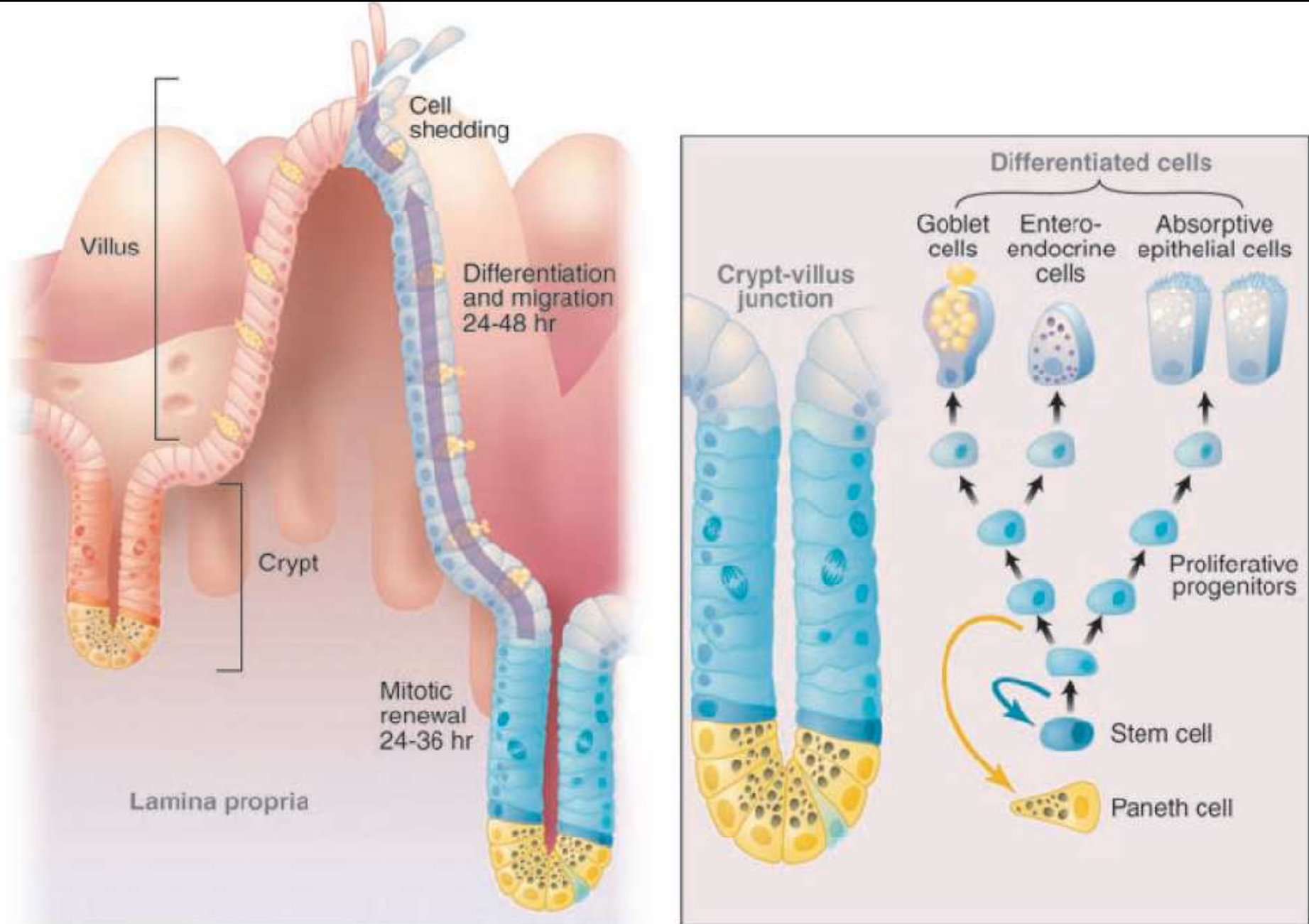
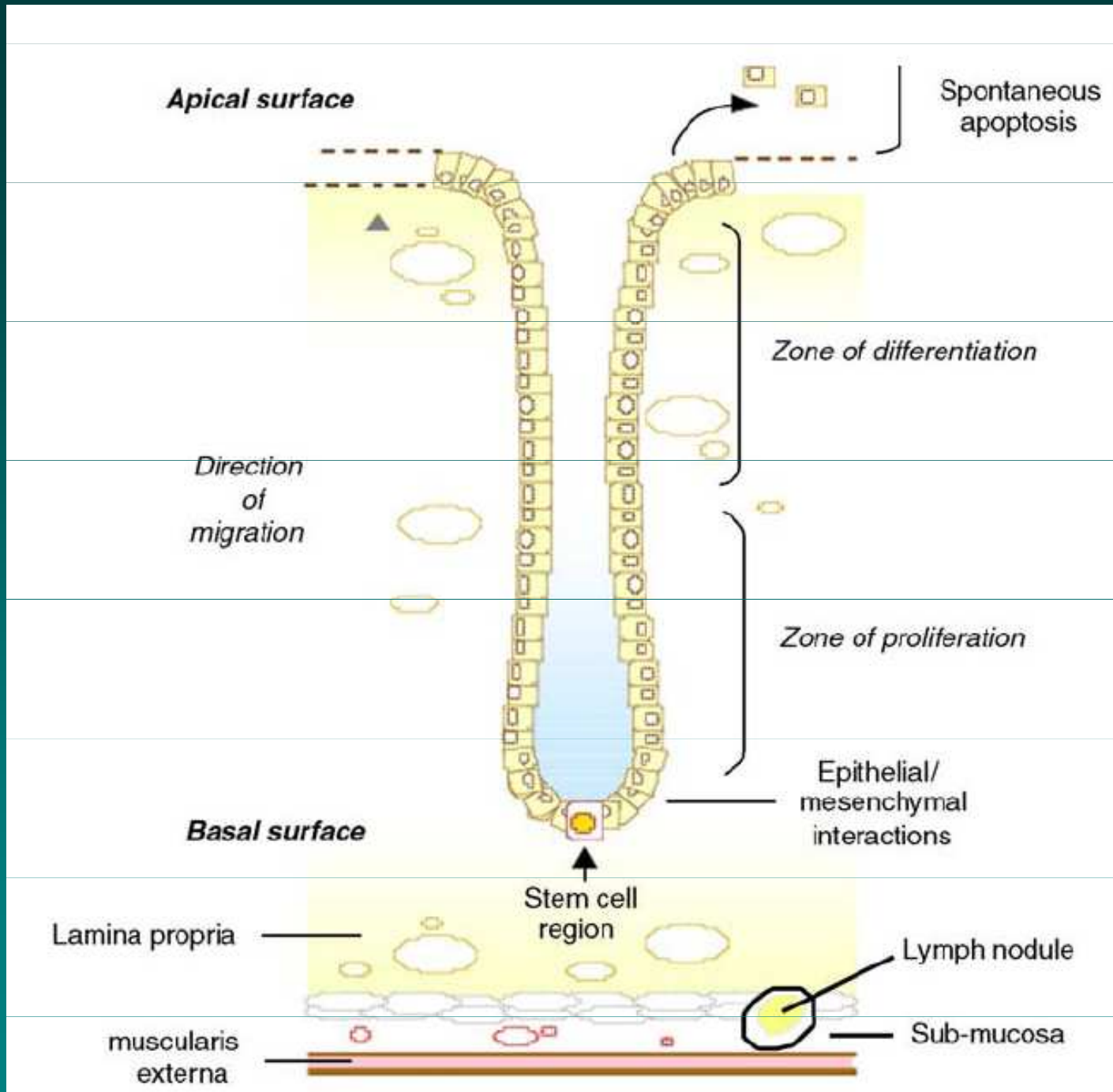


Fig. 1. The anatomy of the small intestinal epithelium. The epithelium is shaped into crypts and villi (left). The lineage scheme (right) depicts the stem cell, the transit-amplifying cells, and the two differentiated branches. The right branch constitutes the enterocyte lineage; the left is the secretory lineage. Relative positions along the crypt-villus axis correspond to the schematic graph of the crypt in the center.

Rovnováha mezi proliferací, diferenciací a apoptózou ve střevní kryptě



Homeostáza ve tkáních

je udržována

integrovaným systémem komunikačních mechanismů (mimo-, vnitro- a mezibuněčných)

a reguluje chování buněk především s ohledem na schopnost proliferace, diferenciaci, adaptivní odpovědi a apoptózy.

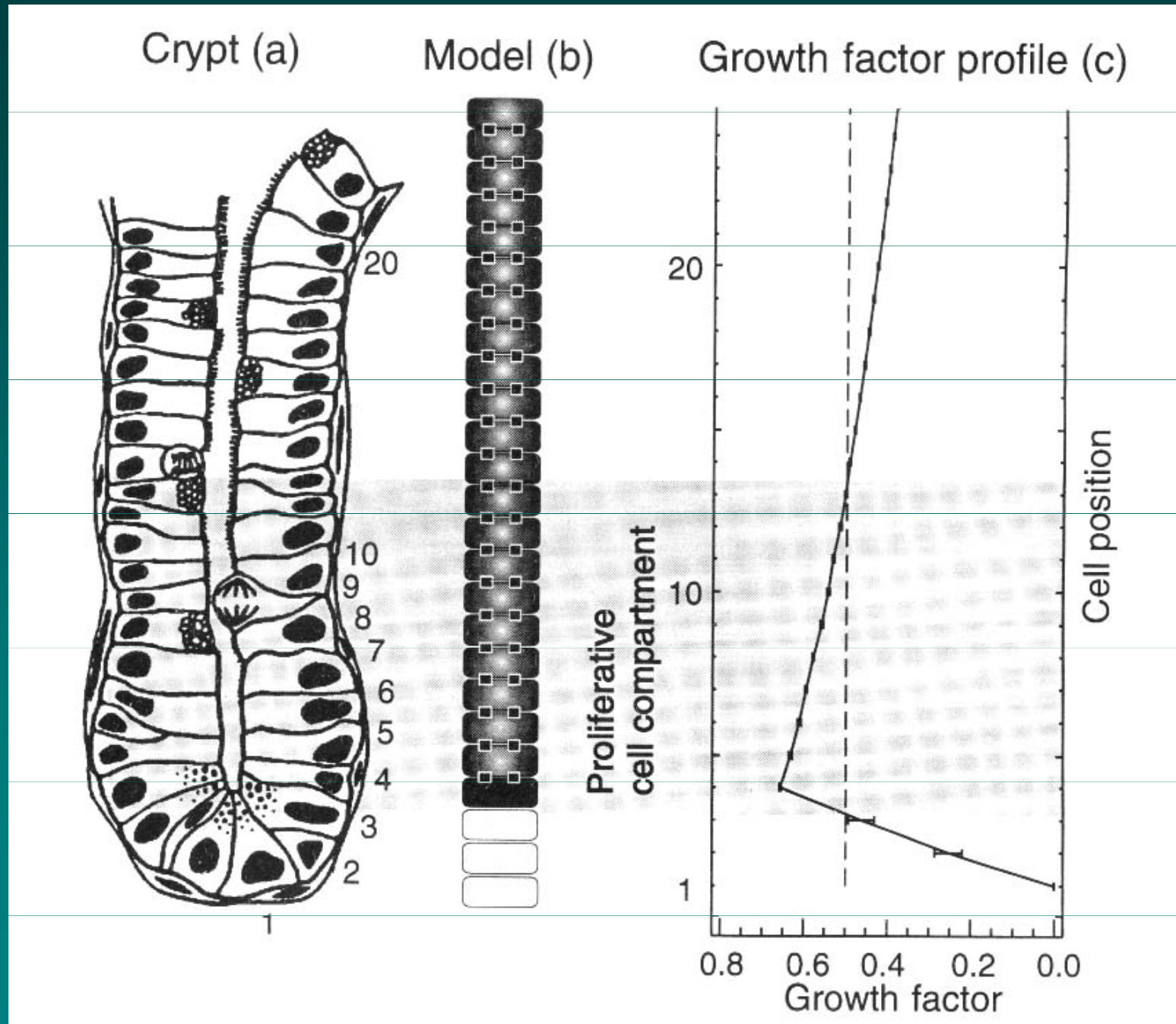
Iniciované preneoplastické buňky jsou udržovány v latentním stavu v důsledku působení těchto "přirozených" regulačních mechanismů.

V podpůrné (promoční) fázi rozvoje nádorů se uplatňují

látky **působící negenotoxickými (nebo epigenetickými) mechanismy, tzv. nádorové promotory**, které způsobují změny chování buněk v důsledku deregulace zmíněných procesů.

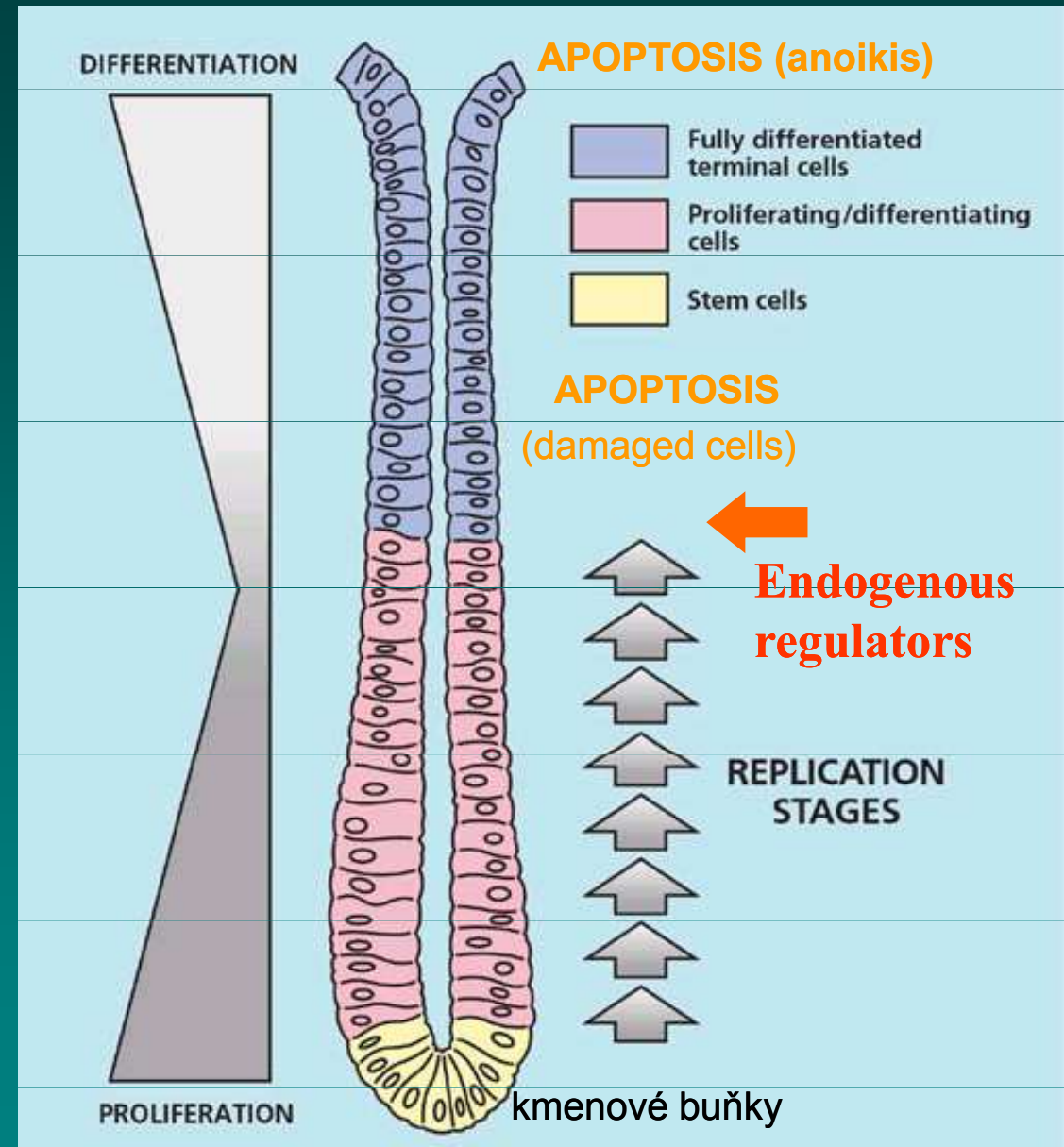
Zásahy, které vedou ke změnám v expresi genů a k poruchám homeostázy se odehrávají v buňce na různých úrovních a různými mechanismy.

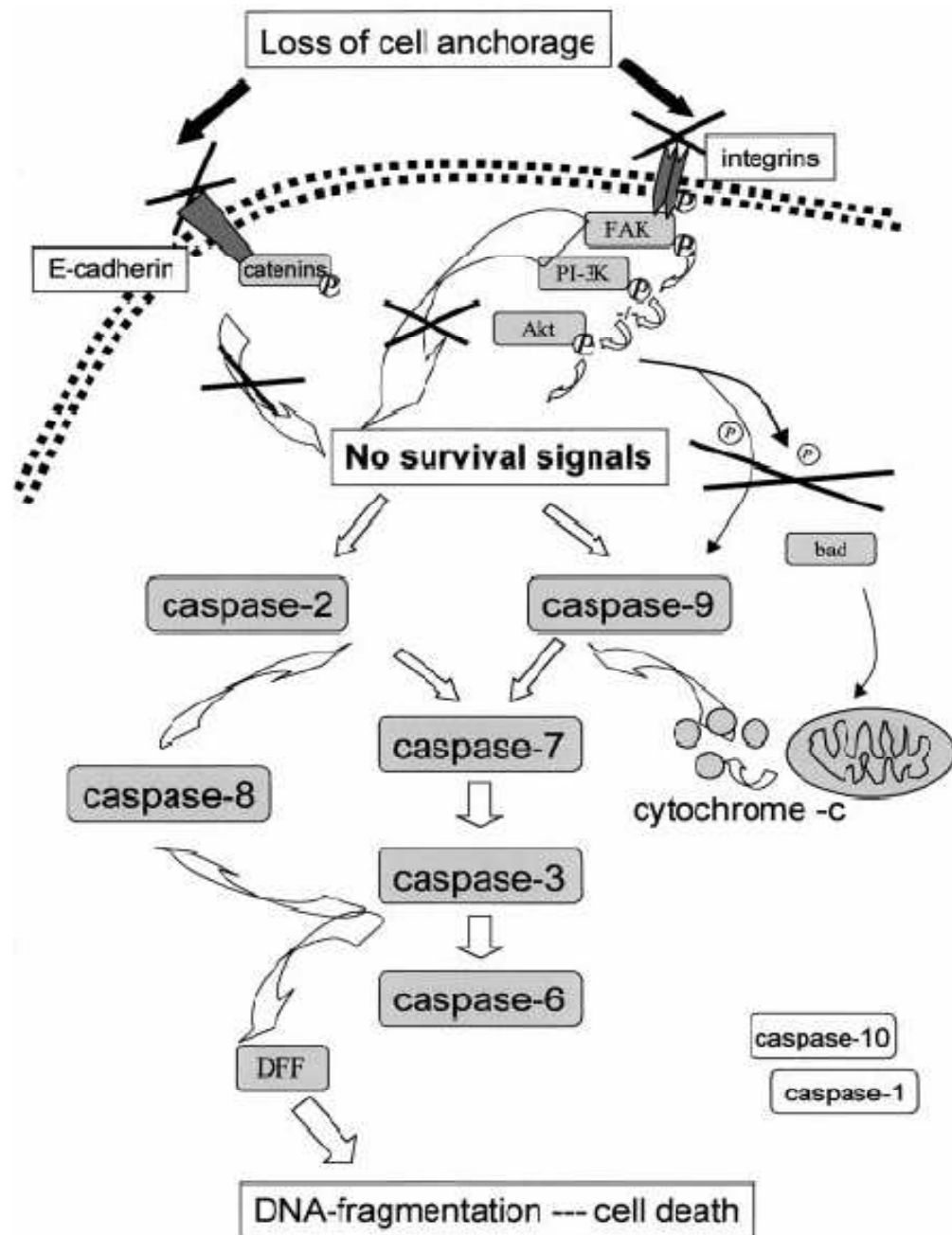
Střevní krypta a profil růstových faktorů



EPITEL TLUSTÉHO STŘEVA (kolonu)

- ◆ kontinuálně se obnovující buněčné populace
- ◆ řada zásadních fyziologických funkcí
- ◆ dynamická rovnováha mezi přírůstkem buněk na bázi krypty (proliferace) a úbytkem (apoptóza-anoikis) na povrchu
- ◆ regulace endogenními faktory (hormones and cytokines), ale rovněž složkami diety přítomnými v lumen střeva



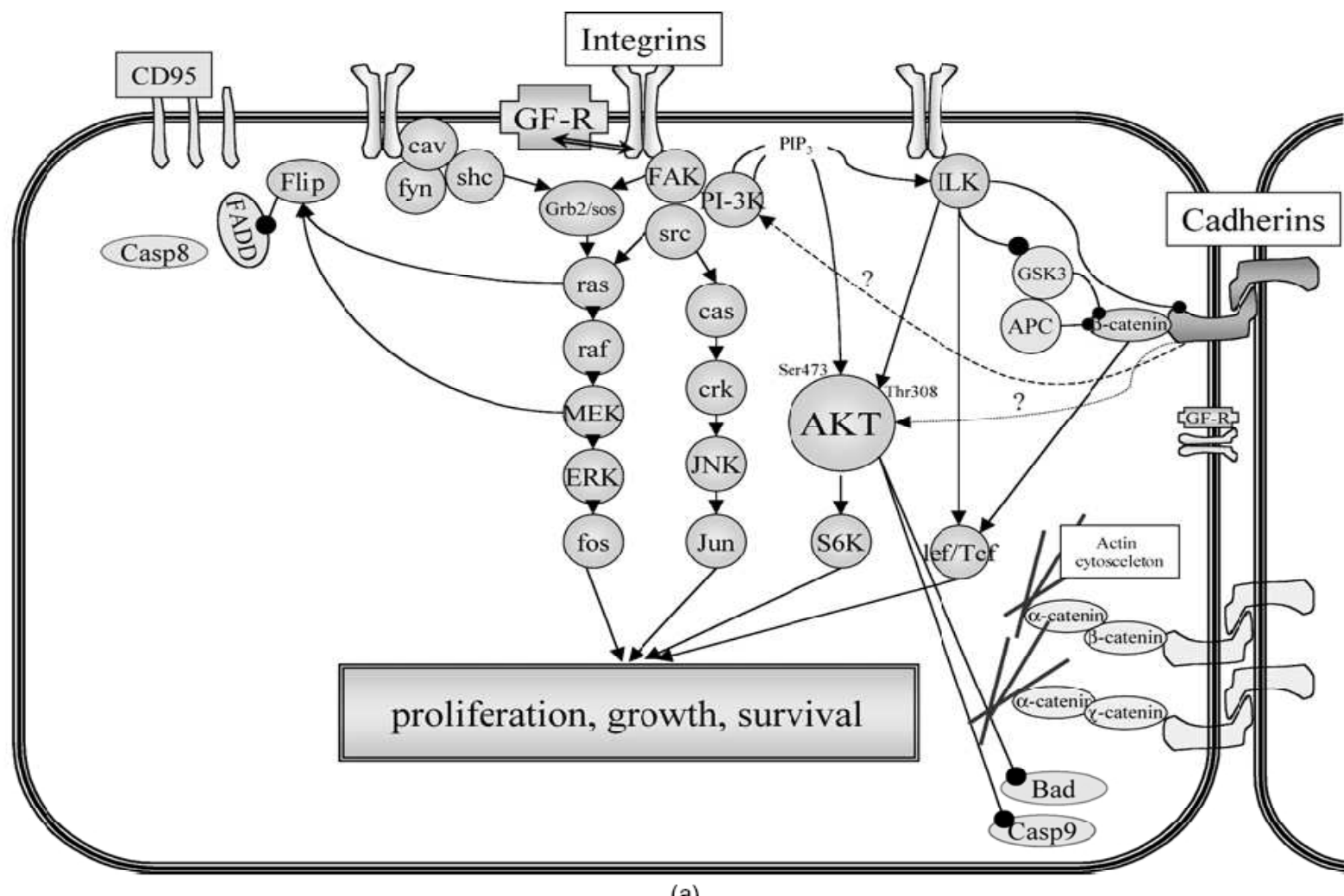


Signal transduction pathways associated with ANOIKIS

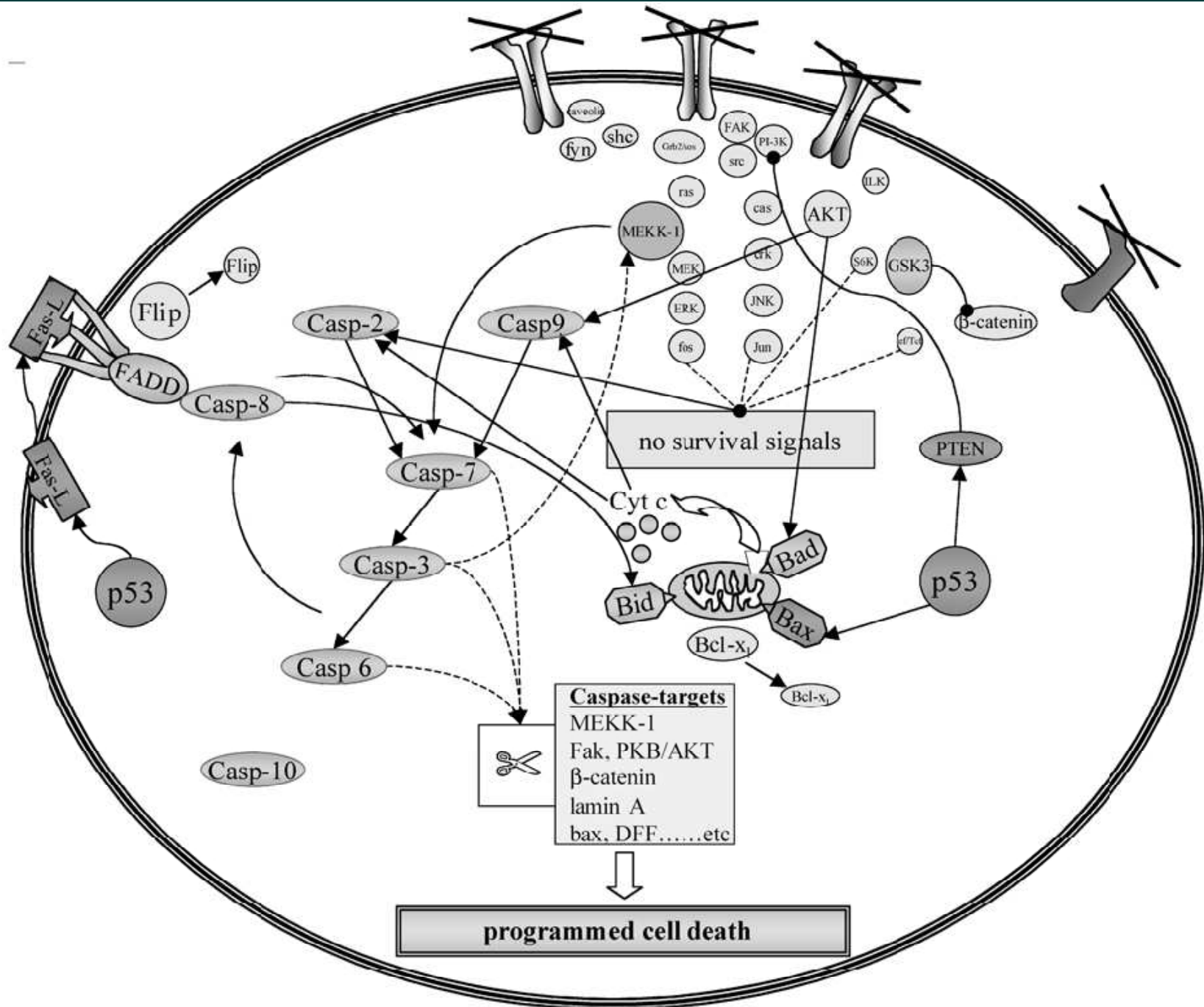
„Survival signalling pathways“ aktivované při kontaktu buňka-buňka a buňka - ECM

Figure 1. (a) Survival signaling pathways activated by cell-cell and cell-matrix anchorage. [Focal Adhesion-Kinase (FAK), Integrin-linked Kinase (ILK), caveolin (cav), phosphoinositide-3-OH kinase (PI-3K), phosphatidylinositide- (3,4,5) triphosphate 3 (PIP3), Protein kinase B (PKB/AKT), ras-extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun-NH₂-terminal kinase (JNK) /mitogen activated protein kinase (MAPK), p70 ribosomal protein S6 kinase (S6K), lymphoid enhancer factor (LEF)/T-cell factor (TCF), Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), adenomatosis coli gene product (APC), caspase (Casp), growth-factor receptors (GF-R), FLICE-inhibitory protein (Flip), Fas-associated death domain protein (FADD)]. (b) Signal transduction following loss of cell anchorage leading to anoikis. [MAP/ERK Kinase Kinase 1 (MEKK-1), Caspase (casp), cytochrome c (cyt c), Fas-Ligand (Fas-L), FLICE-inhibitory protein (Flip), Fas-associated death domain protein (FADD), DNA fragmenting factor (DFF)].

(Continued on next page.)



Přenos signálů po ztrátě kontaktu vedoucí k indukci anoikis



(b)

INICIACE

PROMOCE

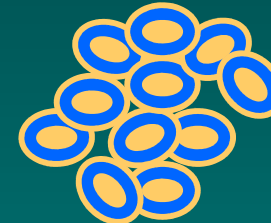
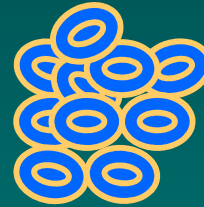
PROGRESE

MUTAGENY
RADIACE
VIRUSY....

NEGENOTOXICKÉ
KARCINOGENY

GENOTOXICKÉ
+NEGENOTOXICKÉ
FAKTORY

GENOTOXICITA



NORMÁLNÍ
BUŇKA

INICIOVANÁ
BUŇKA

PRENEOPLASTICKÉ
PORUCHY

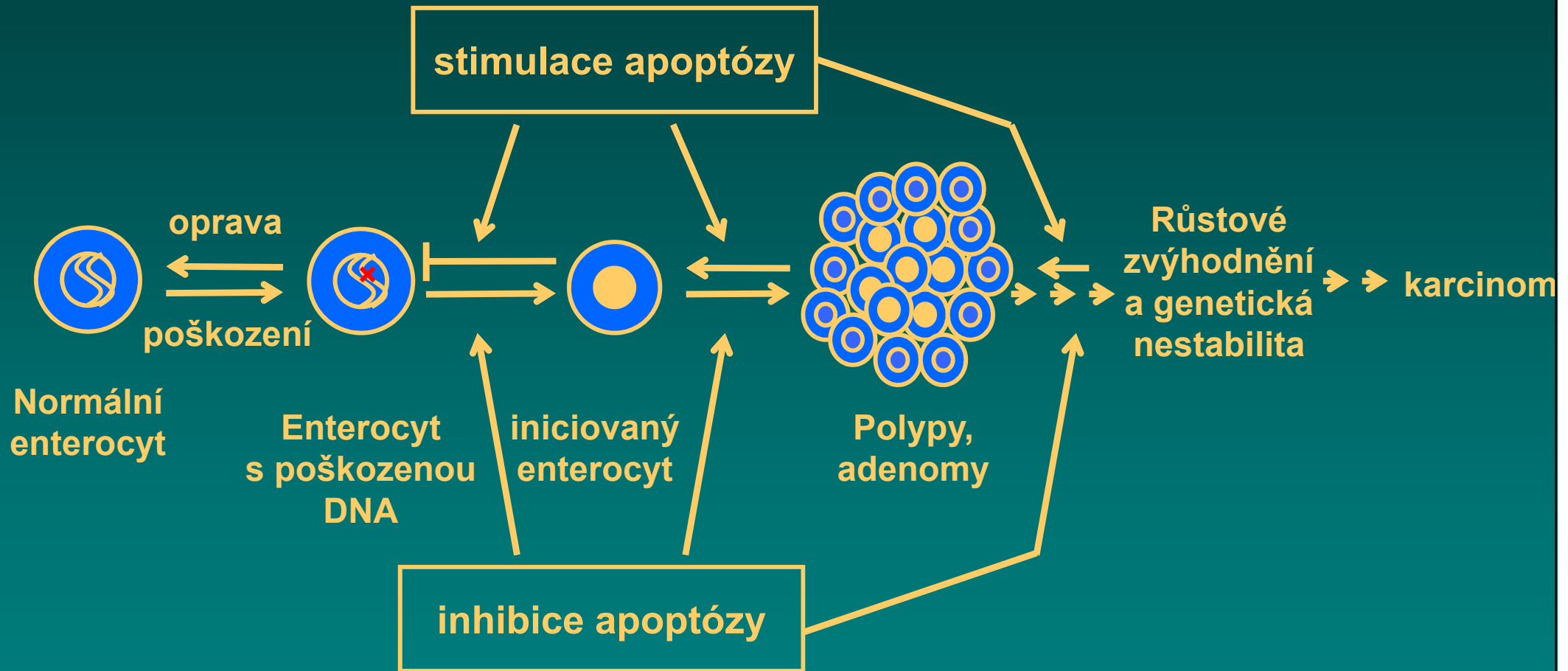
MALIGNÍ
NÁDOR

INVAZE
METASTÁZY

AKTIVACE PROTO-ONKOGENŮ
INAKTIVACE NÁDOROVĚ SUPRESOR. GENŮ
INAKTIVACE ANTIMETASTAT. GENŮ

Mnohostupňový proces karcinogeneze

Vliv narušení (stimulace/inhibice) průběhu apoptózy v rámci procesu vícestupňové karcinogeneze



Karcinogeneze však znamená víc než jen mutagenezi

Kromě genových a chromozomálních mutací (genotoxicita) zahrnuje i
NEGENOTOXICKOU SLOŽKU (EPIGENETICKÉ DĚJE)
změny v expresi genetické informace
na transkripční, translační nebo postranslační úrovni

Geny jsou zapínány a vypínány

- ▶ během vývoje
- ▶ během buněčného cyklu, když buňka proliferuje
- ▶ když buňka diferencuje
- ▶ když je diferencovaná buňka stimulována k adaptivní odpovědi

Iniciovaná kmenová buňka je omezena v dalším růstu okolními normálními buňkami.

Po **expozici nádorovým promotorem** nebo promočními podmínkami (buněčná smrt nebo odstranění buněk) suprimující účinek okolních buněk prostřednictvím kontaktní inhibice mizí.

Hlavní mechanismy charakterizující negenotoxickou karcinogenezi

- ovlivnění mechanismů signálové transdukce
 - aktivace specifických receptorů
 - produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, RNS)
 - změny GJIC
 - změny v metylaci DNA nebo v acetylaci histonů
 - ovlivnění exprese onkogenů, nádorově supresorových genů a genů buněčného cyklu
-
- změny buněčného cyklu
 - změny proliferace (regenerativní nebo mitogenní)
 - změny v apoptóze
 - změny v rovnováze vyúsťující ve změnu obratu buněk ve tkáni

VÝŽIVA

hraje roli při vzniku v aterosklerózy, nádorů a řady dalších onemocnění.

Mechanismy jsou předmětem výzkumu

Je prokázáno, že

vysoký příjem kalorií a tvorba tukových zásob je rizikovým faktorem.

Příjem, absorpce a metabolismus velkého množství potravy vyžaduje **oxidativní metabolismus** a produkuje více reaktivních kyslíkových radikálů, které poškozují DNA.

Ukázalo se, že příjem tuků, zejména živočišných zvyšuje riziko aterosklerózy a nádorů.

Epidemiologické studie předpokládají

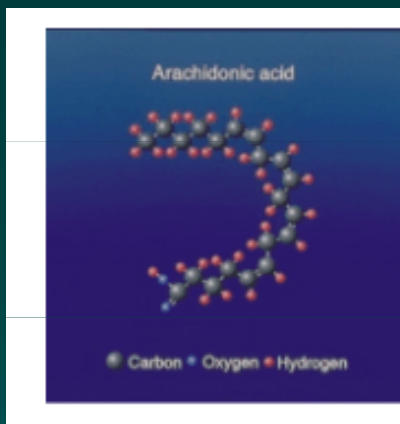
pozitivní korelaci mezi příjmem tuků a nádory prsu, kolonu a prostaty.

