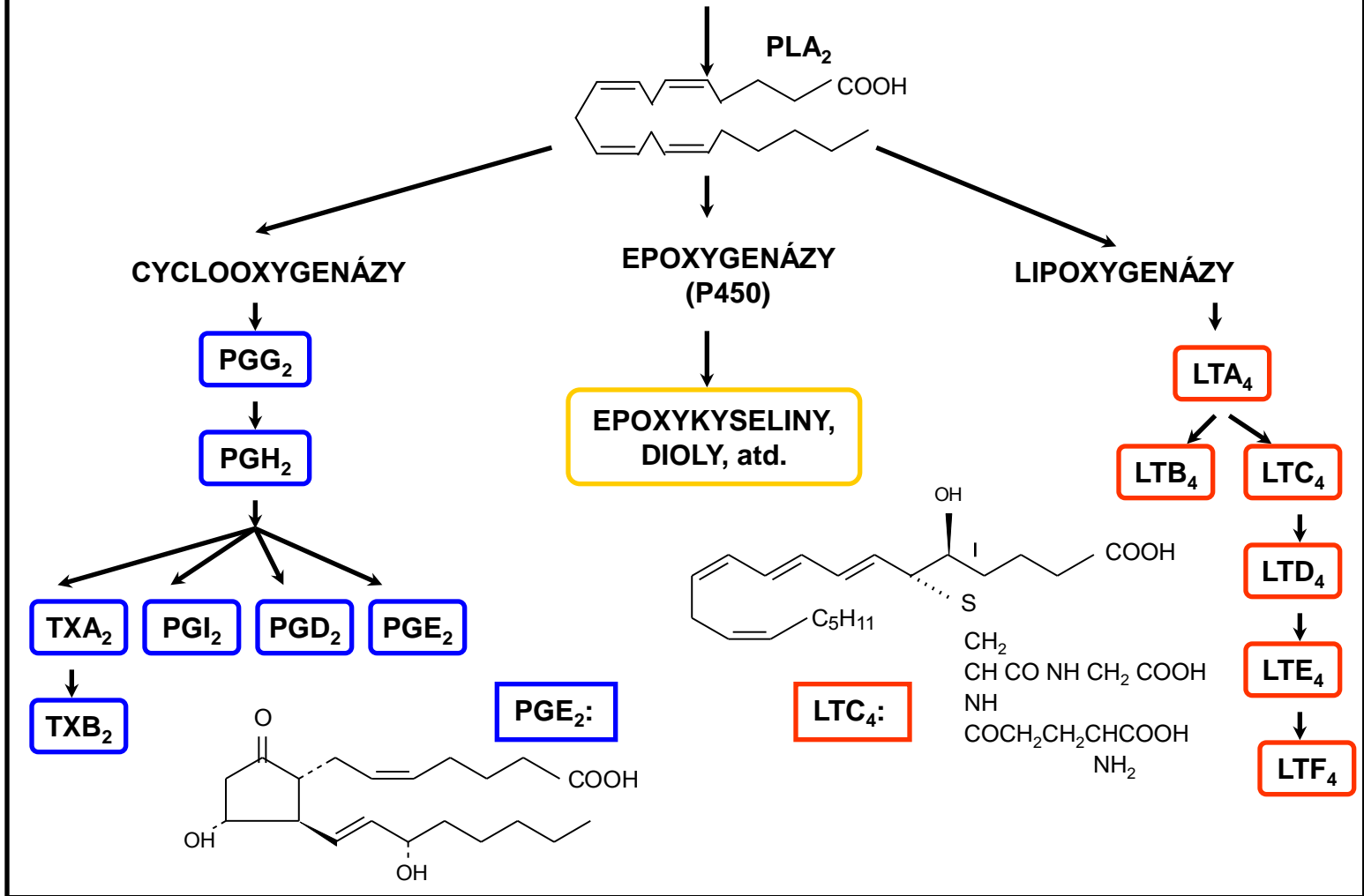


Fyziologie buněčných systémů (praktické aplikace)

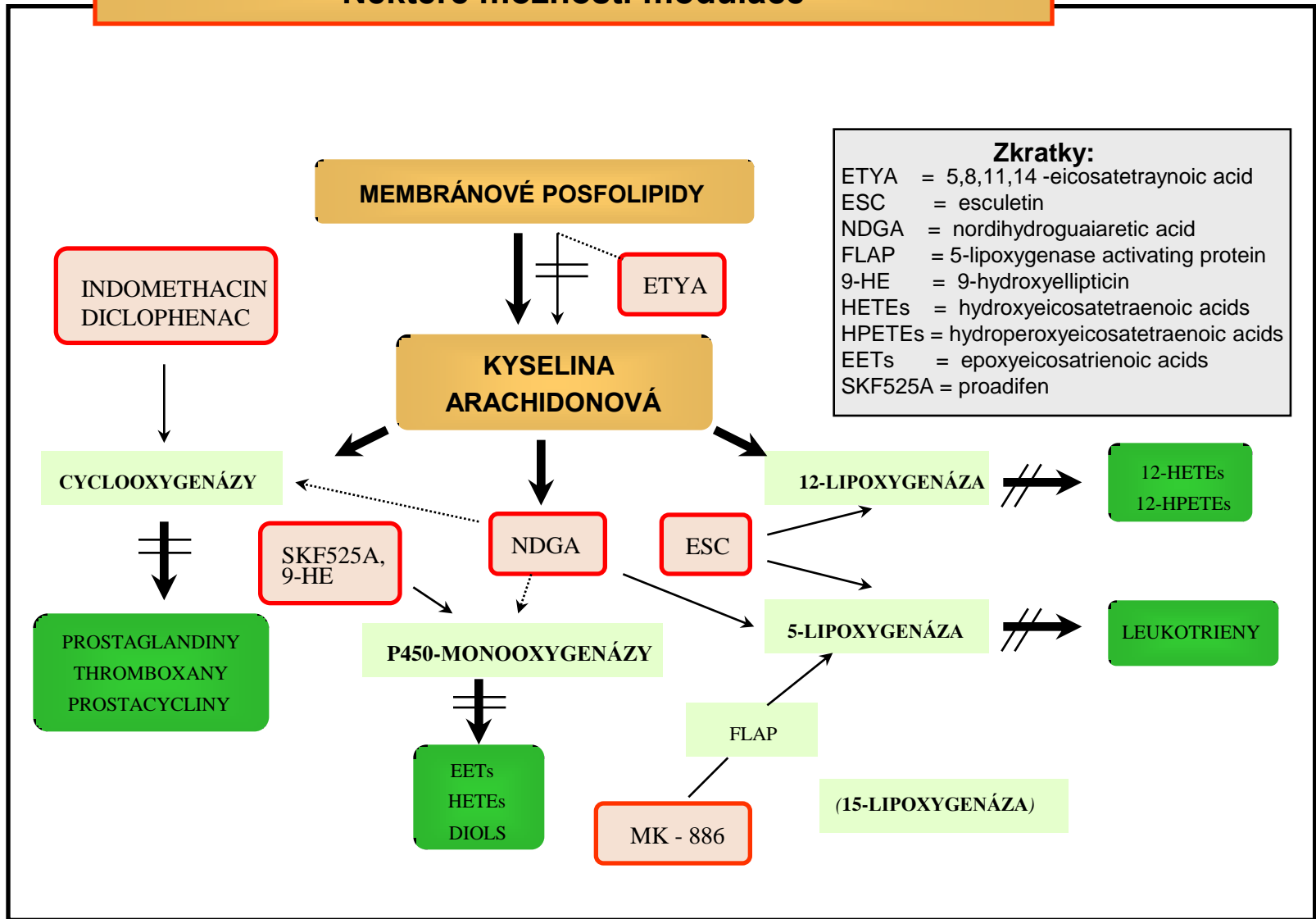
A. Kozubík

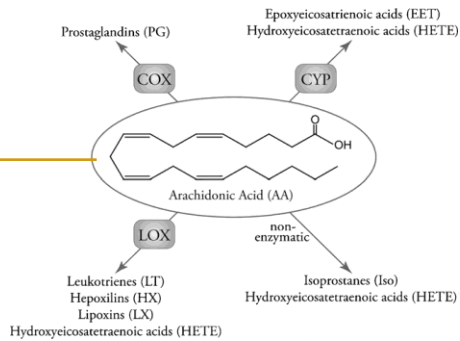
**Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i., (*Oddělení cytokinetiky*)
Ústav experimentální biologie, PŘF MU
(*Oddělení fyziologie a imunologie živočichů*)
Brno**

MEMBRÁNOVÉ POSFOLIPIDY



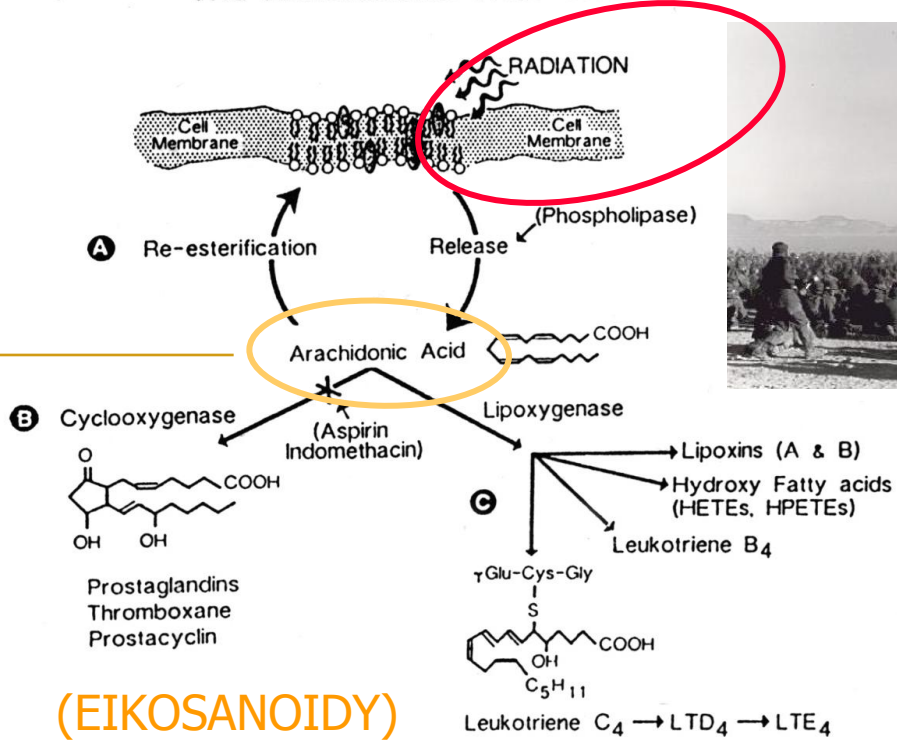
Metabolická přeměna kyseliny arachidonové: Některé možnosti modulace





BIOLOGICAL MEDIATORS

THE ARACHIDONIC ACID CASCADE



(EIKOSANOIDY)

Fosfolipidový metabolismus a působení ionizujícího záření (škodlivých faktorů životního prostředí)