Navzdory dlouhé historii studií tuků a nádorů, zůstává řada protikladů.

Ukazuje se, že nejen kvantita, ale i kvalita tuků hraje důležitou roli, a že se zde uplatňují i rostlinné oleje a rybí olej, zejména

vysoce nenasycené mastné kyseliny (VNMK, PUFAs)

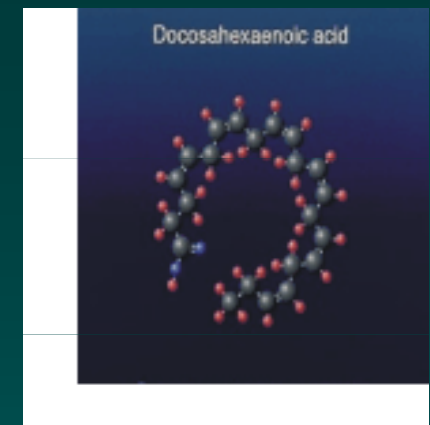
tříd n-3 a n-6



Zdroje tuků

živočišné a rostlinné

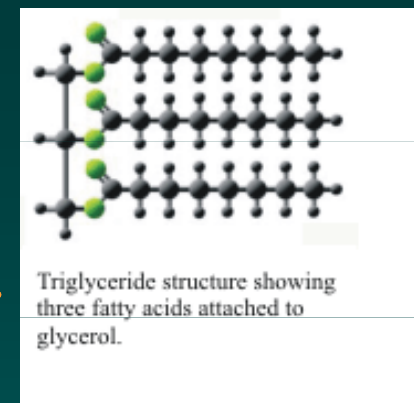
Mastné kyseliny



- ▶ s krátkým řetězcem – 6-12 C (SCFA)
kys. máselná, propionová
- ▶ nasycené – 12 a více C
kys. palmitová, stearová
- ▶ mononenasycené – 16 a 18 C, 1 dvojná vazba
kys. palmitoolejová, olejová
- ▶ polynenasycené (PUFA) – 18 a více C, 2 a více dvojných vazeb
kys linoleová, alfa-linolenová – esenciální MK

Změny membránových fosfolipidů přímo ovlivňují **syntézu lipidových mediátorů** typu **eikosanoidů**, PAF a sekundárních přenašečů diacylglycerolu a ceramidu.

Lipidové mediátory ovlivňují **produkci a funkci cytokinů**. To má důležitý dopad na řadu imunitních a buněčných funkcí včetně proliferace, diferenciaci a apoptózy



Imbalance v lipidovém metabolismu hraje roli u mnoha závažných onemocnění

- ▶ Vysoká hladina cholesterolu je spojena s **kardiovaskulárními chorobami**, které jsou nejčastější příčinou úmrtí v populaci.
- ▶ Lipidy produkované buňkami imunitního systému jsou zahrnuty v **zánětlivých onemocněních** jako je revmatoidní artritida, sepse, astma, zánětlivé onemocnění střeva.
- ▶ Lipidy hrají úlohu také v **psychických a neurodegenerativních onemocněních** (deprese, schizofrenie, Alzheimerova choroba)
- ▶ Lipidy ovlivňují počátek a rozvoj **nádorových onemocnění**

Relativní procento různých mastných kyselin v potravě a změny způsobené průmyslovým zpracováním potravin

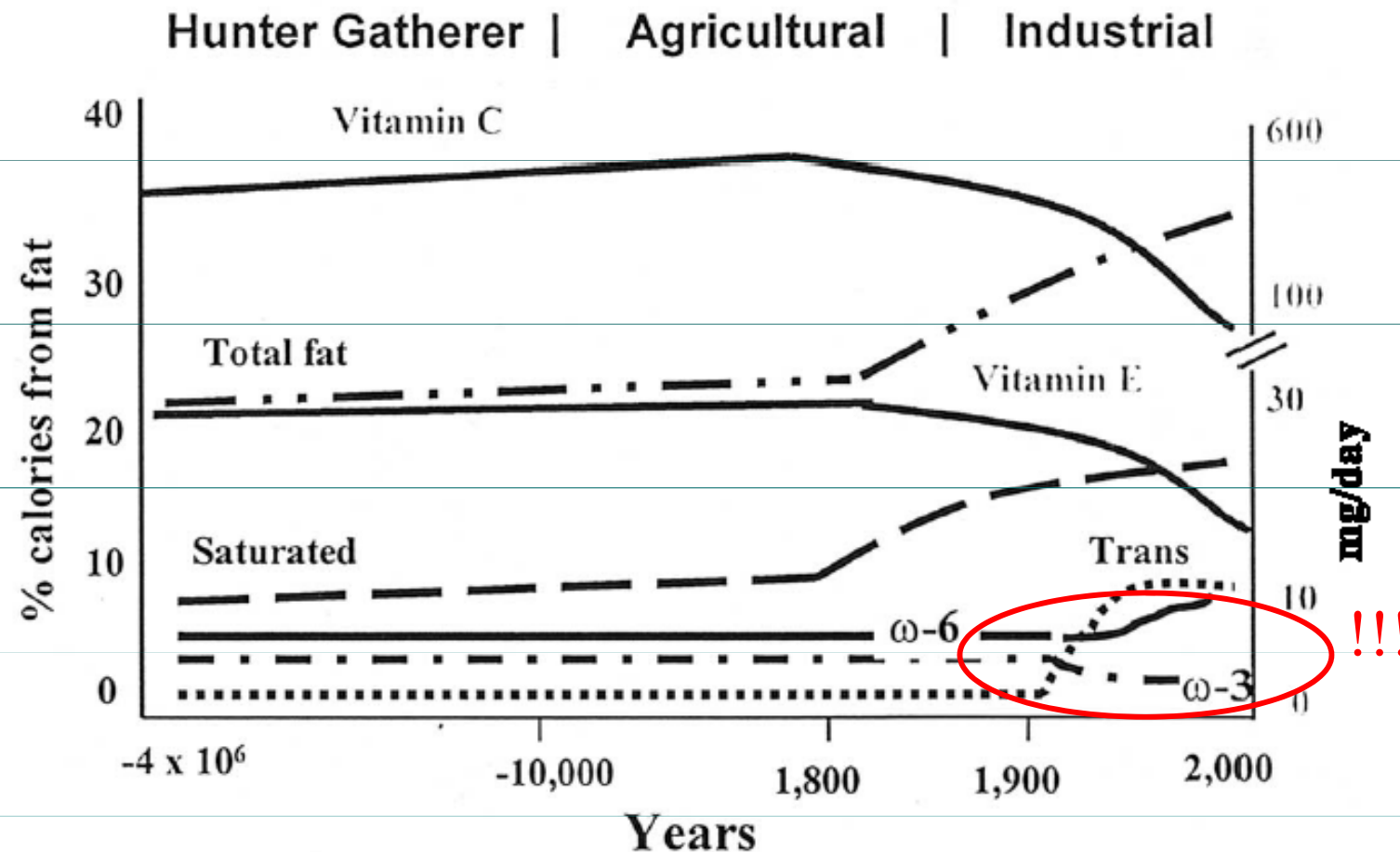


Fig. 1. Hypothetical scheme of fat, fatty acid ($\omega 6$, $\omega 3$, *trans* and total) intake (as percentage of calories from fat) and intake of vitamins E and C (mg/d). Data were extrapolated from cross-sectional analyses of contemporary hunter-gatherer populations and from longitudinal observations and their putative changes during the preceding 100 years [75].

VYSOCE NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY

(Polyunsaturated fatty acids - PUFAs) - mastné kyseliny s 2 i více dvojnými vazbami.

Tři hlavní skupiny PUFAs:

n-3 (omega-3), n-6 a n-9, podle polohy dvojných vazby nejbližší ke koncovému metylovanému uhlíku.

Tyto jsou metabolizovány stejným způsobem alternativními **desaturačními a elongačními enzymy**.

NOMENKLATURA:

Např. kyselina arachidonová, 20:4, n-6

20 - počet uhlíků

4 - počet konjugovaných dvojných vazeb

n-6 - poloha první dvojných vazby od metylovaného konce molekuly

Téměř všechny dvojných vazby jsou ve víceméně stabilní cis - konfiguraci.

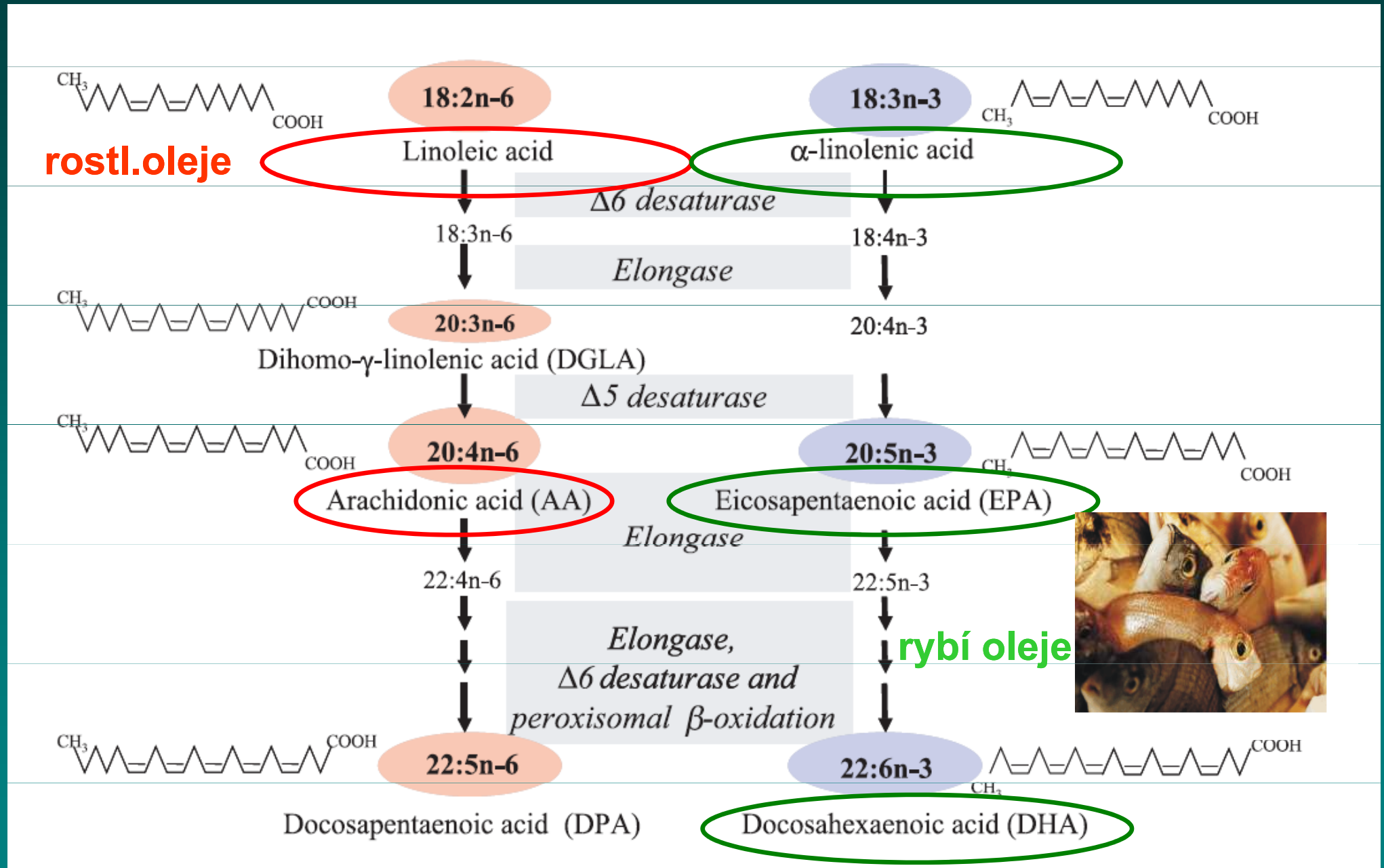
Živočichové nedovedou syntetizovat n-3 a n-6 PUFAs de novo ani nedovedou přeměnit jednu sérii v druhou.

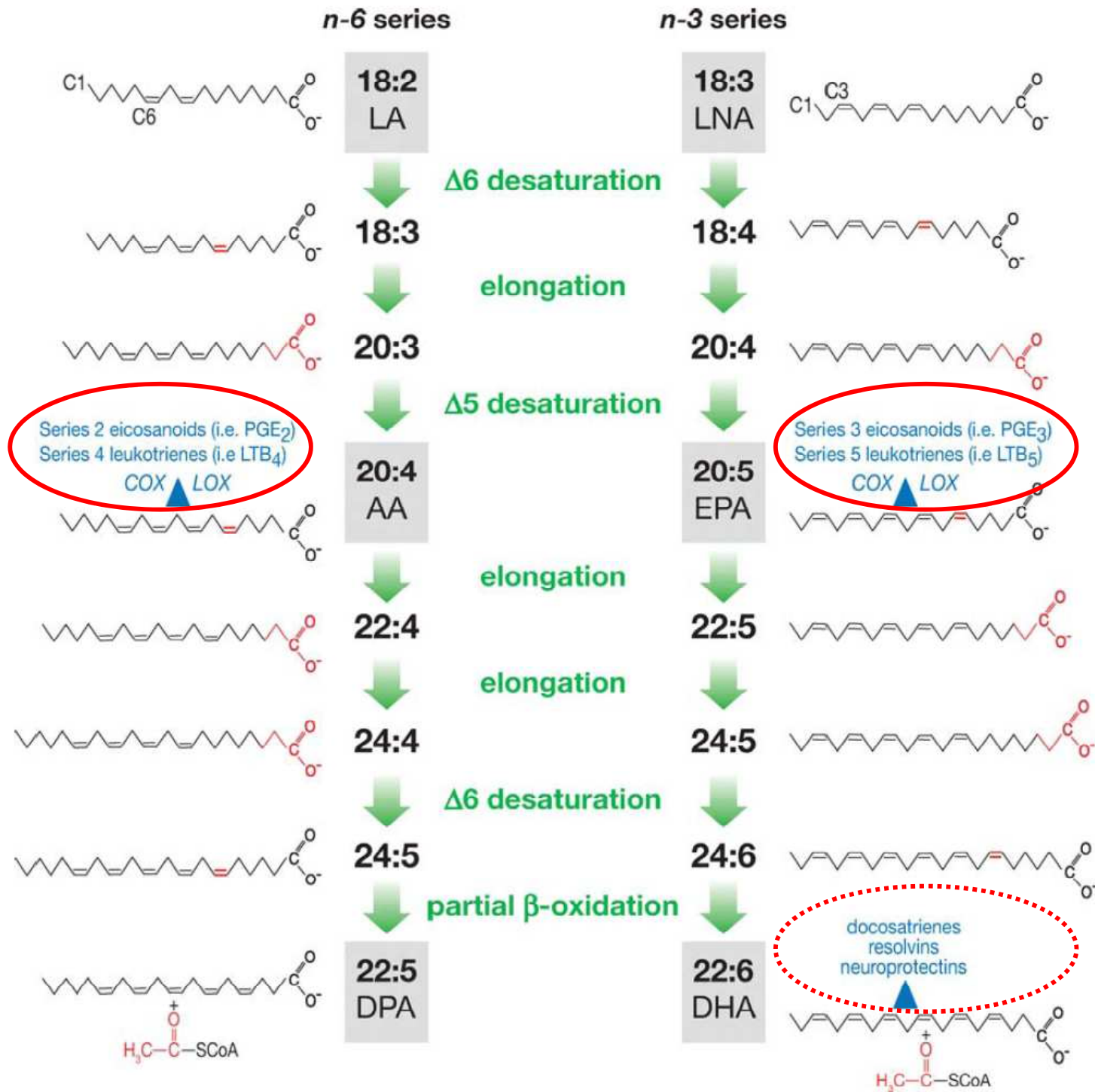
Tyto **ESENCIÁLNÍ MASTNÉ KYSELINY** musí být obsaženy v potravě podobně jako vitamíny. Jsou životně důležité jako složka všech membrán a permeabilní bariéry pokožky a jako prekursory eikosanoidů a s nimi souvisejících látek, které hrají důležitou regulační úlohu ve tkáních.

Zdrojem jsou rostlinné oleje (n-6 PUFA) a rybí olej (n-3 PUFA)

VYSOCE NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY (VNMK)

(Polyunsaturated fatty acids - PUFAs) - mastné kyseliny s 2 i více dvojnými vazbami. Esenciální prekurzorové kyseliny řady n-6 a n-3





Důležitý je poměr n-3: n-6 VNMK!!!

Kys. linolová (18:2, ω -6)

kyselina arachidonová (AA, 20:4), rostlinné oleje
zdroj eikosanoidů (prostaglandiny, leukotrieny) význam u
různých nádorů.

V experimentálních systémech často podpůrný účinek pro
vznik a rozvoj nádorů

Kys. alfa-linolenová (18:3, ω -3)

kys. eikosapentaenová (20:5) a dokosahexaenová (22:6)
z rybích a některých rostl. olejů (pupalka, len, rakytník)

V experimentálních systémech často inhibiční účinek pro
vznik a rozvoj nádorů



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.

PREVENCE

Epidemiologické studie – snížená incidence nádorů (kolonu) v populacích konzumujících velké množství ω -3 VNMK z mořské stravy

Experimentální studie

- ω -3 VNMK inhibují karcinogeny-indukovanou karcinogenezi
- redukují růst transplantovaných nádorů u laboratorních zvířat
- 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

TERAPIE

Při **chirurgických zákrocích** předoperační perorální nebo pooperační enterální či parenterální dieta s ω -3 VNMK zlepšuje postoperační zánětlivou a imunitní odpověď a snižuje infekci.

Dieta s ω -3 VNMK zlepšuje **nádorovou kachexii a kvalitu života**

Kombinace se standartní terapií (chemoterapie, záření)

- dieta s ω -3 VNMK netoxický způsob zvýšení účinků terapie
- samotné použití ω -3 VNMK užitečný přístup, jestliže je vyloučena toxická standartní terapie.

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

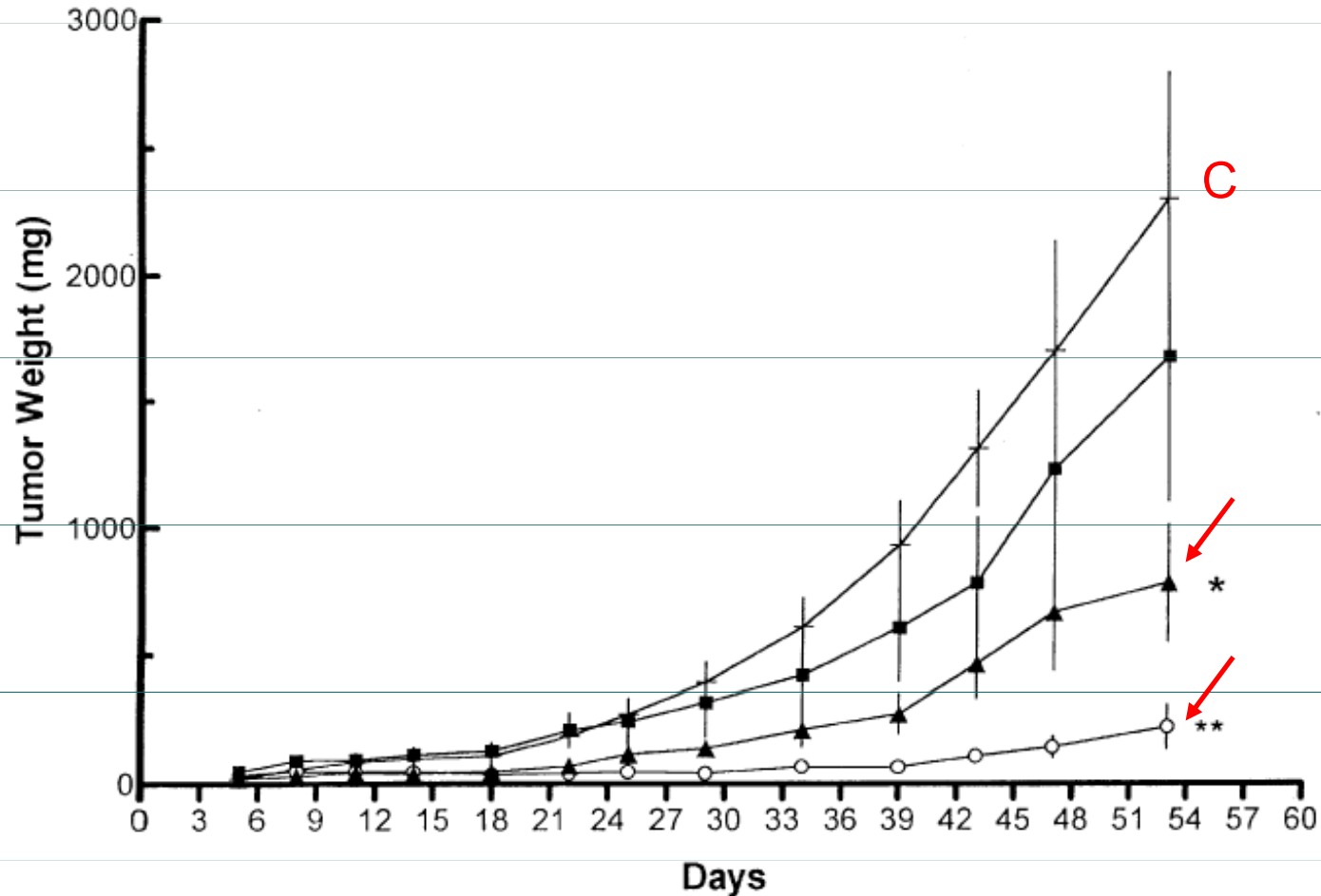


Fig. 1. Effect of dietary fatty acids (corn oil, menhaden oil, golden algae oil) on the growth of WiDr tumor in athymic mice. Tumor weights were estimated using the formula (tumor weight in mg = $A \times B \times C/2$) where A , B , C represent the three perpendicular diameters of the tumor in millimeters. 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.

Prokázány změny ve složení a metabolismu lipidů!!!!

- ▶ v plazmě nádorových pacientů
- ▶ u pacientů se zánětlivým onemocněním střeva (IBD – ulcerativní kolitida, Crohnova nemoc)
- ▶ v nádorové tkáni a buňkách ve srovnání s nenádorovými

Zejména snížení obsahu ω -3 VNMK (DHA) ve srovnání s ω -6 (kys. linolová a arachidonová), změny v expresi genů lipidového metabolismu, změny aktivit enzymů (fatty acid syntáza – FAS)

Integrovaný pohled na komplexní lipidové interakce, které určují výsledný tzv. LIPIDOM – lipidový profil jednotlivce.

S protekcí určitých typů nádorů (např. prsu) spojen složený indikátor kombinující zvýšené mononenasyčené MK a nízký poměr omega6/omega 3. Tento lipidom by se mohl stát templátem pro detekci rizika nádorů prsu ve vztahu k dietě.

(Bougnoux P. et al, Diet, Cancer and Lipidome
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15, 2006)

MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY působení ω -3 VNMK

- ▶ změny vlastností buněčných membrán (fluidita, lipidové rafty)
- ▶ suprese biosyntézy eikosanoidů odvozených od AA – změna imunitní odpovědi a modulace zánětu, proliferace, apoptózy, tvorby metastáz a angiogeneze
- ▶ ovlivnění signálové transdukce, aktivity transkripčních faktorů (NF κ B, PPAR γ) a genové exprese – změny metabolismu, buněčného růstu a diferenciacce
- ▶ změny metabolismu estrogenů – redukce estrogeny stimulovaného růstu
- ▶ zvýšená nebo snížená produkce volných radikálů (kyslíku, dusíku)
- ▶ mechanismy zahrnující citlivost k insulinu

Složky lipidového metabolismu v buněčných signalizacích

Mediátory a modulátory

Biofyzikální vlastnosti membrán

Lipidový metabolismus

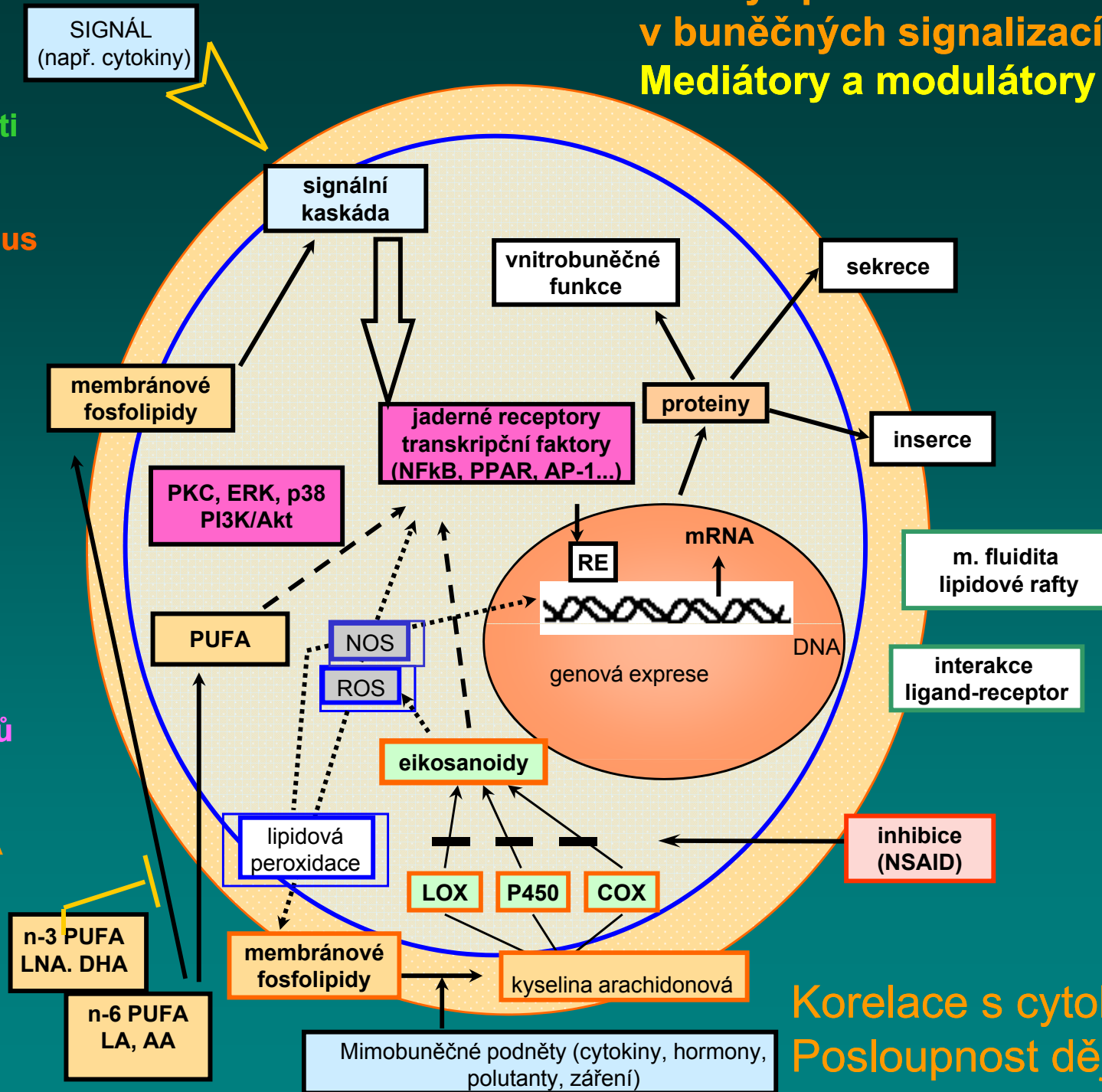
Aktivace fosfolipáz
Uvolňování a metabolizace AA
eikosanoidy

Oxidativní metabolismus

Transdukce signálů
(kinázy, fosfatázy)

Aktivace membrán. i vnitrobun.
receptorů – tr. faktorů

Expres proteinů
Expres genů - mRNA



Korelace s cytokinetikou
Posloupnost dějů

Phospholipid structure and the orientation of phospholipids in membrane

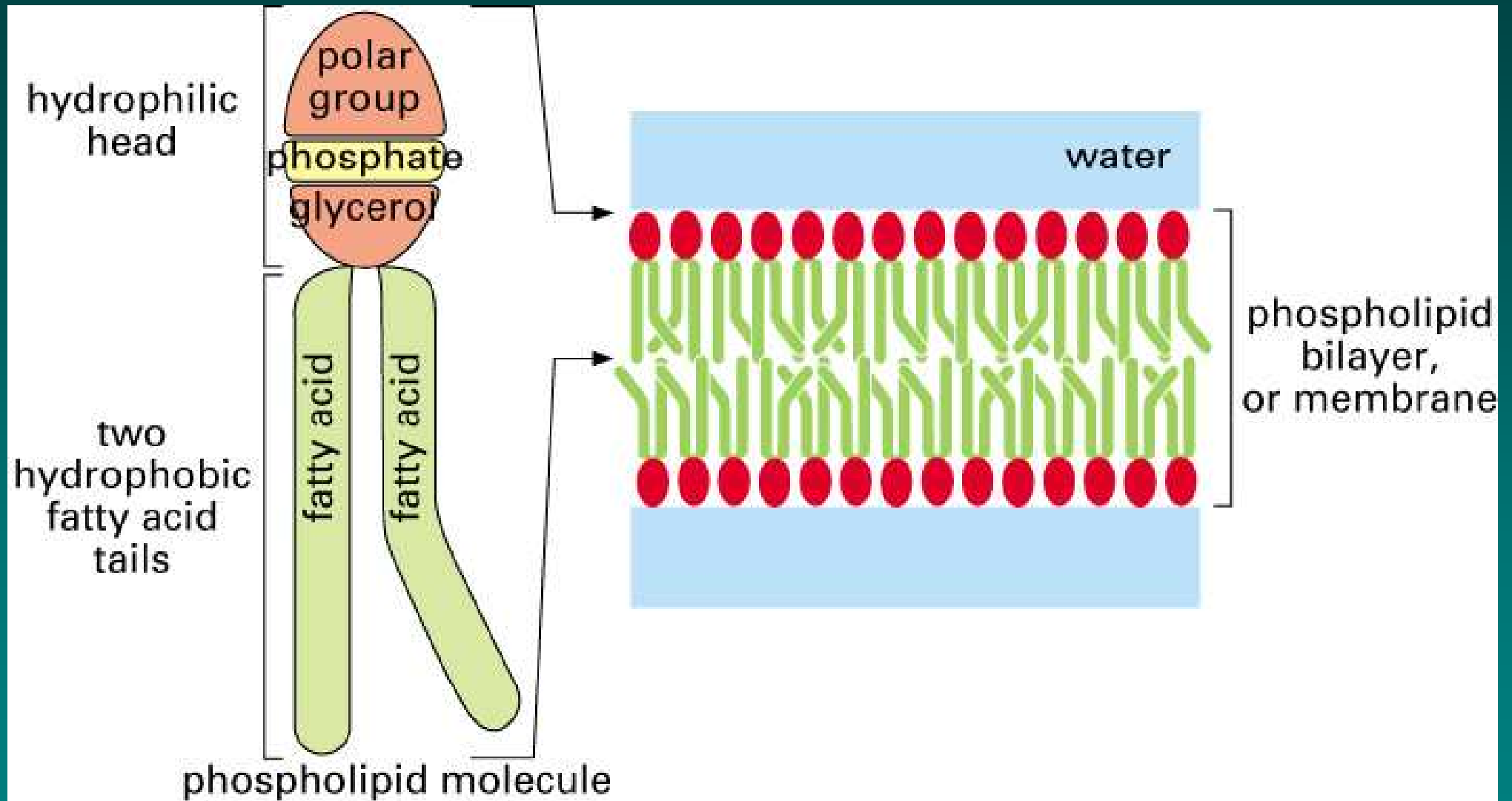
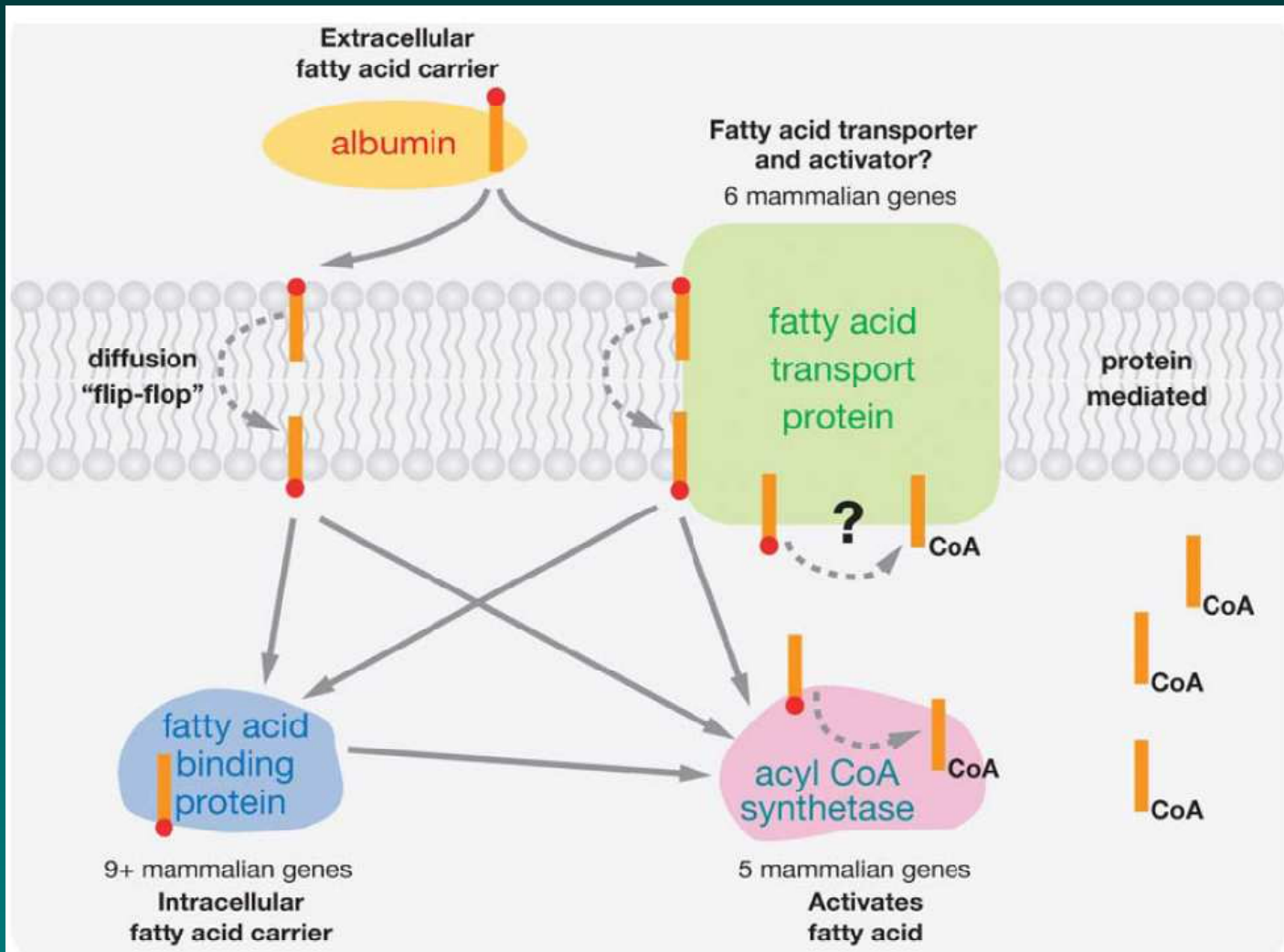