Zánět, karcinogeneze

Dobový kontext

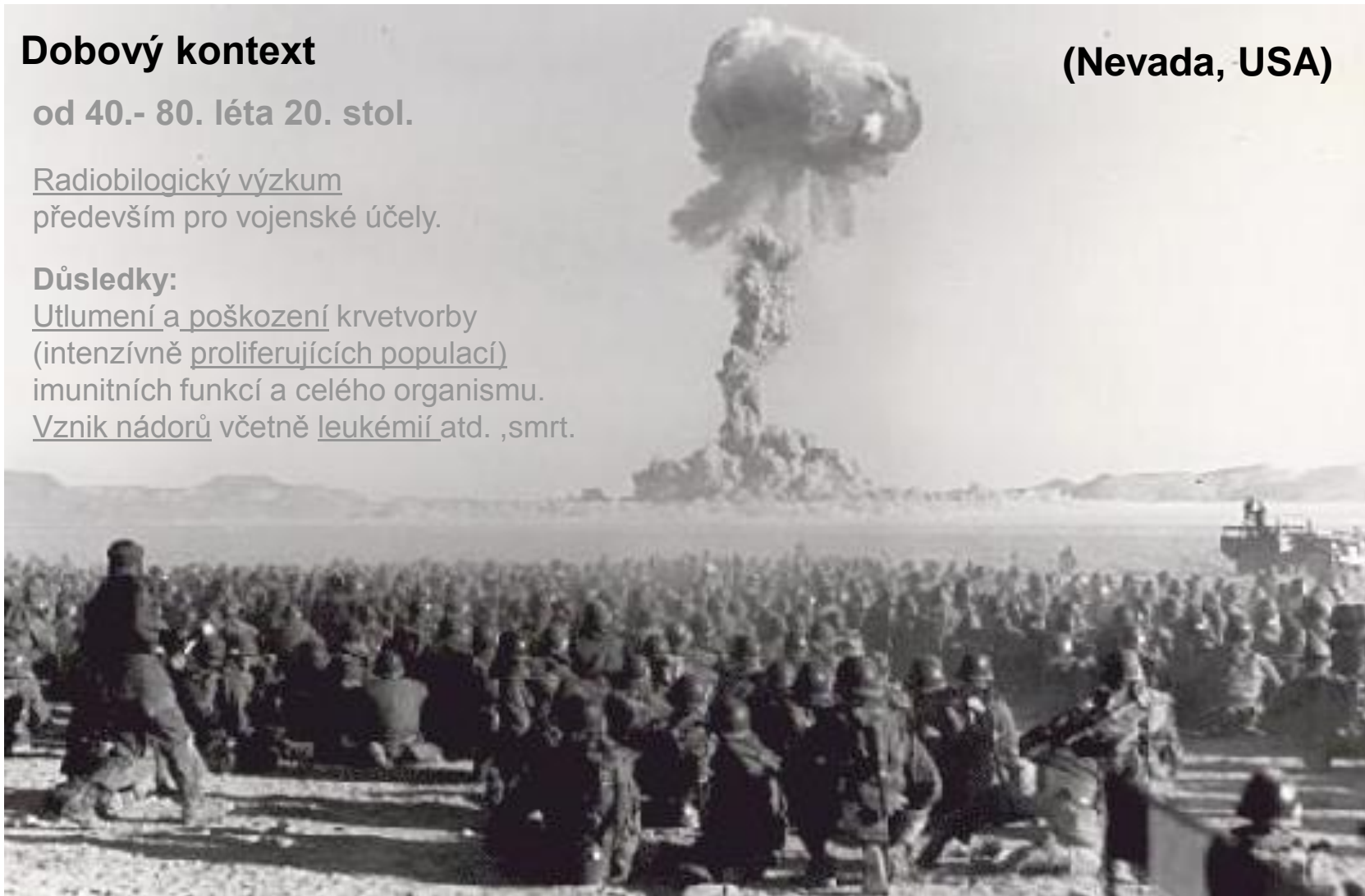
od 40.- 80. léta 20. stol.

Radiobiologický výzkum
především pro vojenské účely.

Důsledky:

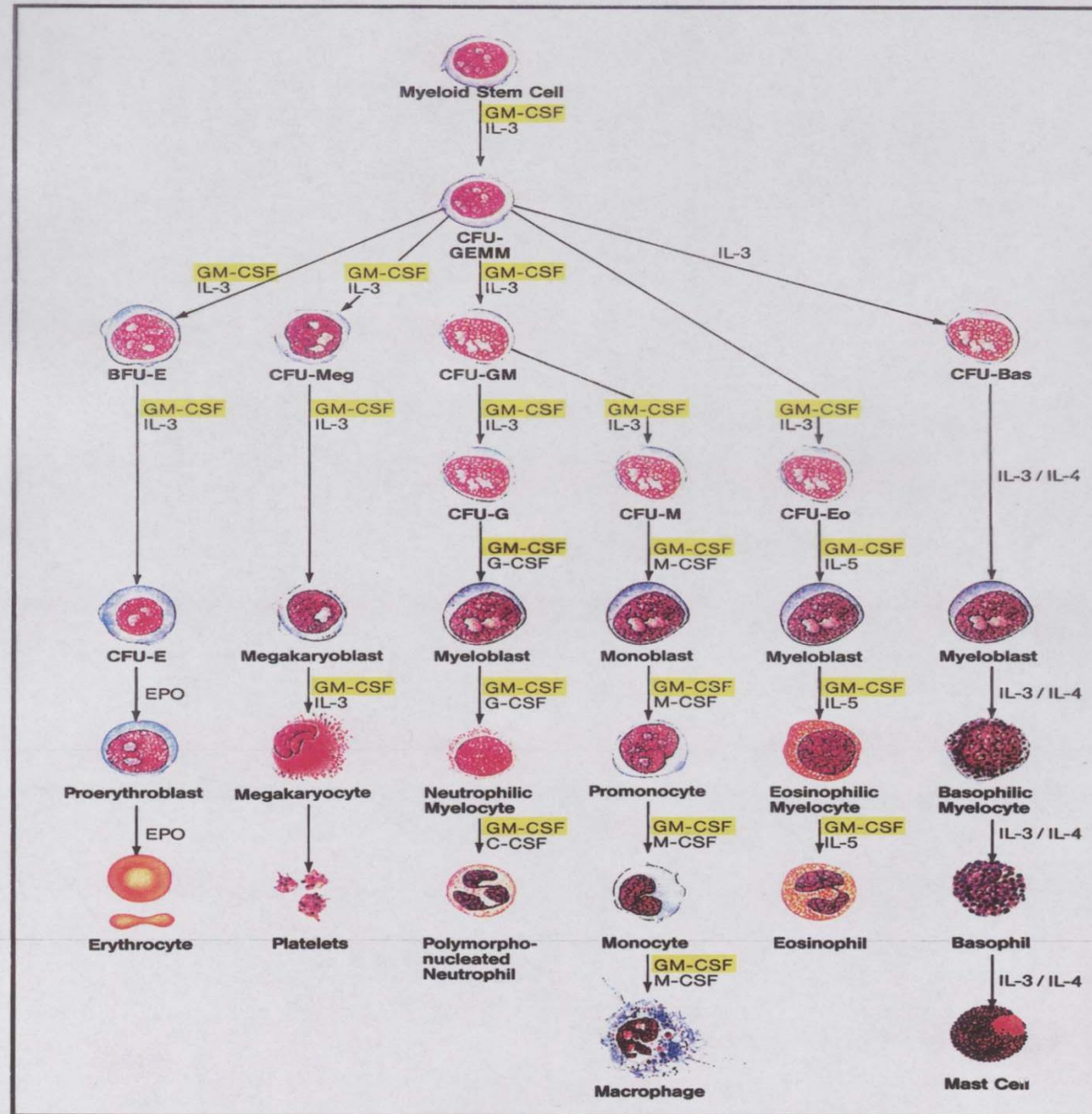
- Utlumení a poškození krvetvorby
(intenzívně proliferujících populací)
imunitních funkcí a celého organismu.
- Vznik nádorů včetně leukémií atd. ,smrt.

(Nevada, USA)



- Jestliže dojde k celotělovému vystavení ionizujícímu záření, dochází k rozvoji tzv. **RADIČNÍHO SYNDROMU** provázeného devastujícími účinky na organismus

The early acting growth factor which maximises host defense



Formy nemoci z ozáření (myš)

→ Průběh nemoci závisí zejména na

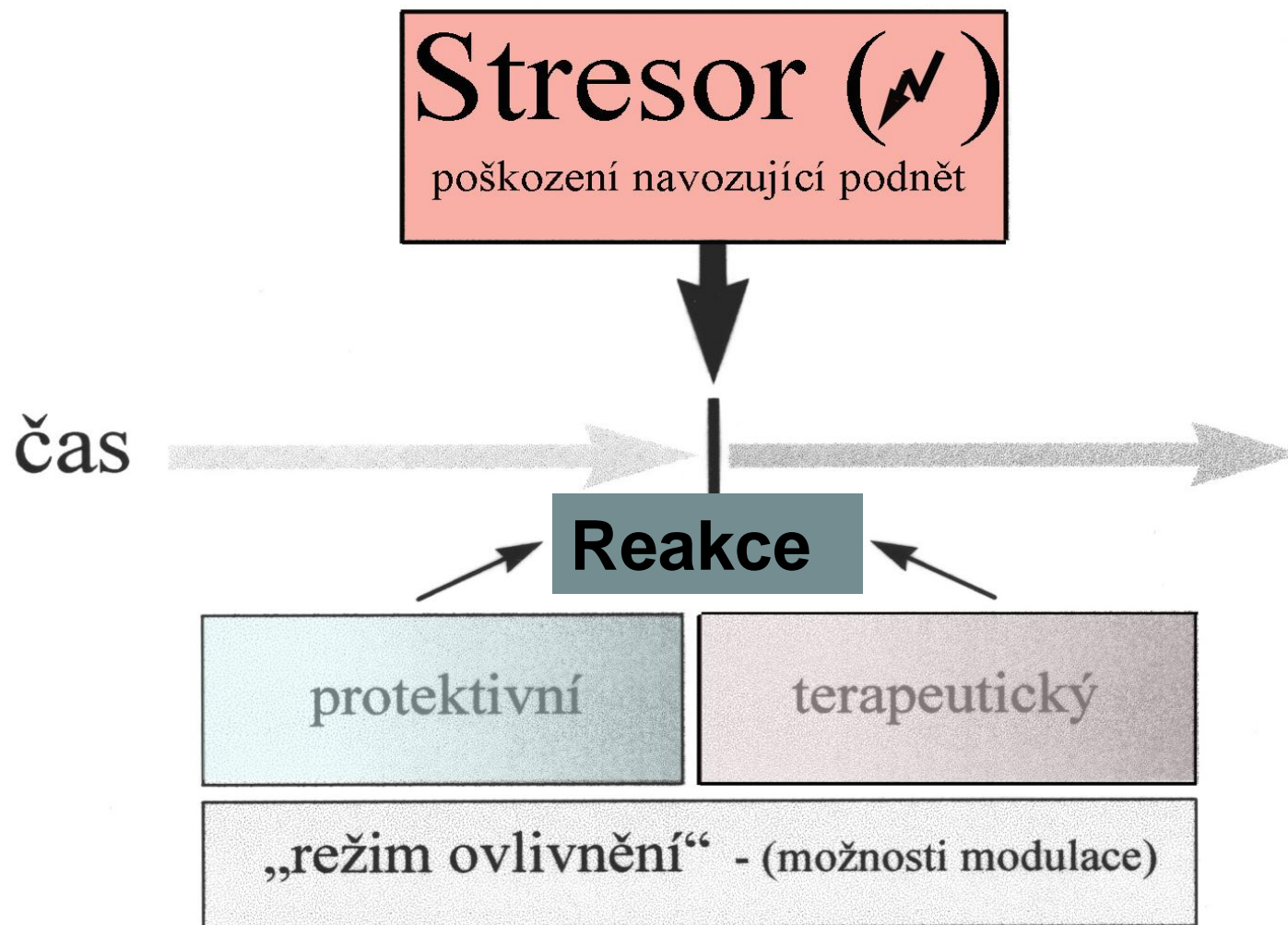
- 1) dávce ozáření
- 2) na druhu a celkové „kondici“ organismu.