Figure 2-22. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

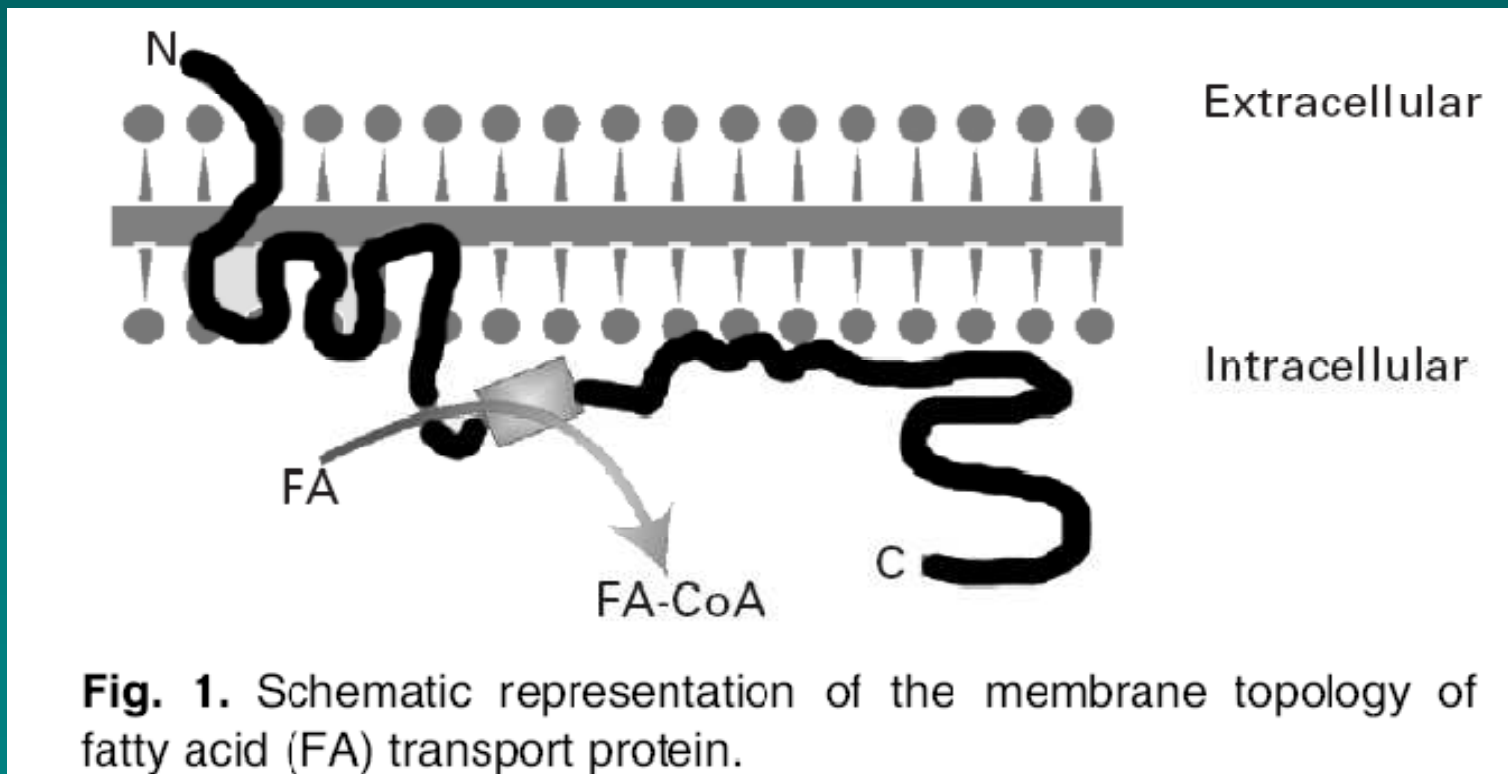


Proposed models for FA internalization in neurons. In the diffusion model of FA internalization, FAs are released from albumin and, owing to their hydrophobicity, partition into the outer leaflet of the plasma membrane. The FAs then “flip-flop” from the outer leaflet to the inner leaflet of the plasma 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 kolagen 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)



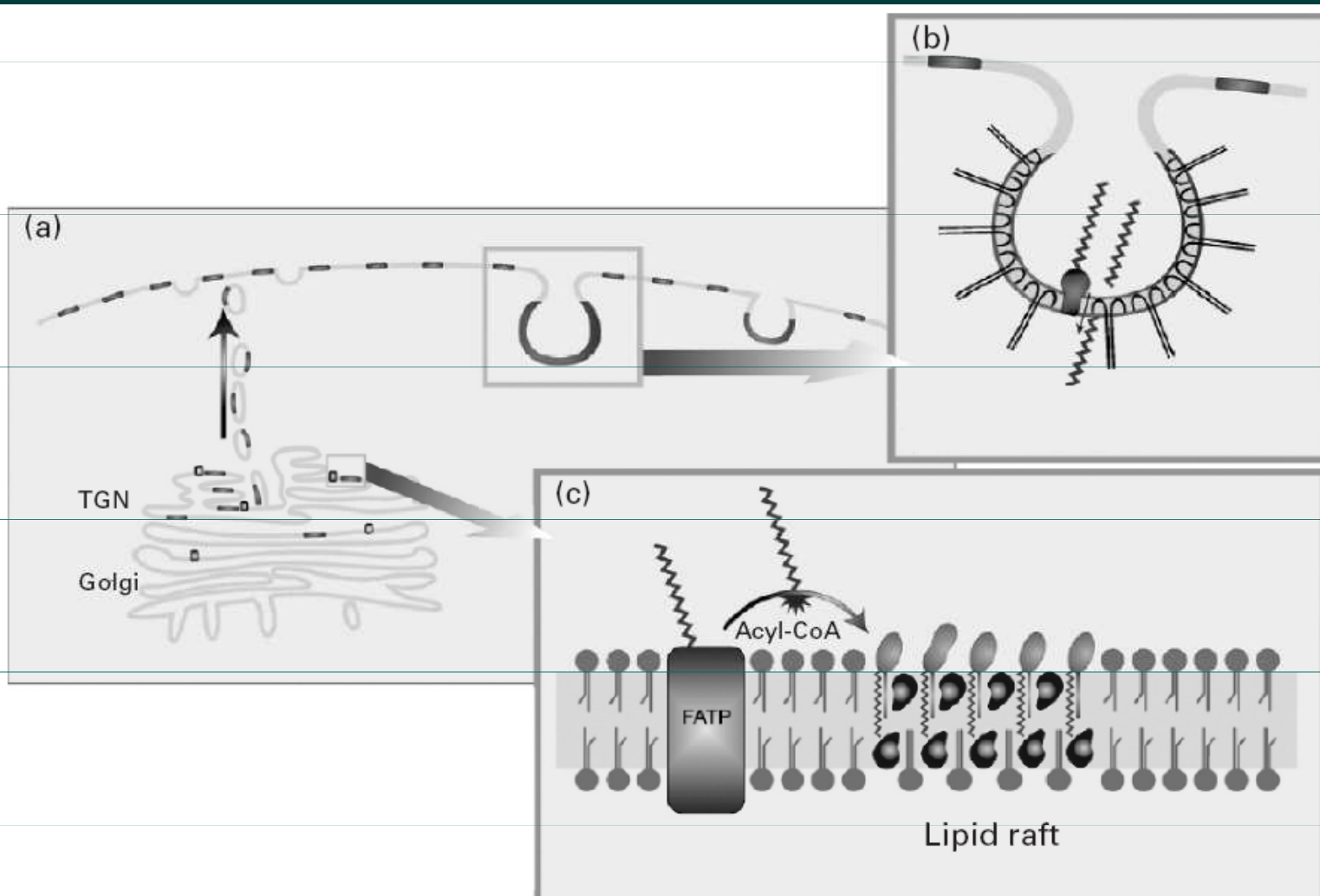
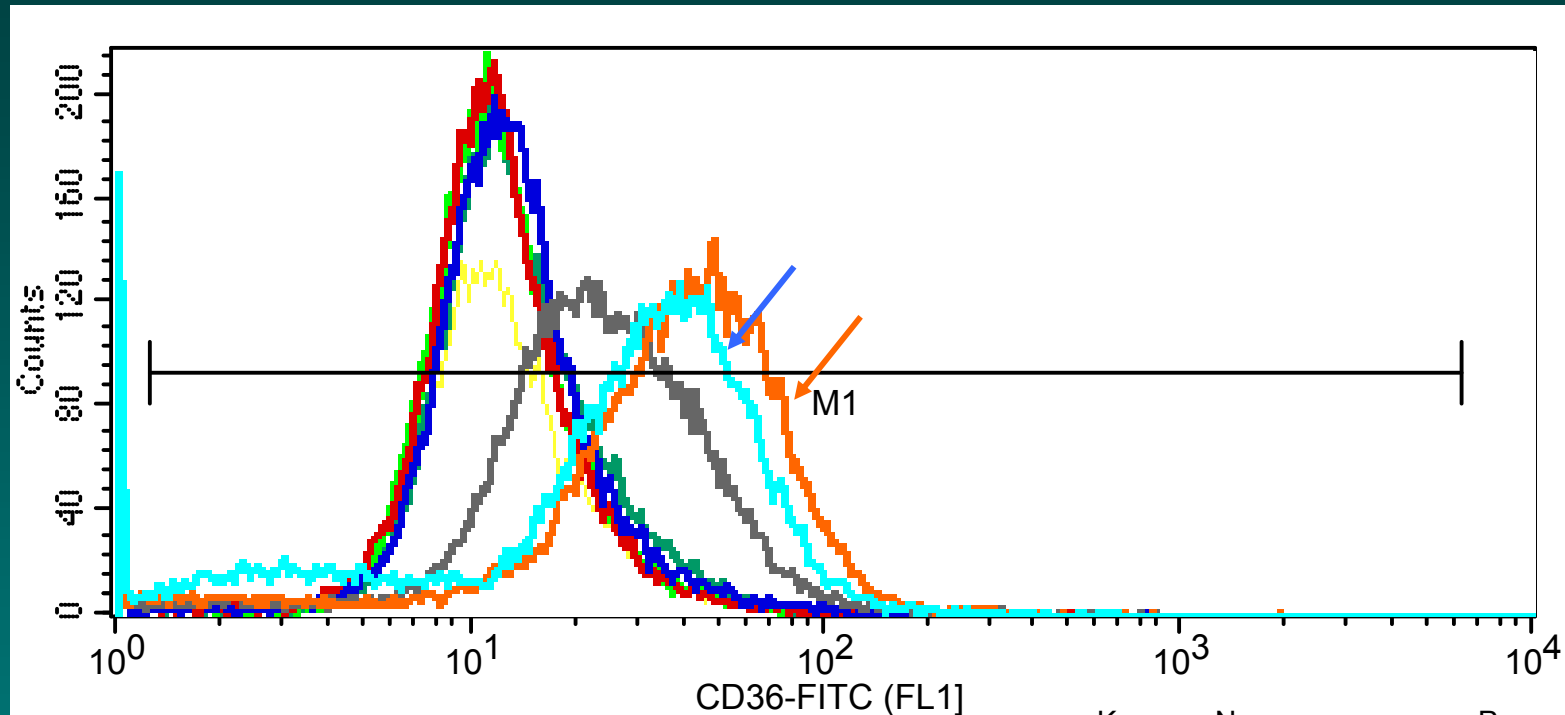


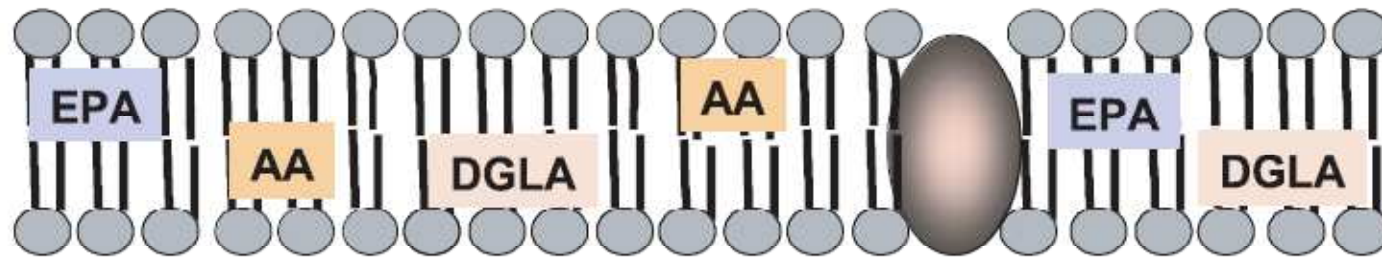
Fig. 3. Proposed model for cellular fatty acid uptake. Fatty acid transport protein (FATP, □), stabilization of lipid rafts (—) by acylated very-long-chain fatty acids (VLCFA) and fatty acid translocase (FAT)/CD36 incorporation into lipid rafts could cooperate to facilitate efficient long-chain fatty 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

membrane bilayer



Phospholipase A2



Cyclooxygenase (COX)

5 and 15 Lipoxygenases

Cyclooxygenase

Cyclooxygenase

5 and 15 lipoxygenases

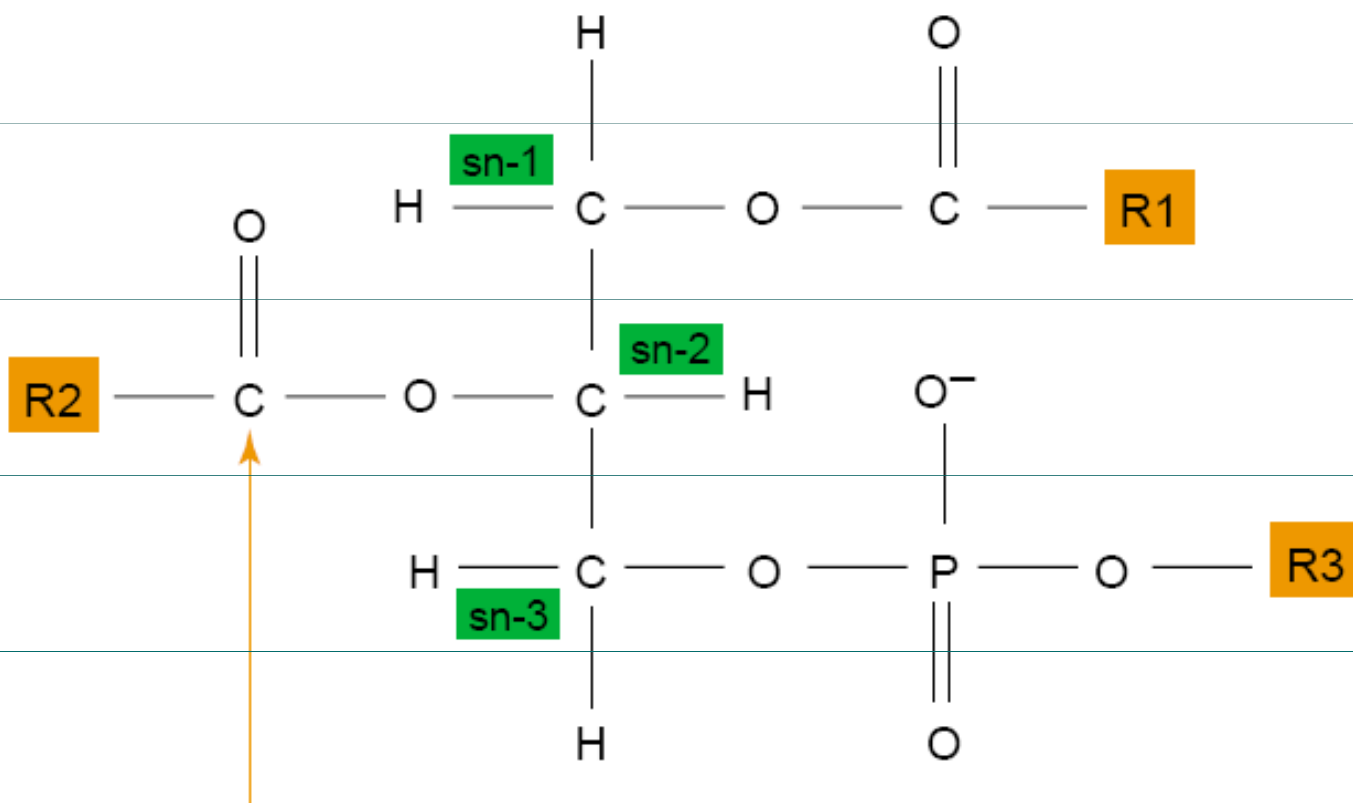
Prostaglandins series 1

Leukotrienes and Lipoxins series 4

Eicosanoids series 2

Eicosanoids series 3

Leukotrienes and Lipoxins series 5



Phospholipase A₂

Drug Discovery Today

Figure 1. Phospholipid structure with phospholipase A₂ cleavage site.

Fosfolipáza A2

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

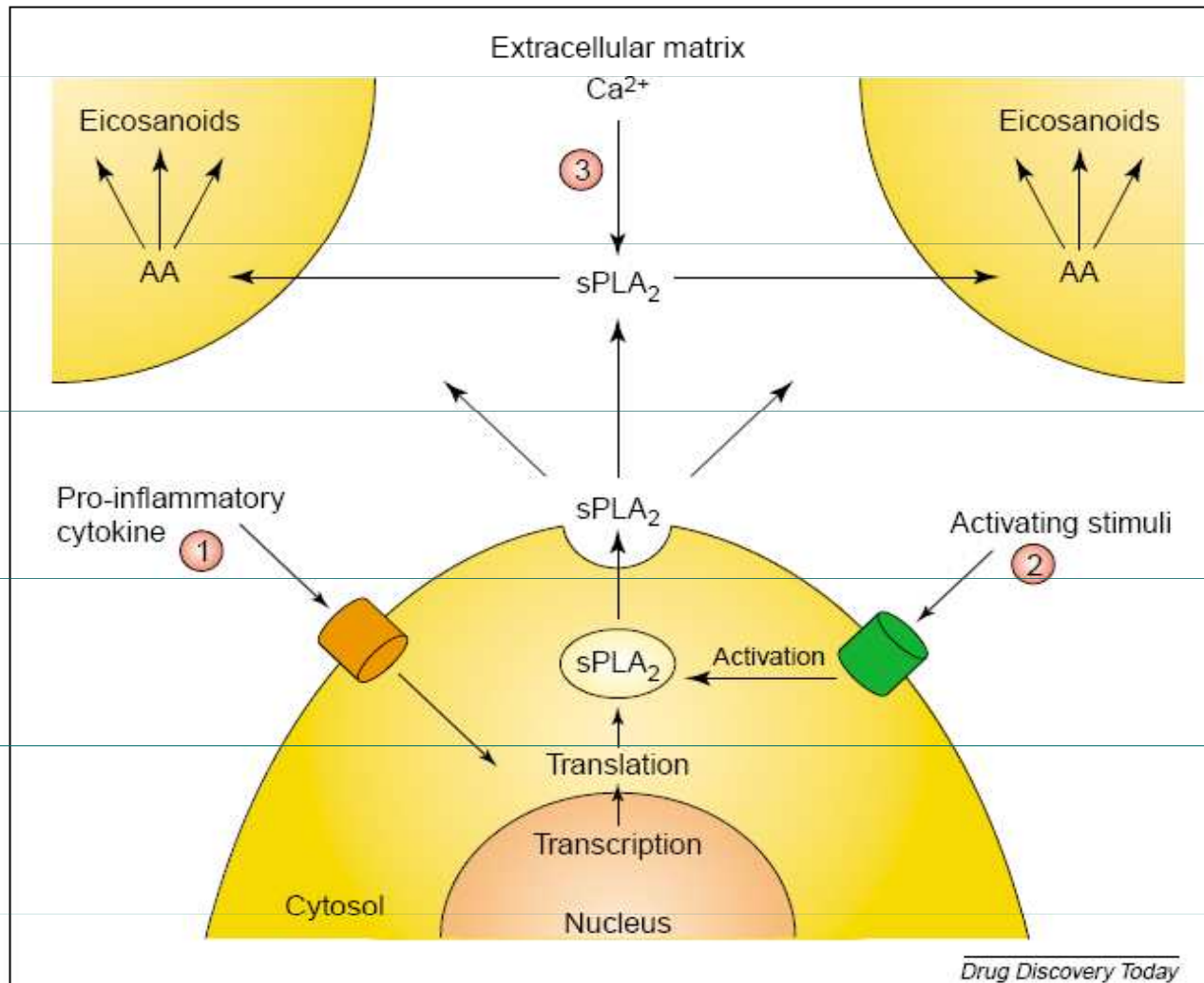
Tři skupiny:

- ▶ 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

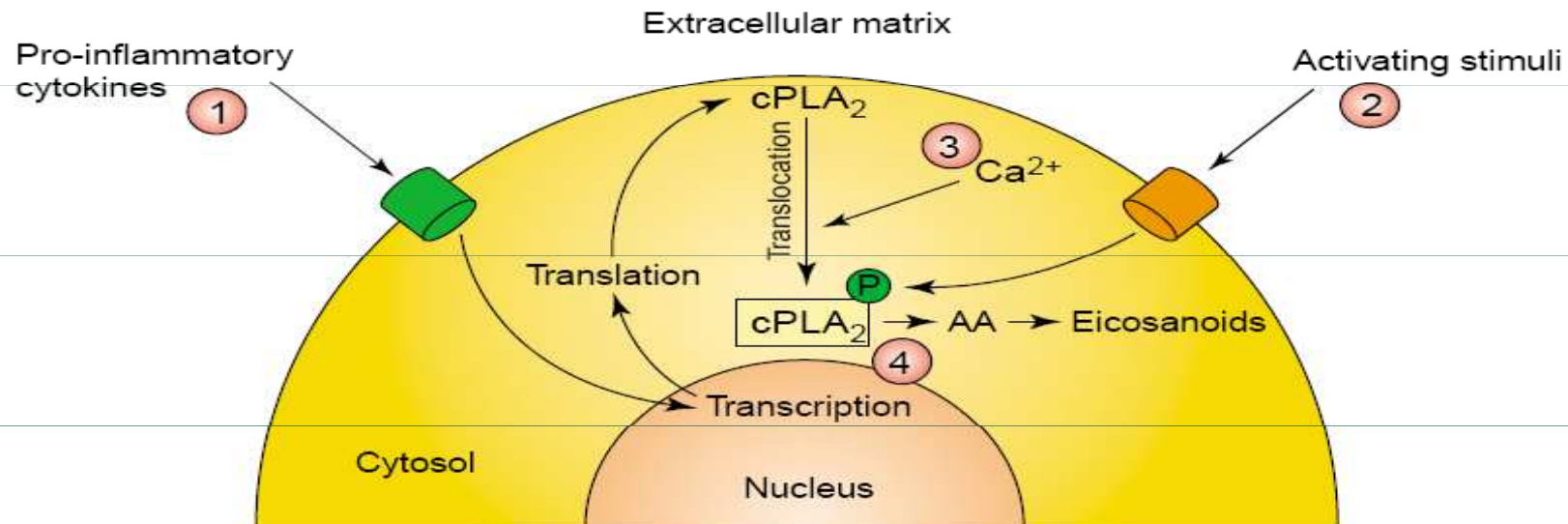


Drug Discovery Today

Figure 2. sPLA₂ participating in an inflammatory response. (1) Pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor α (TNF- α) or interleukin 1 β (IL-1 β) induce cellular expression of sPLA₂. (2) Activating factors cause release of sPLA₂ from secretory granules into the extracellular matrix. (3) In the presence of millimolar concentrations of Ca²⁺, sPLA₂ 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.

sPLA₂ v zánětlivé odpovědi

Prozánětlivé cytokiny indukují expresi sPLA₂. Aktivační faktory uvolňují sPLA₂ ze sekrečních granul do ECM. Za přítomnosti Ca²⁺ sPLA₂ hydrolyzuje membránové fosfolipidy sousedních buněk. Uvolnění AA a následná tvorba eikosanoidů indukuje zánět.



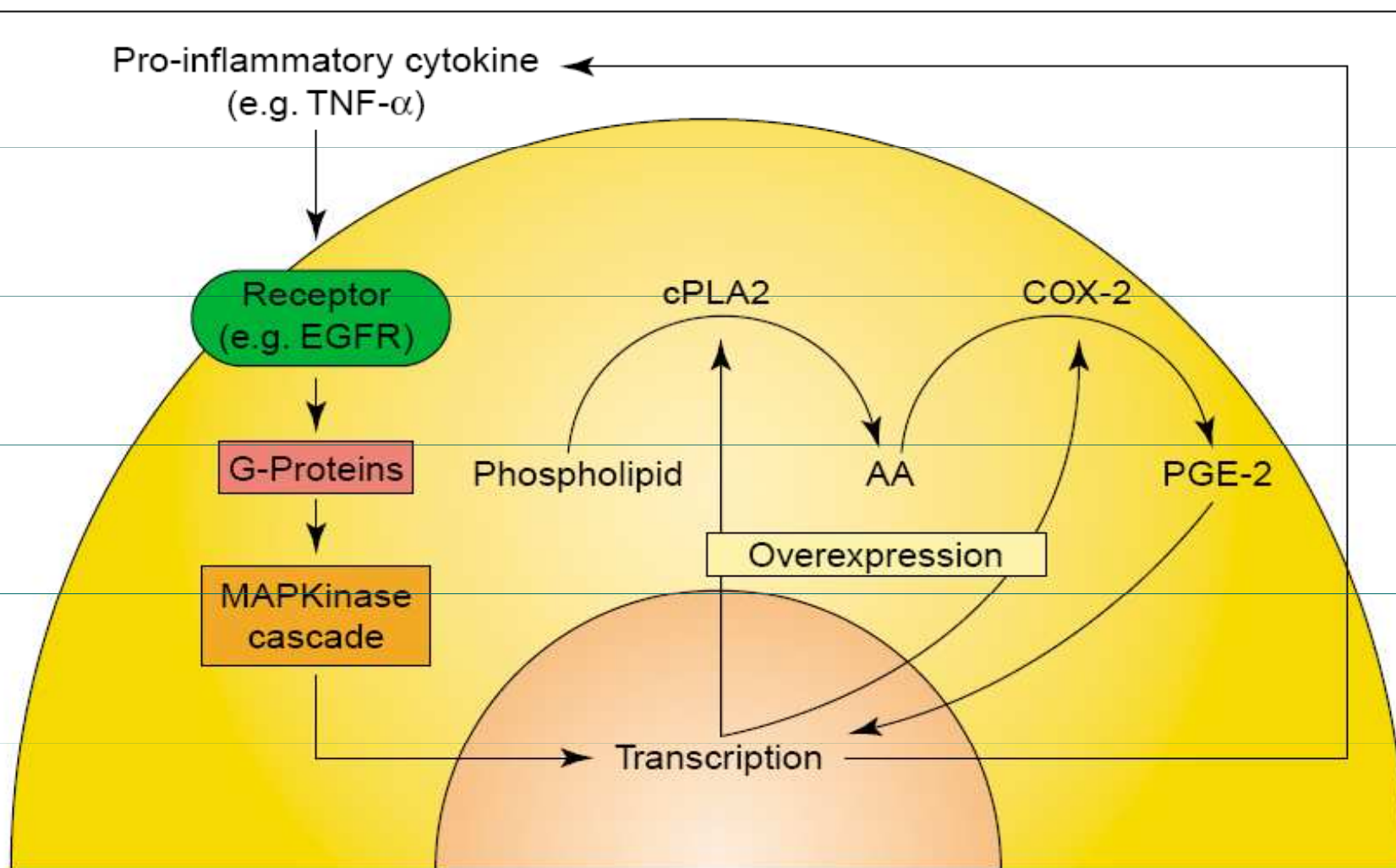
Drug Discovery Today

Figure 3. Activation of cPLA₂-α. (1) Pro-inflammatory cytokines including tumour necrosis factor α induce expression of cPLA₂-α. (2) Activation leads to mitogen-activated protein kinase-pathway-directed phosphorylation of cPLA₂-α. (3) Extracellular influx or mobilization of intracellular stores of Ca²⁺ bring about cPLA₂-α translocation from the cytosol to perinuclear membranes. This brings cPLA₂-α in close proximity to both its substrate and enzymes involved with eicosanoid synthesis. (4) Activated cPLA₂-α lyses membrane phospholipids providing arachidonic acid (AA) to a range of enzymes involved with eicosanoid synthesis, specifically COX and LOX.

Aktivace cPLA2

Prozánětlivé cytokiny indukují expresi cPLA2. Následuje fosforylace zprostředkovaná MAP kinázami. Ca²⁺ způsobuje translokaci cPLA2 z cytosolu do perinukleární membrány, kde je také její substrát a enzymy nutné k tvorbě eikosanoidů. Aktivovaná cPLA2 lyzuje membránové fosfolipidy a uvolňuje AA, která je metabolizovaná COX a LOX.

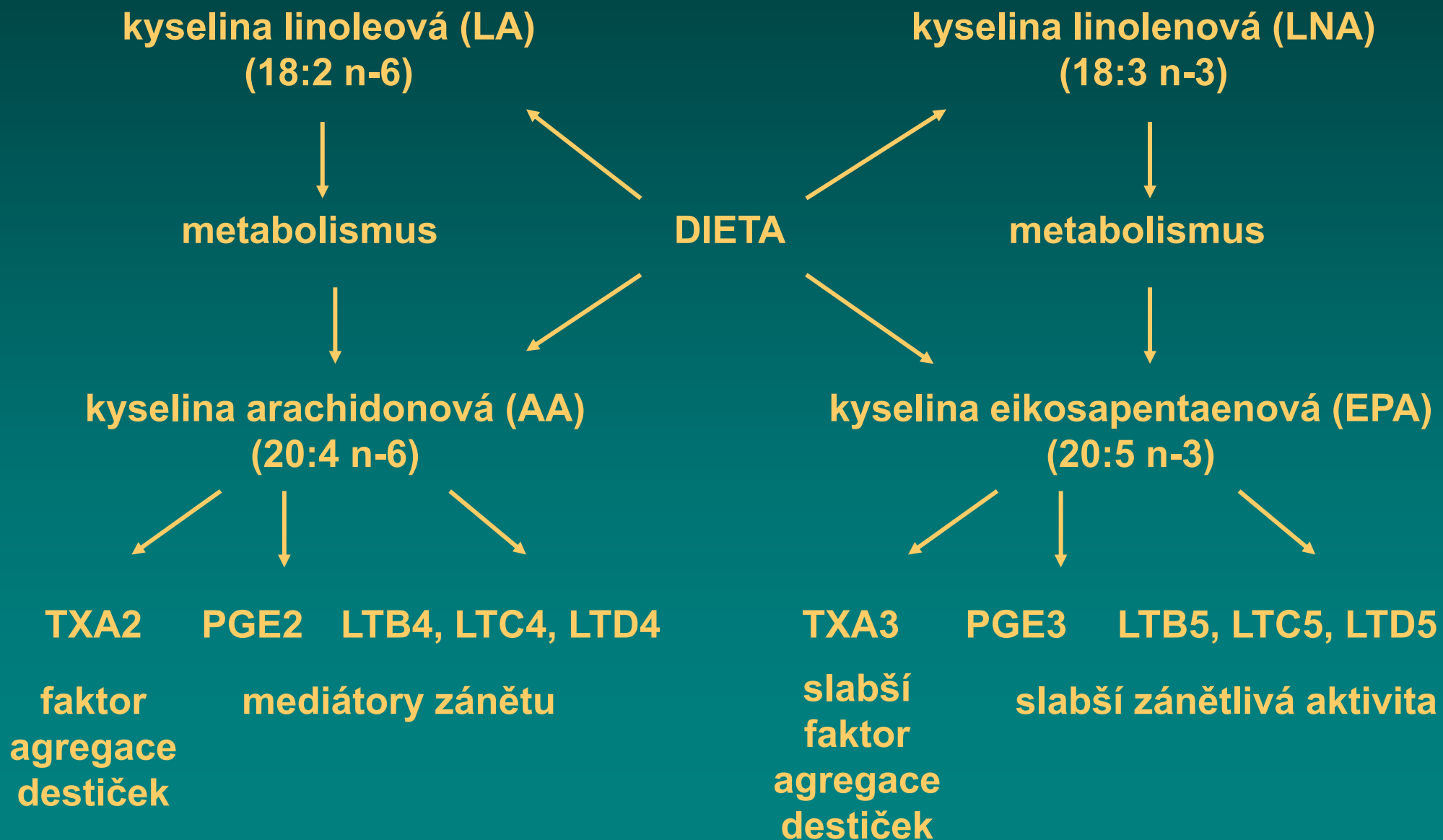
Model konstitutivní overexprese cPLA₂ a COX-2 u nádorových buněk



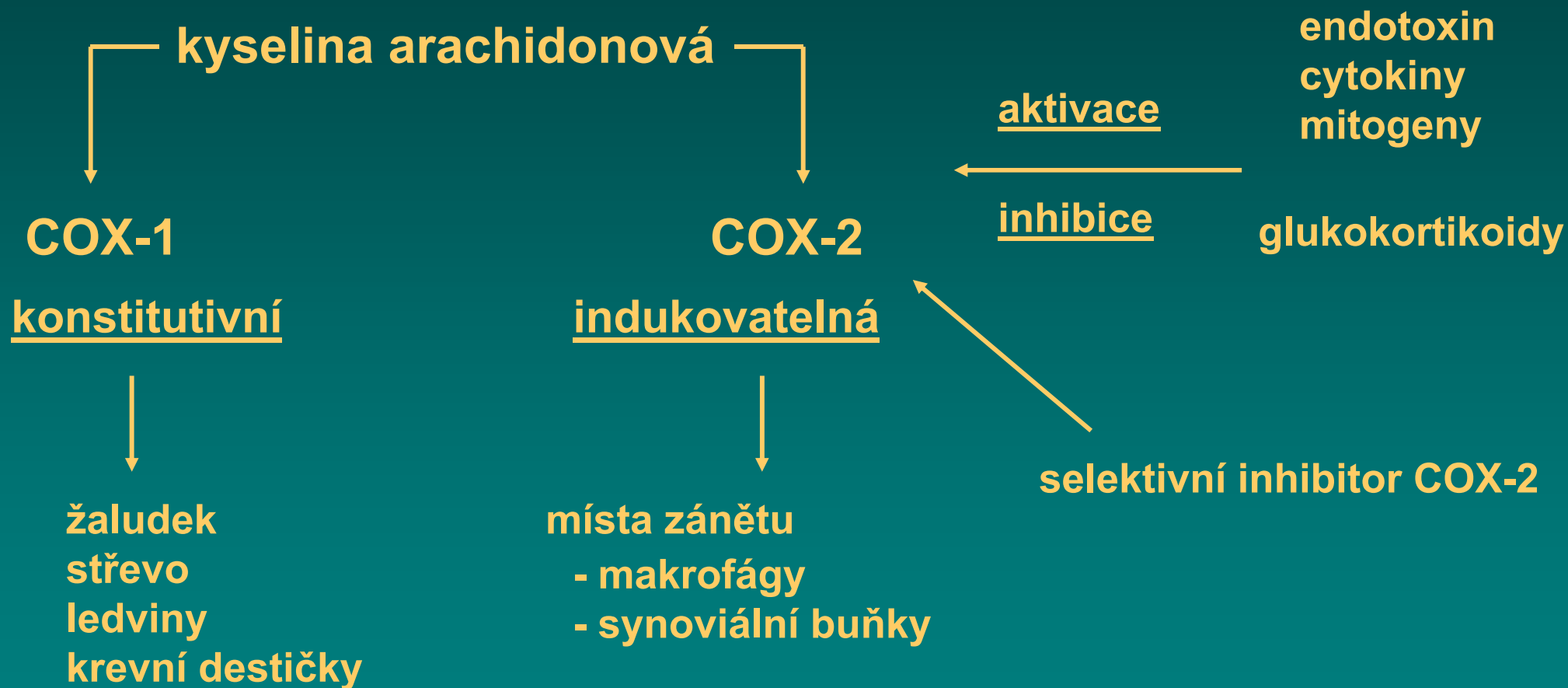
Drug Discovery Today

Figure 4. Model of constitutive overexpression of cPLA₂ and COX-2 in tumour cells (reviewed in [4]).