Forma nemoci z ozáření	Dávka	Hlavní oblasti postižení
Dřeňová (má smysl ¹)	0.1- 6 Gy	Kmenové buňky K.D.
Střevní	5 – 10 Gy	Epitely, zejména střeva
Centrálně nervová	100 Gy	viz výše včetně C.N.S.

- 1) (do 10ti Gy) zvládnutí této formy rozhoduje o přežití organismu

Pozitiva:

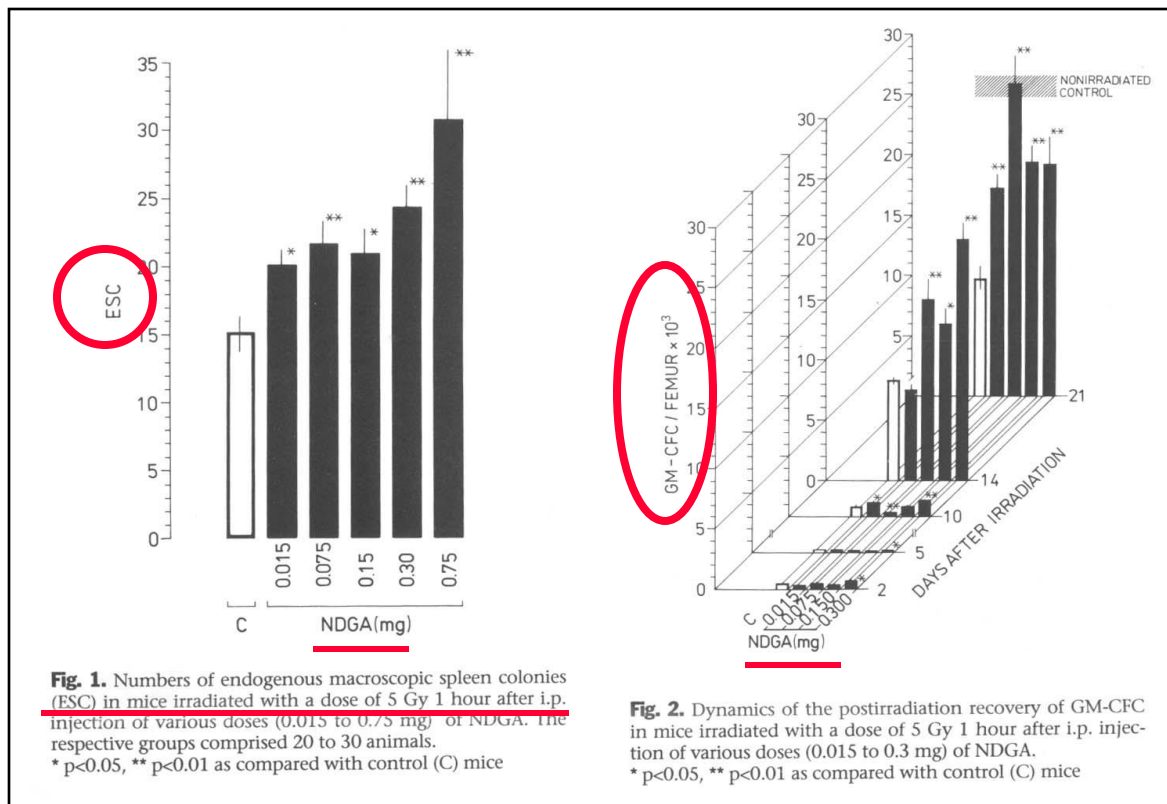
- 1) výsledky uplatnitelné v radioterapii nádorů
- 2) objev kmenové buňky krvetvorby
- 3) radiací utlumená krvetvorba - **model** pro studium reg. schopností savčího org.





The effect of nordihydroguaiaretic acid, an inhibitor of prostaglandin and leukotriene biosynthesis, on hematopoiesis of gamma-irradiated mice

Alois Kozubík, Jiřina Hofmanová, Jiřina Holá, Jaromíra Netíková



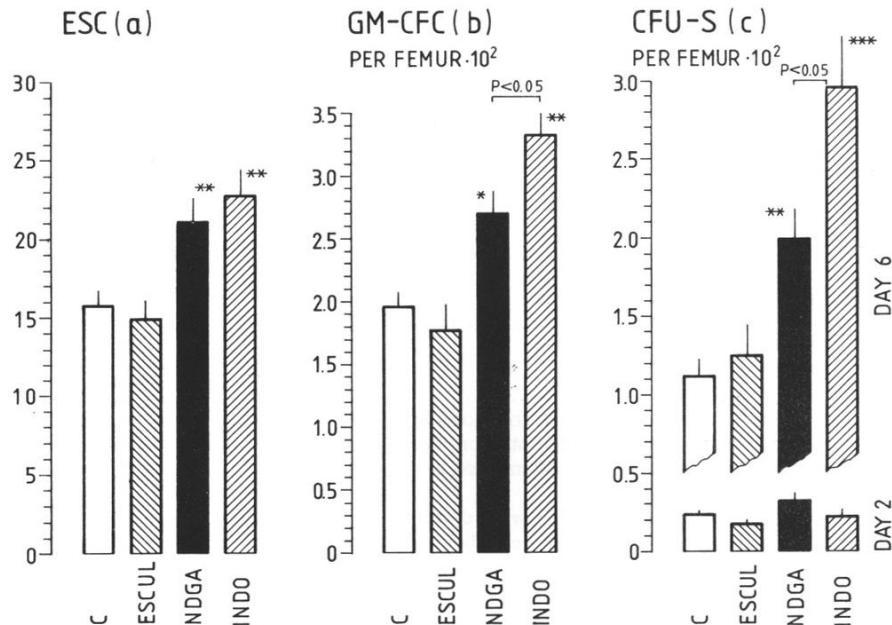
Efekty aplikace NDGA
„v protektivním režimu“

a její dávkově závislé
účinky na regeneraci ESC
a GM-CFC (v čase).

Indices	Non-irrad. control	Exp. group	Days after irradiation			
			5	10	14	21
<u>Granulocytes</u>	595.8±52.9	C	406.4±51.8	971.5±130.8	601.1±82.2	1300.4±131.2
		NDGA	717.7*±64.0 ↑	1597.8±176.0* ↑	575.7±37.5	1486.4±187.9
<u>Lymphocytes</u>	3184.2±239.4	C	787.5±81.8	830.8±140.0	1575.2±141.6	1831.6±244.9
		NDGA	935.9±83.5	1025.9±113.0	1617.6±105.5	2121.3±268.1
<u>Nucleated cells per femur × 10⁷</u>	3.0141±0.1476	C	0.8240±0.0942	1.5486±0.0657	1.8255±0.0778	2.4760±0.0721
		NDGA	0.7577±0.0417	1.6477±0.440	2.2960±0.1500* ↑	3.4919±0.2023** ↑

Numbers of granulocytes and lymphocytes, and bone marrow cellularity measured at selected postirradiational intervals in control (C) and experimental mice treated with NDGA at a dose of 0.3 mg per mouse 1 hour before 5 Gy gamma-irradiation. At least 10 animals per group were used. *p<0.05; **p<0.01 as compared with control (C) mice

Fig. 3. Endogenous spleen colony numbers (ESC) detected on day 10 (A), GM-CFC numbers in femoral marrow on day 2 (B) and exogenous spleen colony numbers (CFU-S) in femoral marrow on days 2 and 6 (C) after 5 Gy of gamma-irradiation and experimental treatment (0.3 mg of NDGA, 0.25 mg INDO or 0.51 mg ESCUL, i.e., isomolar doses administered 1 hour before irradiation). Ten mice per group were used for ESC and CFU-S determination; each value for GM-CFC represents the average of 3 independent experiments. * p<0.05; ** p<0.01 *** p<0.001 as compared with control (C) mice



Periferní krev

Efekty dalších inhibitorů

Kostní dřeň

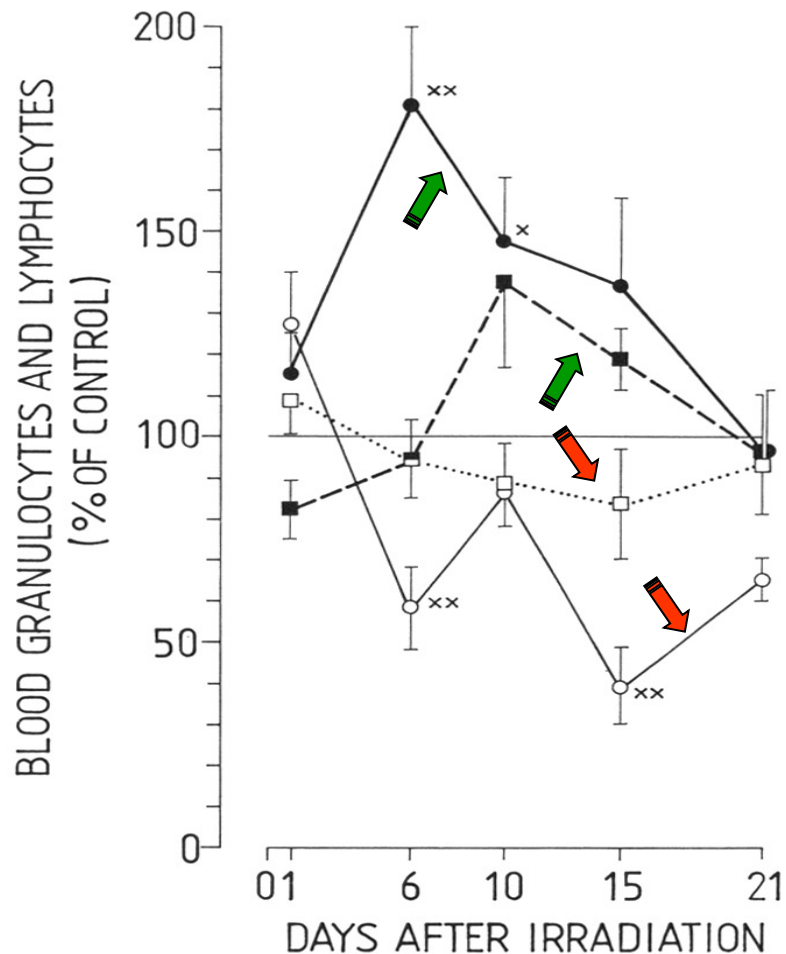


Figure 3. Percentage changes (related to 100% of irradiated control) of peripheral blood granulocytes (●, ○) and lymphocytes (■, □) in selected intervals after 5-Gy irradiation of mice. One hour before irradiation, mice were injected i.p. with indomethacin (0.3 mg/mouse, closed symbols) or esculetin (0.15 mg/mouse, open symbols). Control mice were injected with the vehicle. Ten mice from two independent experiments per point were used (mean ± SEM). Statistical significance: x, $p < 0.05$; and xx, $p < 0.01$ as compared with control.

Inhibitory
 cyklooxygenáz (INDO) stimulují (+)
 a lipoxygenáz (ESUL) inhibují (-)

granulopoézu ○ ●
 i
 lymfopoézu □ ■

INT. J. RADIAT. BIOL., 1994, VOL. 65, NO. 3, 369-377

Effects of drugs inhibiting prostaglandin or leukotriene biosynthesis on postirradiation haematopoiesis in mouse

A. KOZUBÍK*, J. HOFMANOVÁ, M. POSPÍŠIL, J. NETÍKOVÁ, J. HOLÁ and A. LOJEK

(Received 21 May 1993; revised 31 August 1993; accepted 15 October 1993)

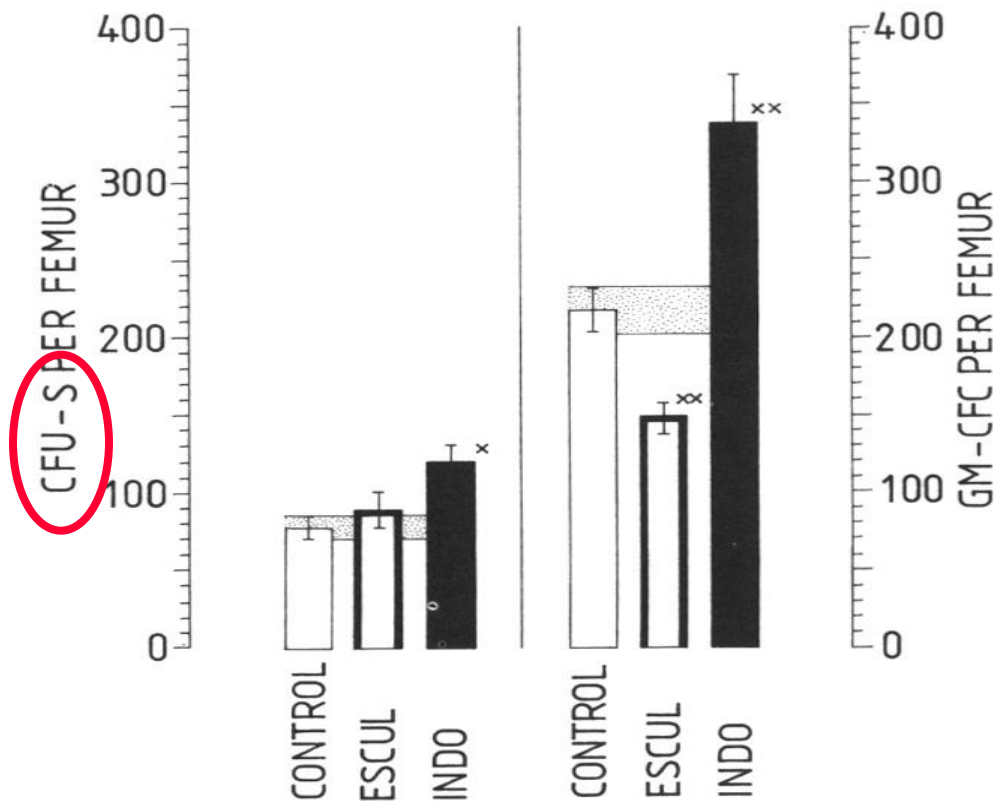


Figure 2. Mean \pm SEM numbers of CFU-S and GM-CFC in the femoral bone marrow of the 8.5 Gy-irradiated and bone marrow-transplanted mouse determined on day 6 after transplantation. On days 3, 4 and 5 after transplantation mice were injected with indomethacin (INDO, 0.025 mg/mouse and dose) or esculetin (ESCUL, 0.0125 mg/mouse and dose), in two daily doses (a total of six injections were administered). Control mice (open columns and dotted areas) were treated in the same way with the vehicle. Two independent experiments were performed and the data were pooled. Twelve mice per group were used. Statistical significance: x, $p < 0.05$; and xx, $p < 0.01$ as compared with controls.

Příklad aplikace inhibitorů metabolismu AA v „terapeutickém režimu“

NSAIDs lze tedy použít jak k prevenci, tak při úpravě poškození

INT. J. RADIAT. BIOL., 1994, VOL. 65, NO. 3, 369-377

Effects of drugs inhibiting prostaglandin or leukotriene biosynthesis on postirradiation haematopoiesis in mouse

A. KOZUBÍK*, J. HOFMANOVÁ, M. POSPÍŠIL, J. NETÍKOVÁ, J. HOLÁ and A. LOJEK

(Received 21 May 1993; revised 31 August 1993; accepted 15 October 1993)

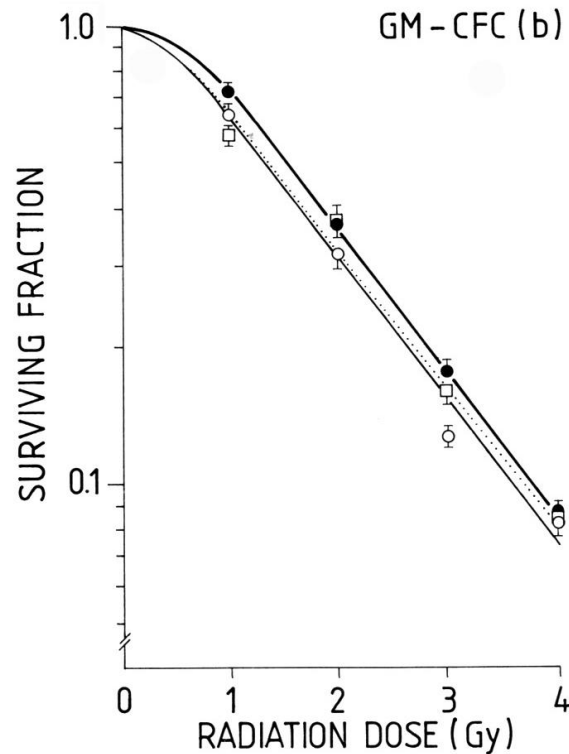
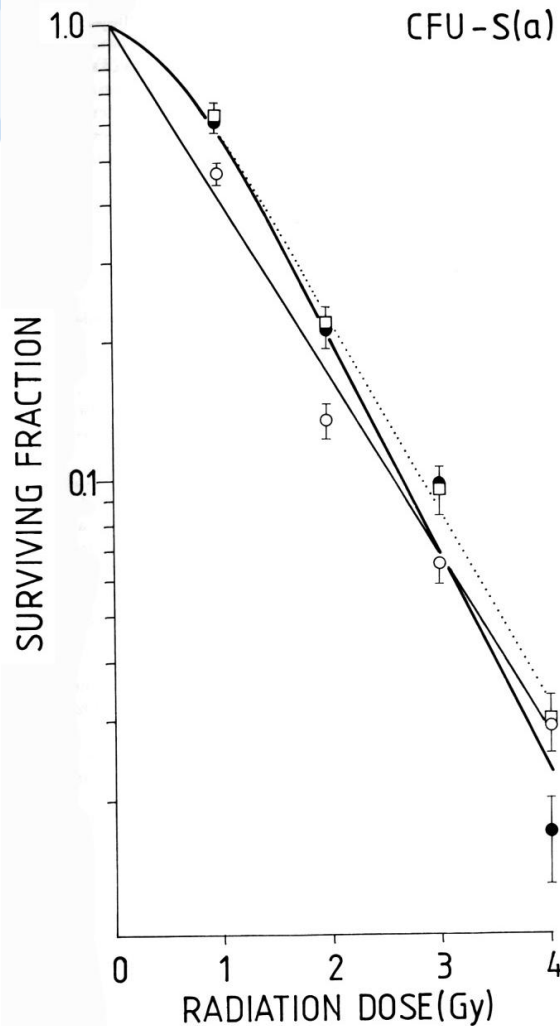


Figure 4. Radiation survival curves of femoral marrow CFU-S (a) or GM-CFC (b) populations. Control mice were injected i.p. with the vehicle (\square , dotted lines). Experimental animals were treated with indomethacin (0.3 mg/mouse; \bullet —thick lines) or esculetin (0.15 mg/mouse; \circ —thin lines) 1 h before irradiation with the indicated doses. Bone marrow for transplantation (CFU-S) or determination of GM-CFC was taken 1 h after irradiation. Results represent pooled data from two independent experiments (mean \pm SEM). Eight to twelve mice per point were used.

Effects of drugs inhibiting prostaglandin or leukotriene biosynthesis on postirradiation haematopoiesis in mouse

A. KOZUBÍK*, J. HOFMANOVÁ, M. POSPÍŠIL, J. NETÍKOVÁ, J. HOLÁ and A. LOJEK

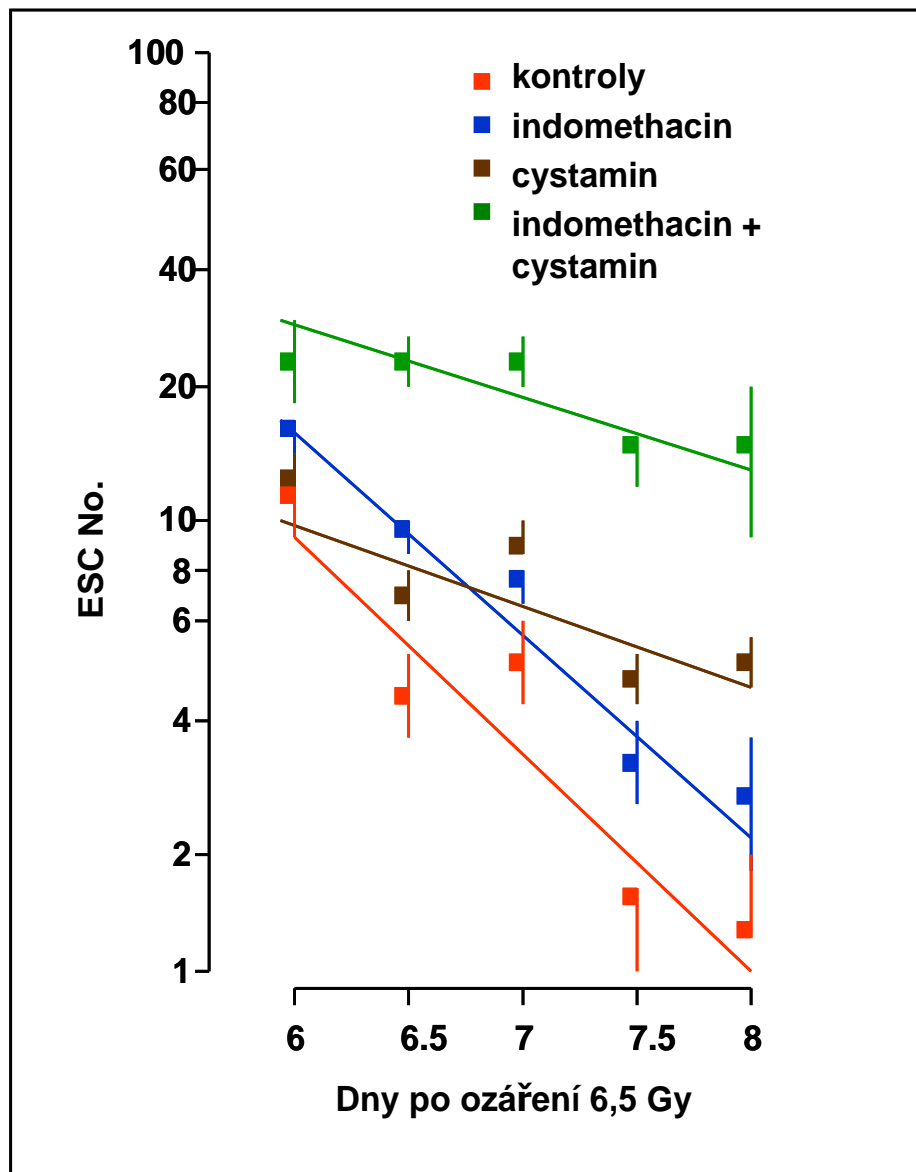
(Received 21 May 1993; revised 31 August 1993; accepted 15 October 1993)