Interakce n-3 PUFA s AA při syntéze eikosanoidů s prozánětlivou aktivitou



Cyklooxygenázové dráhy



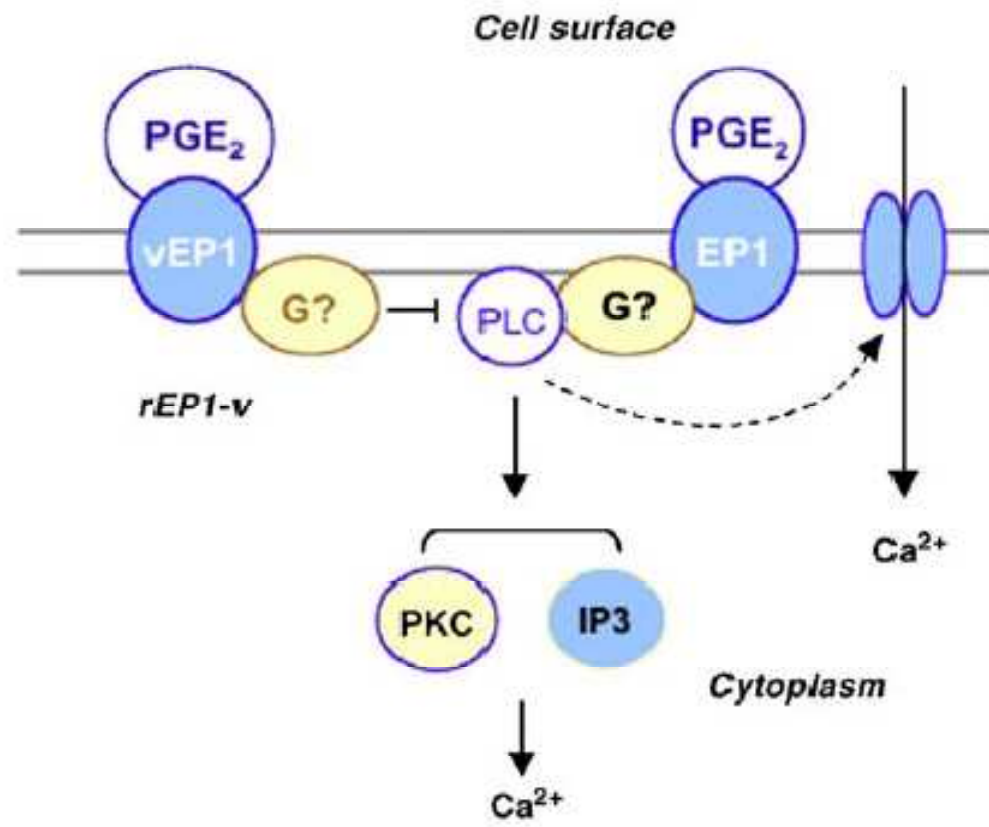
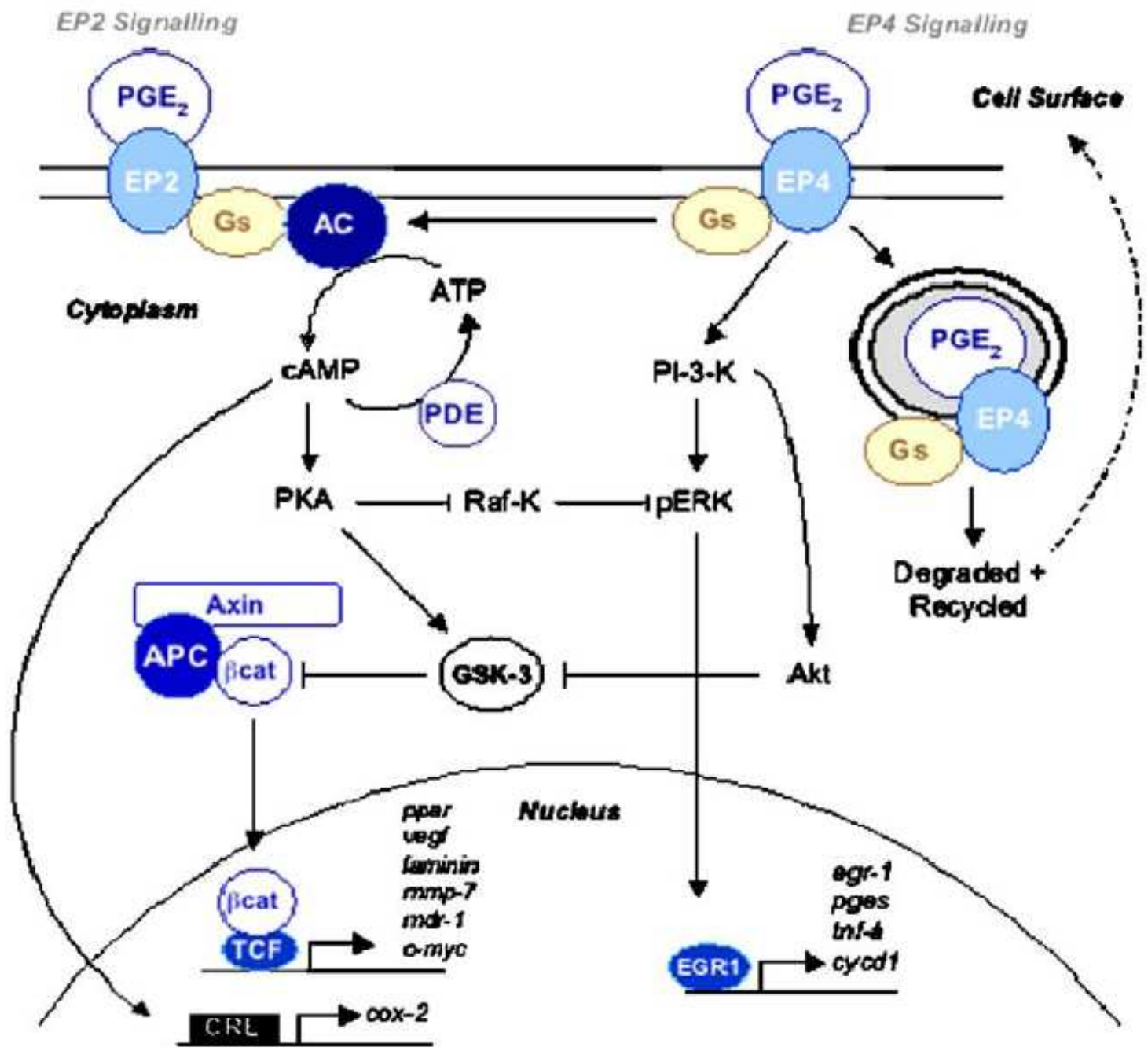


Fig. 5. The EP1 receptor signals via coupling to an as yet uncharacterised G protein. The blocked arrow indicates the potential inhibitory effect on PGE₂ signalling through a variant EP1 receptor such as found in the rat (see text).



Přenos signálů PGE₂ prostřednictvím receptorů EP1 - 4

110

S. Chell et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* 1766 (2006) 104–119

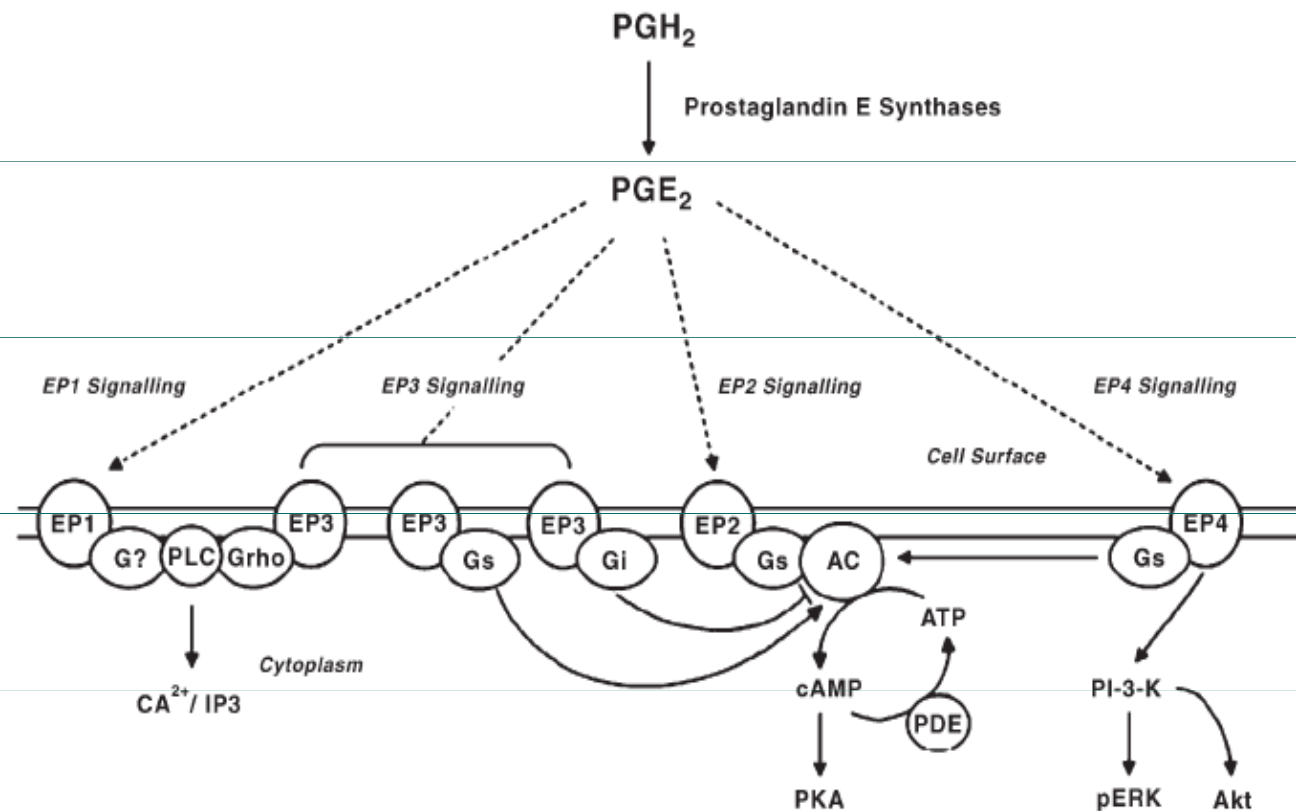


Fig. 4. PGE₂ can signal through any single (or combination of) EP receptor. Signalling depends upon the enzymatic machinery and receptors present in the tissue or cell type in question. Signalling via the EP1 receptor subtype activates IP₃ and mobilises intracellular Ca²⁺, through an as yet uncharacterised G protein [110]. The EP2 and EP4 receptors activate adenylyl cyclase activity through binding Gs proteins (EP4 also has the capacity to modulate MAPK signal cascades). The predominant EP3 receptor splice variant (of which four have been identified in humans) induces the inhibition of adenylyl cyclase, and hence inhibits cAMP activation, although this receptor subtype can also couple to Gs and G12. Arrows indicate activation by phosphorylation, whereas blocked arrows indicate inhibition of activation.

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

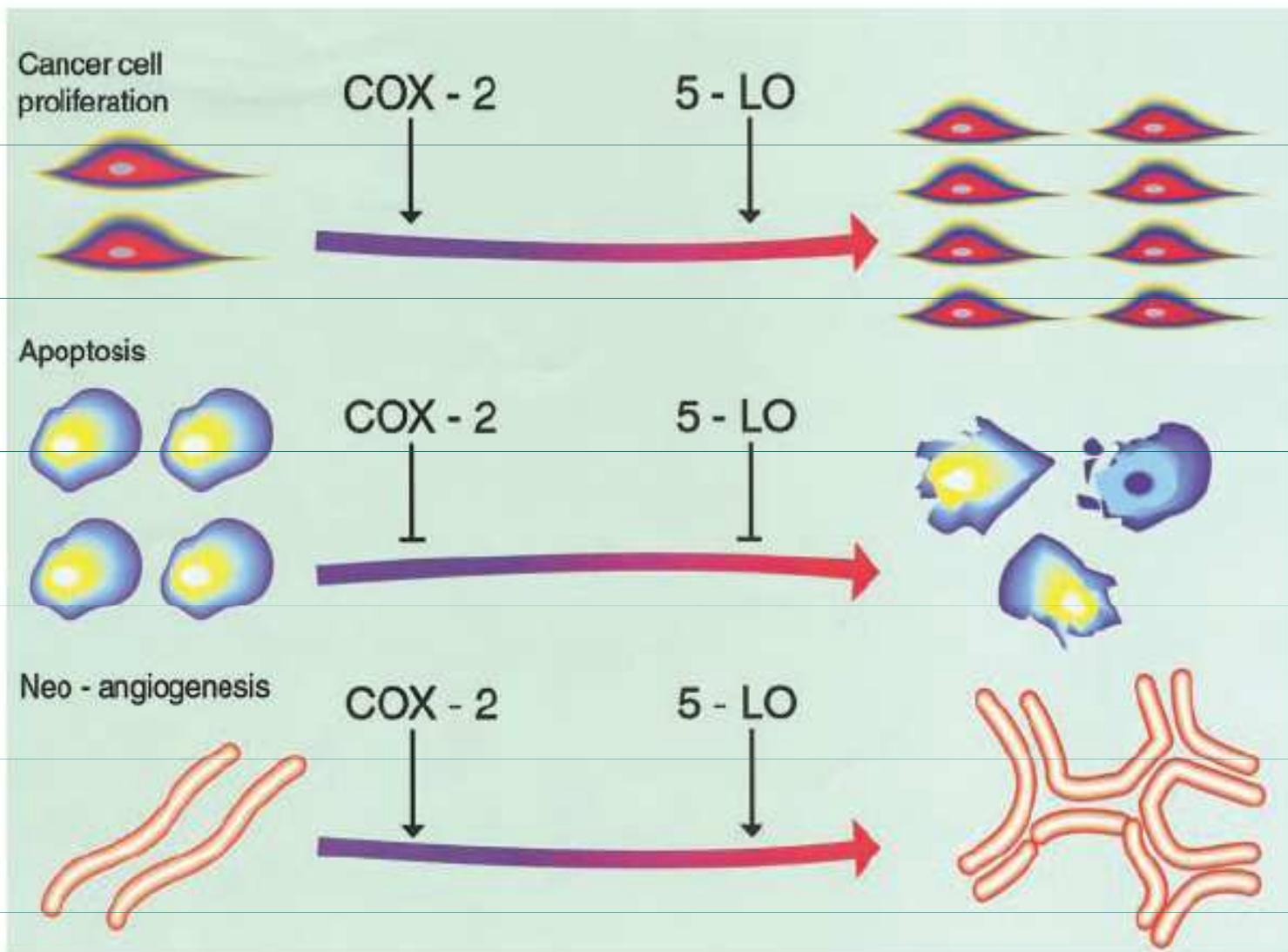
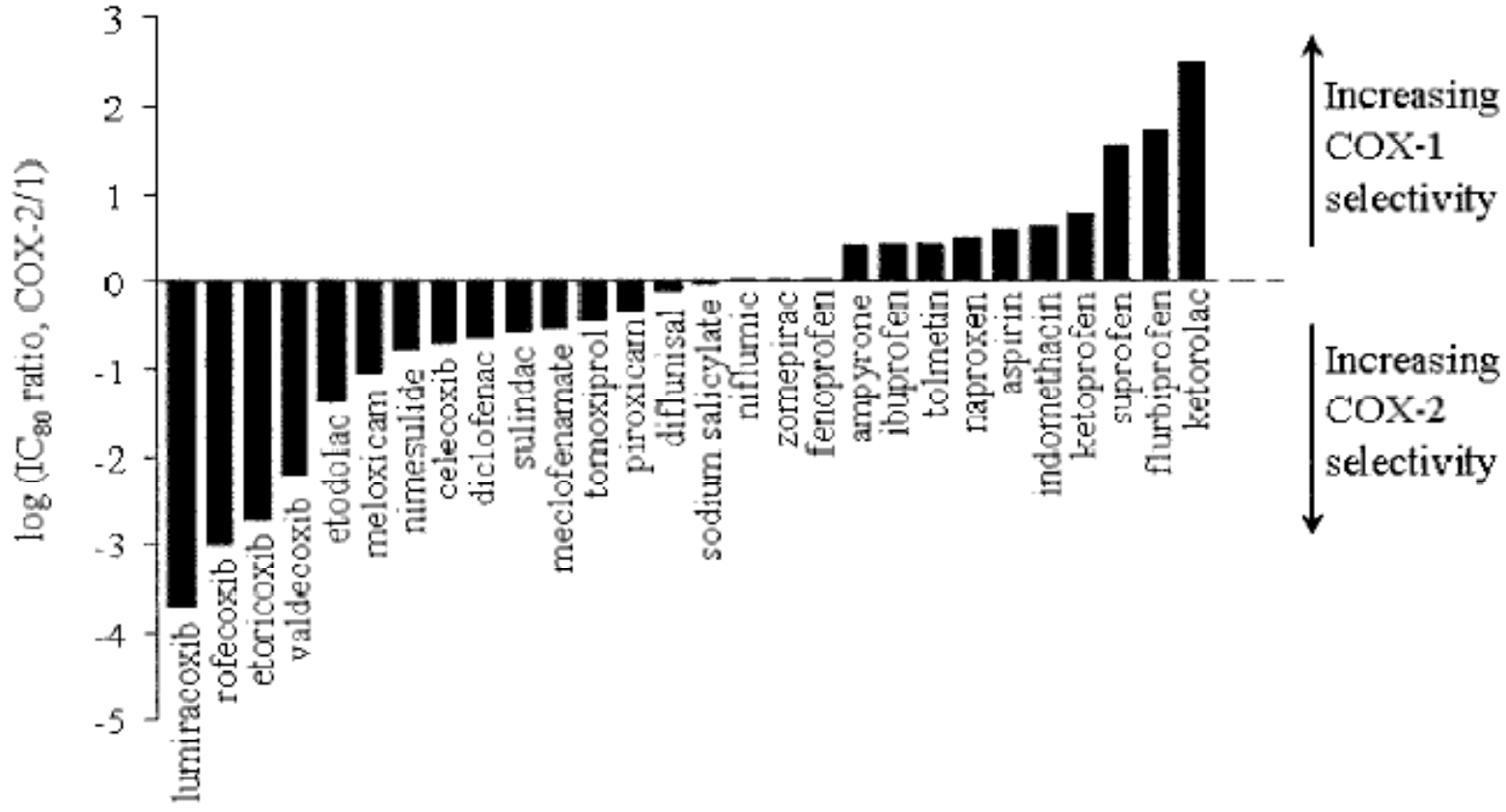


Table 1. COX2 expression in malignant or premalignant human tumours

Premalignant or malignant lesion	COX2 expression (%)
Colorectal	80–90
Gastric	80
Oesophageal	70
Hepatocellular (liver cirrhosis)	54 (81)
Pancreatic	67
Head and neck	80
Non-small-cell lung cancer	70
Breast (ductal carcinoma-in-situ)	40 (60)
Prostatic	83–93
Bladder	86
Cervix	43
Endometrial	37
Cutaneous basal cell	25
Cutaneous squamous cell	80
pPNET	100
Glioblastoma multiforme	71–74
Anaplastic astrocytoma (low grade)	44 (30)

References available at <http://image.thelancet.com/extras/03oncl205webfr.pdf>



Mechanismy účinků exprese COX-2 na vývoj kolorektálních nádorů:

Účinky nezávislé na produkci prostaglandinů (PGE₂):

Aktivace karcinogenů

Produkce malondialdehydu

Redukce hladiny volné AA

Účinky závislé na produkci PGE₂:

Indukce buněčné proliferace

Inhibice apoptózy

Indukce angiogeneze

Zvýšení buněčné motility

Zvýšené metastatického potenciálu

Indukce lokální imunosuprese

Model interakce mezi nádorovými buňkami, endoteliálními buňkami a infiltrujícími zánětlivými buňkami v místě nádoru

Úloha COX-2, PG a prozánětlivých molekul v angiogenezi

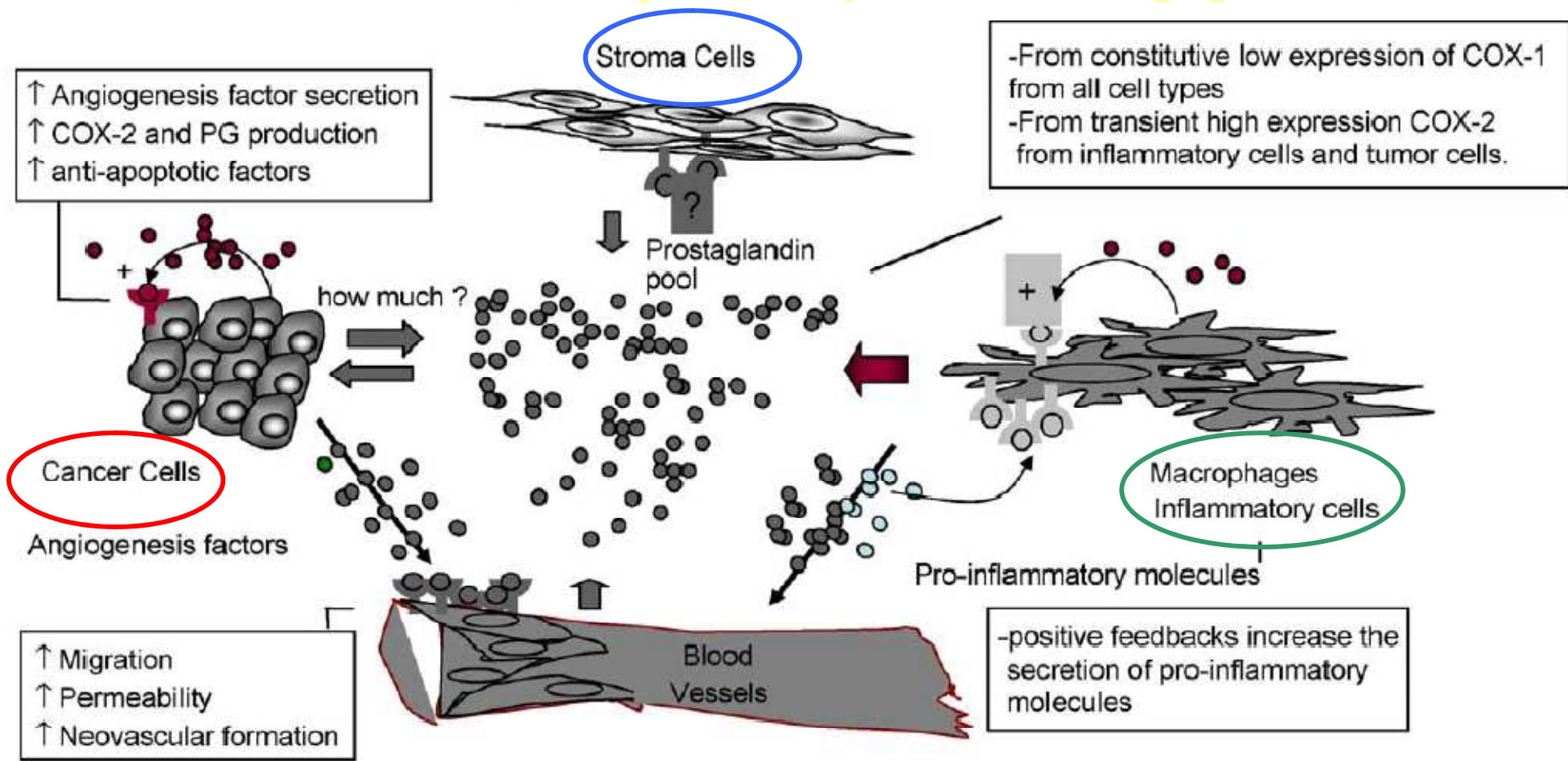


Fig. 1. COX-2 in angiogenesis. This figure models the interactive relationship among cancer cells, endothelial cells and infiltrating inflammatory cells at the site of tumorigenesis. The prostaglandin pool is contributed to by all three different cell types and occasionally stromal cells. The positive feedback through prostaglandin receptors increases COX-2 expression and ensures the continued generation of prostaglandins. In the cancer cell, prostaglandin signaling also results in the production of multiple angiogenesis factors, through which they stimulate neovascular formation at the site of tumorigenesis. In inflammatory cells, prostaglandin signaling stimulates the generation of pro-inflammatory molecules such as IL-2, which further recruits additional circulating monocytes and amplifies the inflammatory response. As a response to increased levels of prostaglandins, angiogenesis factors and pro-inflammatory molecules, endothelial cells proliferate, migrate and undergo tubal formation, providing additional nutrients for oncogenesis as well as a potential route for metastasis.

ÚČINKY INHIBICE CYKLOOXYGENÁZ A LIPOXYGENÁZ NA NÁDOROVÉ BUN. POPULACE

- Řada nádorů má změněný metabolismus nenasycených MK a produkuje zvýšené množství metabolitů AA, které indukují růst a invazivitu (epiteliální nádory - prsu, kolonu, plic, prostaty)
- Frekvence exprese jednotlivých typů enzymů (COX1, COX2, 5-, 12- 15- LOX, FLAP, P450) se liší podle typu a histologického stupně nádoru
- Mitogenní a viabilitní faktory (EGF, HGF atd.) a prozánětlivé cytokiny (TNF- α , IL-1) indukují uvolňování AA a tvorbu eikosanoidů, které slouží jako přenašeče nebo modulátory signálů regulujících proliferaci a apoptózu
- Nesteroidní antiflogistika (NSAID - aspirin, sulindac, indometacin, ibuprofen , piroxicam) inhibují aktivitu COX a mají preventivní a terapeutické účinky na rozvoj nádorů, zejména kolonu - využití inhibitorů COX2 (inducibilní)
- NSAID - snižují proliferaci a indukují apoptózu mechanismy závislémi i nezávislémi na aktivitě COX
- Účinky mohou být přímé nebo nepřímé - zprostředkované např. změnami aktivity imunitního systému
- Inhibitory LOX (NDGA, esculetin, MK-886) inhibují proliferaci a indukují apoptózu řady nádorových linií
- Produkty 5-LOX fungují jako „second messengers“ řady růstových a viabilitních faktorů
- Produkty 12-LOX se uplatňují v procesu invaze a tvorby metastáz - ovlivnění exprese proteáz, adhezivních molekul - využití inhibitorů

Molekulární mechanismy COX-2 a NSAIDs

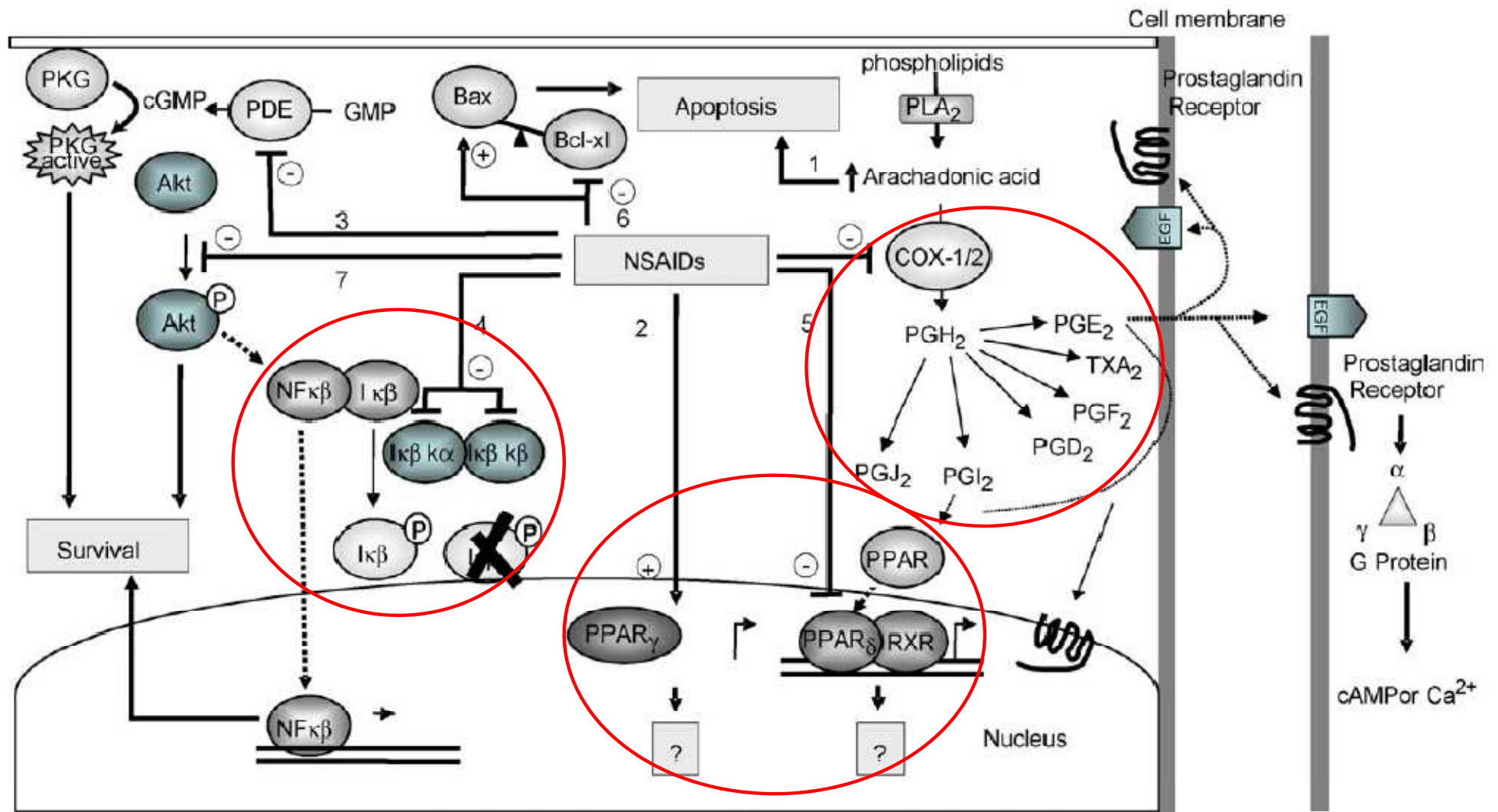
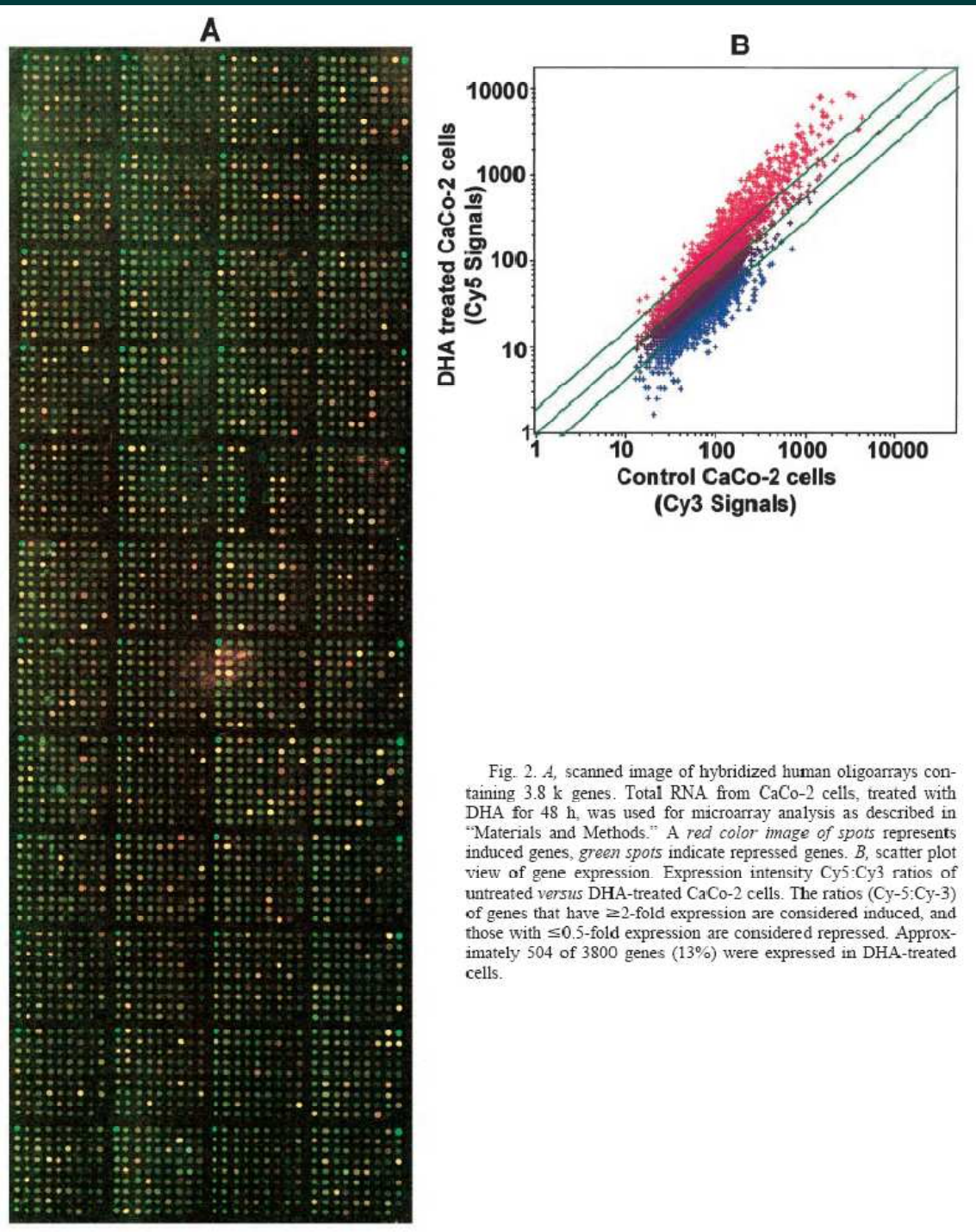


Fig. 4. Molecular mechanisms for COX-2 and NSAIDs. The right part of the model illustrates the prostaglandin synthesis pathway as well as the subsequent receptor signaling—the specific prostaglandin receptors as well as the non-canonical EGF receptor pathway. As the result of inhibiting COX enzymes, 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

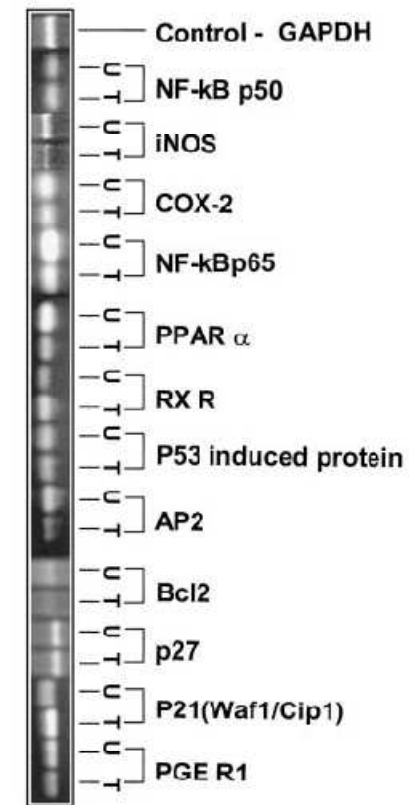


Fig. 3. RT-PCR validation of selected genes listed in Table 1. Differential expression of potential molecular targets modulated by DHA in CaCo-2 cells is shown on 2% agarose gel.

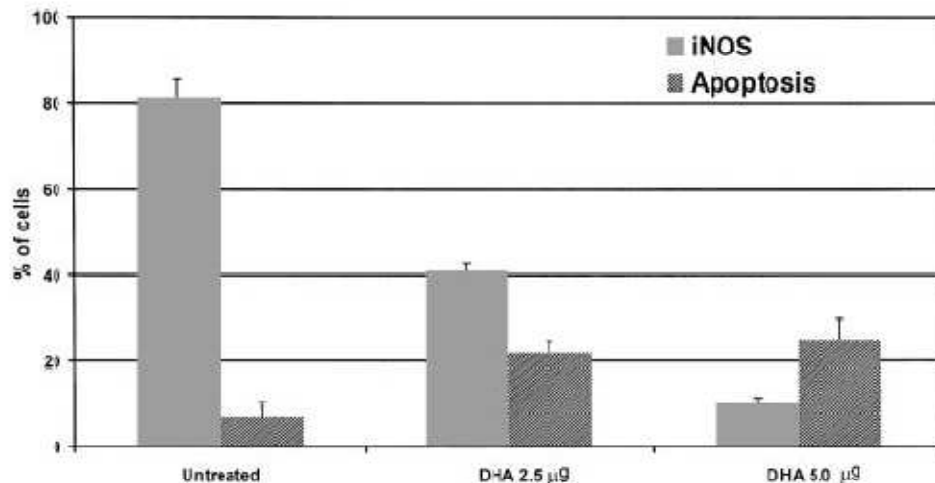
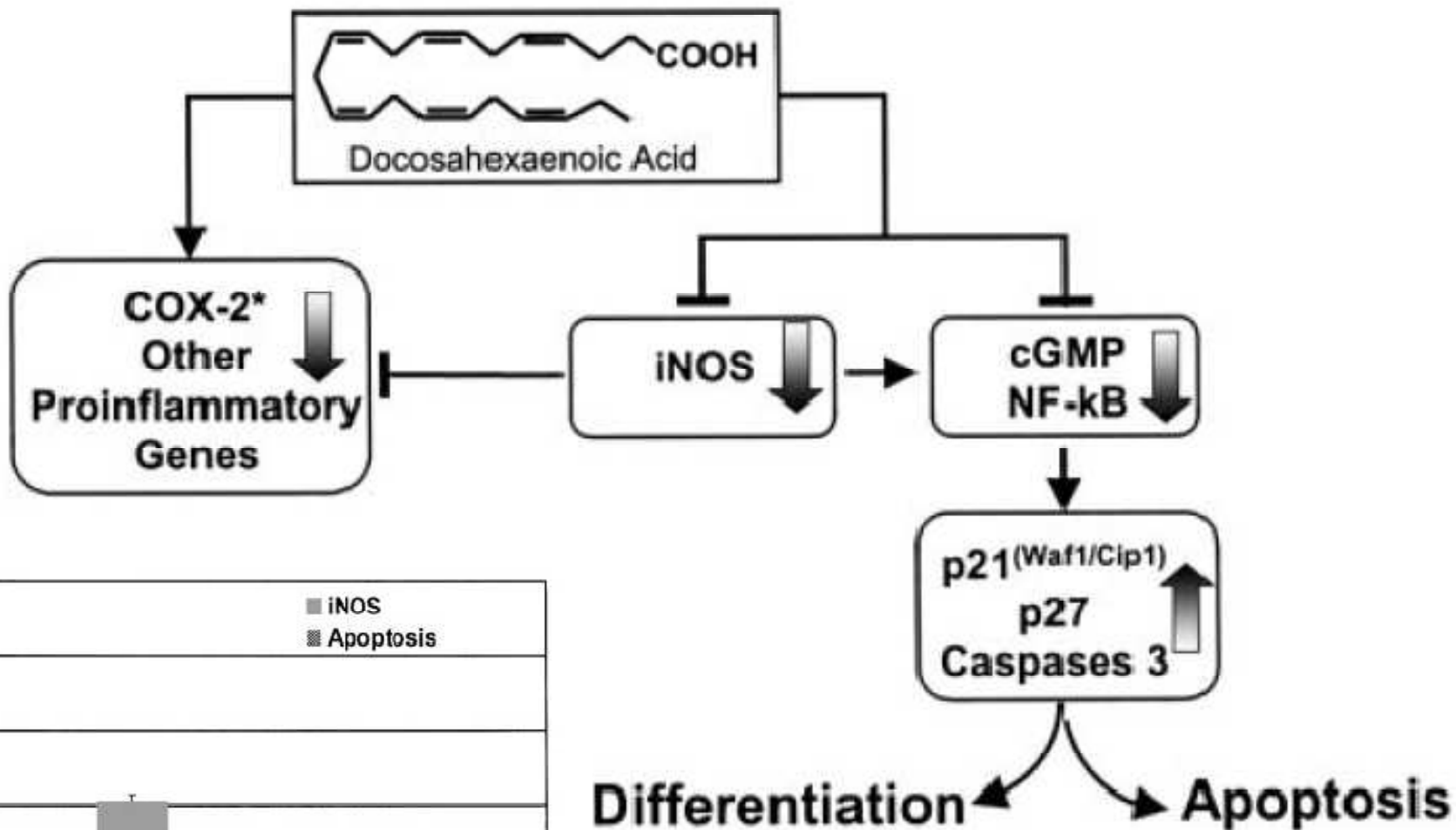
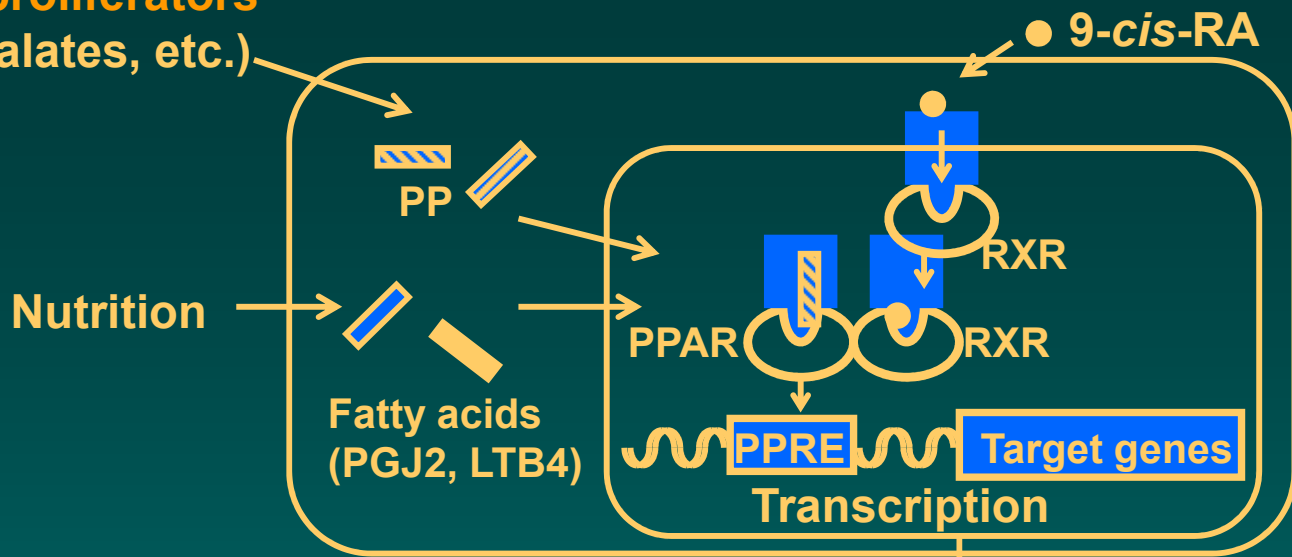


Fig. 6. Effect of DHA on iNOS-positive and apoptotic cells. Percentage of apoptotic cells was determined by DAPI staining. DAPI-positive cells with characteristic nuclear condensation and DNA strand breaks for apoptosis were counted from 10 identical fields using a fluorescence microscope (Olympus) with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

Potenciální molekulární mechanismy působení DHA na nádorové buňky kolonu

Peroxisome proliferators

(fibrates, phtalates, etc.)



Importance of PPARs in cell proliferation, differentiation and apoptosis.

After activation, PPAR and RXR form heterodimers which bind to DNA regulatory sequences of target genes through interaction with PPRES. The control by PPARs of the transcriptional activity of target genes gives rise to biological effects which may have consequences for human health. LTB4, leukotriene B4; PGJ2, prostaglandin J2; PP, peroxisome proliferator; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PPRES, peroxisome proliferator responsive element; 9-cis-RA, 9-cis-retinoic acid; RXR, 9-cis-retinoic acid receptor.

CELL SPECIFIC RESPONSES

Proliferation

Differentiation and maturation

Apoptosis

MEDICAL RELEVANCE

* Clonal expansion of preadipocytes promoting adipogenesis (participation on PPAR γ .)

* Hypothetical risk in man of cell growth stimulation by activation of PPARs.

* Monocyte / macrophage differentiation (implication of PPAR γ) leading to accelerated atherosclerosis.

* Protective effects of PPAR α .

* Adipocyte differentiation responsible of obesity and other related disorders (implication of PPAR α .)

* Enhanced PPAR γ expression could lead to tumoral cell apoptosis and represents a therapeutic approach in malignant disease.

VLÁKNINA

Table 1. Possible mechanisms for the protective action of dietary fibre on colorectal oncogenesis

Physical

Increased bulk and dilution of carcinogen

Decreased contact time due to more rapid transit

Binding of carcinogen

Binding of bile salts

Prebiotic and metabolic action of flora

Alteration of colonic microflora; numbers and species balance

Inhibition of carcinogen activation

Stimulation of flora to increase bulk

Alteration of bile salt metabolism to reduce conversion to secondary bile salts

Fermentative

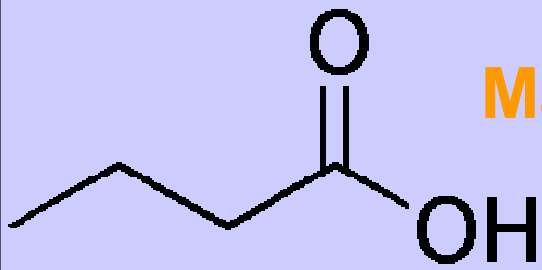
Lowering of pH

Reduced solubility of bile salts

Increased production of SCFAs, especially butyrate

Metabolic

Reduced insulin resistance and hyperinsulinaemia



Mastné kyseliny s krátkým řetězcem– BUTYRÁT

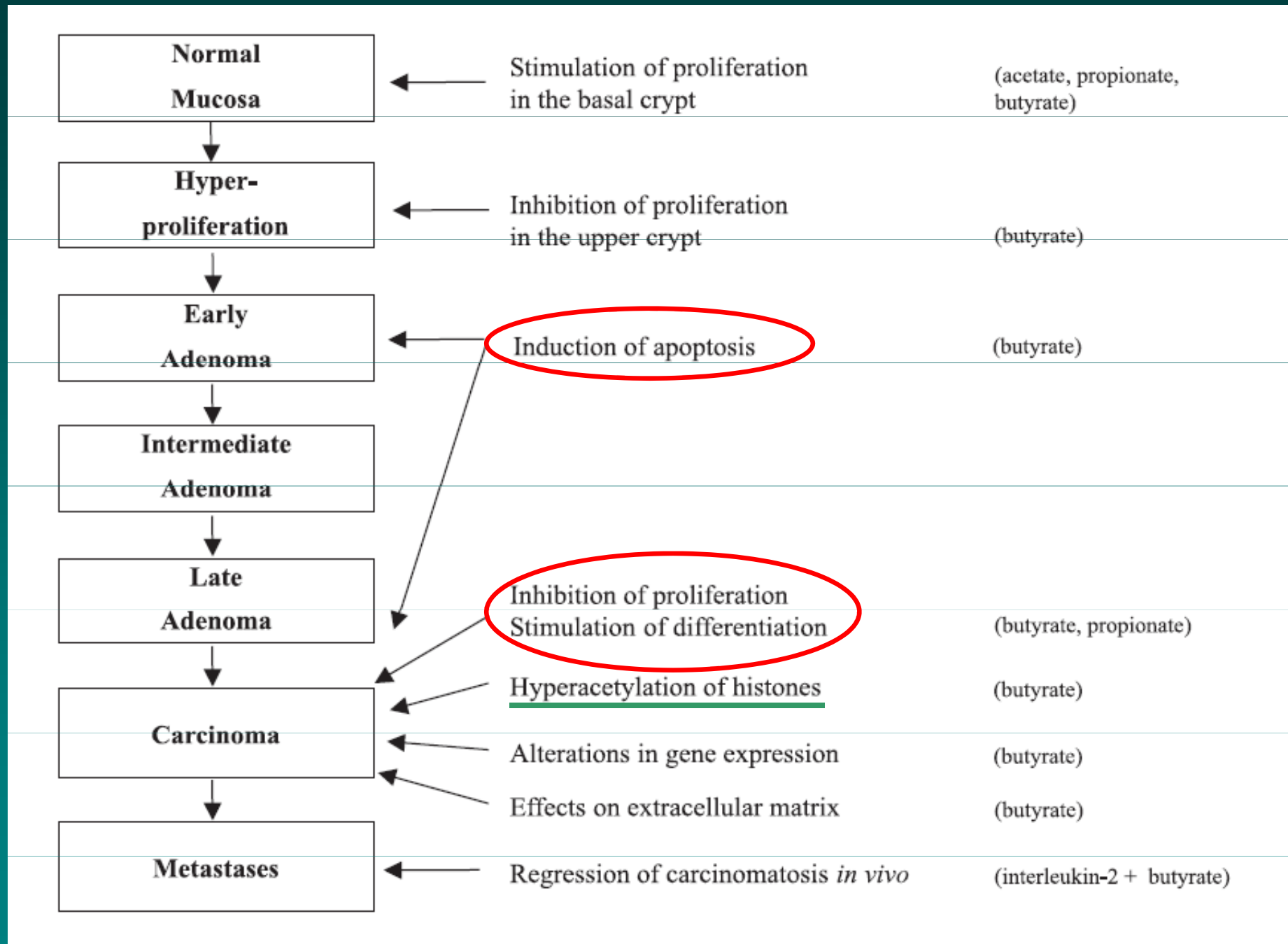
- ▶ produkován anaerobní mikrobiální fermentací vlákniny ve střevě
- ▶ zdroj energie pro normální kolonocyty
- ▶ významný pro udržení homeostázy ve střevní tkáni regulací exprese genů spojených s regulací proliferace, diferenciace a apoptózy (microarray analýza – změny exprese 19 400 genů), exportní protein MCT1
- ▶ butyrát sodný (NaBt) snižuje proliferaci a indukuje diferenciaci a apoptózu neoplastických kolonocytů *in vitro* a *in vivo*



Psyllium

Prevence NÁDORŮ TLUSTÉHO STŘEVA

Účinky butyrátu na epiteliální buňky kolonu v průběhu rozvoje adenom-karcinom



Účinky butyrátu na nádorové buňky:

Inhibice proliferace – blok v G1 nebo G2/M, indukce p21, Cyklin D1,D3, downregulace c-myc

Indukce diferenciaci a apoptózy – genové arrays

Inhibitor histon deacetyláz – změny exprese genů

Ovlivnění specif. kináz, aktivace PPAR gamma, inhibice NFkB

Inhibice c-Src, FAK, iNOS, COX-2

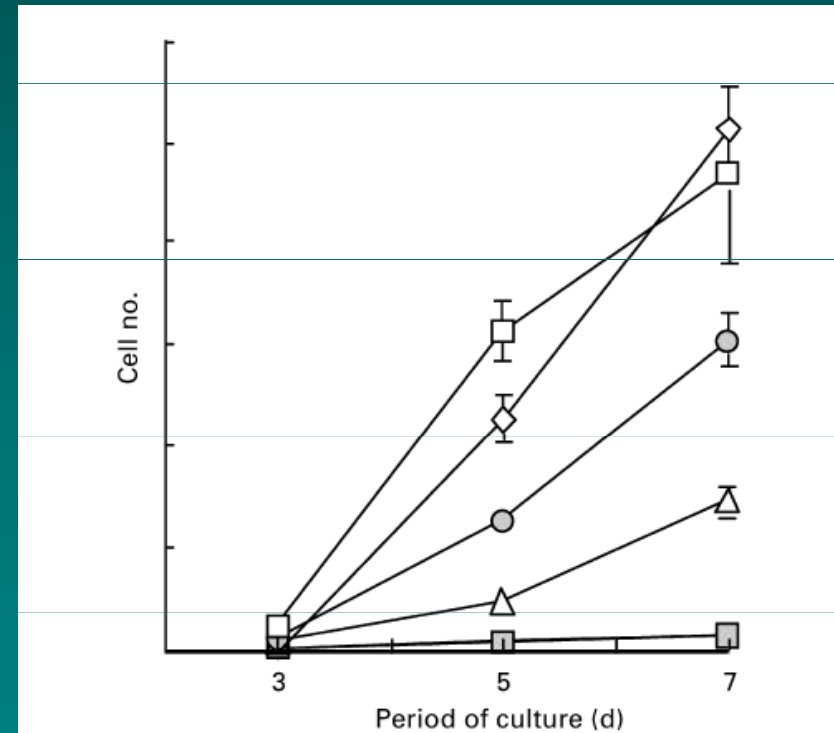
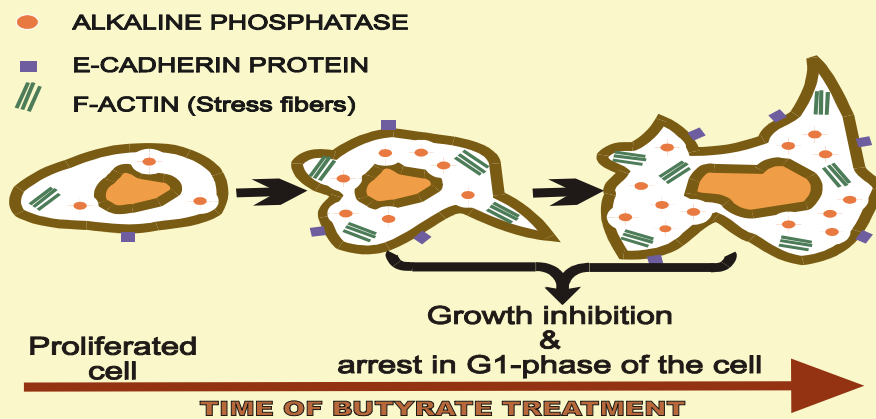
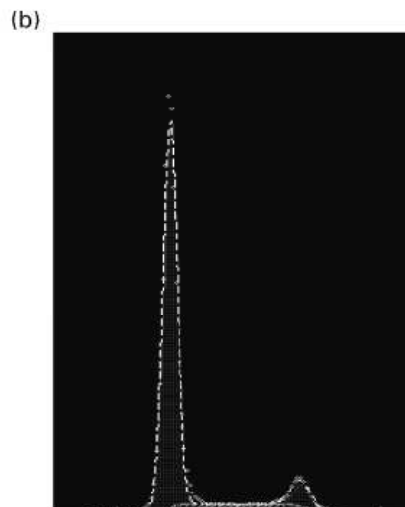
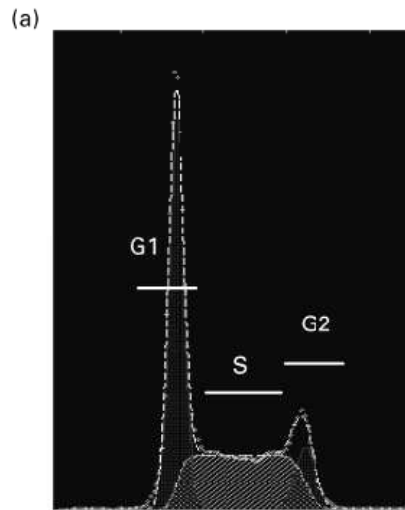
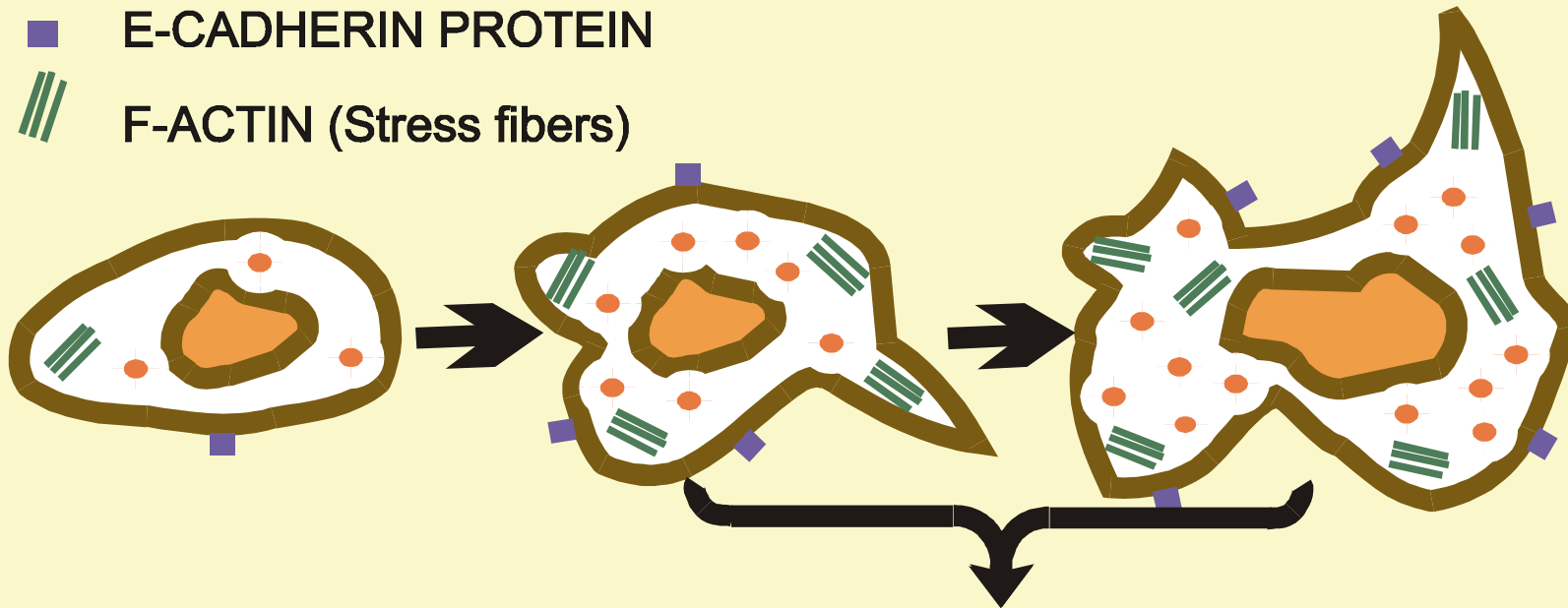


Fig. 1. Dose-dependent inhibition of rat non-tumoural intestinal epithelial cells (IEC-6) by butyrate as assessed *in vitro*. Cells were cultured without (◇; control) or with butyrate (□, 0.5 mM; ●, 1 mM; △, 2 mM; ⊗, 5 mM) and cell number was measured after 3, 5 and 7 d.

Znaky diferenciace indukované butyrátem

- ALKALINE PHOSPHATASE
- E-CADHERIN PROTEIN
- ▨ F-ACTIN (Stress fibers)

EXPRESSE KARCINOEMBRYONÁLNÍHO ANTIGENU



TIME OF BUTYRATE TREATMENT

0mM

1mM

3mM

5mM

Short-chain fatty acids

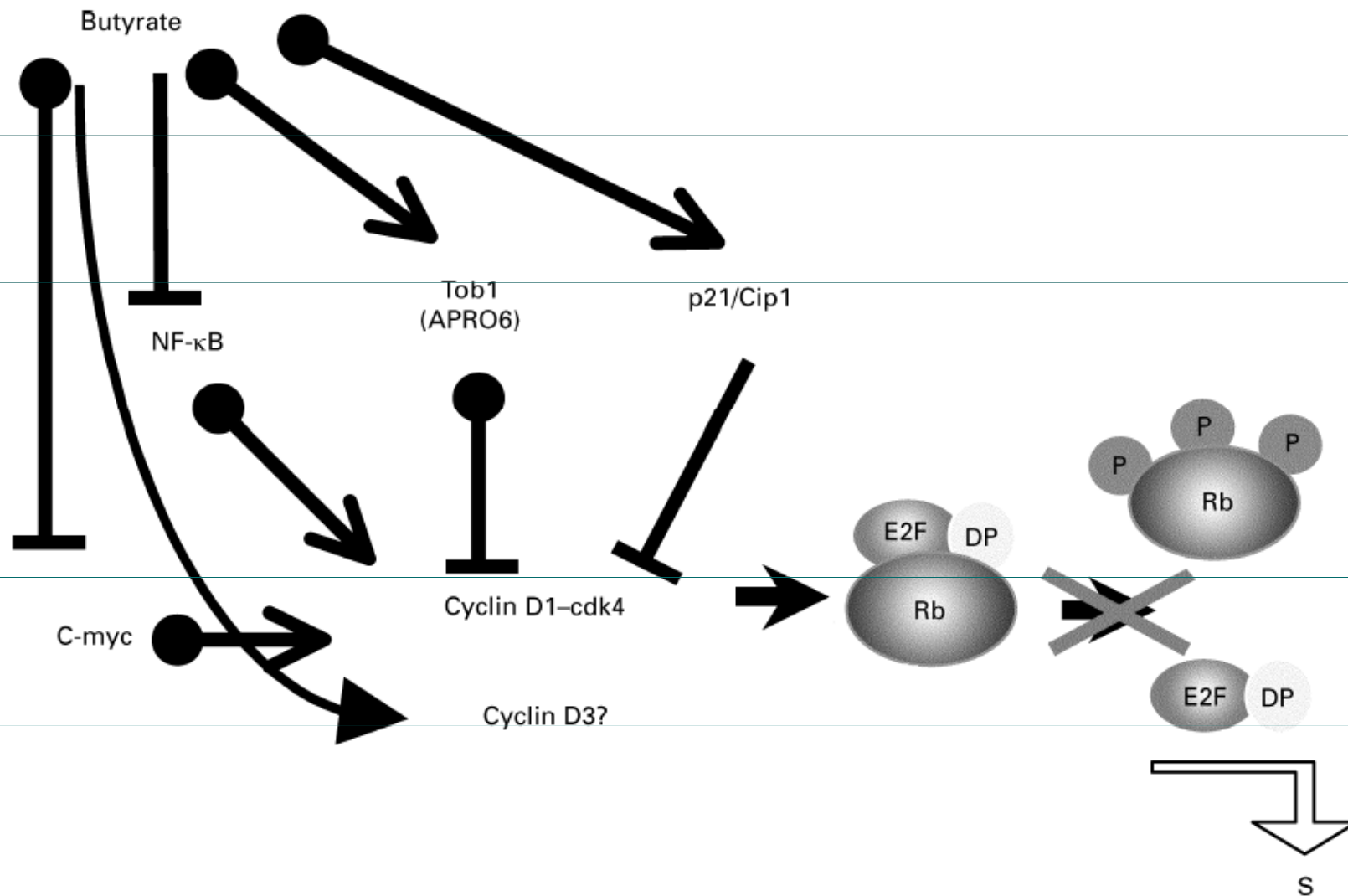


Fig. 4. Overview of the different pathways leading to inhibition of cell proliferation and the blocking of the G1 stage of the cell cycle (for details, see p. 104). NF-κB, nuclear factor kappa B; Rb, retinoblastoma protein; cdk, cyclin-dependent kinases; p21/cip 1, a member of the Cip/Kip family which bind to the cyclin-cdk complex to inhibit its activity; Tob1 (APRO6), a member of the anti-proliferative family APRO, members of which control cyclin D1 transcription.

LIPIDOVÉ SLOŽKY VÝŽIVY

VÍCE, NEŽLI JEN ZDROJ ENERGIE!!!!

- ◆ **strukturální a regulační úloha**
- ◆ **dopad na fyziologické funkce organismu**
 - ▶ **účinky na imunitní systém**
 - ▶ **regulace proliferace, diferenciacce a apoptózy**

 - ▶ **úloha v karcinogenezi**

(etiologie nádorů tlustého střeva, prostaty, prsu)

Spolu s cytokiny a hormony fungují jako intra- i intercelulární mediátory a modulátory buněčné signalizační sítě

Poměr obsahu ω -6 a ω -3 esenciálních vysoce nenasycených mastných kyselin (**VNMK**) ovlivňuje vlastnosti membrán, zejména jejich fluiditu a produkci látek vznikajících hydrolýzou membránových fosfolipidů.

Tyto změny pak ovlivňují vazbu cytokinů, aktivitu receptorů i funkci na membránu vázaných signálních molekul (G proteinů, fosfolipáz atd.).

Patologické změny v produkci a funkci cytokinů a eikosanoidů přispívají k rozvoji nádorových onemocnění zejména ovlivněním imunitního systému a buněčné kinetiky

Metabolismus a obrat fosfolipidů v membránách i oxidativní metabolismus nádorových buněk se zásadně liší od buněk nenádorových.

Nádorové buňky kolonu vykazují:

- ◆ změny ve spektru a koncentraci VNMK ve srovnání s normální tkání
- ◆ zvýšenou periferní utilizaci VNMK z potravy
- ◆ změny v oxidativním metabolismu a antioxidační ochraně
- ◆ zvýšenou aktivitu enzymů metabolismu kys. arachidonové (COX2, 12-LPO...) a produkci eikosanoidů
- ◆ sníženou citlivost k endogenním inhibitorům růstu (TGF- β 1), induktorům apoptózy (TNF α , FasL, TRAIL) a diferenciaci (butyrát)

CYTOKINY

Důležité endogenní faktory ovlivňující kolorektální karcinogenezi

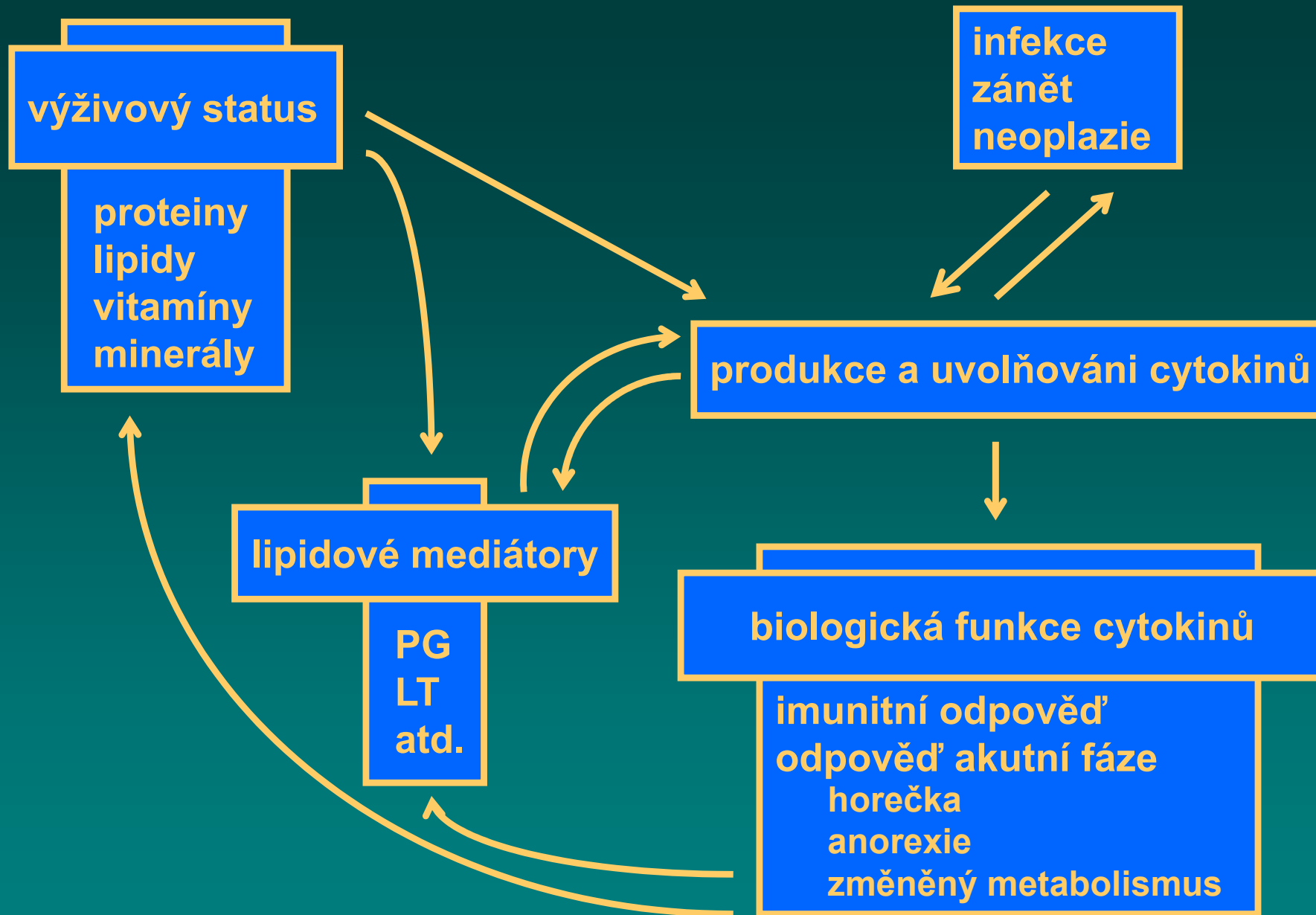
TNF-family (TNF- α , Fas ligand, TRAIL – TNF relating apoptosis inducing factor)

TGF-family (TGF- β)

EGF – epidermální růstový faktor

Tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukiny

- ▶ multifunkční cytokin
- ▶ jeden z hlavních mediátorů zánětu
- ▶ TNF- α je produkován makrofágy a dalšími buňkami imunitního systému
- ▶ koncentrace TNF- α v kolonu je zvýšena během chronického zánětu (ulcerativní kolitida nebo Crohnova choroba)
- ▶ úloha v nádorové kachexii
- ▶ existuje interakce mezi cytokiny a dietetickými faktory – mastné kyseliny a eikosanoidy



Vzájemné vztahy mezi výživou a infekčními a zánětlivými chorobami zprostředkovanými cytokiny

potentiation effects

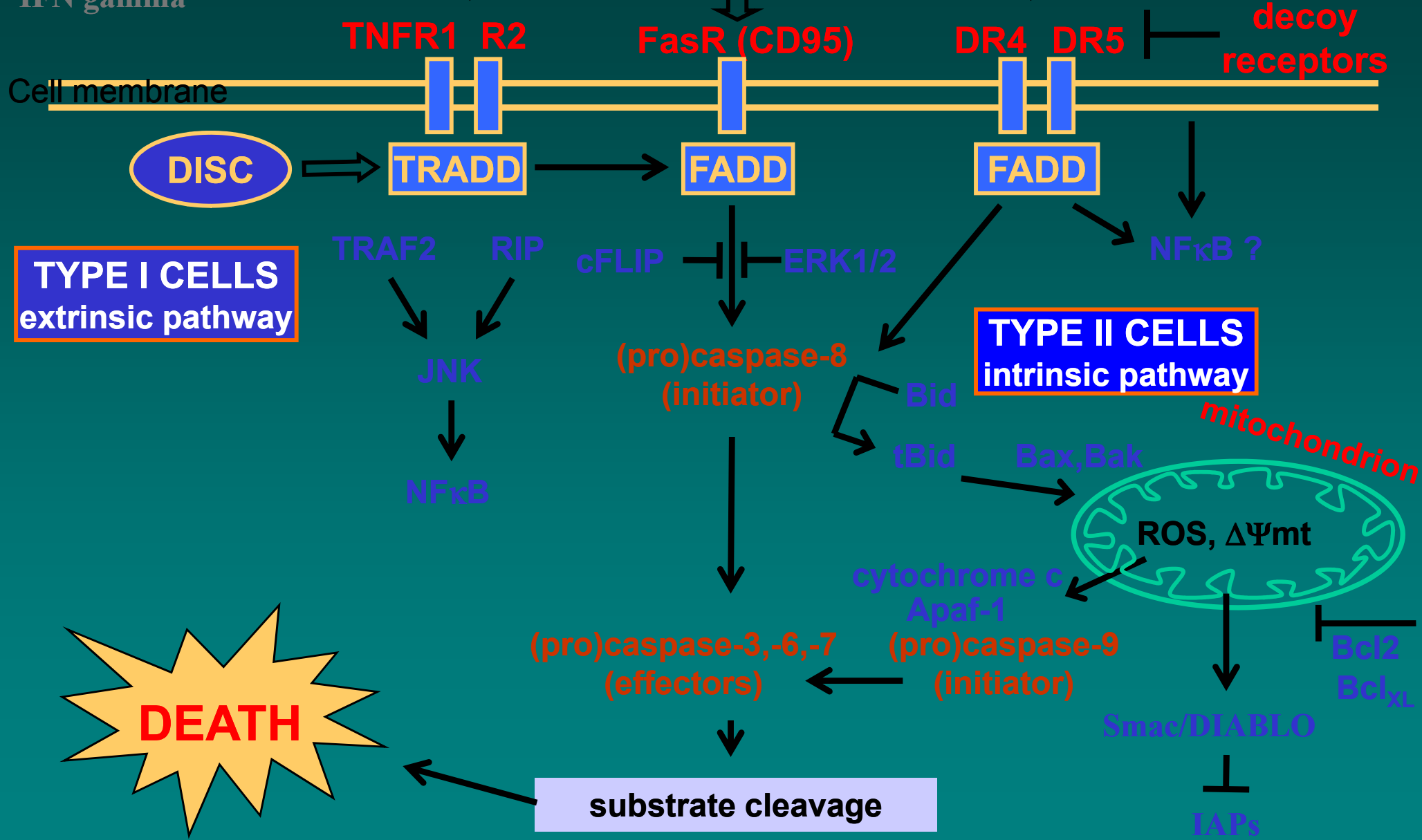
cycloheximide
actinomycin D
IFN gamma

TNF- α

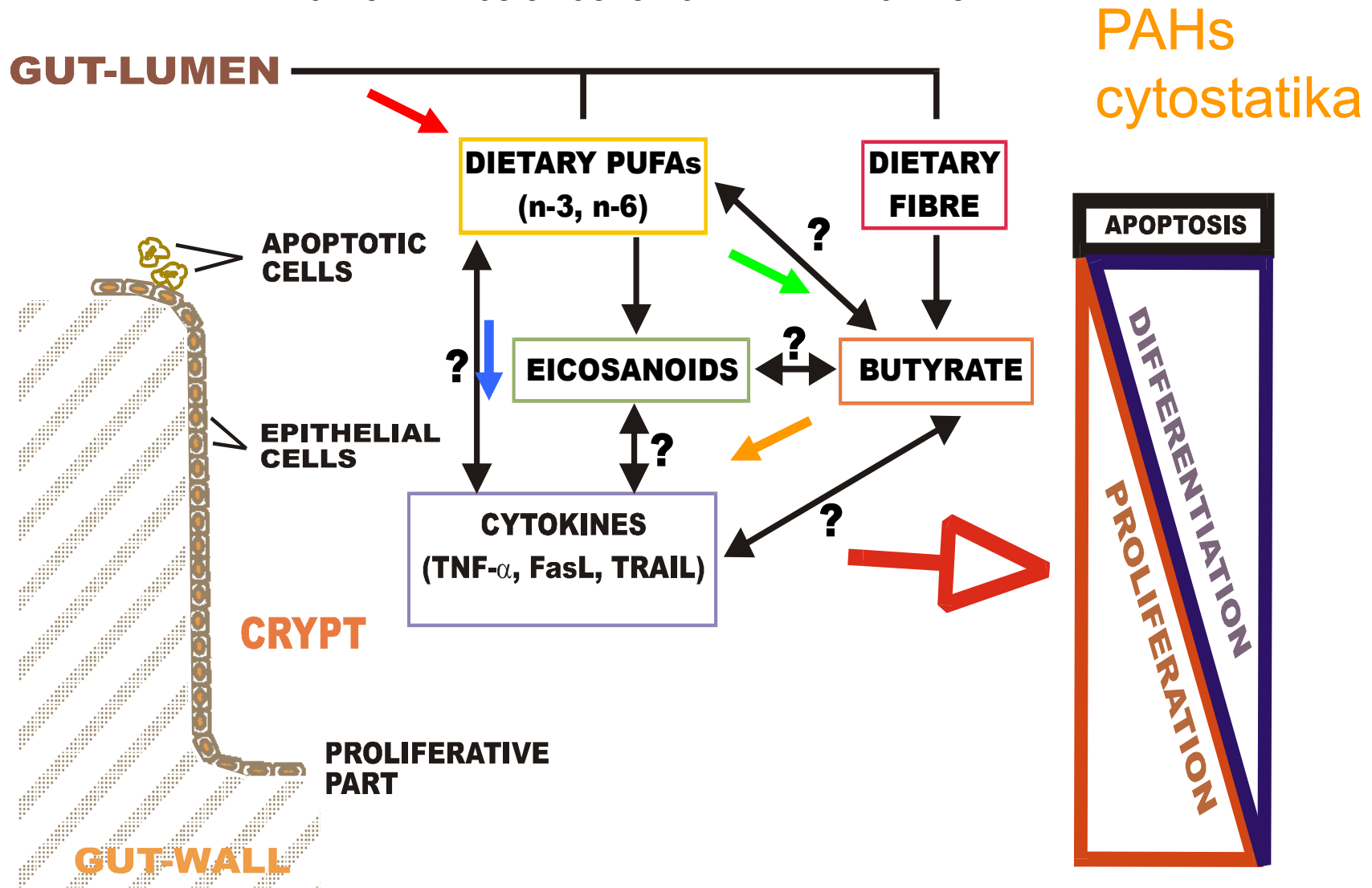
FasL
anti-Fas
antibody

TRAIL

PUFAs ?
Butyrát?