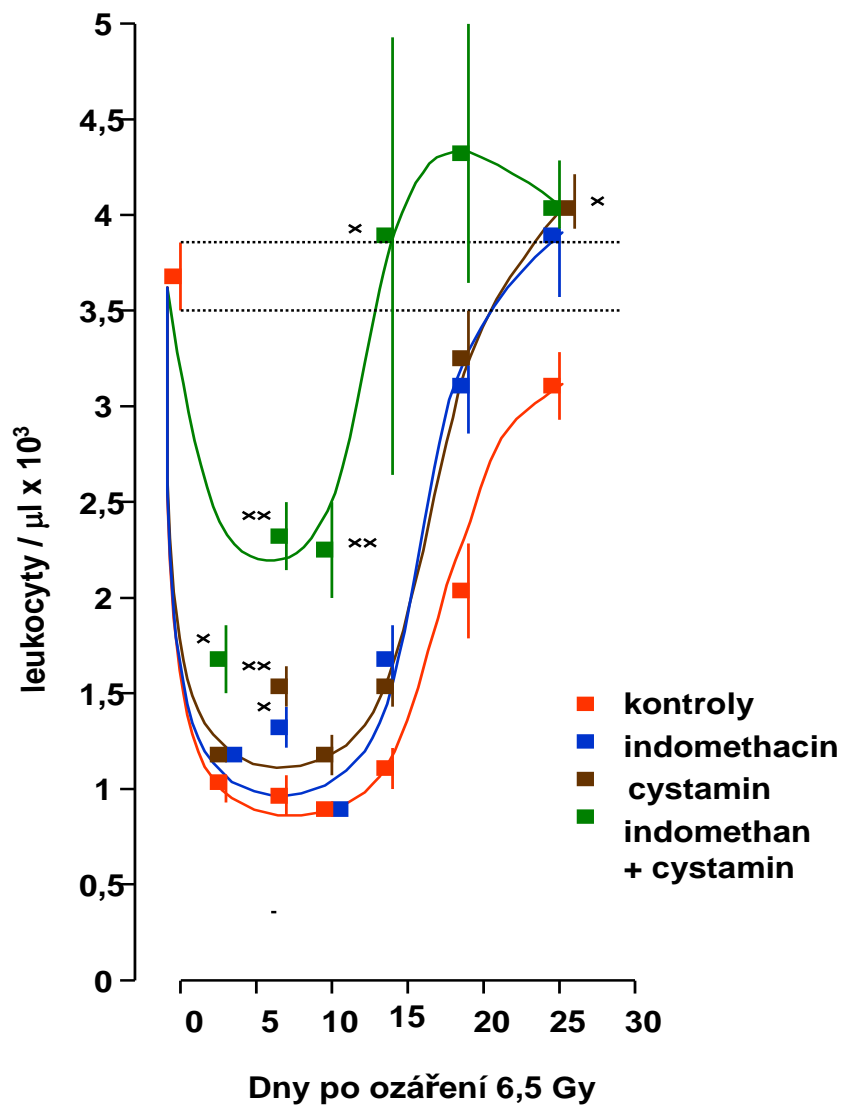
Dílčí shrnutí: MOŽNÉ MECHANISMY

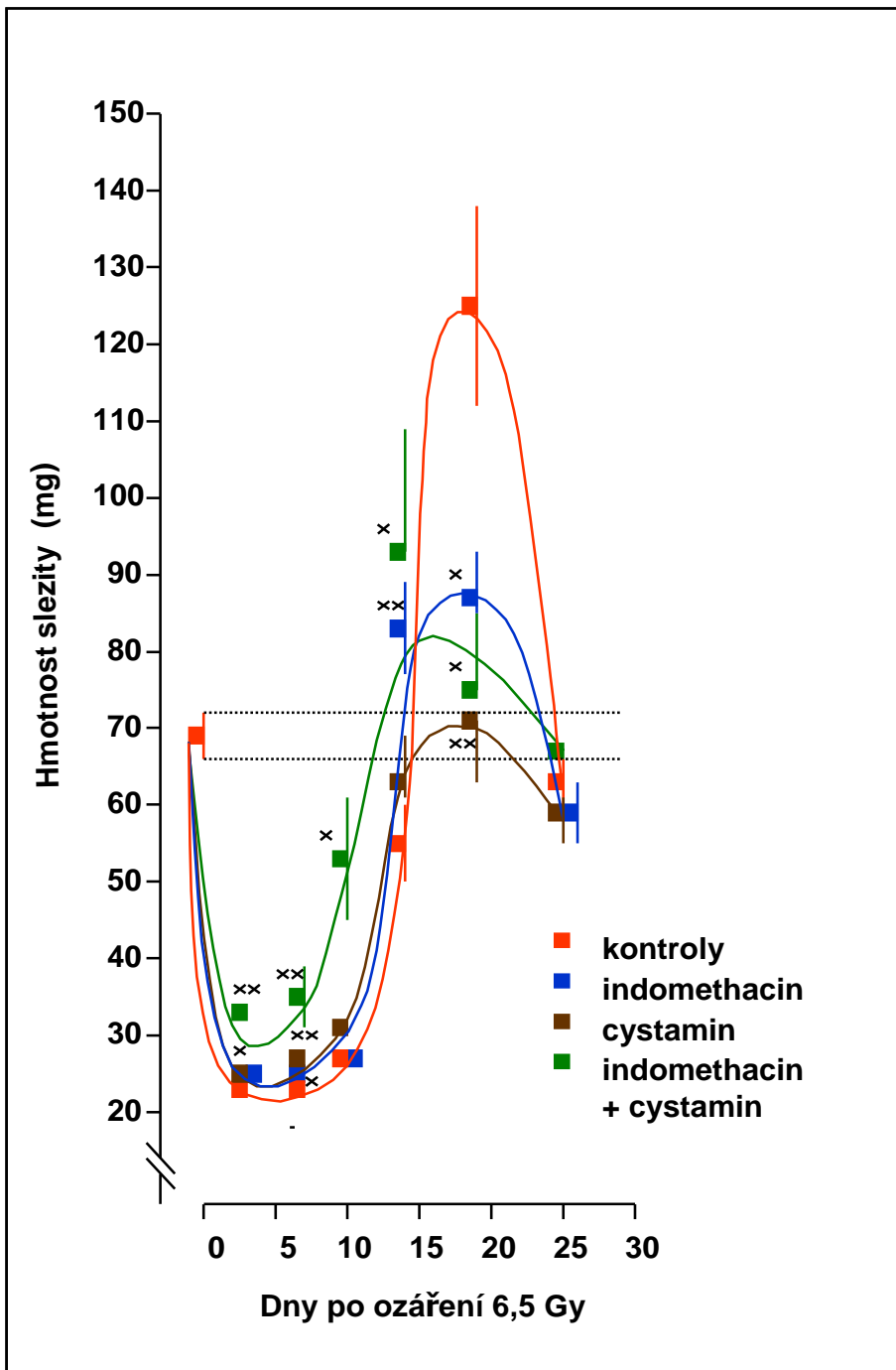
(Indomethacin, Esculetin)

Radiorezistence
kmenových a
prekurzorových
buněk není
ovlivněna !!!

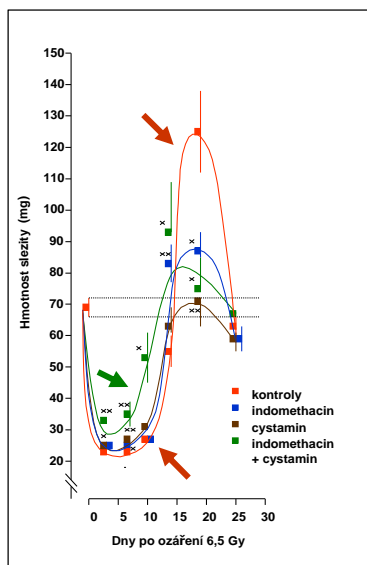
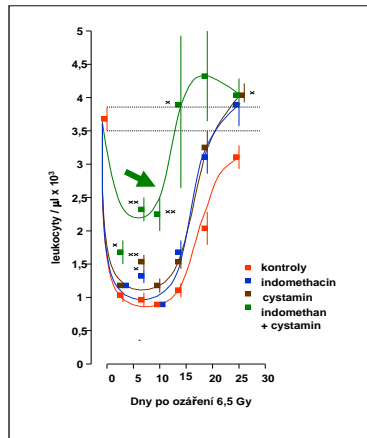
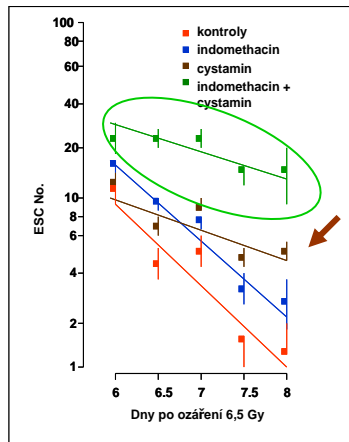
Efekty inhibitorů mohou být tedy způsobeny zásahy do biosyntézy eikosanoidů a jejich
regulačními účinky na krvevorbu