INTERACTIONS OF DIETARY FACTORS AND ENDOGENOUS REGULATORS SUPPOSED TO AFFECT CYTOKINETICS OF COLONIC EPITHELIAL CELLS



Kovařiková M. et al. Eur J Cancer 2000
 Kovařiková M. et al. Differentiation 2004

Hofmanová J. et al. Eur J Nutr 2005
 Hofmanová J. et al. Cancer Letters 2005
 Vaculová et al. Cancer Letters 2005

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

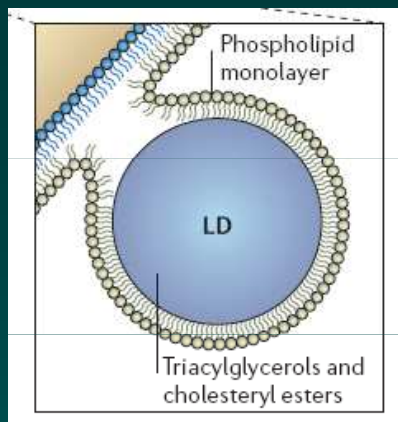
Pomocí MC540 lze monitorovat

- ▶ 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

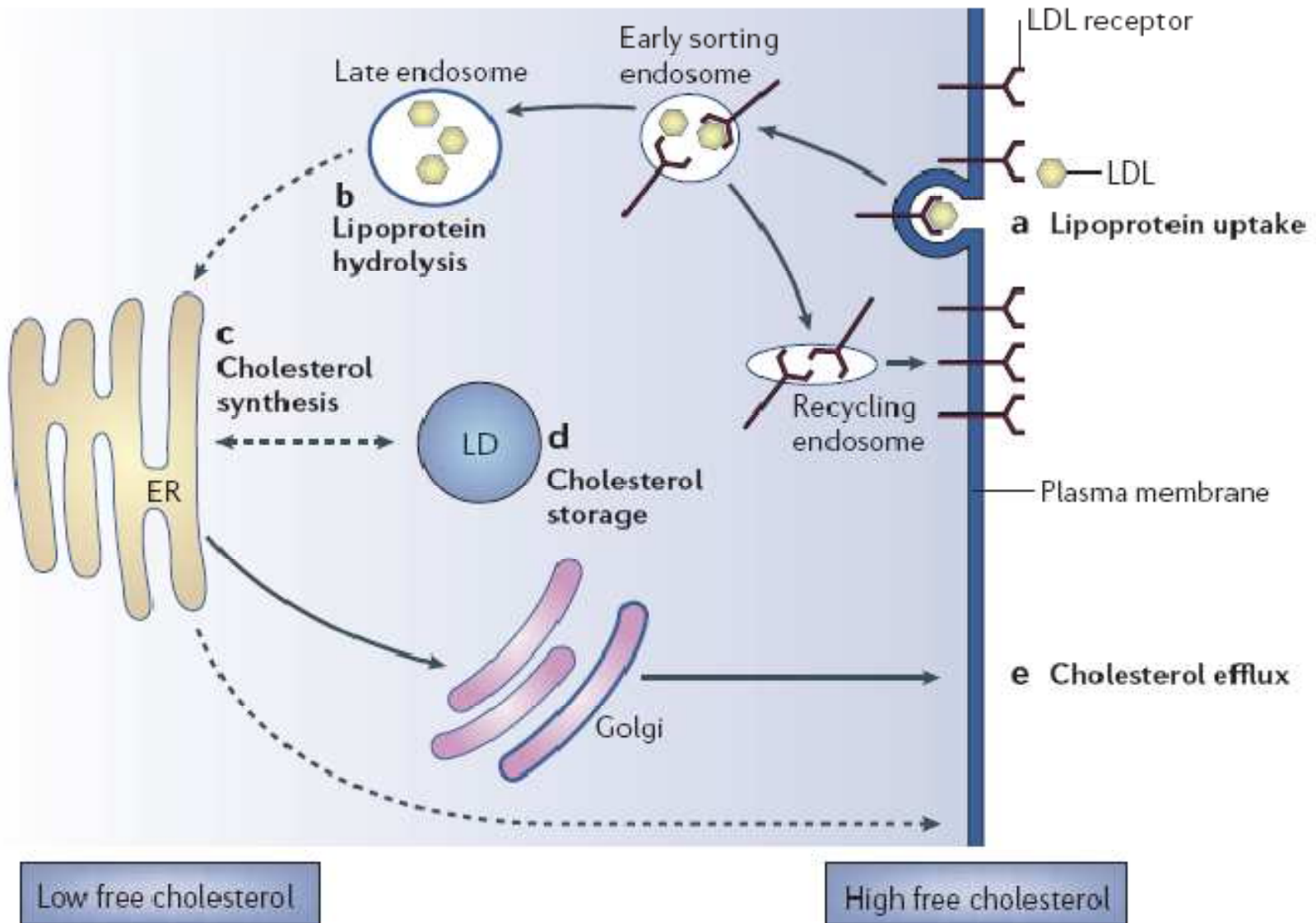


„LIPID DROPLETS“

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



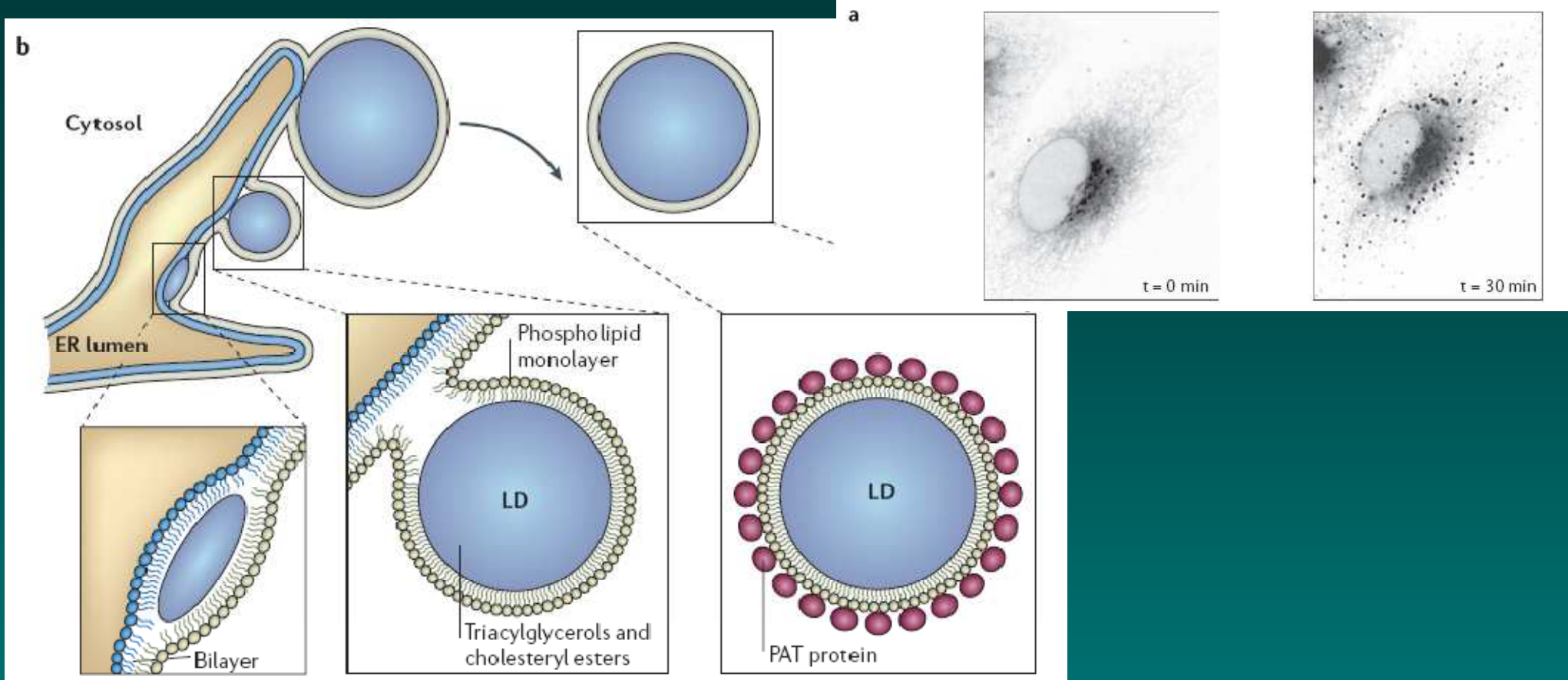


Figure 1 | The formation of lipid droplets. **a** | The formation of lipid droplets (LDs) as monitored by the use of a caveolin-truncation-mutant-green-fluorescent-protein fusion protein ($\text{Cav3}^{\text{DGV}}\text{-GFP}$). Before fatty acid addition ($t = 0$ min), $\text{Cav3}^{\text{DGV}}\text{-GFP}$ 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.

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

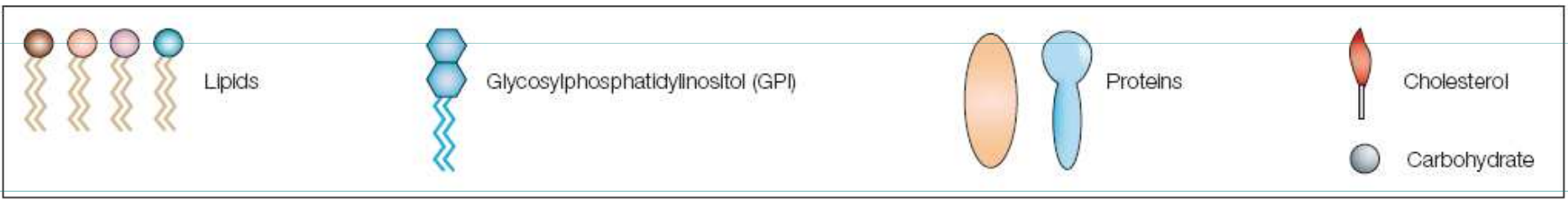
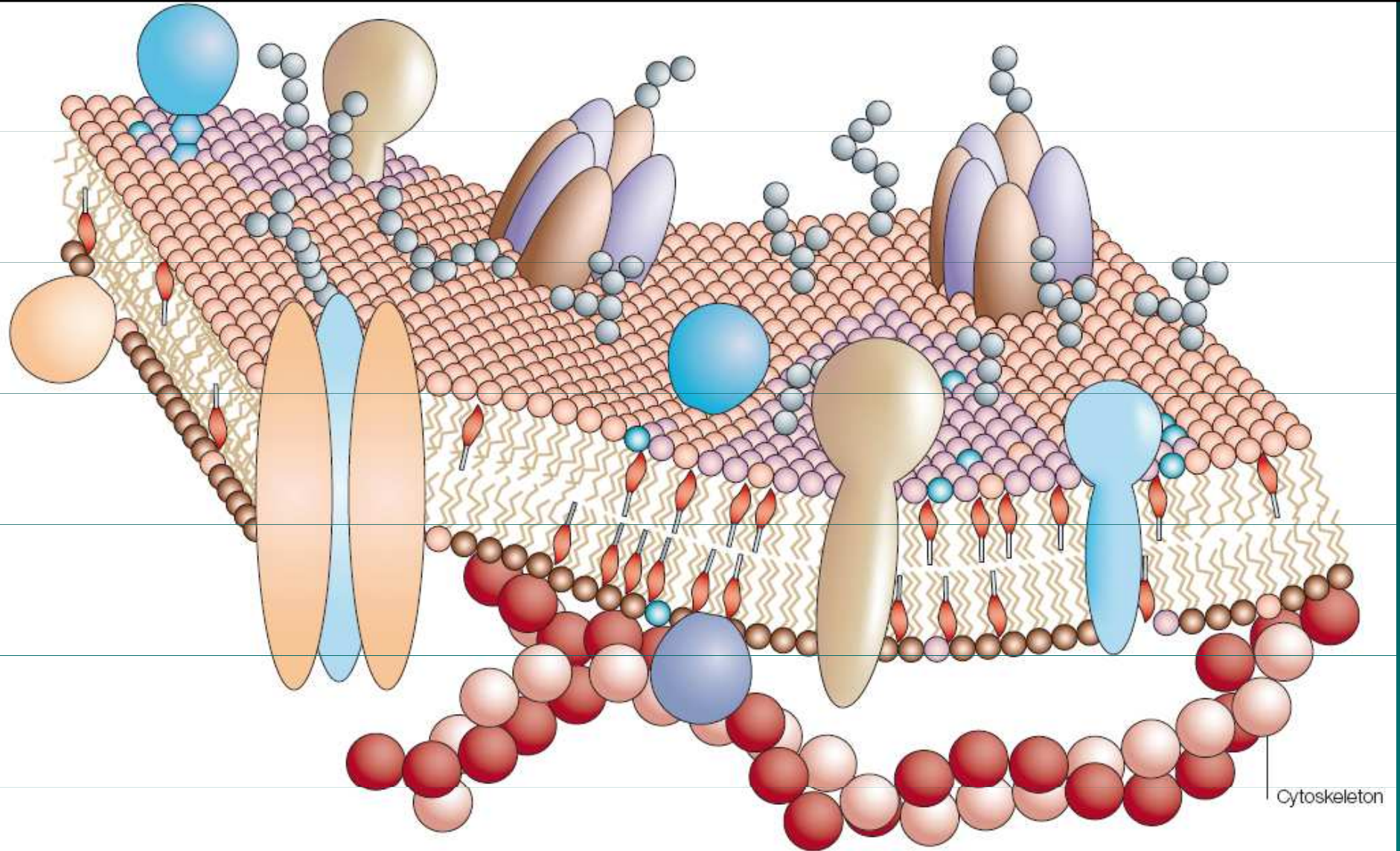


Figure 2 | **The Fluid-Mosaic-Model of the cell membrane.** Like a mosaic, the cell membrane is a complex structure made up of many different parts, such as proteins, phospholipids and cholesterol. The relative amounts of these components vary from membrane to membrane, and the types of lipids in membranes can also vary.

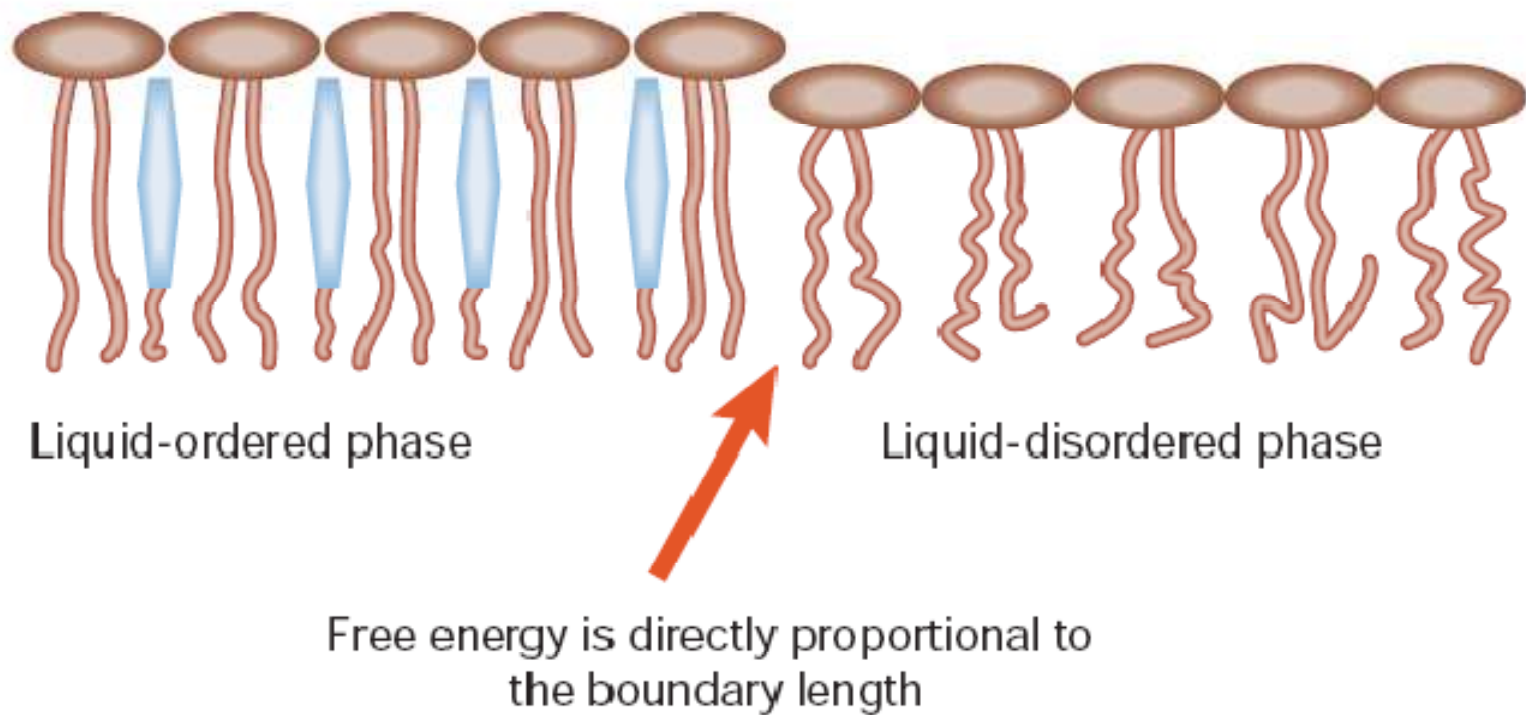


Fig. 2 | Mismatch of hydrated phospholipids and the intercalation of cholesterol as a driving force for a phase separation into liquid-ordered and -disordered phases. (Figure courtesy of P. Kinnunen.)

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

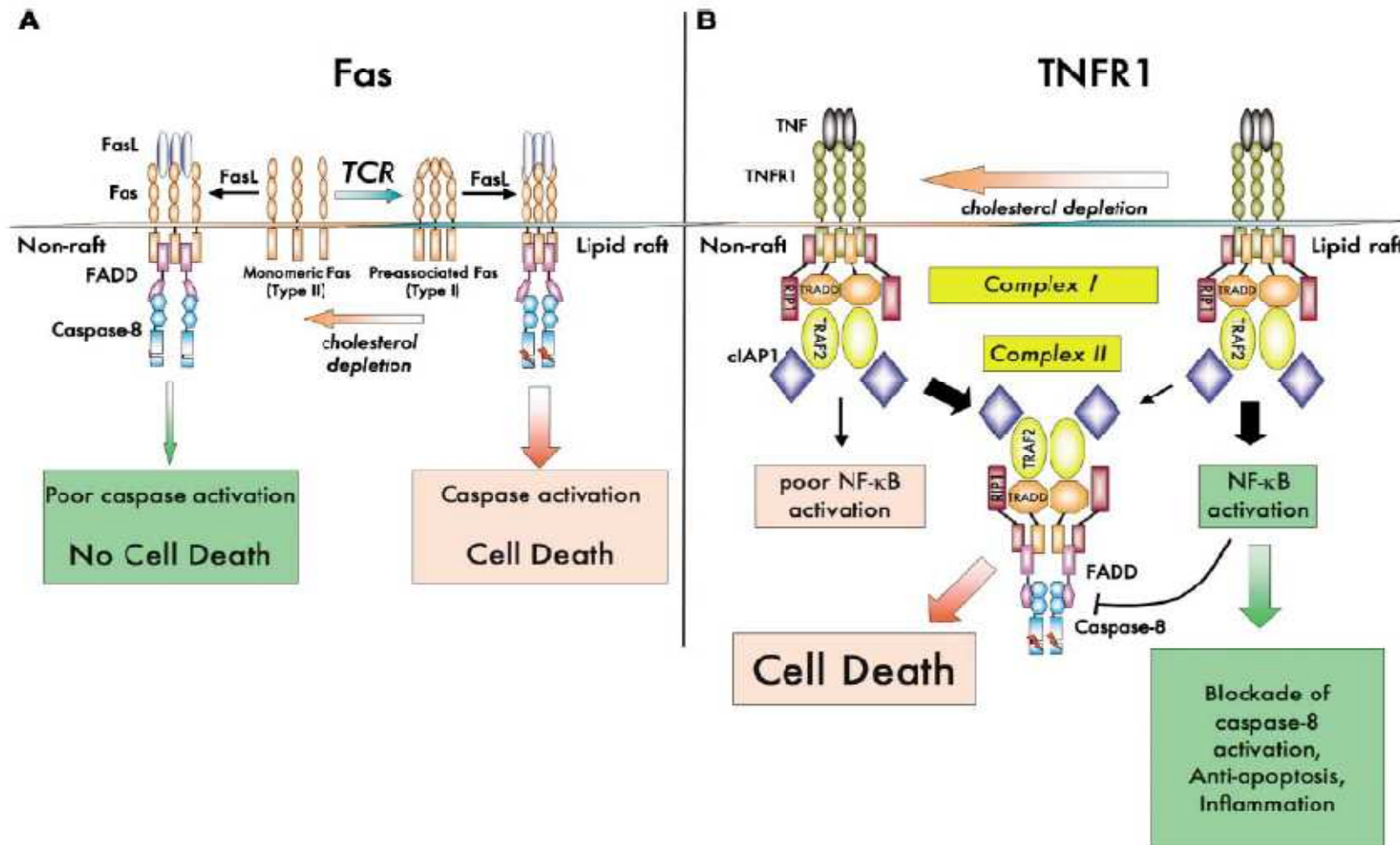


Figure 2. Examples of How Lipid Rafts Can Modify Early Events in TNFR Family Signaling

(A) In activated CD4⁺ 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.

Membrane lipid domains

- Domains are regions with distinctive physical features and compositions
 - Coated pits (clatrin coat – internalization)
 - Caveolae (flask shaped invaginations, caveolins, cholesterol)
 - Lipid rafts (cholesterol, sphingolipids, GPI anchored proteins)
- Domains have wide range in composition, size and dynamics

Definition of lipid rafts

- **Biochemical approach**
 - Detergent resistant liquid ordered (l_o) domain
 - Sensitivity to cholesterol depletion (methyl- β -cyclodextrin, filipin)
- **Biophysical approach**
 - Confocal Laser Scanning Microscopy
 - Electron Microscopy (TEM, SEM)
 - Near-field Scanning Optical Microscopy
 - Atomic force microscopy
 - Single Particle Tracking, Single Dye Tracing
 - Fluorescence Correlation Microscopy
 - Fluorescence Resonance Energy Transfer

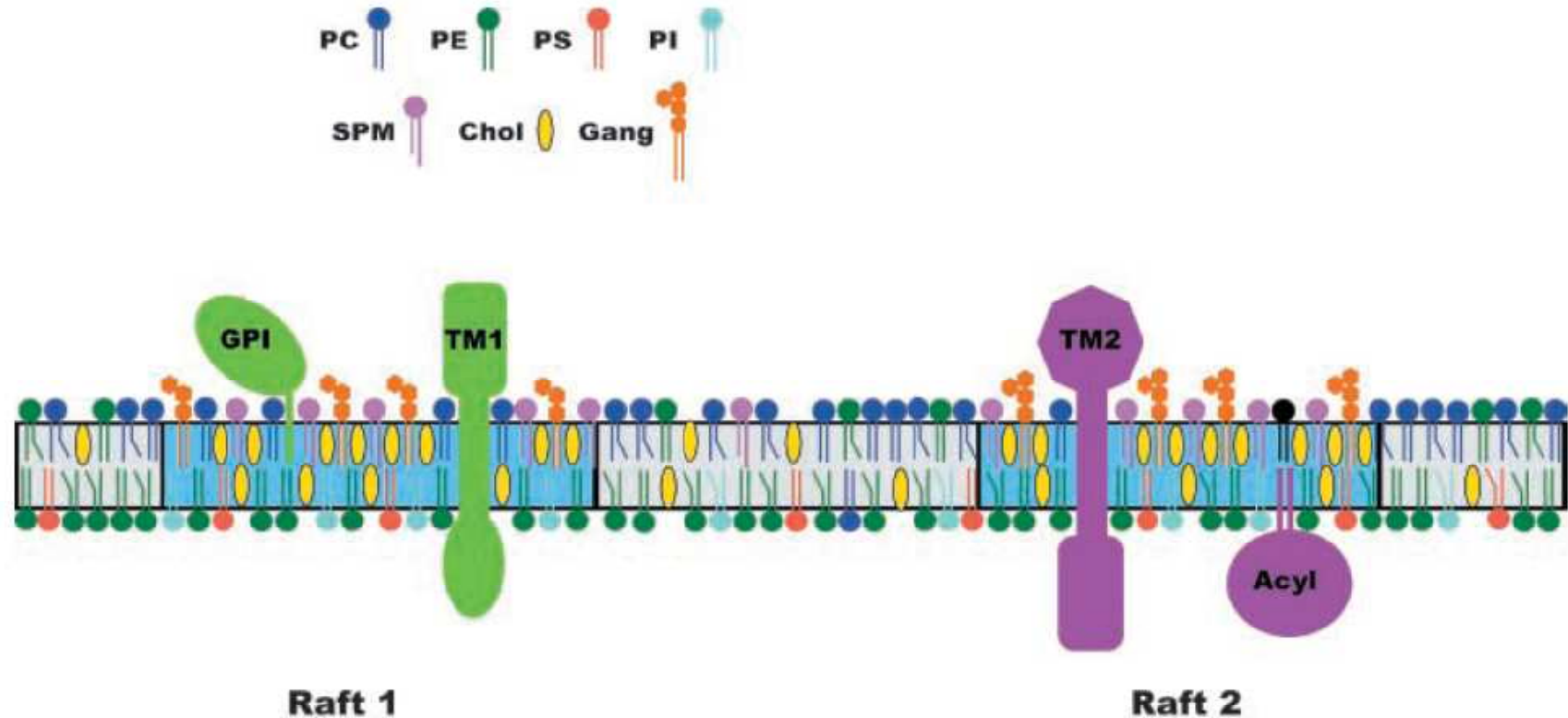


Fig. 1. Structure of lipid rafts. Lipid rafts (blue bilayer) are specialized membrane domains containing high concentrations of cholesterol, sphingomyelin, and gangliosides. They are also enriched in phospholipids that contain saturated fatty acyl chains (straight lines in lipid tails). This composition results in lateral phase separation and the generation of a liquid-ordered domain. Bulk plasma membrane (gray) contains less cholesterol, sphingomyelin, and gangliosides, and more phospholipids with unsaturated acyl chains. As a result, it is more fluid than lipid rafts. A variety of proteins partition into lipid rafts: glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins; transmembrane proteins (TM); dually acylated proteins (Acyl). As shown in the diagram, not all lipid rafts have the identical protein or lipid composition (Raft 1 vs. Raft 2). Not shown are invaginated caveolae, a subclass of lipid rafts that contains caveolin. PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; PI, phosphatidylinositol, SPM, sphingomyelin, Chol, cholesterol; Gang, gangliosides.