Dosažení dynamické rovnováhy v systému po podnětech rozdílné intenzity



Vlastní výsledky

Posílení inhibitorů COX

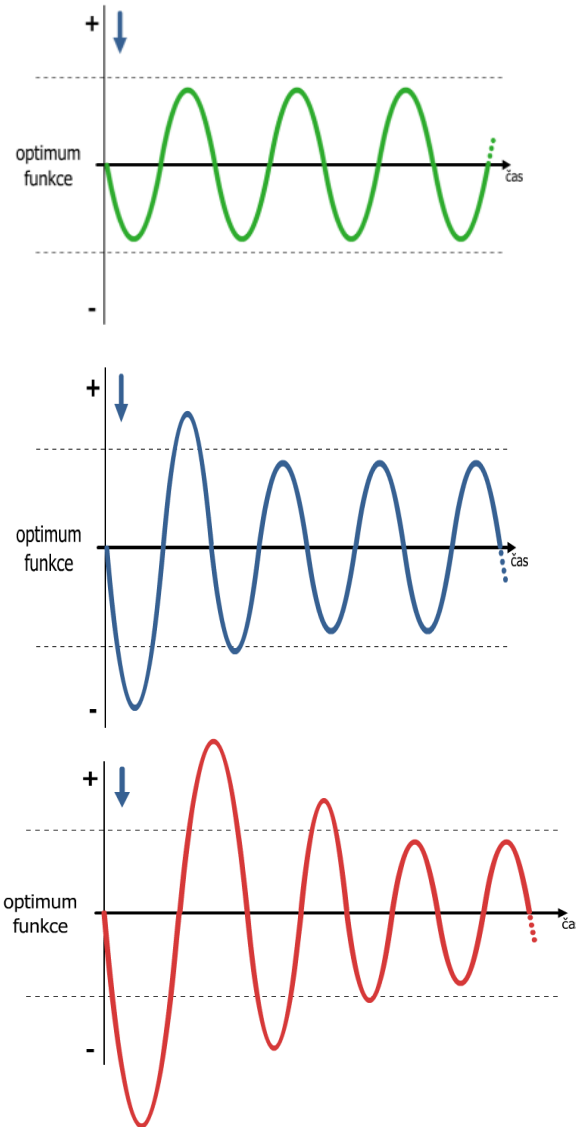
- Kontrola
- Cystamin
- Indomethacin

■ Cystamin + Indomethacin

Kombinovaná léčba

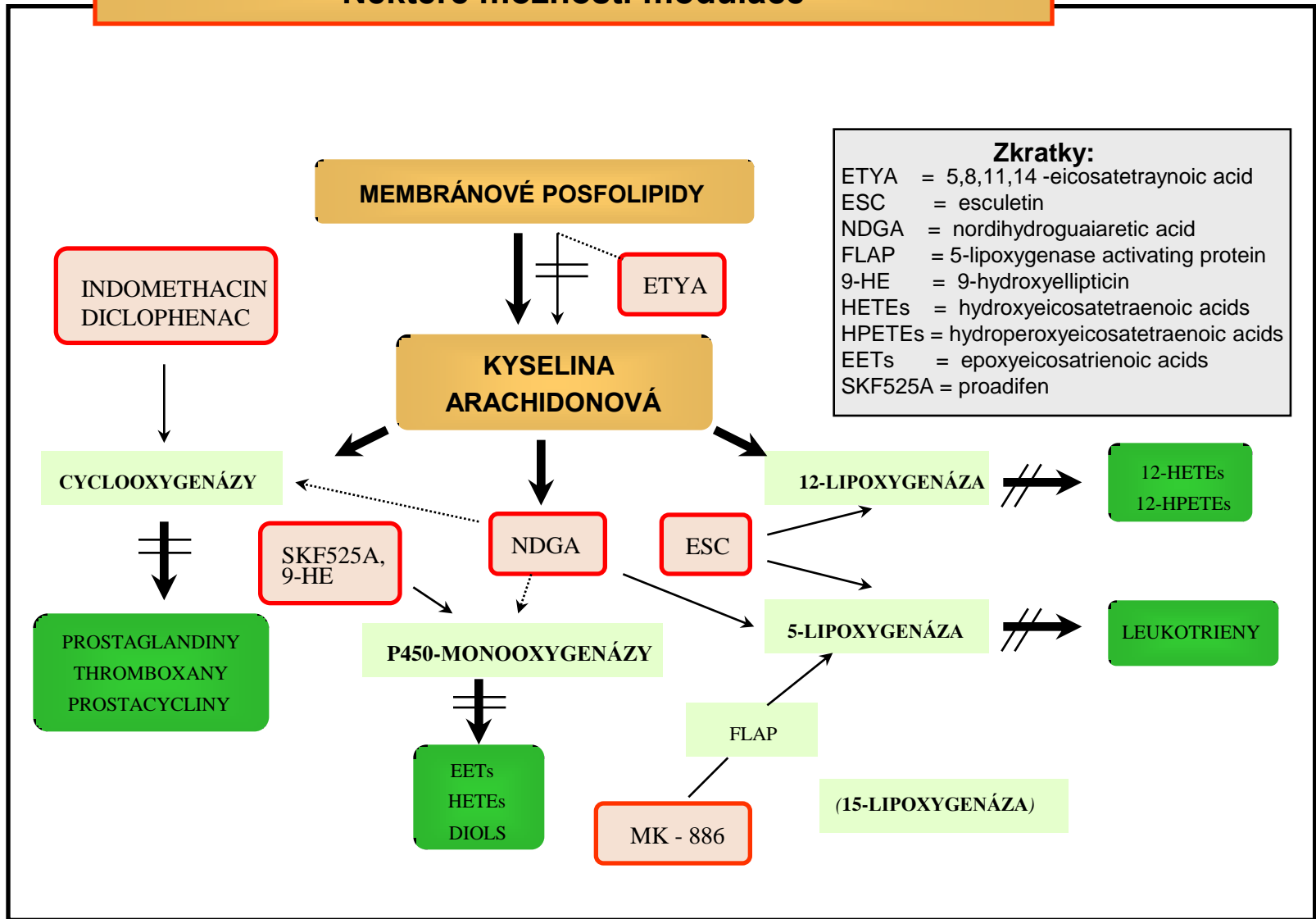
Zátěž
nižší
intenzity

→
Silně
poškozený
systém

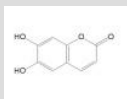


Viz „negativní zpětná vazba“

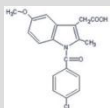
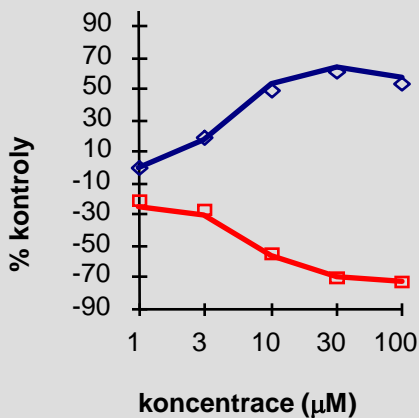
Metabolická přeměna kyseliny arachidonové: Některé možnosti modulace



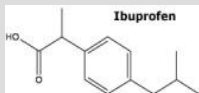
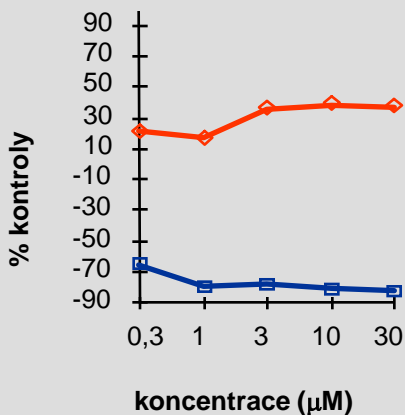
CELKOVÉ PRODUKTY LIPOXYGENÁZ A CYKLOOXYGENÁZ



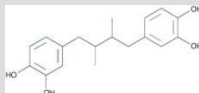
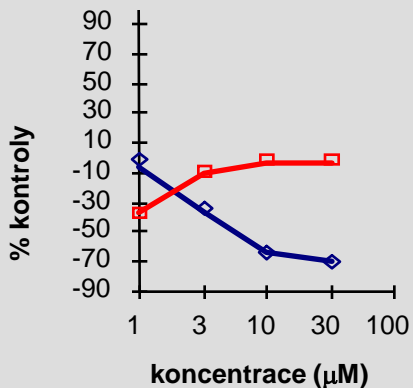
Esculetin



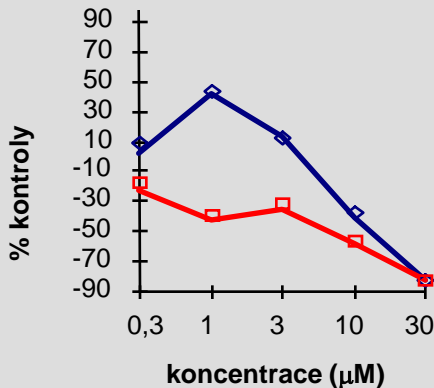
Indomethacin



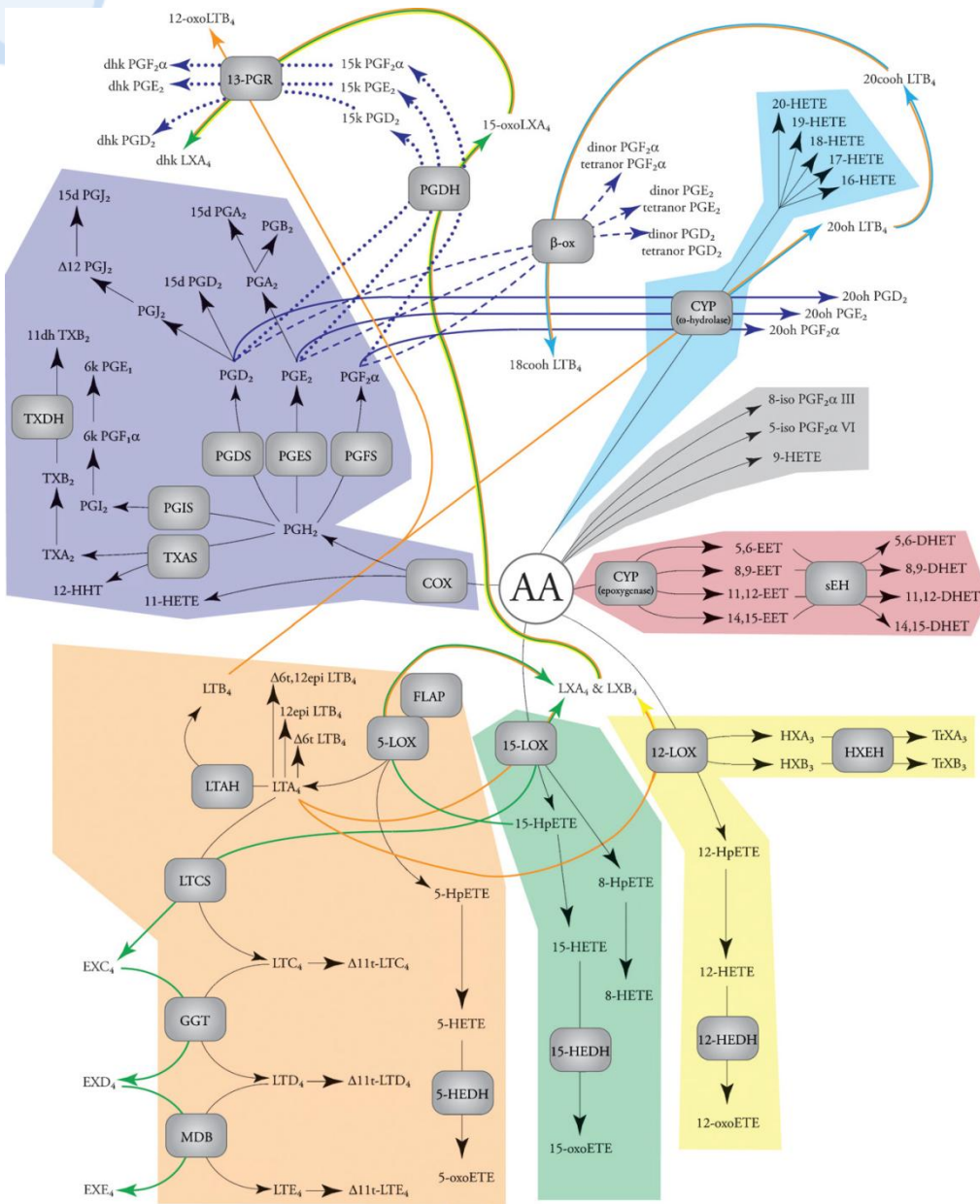
Ibuprofen



NDGA



Koncentračně závislé
efekty inhibitorů AA
na celkovou tvorbu
jejích hlavních
metabolitů
v buňkách kostní dřeně
myši



Hlavní dráhy biosyntézy eikosanoidů (metabolity hlavních os barevně):

- COX (purpurová)
- 5-LOX (oranžová),
- 15-LOX (zelená),
- 12-LOX (žlutá),
- CYP epoxygenase (červená),
- CYP ω-hydroxylase (světle modrá),
- and nonenzymatic oxidation (šedá)

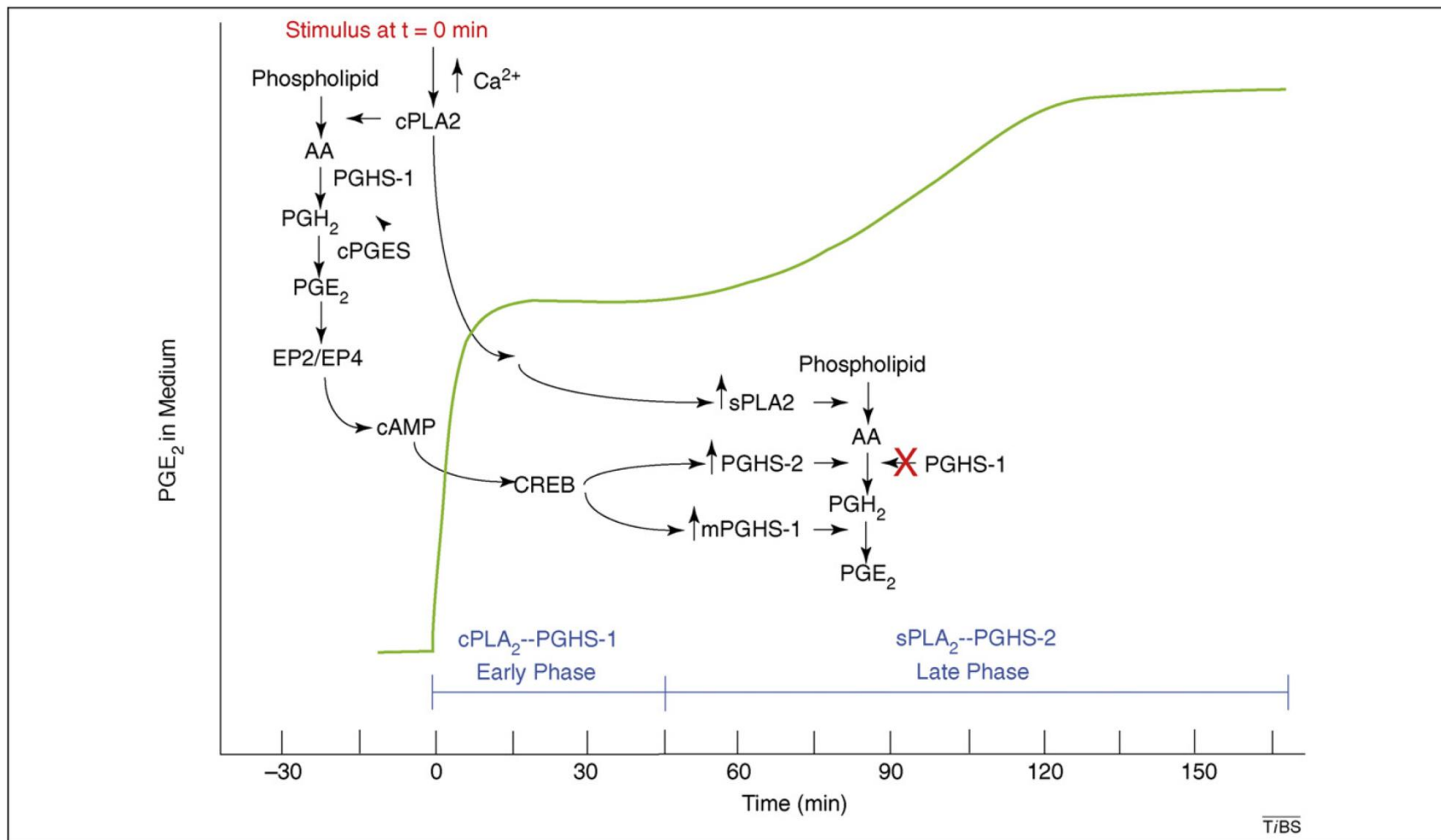
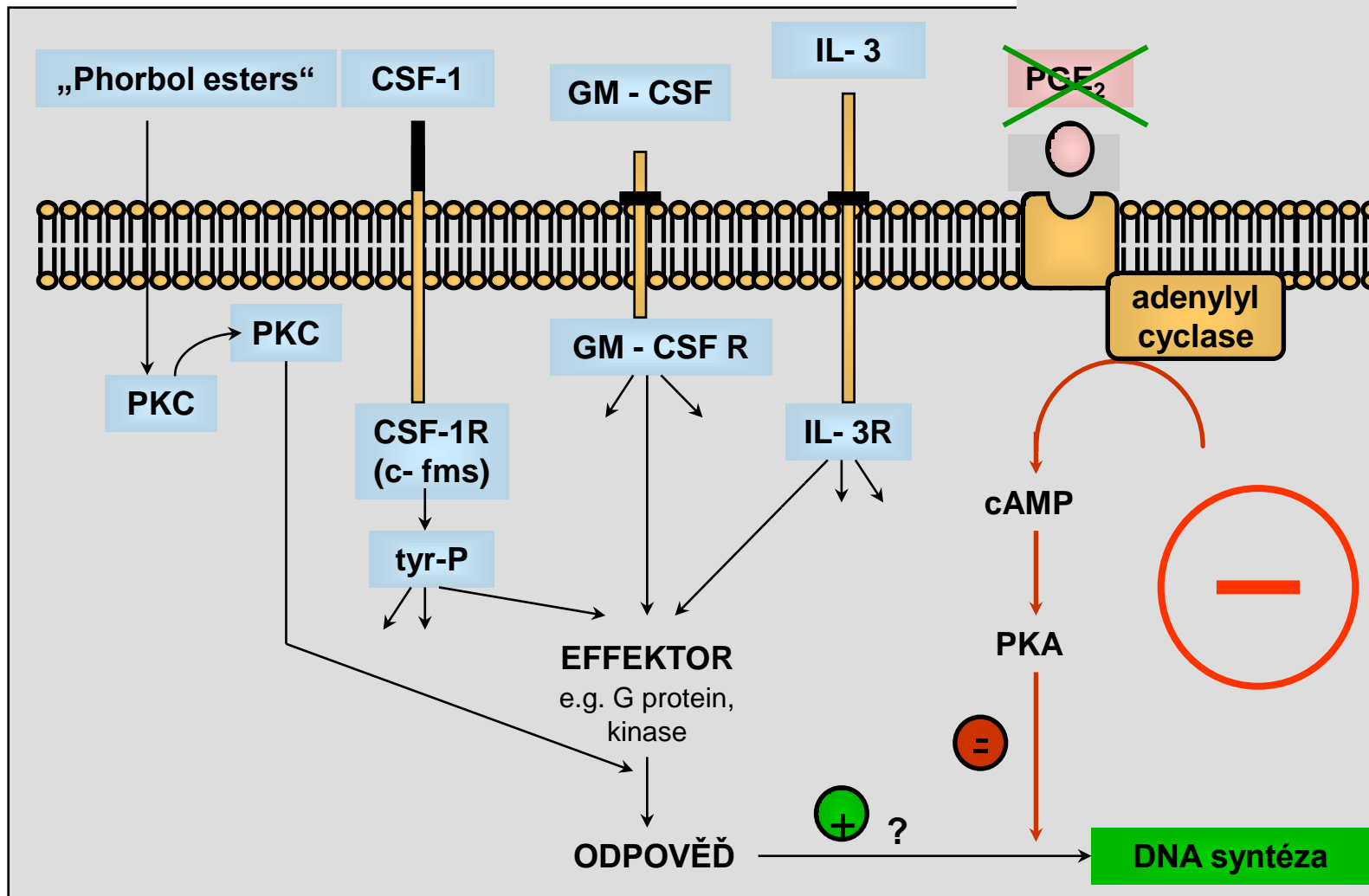


Figure 4. The early and late phases of PGE₂ biosynthesis in a model cell. Treating a resting cell, such as a serum-starved murine NIH 3T3 cell, with an appropriate stimulus leads to an early phase burst of PG synthesis involving cPLA_{2 α} and constitutively expressed PGHS-1. In certain cells and with certain agonists, a second or late phase of prostanoid synthesis, involving primarily PGHS-2 and one or more sPLA₂s, occurs. cPLA_{2 α} is involved in the increase in sPLA₂ activity in the late phase, and products formed via PGHS-1 promote the induction of PGHS-2 gene expression. Depending on the cell type and the stimulus (and thus the length of time the rate of PGHS-2 gene transcription is elevated), PGHS-2 protein levels can continue to increase for up to ~24 h or can begin to decrease after 2–3 h, at which time PGE₂ synthesis stops. PGHS-1 does not appear to function in PG synthesis in the late phase.

Negativní účinek PGE₂ na proliferaci k. buněk

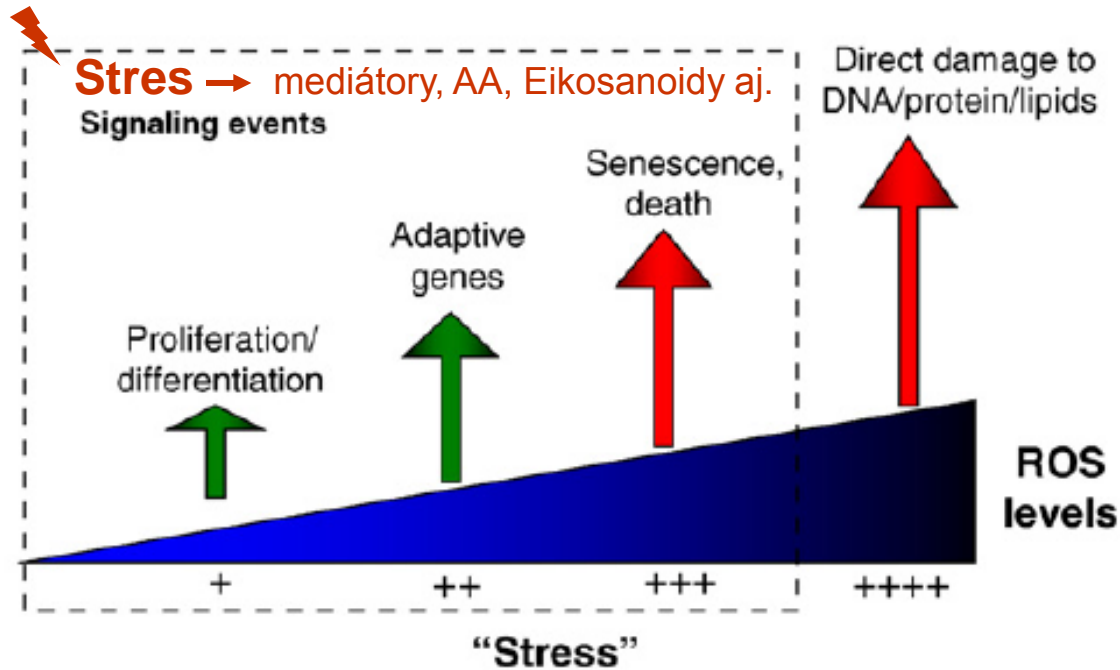
+ Indomethacin



Fáze buněčného cyklu



Model: mitochondrial ROS signaling dictates biological outcomes.



T/BS

Figure 4. Mitochondrial ROS levels are crucial for biological outcomes. Low levels of mitochondrial ROS production are required for cellular processes such as proliferation and differentiation. An induction in ROS production will lead to adaptive programs including the transcriptional upregulation of antioxidant genes. Even higher levels of ROS will signal the initiation of senescence and apoptosis. Non-signaling, irreversible damage to cellular components is only observed under the highest levels of cellular ROS.

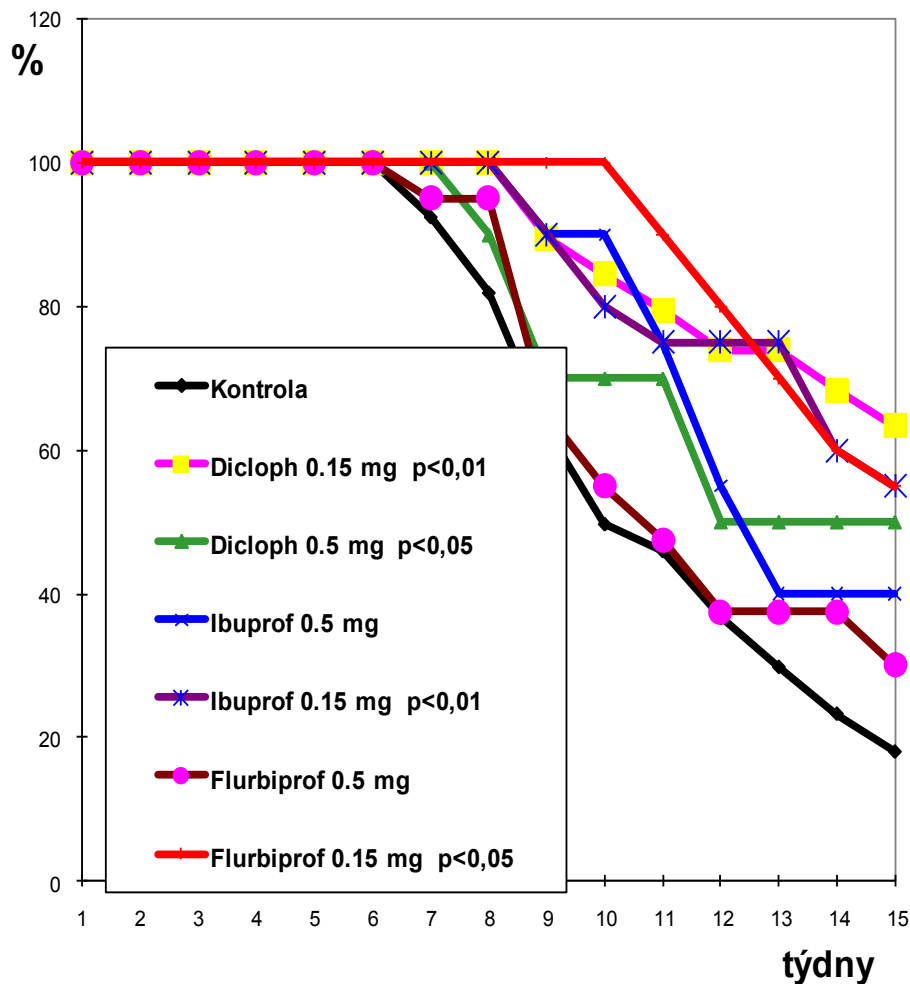
NDGA: duální inhibitor mediátorů **PGs, LTs** (po ozáření produkovaných ve velkých množstvích)

Obdobně samotná AA: Zdroj lipidových peroxidů, ROS....