Lipid rafts

Core

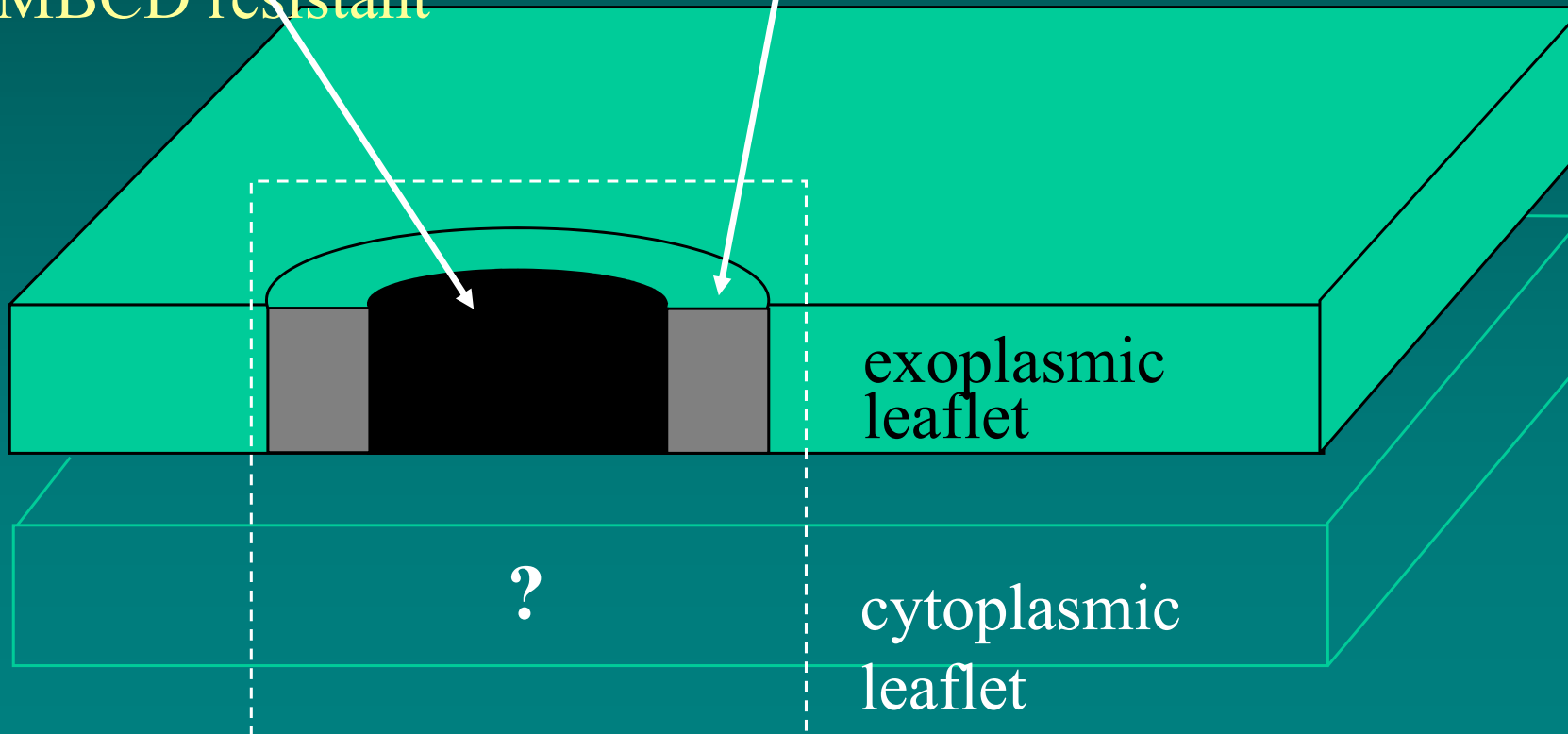
GPI-anchored
proteins
glycosphingolipids
TX-100 insoluble
MBCD resistant

cholesterol-rich annulus

GPI-anchored proteins
TX-100 insoluble
MBCD sensitive

glycerophospholipid- rich-membrane

transmembrane
proteins
TX-100 soluble
MBCD sensitive



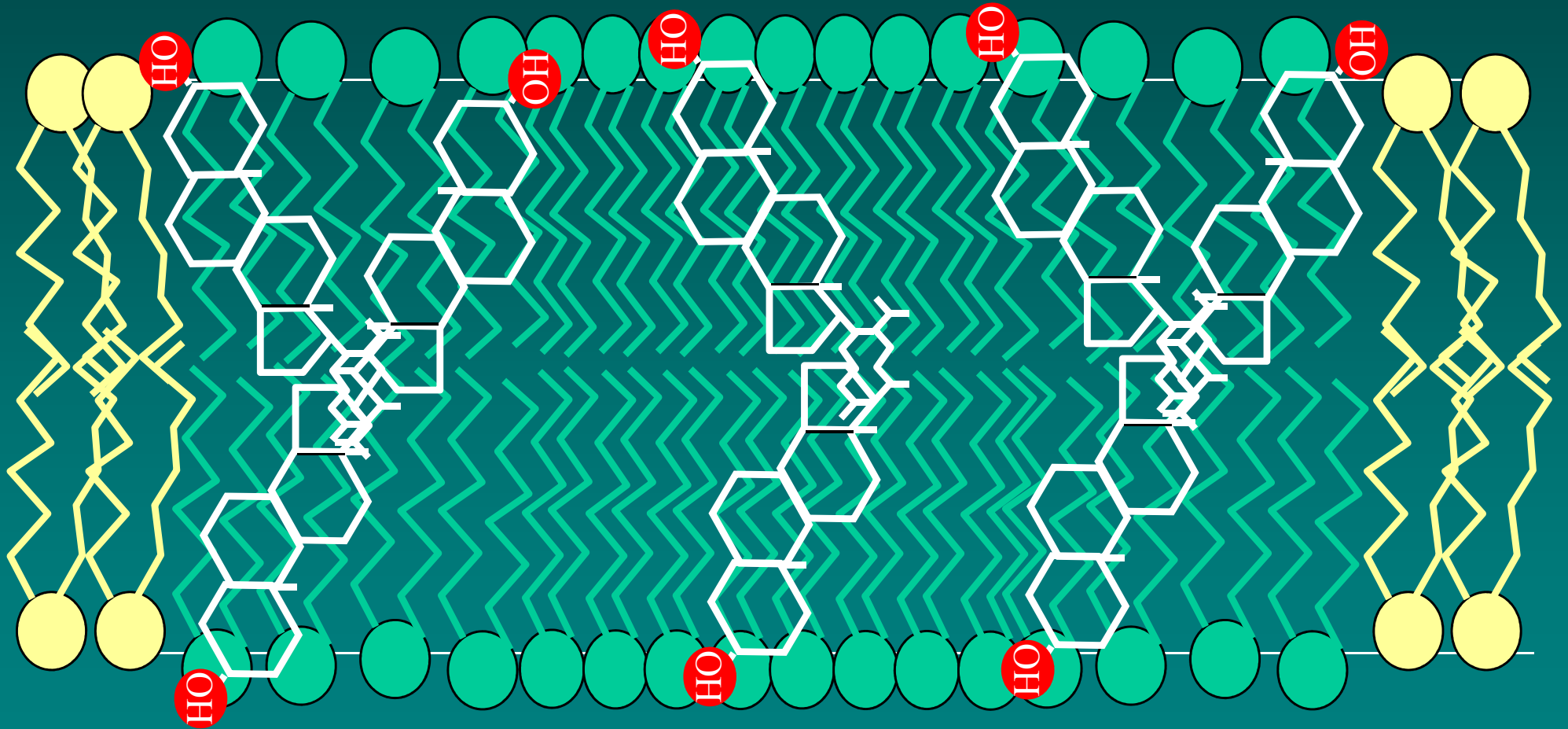
MBCD: methyl- β -cyclodextrin

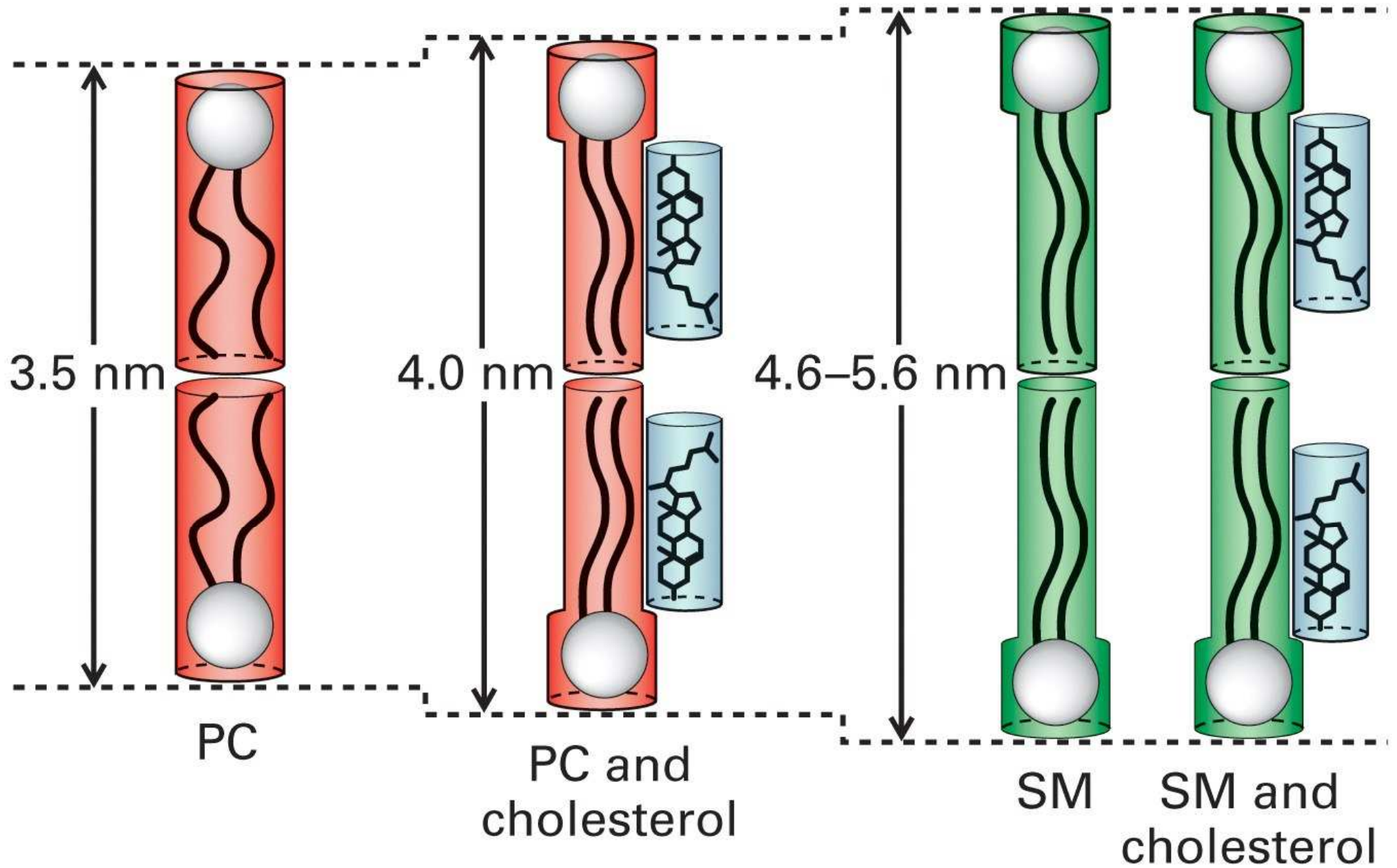
Lipid rafts

cholesterol-rich
annulus

core of the raft

cholesterol-rich
annulus

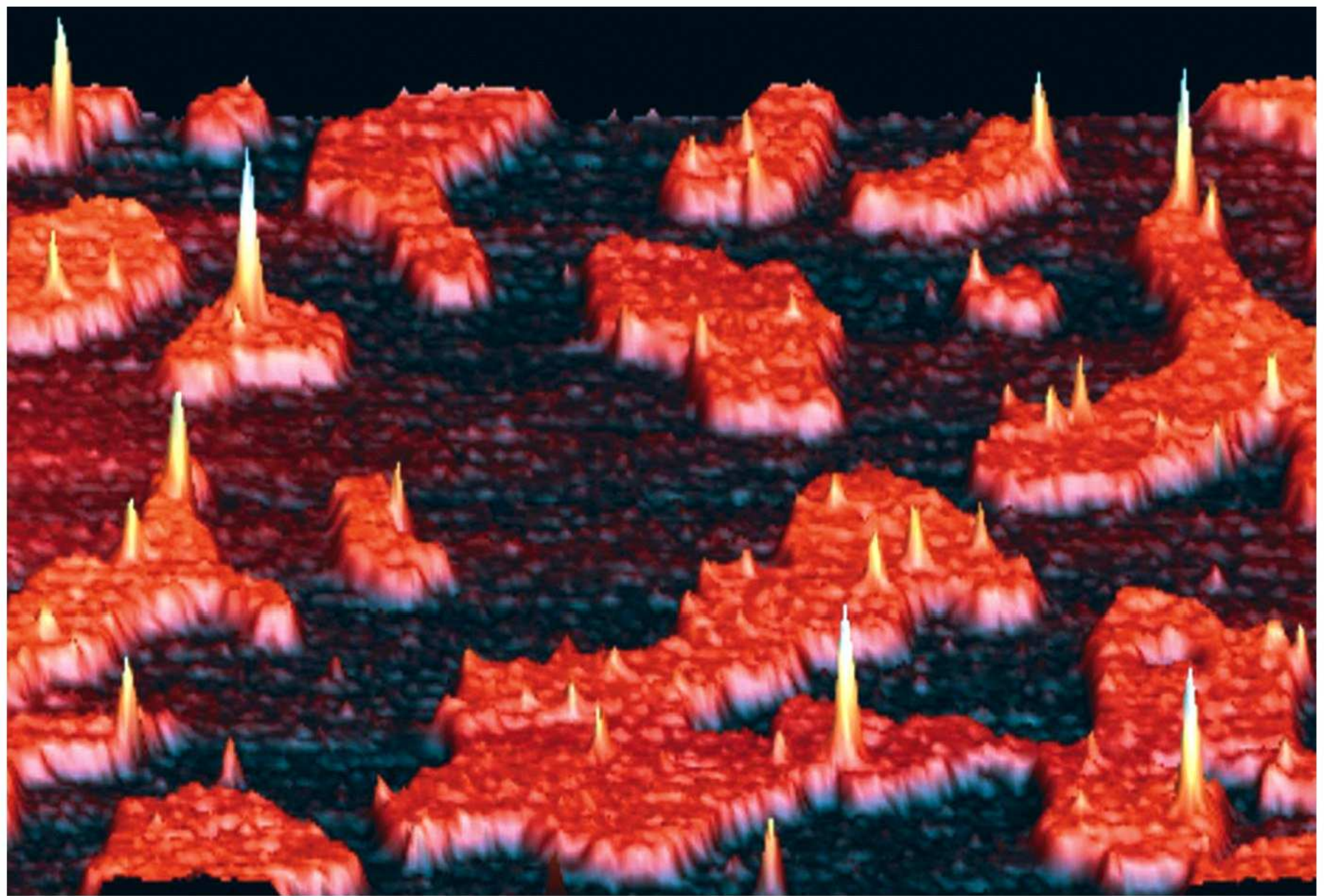




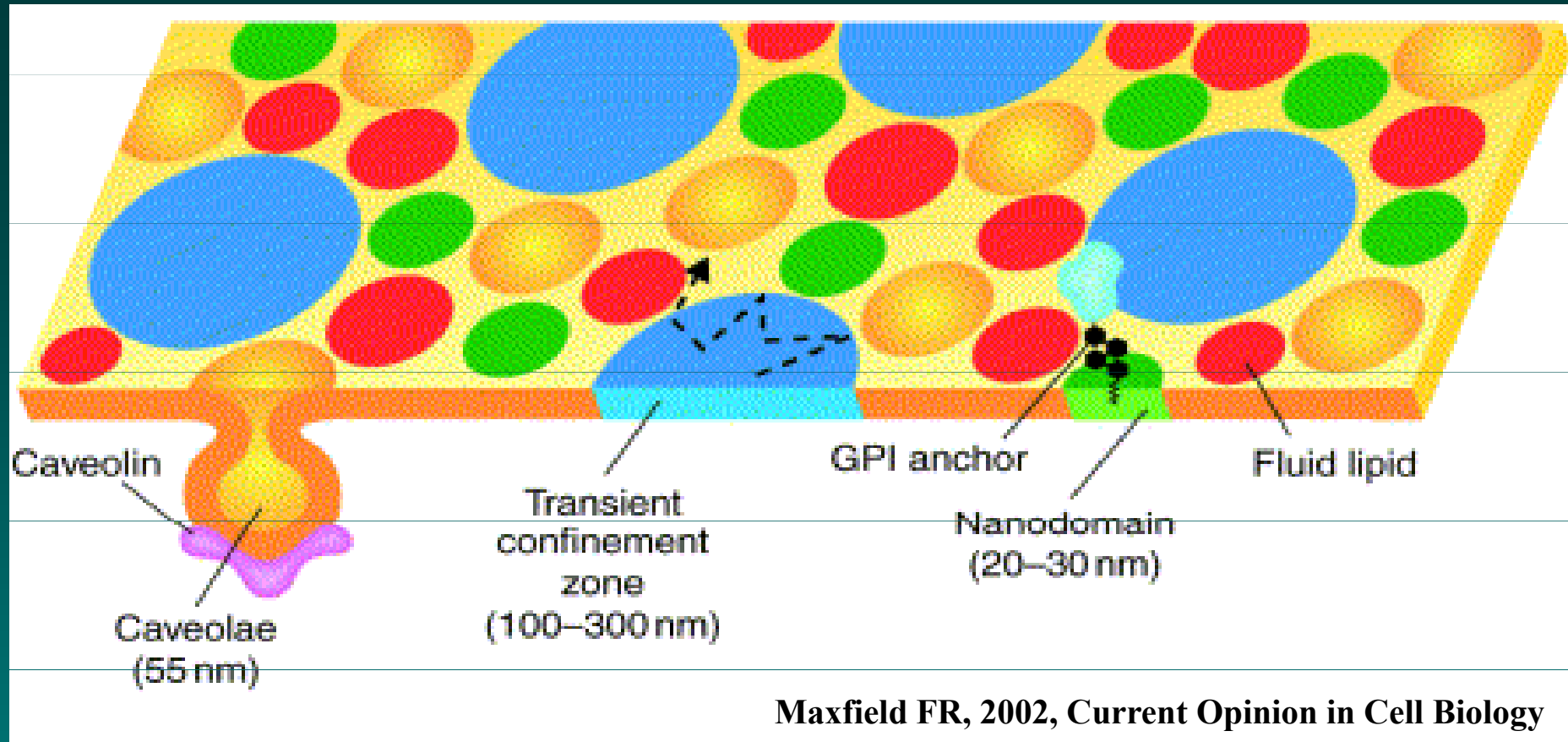
PC= phosphatidyl choline
 SM= sphingomyelin

PC black, SM red, PLAP yellow.

Atomic force microscopy!

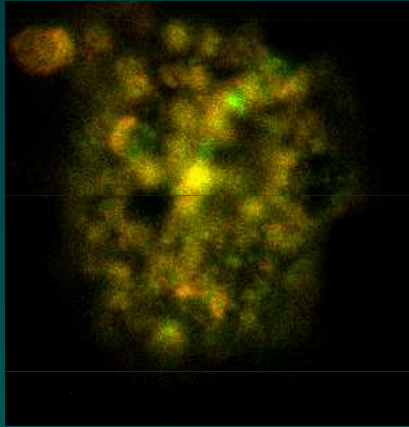


Lipid rafts

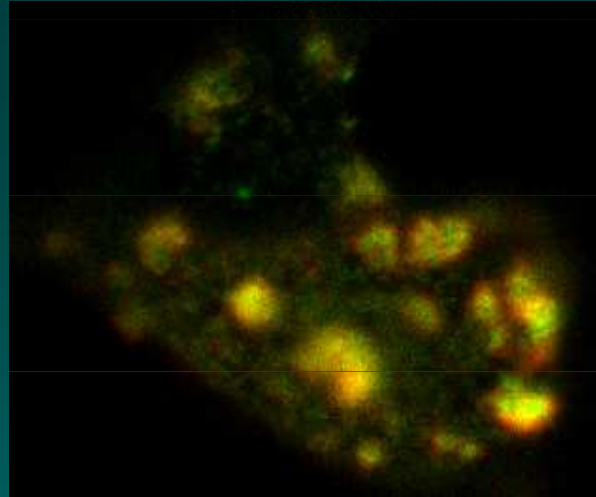


- Mammalian cell membranes show microheterogeneity: lipid microdomains have
 - Distinct lipid composition
 - Range: 20 nm – 1-2 μm
 - Lifetime: μsec - min
- Signaling processes associated with lipid rafts
TCR function, IL-2R, RTKs such as erbB receptors, etc.

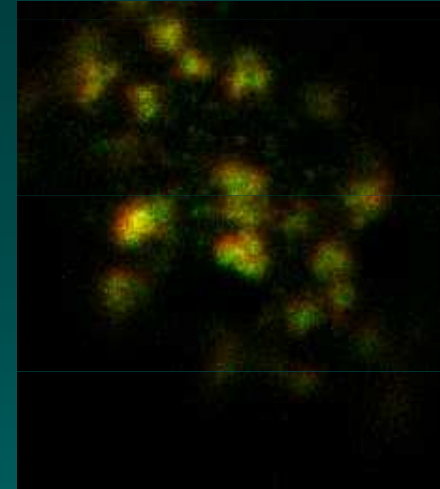
ErbB2 is dynamically localized in lipid rafts on SKBR3 cells



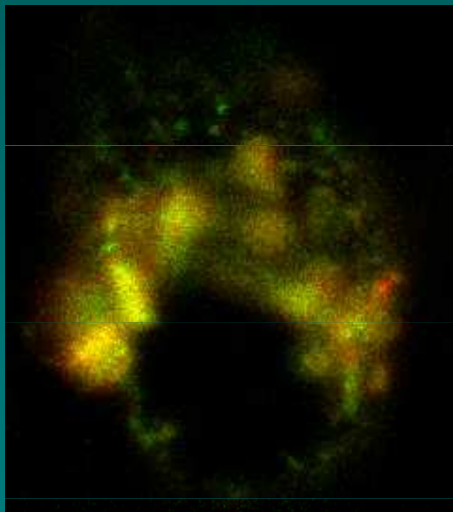
control



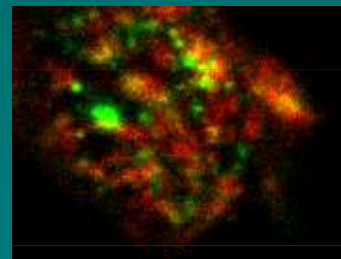
Heregulin-treated



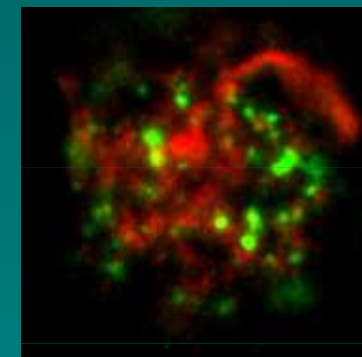
EGF-treated



4D5-treated



cholera toxin-
treated



cholera toxin-
and 4D5-treated

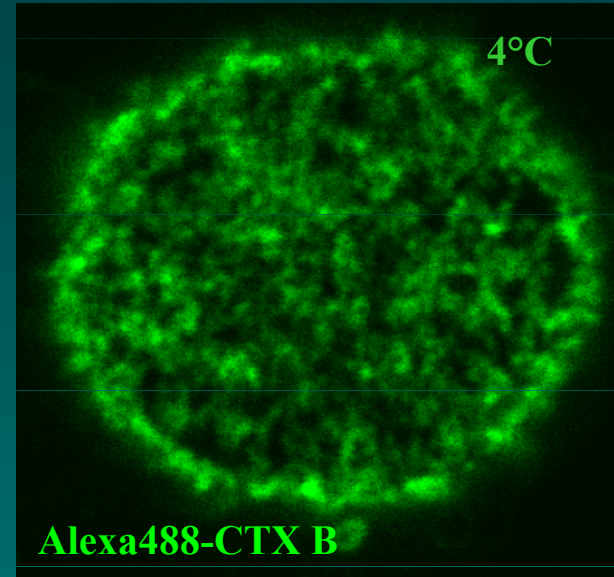
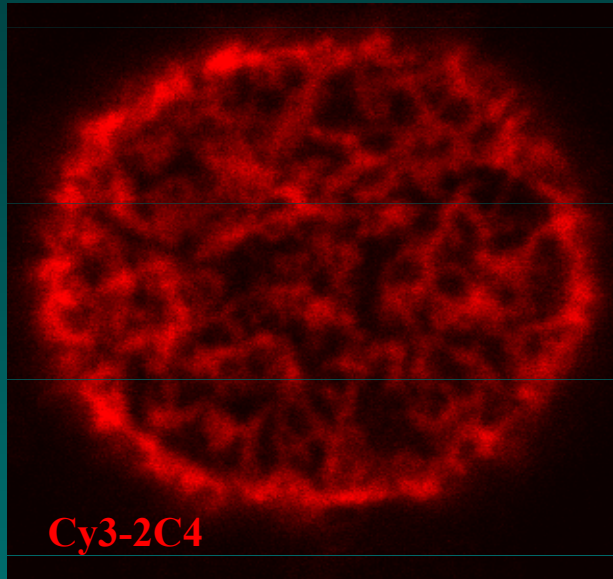
green – rafts labeled by FITC-cholera toxin, subunit B, red – Cy3-4D5-labeled erbB2

Colocalization of ErbB2, β 1-integrin and lipid rafts on the top surface of N-87 cells

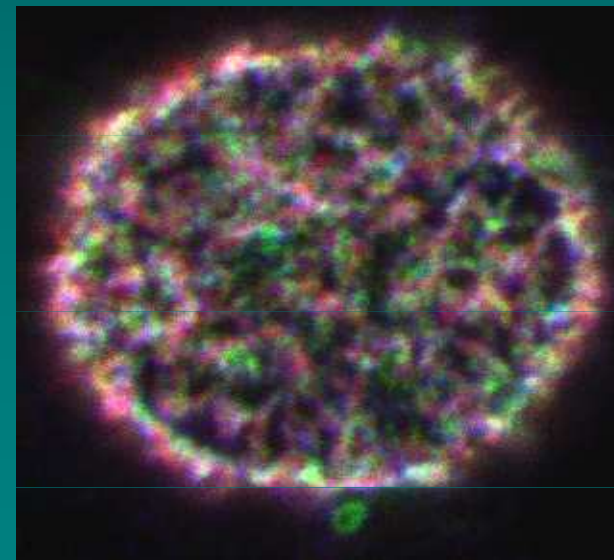
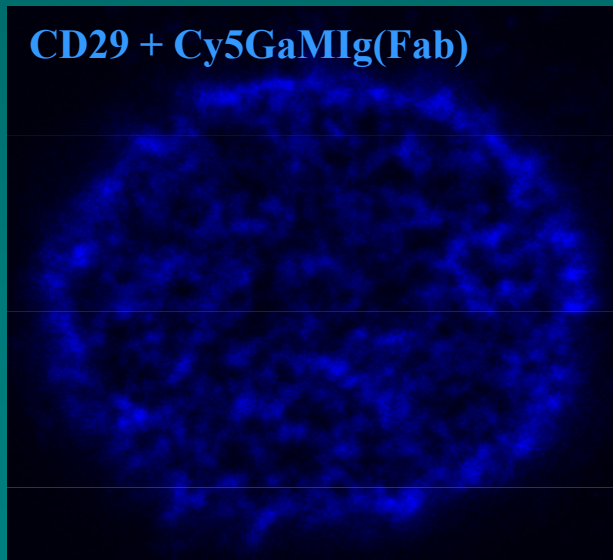
ErbB2

66%

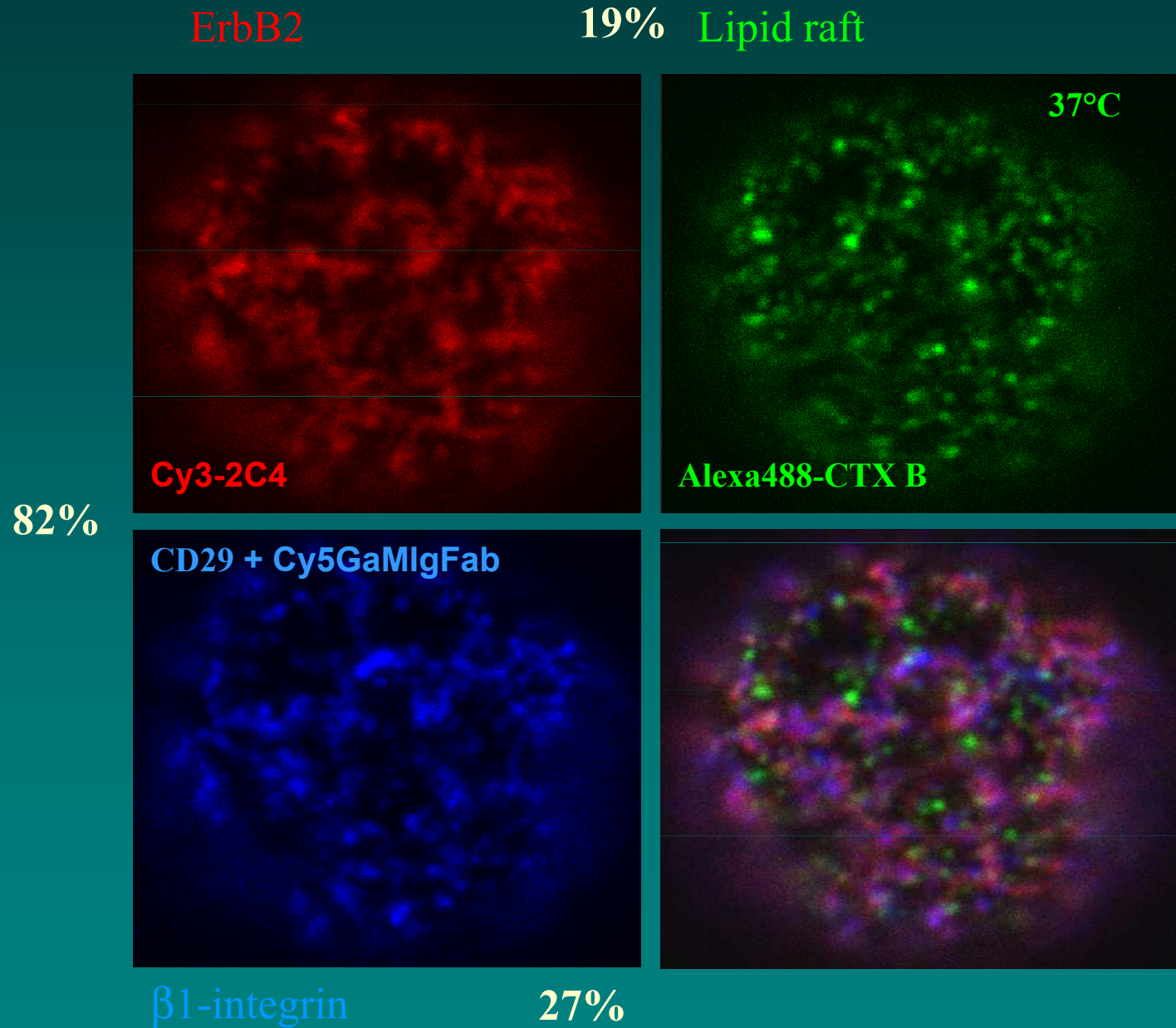
Lipid raft



CD29 + Cy5GaMIg(Fab)



Colocalization of ErbB2, β 1-integrin and lipid rafts on the top surface of N-87 cells after cross-linking the lipid rafts



EXPERIMENTÁLNÍ CÍLE ODDĚLENÍ CYTOKINETIKY BFÚ AV ČR

- ◆ **ÚČINKY VNMK** kys. arachidonová, AA, 20:4, n-6
kys. dokosaheptaenová, DHA, 22:6, n-3

BUTYRÁTU (NaBt)

samostatně nebo v kombinaci na cytotkinetiku epitelálních buněk kolonu a detailnější poznání mechanismů účastnících se těchto procesů

- ◆ **INTERAKCE MASTNÝCH KYSELIN** (a jejich metabolismu) s **ENDOGENNÍMI INDUKTORY APOPTÓZY** (TNF α , Fas, TRAIL) a jejich vlivu na epitelální buňky kolonu - mechanismy

- změny buněčných lipidů v souvislosti s modulací cytotkinetiky
- srovnání odpovědi nádorových a „normálních“ buněk kolonu

VÝSTUPY

➤ Základní výzkum

➤ Klinika a výrobní praxe

- protinádorová prevence a terapie
- oblast nutriční farmakologie

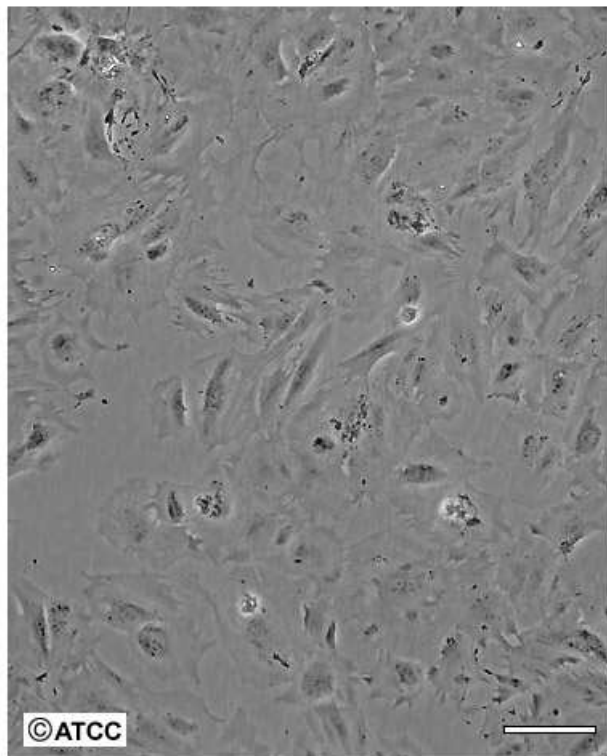
optimalizace lipidových výživ pro určité diagnózy („disease specific nutrition“), zejména u pacientů s nádorovým onemocněním

(Projekt cíleného výzkumu AV ČR – „Tukové složky výživy...“)

Linie lidských epiteliálních buněk kolonu

FHC

normální
fetální střevo



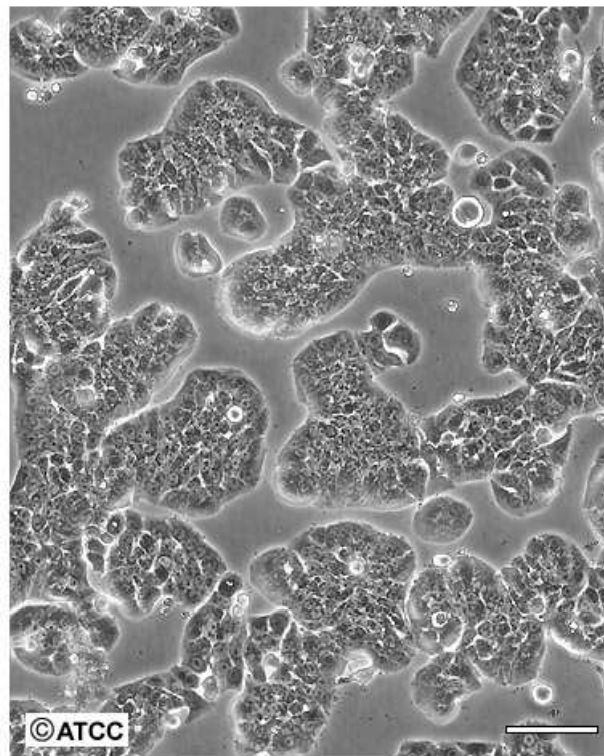
©ATCC

High Density

Scale Bar = 100µm

HT-29

diferencující
neinvazivní



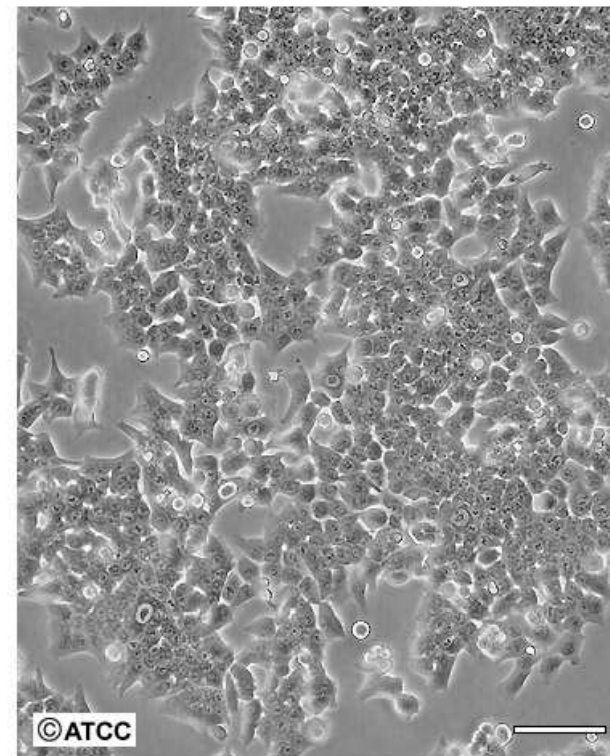
©ATCC

High Density

Scale Bar = 100µm

HCT-116

nediferencující
invazivní



©ATCC

High Density

Scale Bar = 100µm

Adenokarcinom kolonu

CaCo-2

SW 620 – lymf. uzlina

METODOLOGIE



CYTOKINETIKA

Detekce proliferace- regulace buněčného cyklu a zapojených proteinů,

diferenciace -buněčná morfologie, aktivita specifických enzymů, exprese specifických proteinů

apoptózy -detekce charakteristických změn na úrovni jádra, mitochondrií, membrán, cytoskeletu, exprese regulačních proteinů, štěpení specifických enzymů a substrátů

ZMĚNY LIPIDOVÉHO METABOLISMU A VLASTNOSTÍ BUNĚČNÝCH MEMBRÁN

-změny spektra MK v bun. lipidech, „lipid packing“ v membránách, akumulace triglyceridů, detekce kardiolipinu, membránový potenciál

ZMĚNY OXIDATIVNÍHO METABOLISMU

- produkce reaktivních metabolitů kyslíku (ROS) a dusíku, lipidová peroxidace, účinky antioxidantů

Využití moderních metod průtokové cytometrie, fluorescenční mikroskopie, fluorimetrie, spektroskopie, metod molekulární biologie...

TNF α zvyšuje apoptózu buněk HT-29, ale potlačuje diferenciaci indukovanou NaBt u epiteliálních buněk tlustého střeva

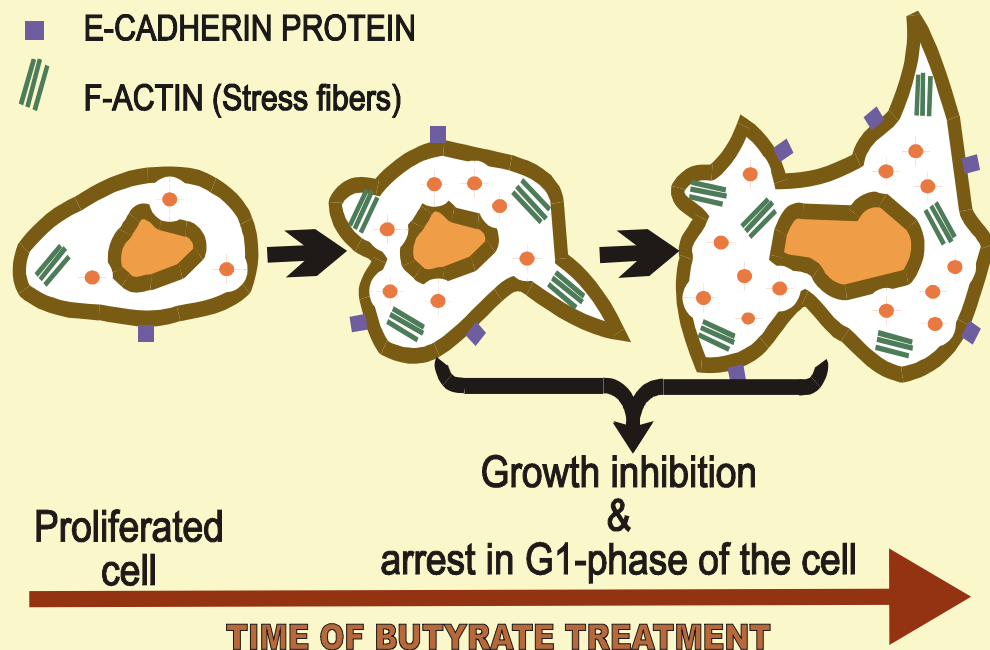
- **Butyrát** vzniká ve střevě fermentací nestravitelné vlákniny
- Navozuje diferenciaci a následnou apoptózu epiteliálních buněk střeva

Znaky diferenciacce střevních buněk

● ALKALINE PHOSPHATASE

■ E-CADHERIN PROTEIN

/// F-ACTIN (Stress fibers)



- **TNF- α** je v tlustém střevě dlouhodobě produkován během chronických zánětlivých onemocnění střeva (ulcerativní kolitida, Crohnova choroba apod.)
- Buňky nádorů tlustého střeva obsahují zvýšené množství TNF ve srovnání ze zdravou tkání

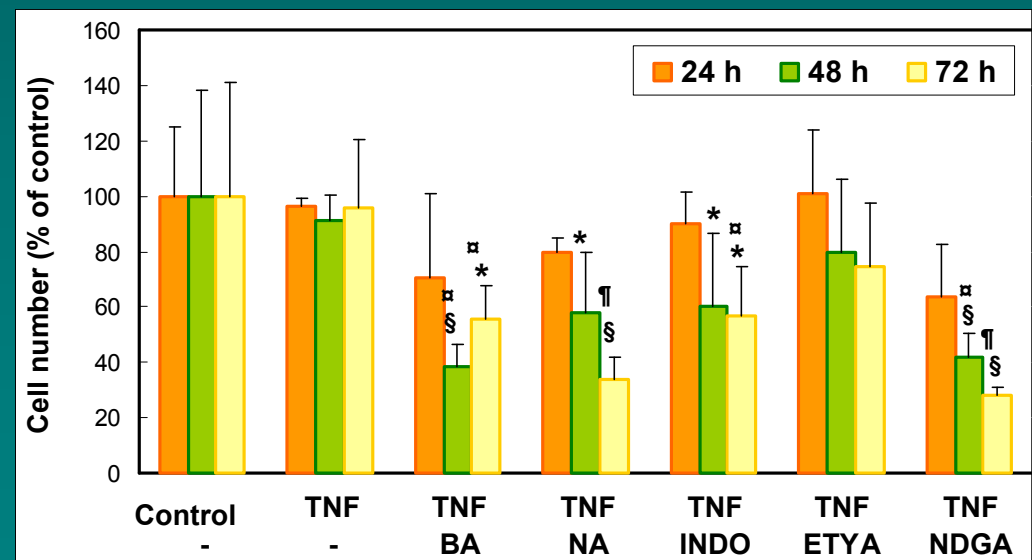
TNF- α posiluje apoptózu a potlačuje diferenciaci navozenou butyrátem u střevních nádorových buněčných linií HT-29 a CaCo-2 a u fetálních střevních buněk FHC

Inhibice metabolismu kyseliny arachidonové může ovlivnit citlivost epiteliálních buněk střeva k TNF- α

- **Kyselina arachidonová (AA)** může být v buňce metabolizována přes cyklooxygenázu (COX), lipoxygenázu (LOX) a cytochrom P450.
- Jednou z možností studia jednotlivých metabolických drah je použití inhibice příslušných enzymů:
 - Baicalein (BA) – 12-LOX inhibitor
 - NDGA – LOX inhibitor
 - Niflumová kys. (NA) – COX inhibitor
 - Indometacin (INDO) – COX inhibitor
 - ETYA – kompetitor AA

Epiteliální buňky HT-29 odvozené od adenokarcinomu tlustého střeva jsou relativně rezistentní k působení TNF- α .

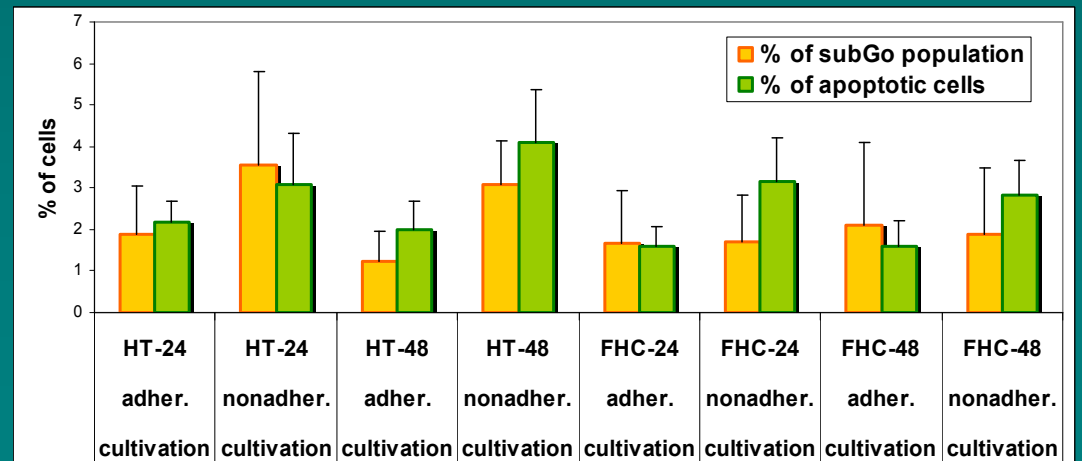
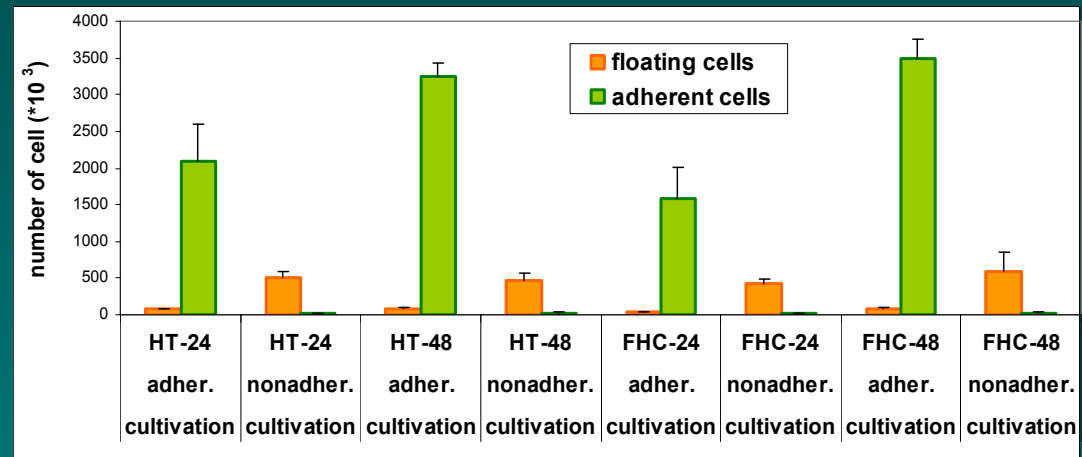
Inhibice metabolismu AA způsobuje jejich zcitlivění k účinkům tohoto cytokinu.



Indukce buněčné smrti a změny adhezivních vlastností epiteliálních buněk střeva během indukce anoikis

Pro indukci anoikis v podmínkách in vitro je používán model neadherentní kultivace buněk

- **Anoikis** představuje typ buněčné smrti, kterou umírají epiteliální buňky pokud dojde k narušení jejich kontaktu s extracelulární matrix.
- V tlustém střevě je anoikis navozena po uvolnění buněk v horních částech krypt, a funguje zde jako jeden z faktorů pro udržení rovnováhy mezi cytokinetickými procesy.
- Vznik rezistence buněk k anoikis představuje jeden z kritických momentů v karcinogenezi tlustého střeva.



KLINIKA

Složení a využití lipidových emulzí

Směsi přírodních olejů (sojový –LCT, kokosový – MCT), emulgované fosfolipidy (vaječný lecitin, sojové fosfolipidy), izotonizační přísada (glycerol)

Tukové částice podobné chilomikronům

Parenterální výživa – emulze součást tzv. „all-in-one“ vaků

Funkce - zdroj energie a esenciálních MK

Na základě nových poznatků o regulační úloze lipidů využití jako farmaka

Enterální a orální výživa

Nutrition pharmacology

Disease-specific nutrition

Nutriční farmakologie „disease specific nutrition“

Physiol. Res. 54: 409-418, 2005

The Effects of Parenteral Lipid Emulsions on Cancer and Normal Human Colon Epithelial Cells *in vitro*

J. HOFMANOVÁ¹, Z. ZADÁK², R. HYŠPLER², J. MIKESKA³, P. ŽDÁNSKÝ²,
A. VACULOVÁ¹, J. NETÍKOVÁ¹, A. KOZUBÍK¹

¹Laboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, ²Department of Metabolic Care and Gerontology, Charles University, Teaching Hospital, Hradec Králové and ³Infusia Hořátev, a. s., Czech Republic

Klinicky využívané lipidové výživy vyvolávaly různou odpověď (proliferace, apoptóza, produkce ROS) u normálních a nádorových linií tlustého střeva. Lipidové emulze měnily spektrum MK v buněčných lipidech. Buňky linie získané z nenádorové tkáně kolonu byly citlivější k působení emulzí, nežli buňky nádorové linie zejména díky vyššímu oxidativnímu stresu vyvolanému působením emulze.

Příklady a mechanismy působení vysoce nenasycených mastných kyselin třídy n-6 a n-3

Experimentální systémy *in vitro* a *in vivo*

Působení n-3 vs. n-6 MK

Působení na proliferaci a smrt normálních a nádorových buněk

Interakce s růstovými faktory

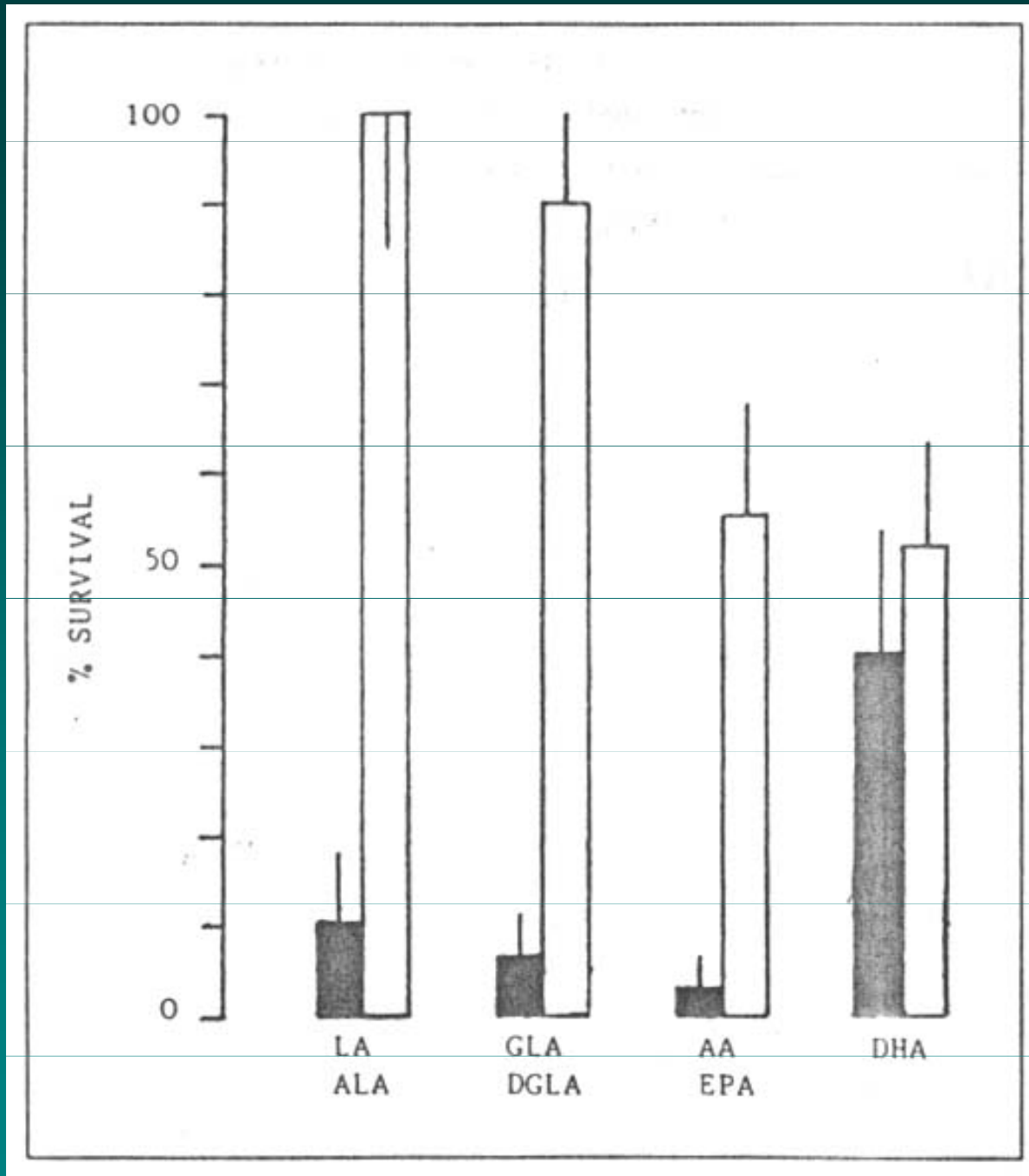
Spolupůsobení s jinými agens (cytostatika, chemoterapeutika)

Metabolismus kyseliny arachidonové

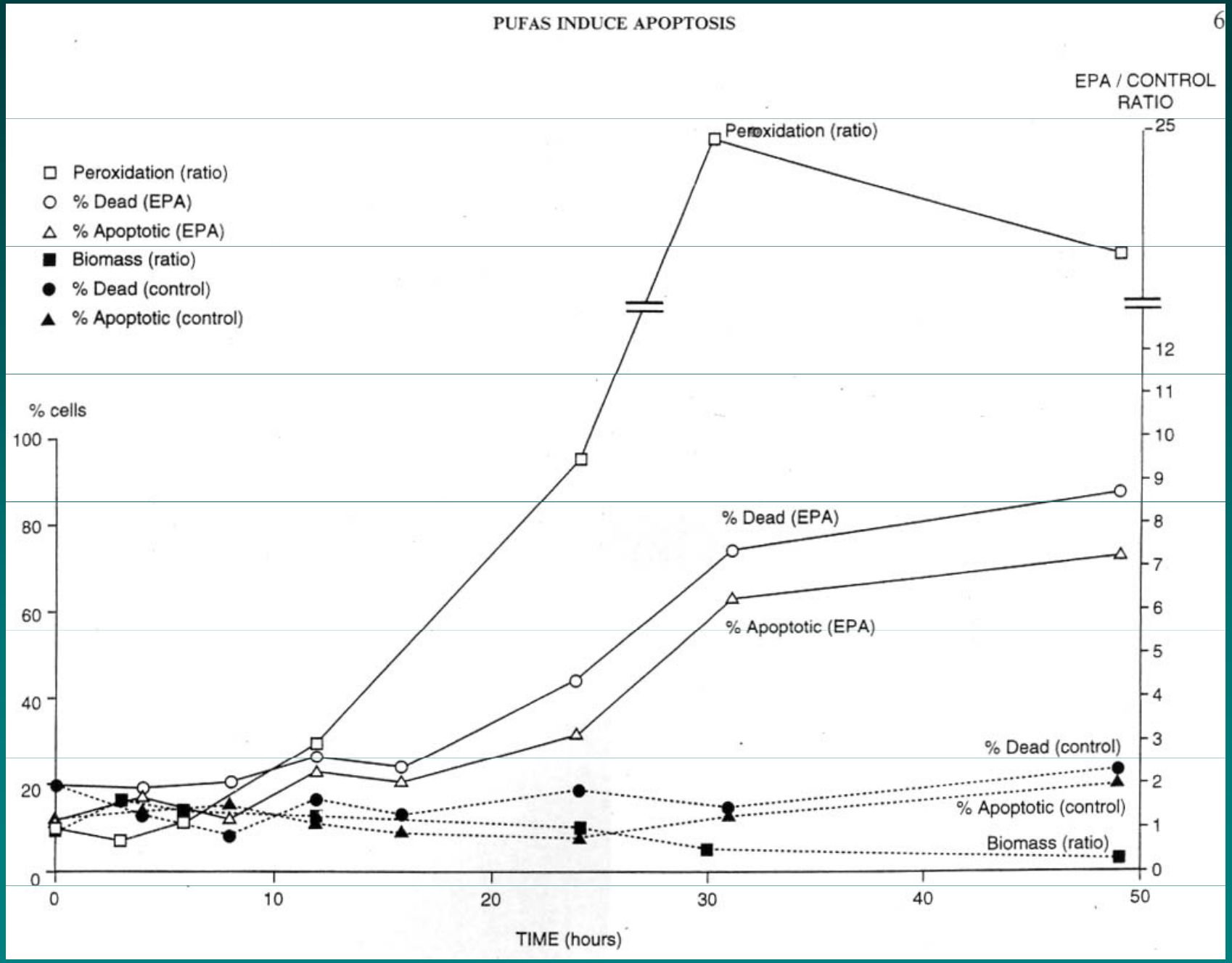
Úloha cyklooxygenázy 2

Inhibitory metabolismu AA v terapii

Cytotoxické účinky n-3 and n-6 EFA na nádorové a nenádorové buňky



Časový průběh účinků kyseliny eikosapentaenové (n-3) na buňky



Suprese růstu buněk nádoru prsu EPA a DHA

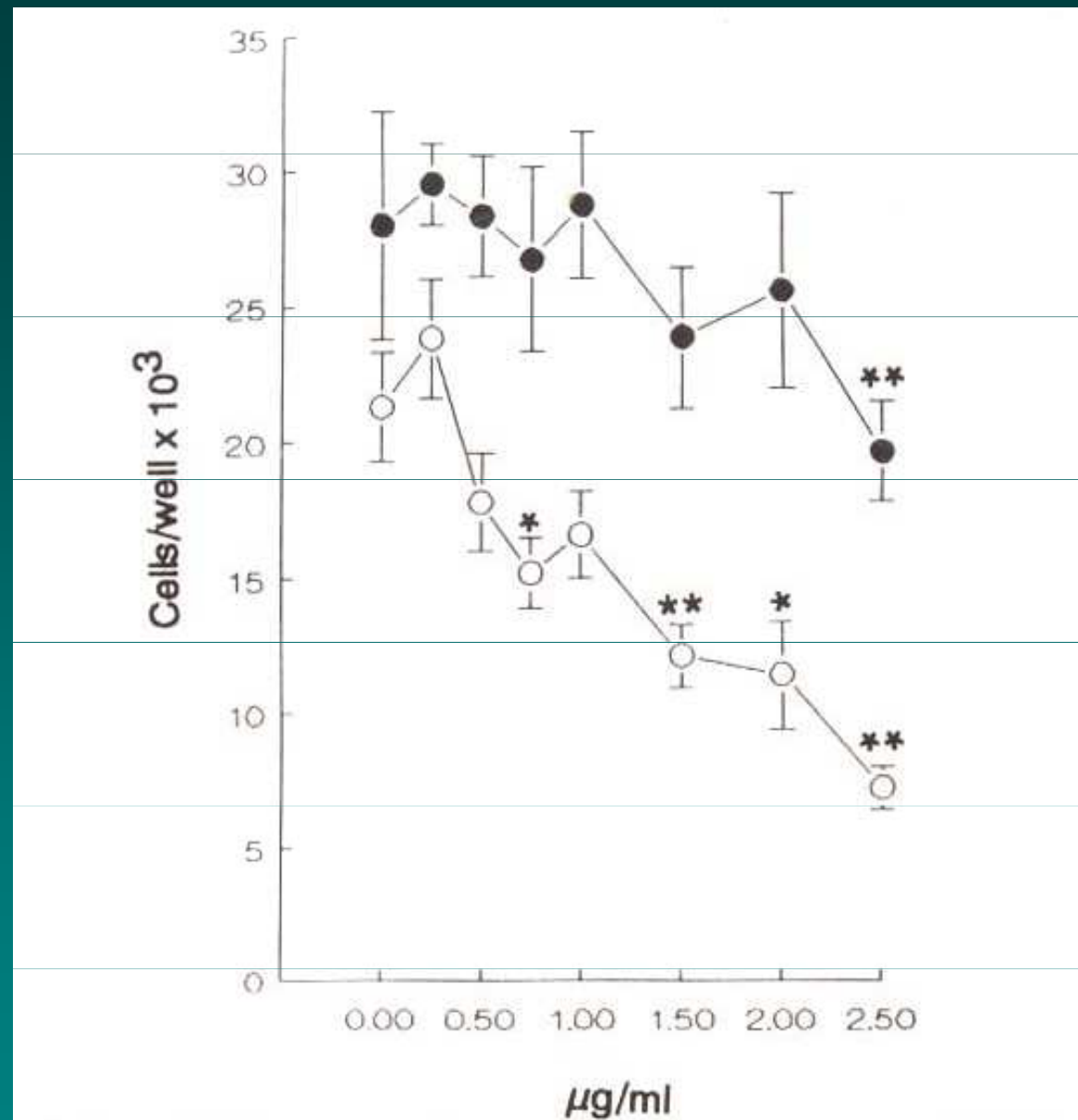


Fig. 2. Suppression of growth of the MDA-MB-231 breast cancer cell line by EPA (●) and DHA (○). Points, mean values for triplicate wells; bars, SE. Cell number reduced significantly compared with control: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Účinky LA a OA na růst buněk nádoru prsu

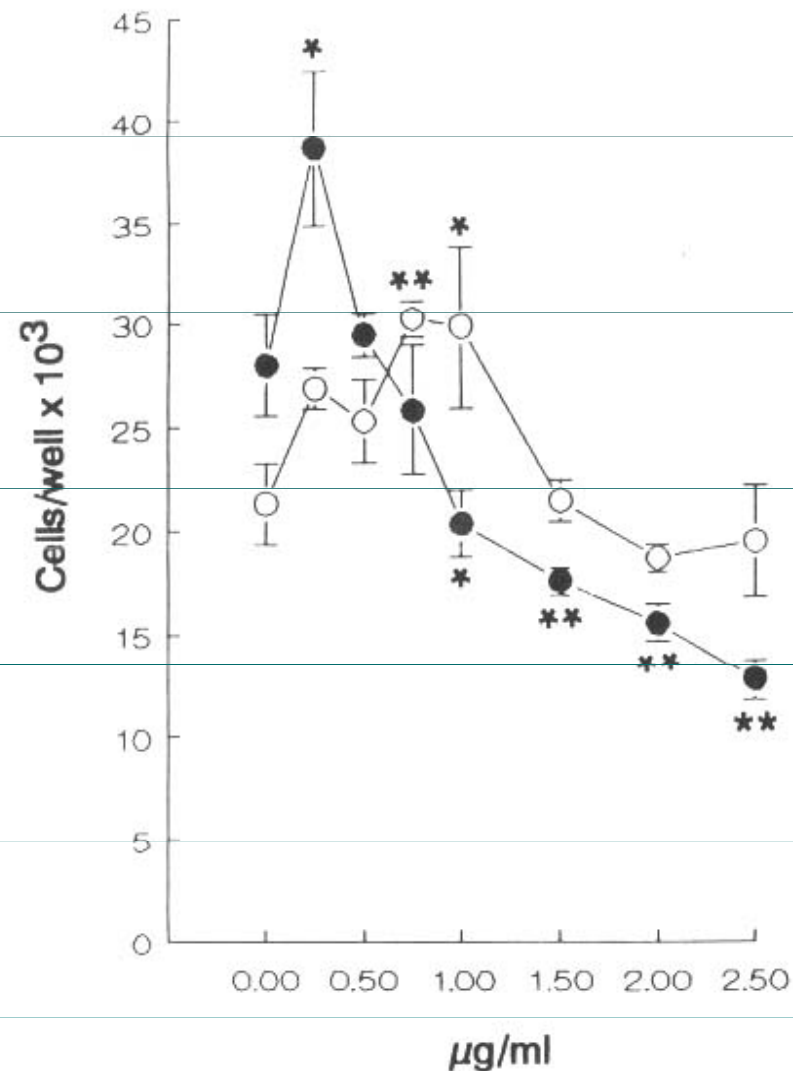


Fig. 1. The effects of LA (○) and OA (●) on growth of the MDA-MB-231 breast cancer cell line. The cells were counted after 6 days. Culture was in serum-free medium containing 1.25 mg/ml of delipidized BSA, and the FAs were added dissolved in ethanol. An equal volume of ethanol was added to the control wells. Points, mean values for triplicate wells; bars, SE. Statistically significant differences in cell numbers compared with those in the absence of FA addition are: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Cytotoxicita indukovaná EFA a její vztah k superoxidovým radikálům a produktům degradace hydroperoxidu

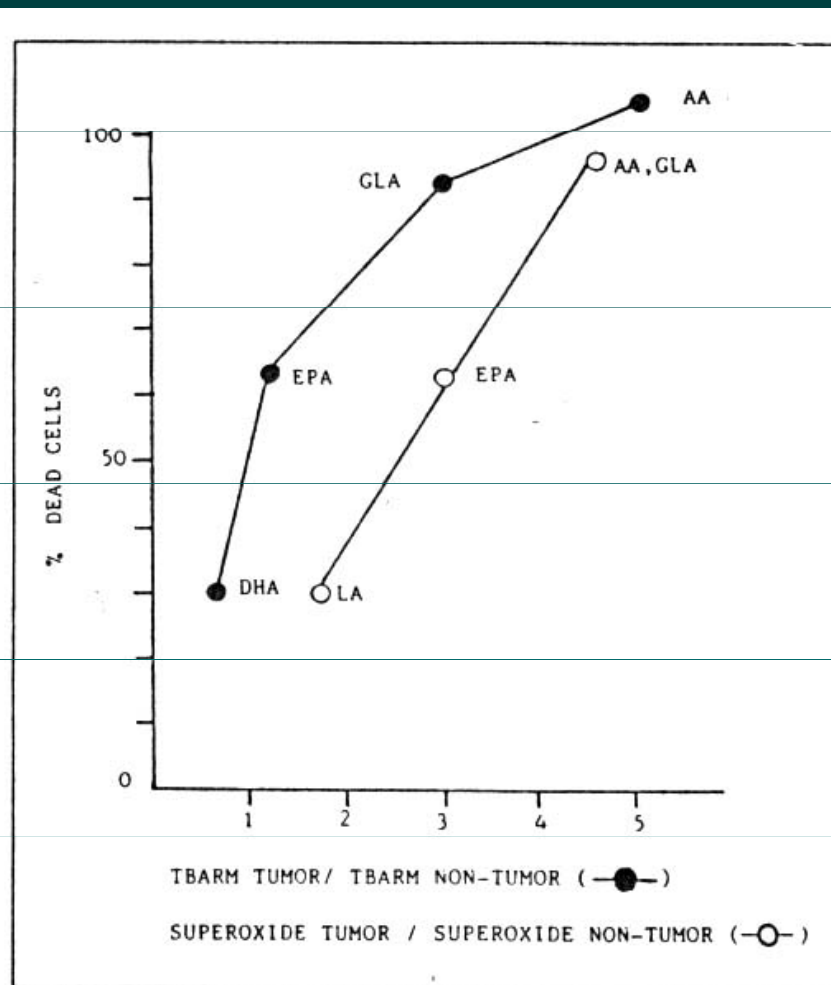


Fig. 2. EFA-induced cytotoxicity and its relationship to superoxide radicals and hydroperoxide degradation products. Human breast tumor (ZR-75-1) cells and non-tumorigenic human skin fibroblasts (CCD-41SK) were exposed to EFAs as described in Table I. Cell viability and hydroperoxide degradation products were determined 6 days after supplementation. Superoxide radicals were determined by nitroblue tetrazolium reduction 3 days after supplementation. Hydroperoxide degradation products were estimated by the amounts of thiobarbituric acid reactive material expressed as malonaldehyde-equivalent (fmole/cell).

Nízké dávky DHA, ale ne EPA, suprimují bazální a EGF-stimulovanou mitogenezi mesangiálních buněk

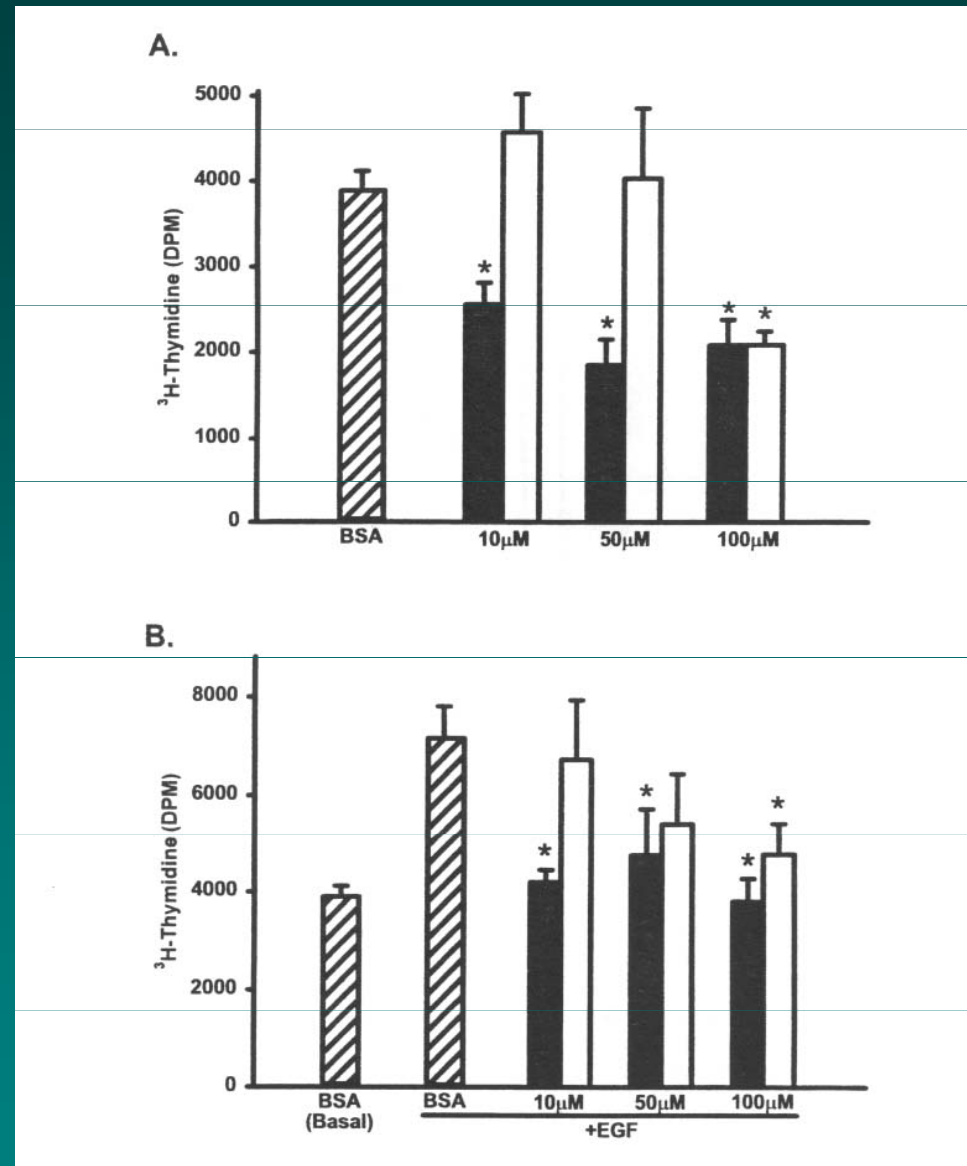
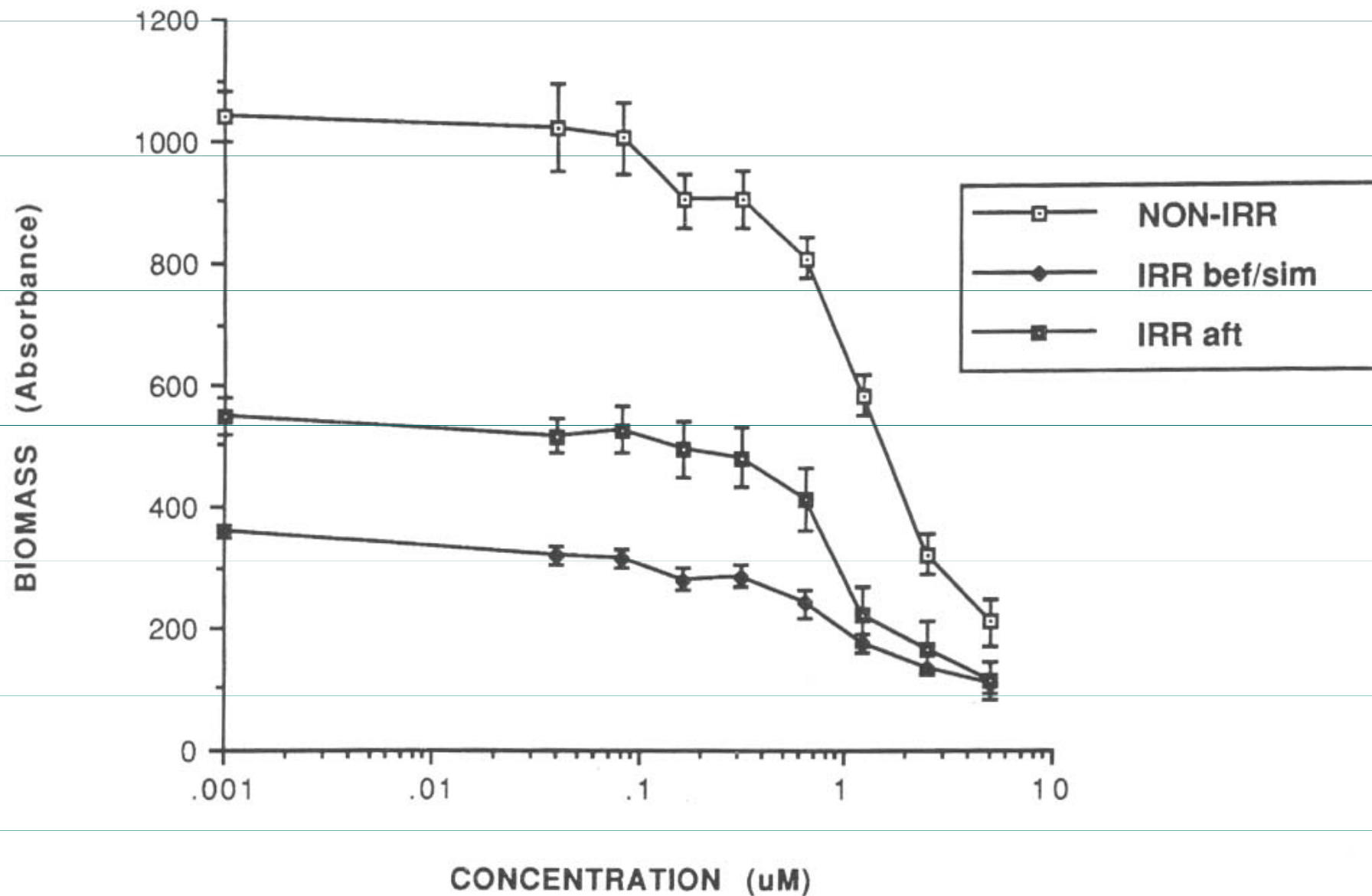


Fig 1. Low dose of DHA, but not EPA, suppresses basal and EGF-stimulated mitogenesis of MC. MC were treated with 10, 50, or 100 μ mol/L BSA (hatched bars), DHA (black bars), or EPA (white bars) for 24 hours in the absence (A) or presence (B) of EGF (20 ng/mL) before assessment of [3 H]-thymidine uptake. Data expressed as mean \pm SEM ($n = 3$ experiments, each performed in duplicate). *Significantly different from BSA-treated control (A) or EGF-stimulated BSA control (B) ($P < .05$).

EFFECT OF DOCOSAHEXAENOIC ACID ALONE, OR
IN COMBINATION WITH IRRADIATION, ON THE
GROWTH OF Mia Pa Ca-2 CELLS



Apoptóza buněk tlustého střeva HT-29 ovlivněných rybím olejem, olivovým olejem, linoleovou a olejovou kyselinou