Trends Biochem Sci. 2010 Apr 27. [Epub ahead of print] Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes.

[Hamanaka RB](#), [Chandel NS](#)

PŘEŽÍVÁNÍ MYŠÍ



POTENCIÁL VYUŽITÍ

inhibitorů metabolismu AA
V nádorové problematice *in vivo*

Příklad působení
NSAIDs u myši
s nádorem (G:5:113)
po terapii inhibitory COX

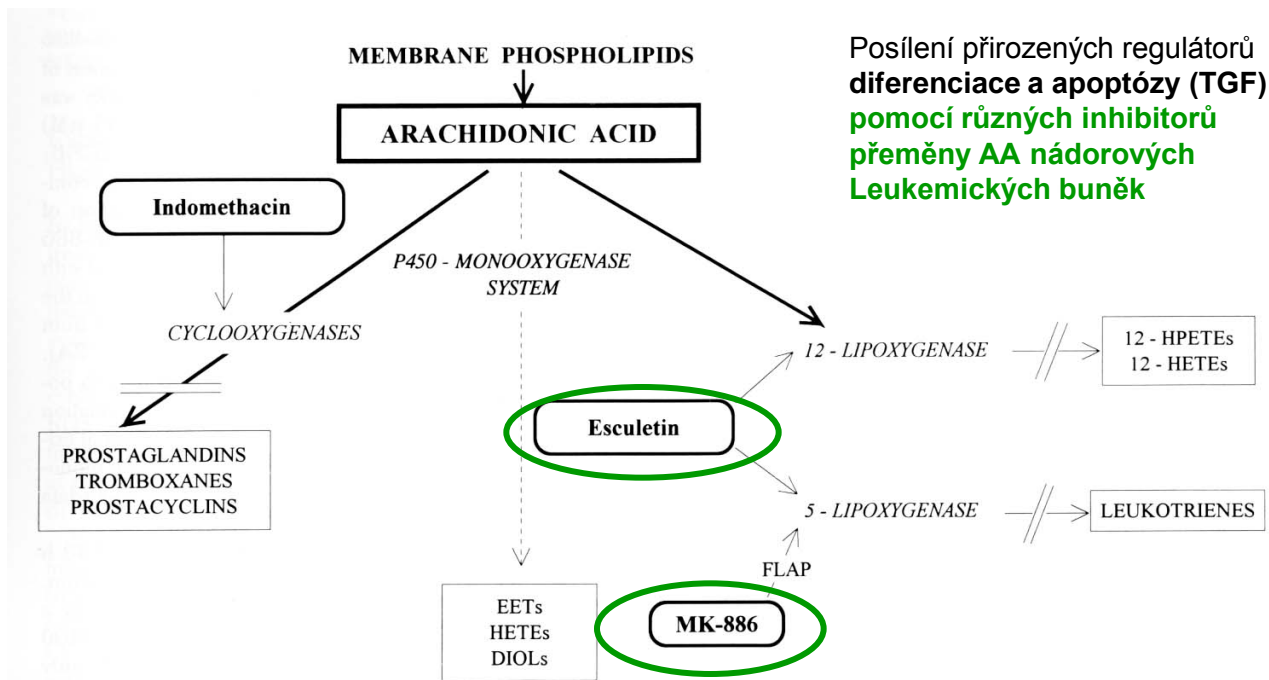
Hoferová et al.:

5-Lipoxygenase inhibitors potentiate effects of TGF- β_1 on the differentiation of human leukemia HL-60 cells

Alois Kozubik,* Jiřina Hofmanova,* Ladislav Duřek,† and Eva Musilova*

*Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic; and †Department of Environmental Studies, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Přıklad využitı inhibitoru biosyntezy eikosanoidu *in vitro* ←



→ „Diferencianı Terapie“

Fig. 1. Formation of arachidonic acid metabolites by lipoxygenases, cyclooxygenases, and P450-monoxygenase system and mechanism of action of specific inhibitors of selected metabolic pathways. HPETEs, hydroperoxy acids; HETEs, monohydroxy acids; EETs, epoxy-eicosatrienoic acids; FLAP, 5-lipoxygenase-activating protein.

„Diferenciační“ účinky měřené pomocí chemiluminiscence (%)

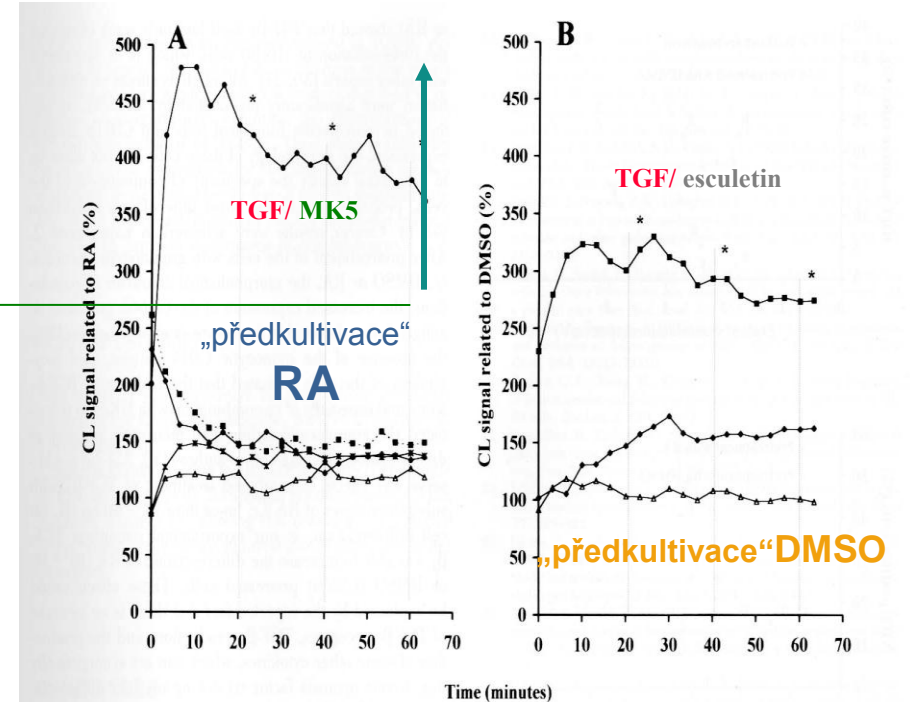
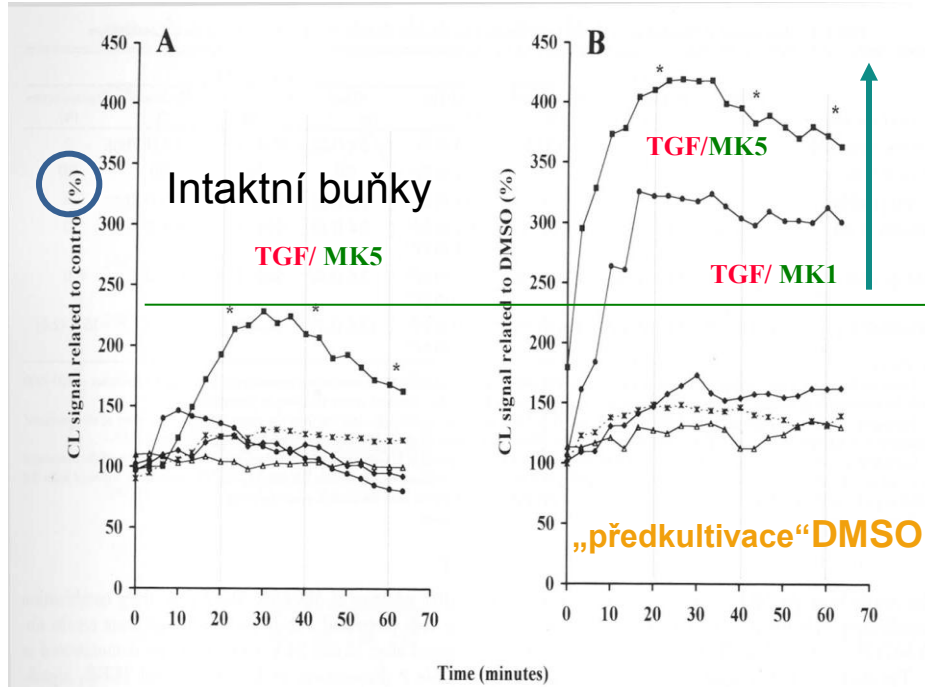


Fig. 2. Chemiluminescence response of HL-60 cells treated for 48 h with 5-LPO inhibitor MK-886 [1 or 5 μ M MK(1) or MK(5)], TGF- β 1 (400 pM) or with combination MK/TGF- β 1. Values are expressed as percentage of controls, which are represented as follows. (A) Experiment 1, intact cells (determination after 48 h of incubation); (B) Experiment 2, cells pretreated with DMSO for 48 h (determination after 96 h of incubation). *Certain points within the vertical line are significantly different (Mann-Whitney test; $P = 0.01$). The character of the differences is described in text. Symbols are as follows: filled diamonds, TGF- β 1; open triangles, MK(1); asterisks, MK(5); filled circles, MK(1)/TGF- β 1; filled squares, MK(5)/TGF- β 1.

Fig. 3. Chemiluminescence response of HL-60 cells treated for 48 h with 5-LPO inhibitors, i.e. esculetin (12.5 μ M), MK-886 [5 μ M; MK(5)], TGF- β 1 (400 pM), or with their combinations. Values are expressed as percentage of controls, which are represented by cells pretreated for 48 h with RA (A) or with DMSO (B). All data were obtained after 96 h of incubation. *Certain points within the vertical line are significantly different (Mann-Whitney test; $P = 0.01$). The character of the differences is described in the text. Symbols are as follows: filled diamonds, TGF- β 1; open triangles, esculetin; asterisks, MK(5); filled circles MK(5)/TGF- β 1; filled squares, esculetin/TGF- β 1.

Inhibitors of lipoxygenase metabolism exert synergistic effects with retinoic acid on differentiation of human leukemia HL-60 cells

Jiřina Hofmanova^{a,*}, Alois Kozubık^a, Ladislav Duřek^b, Jiřı Pachernık^a

^a Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Kralovopolska 135, CZ-612 65 Brno, Czech Republic

^b Department of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Faculty of Sciences, Masaryk University, Kotlarska 2, CZ-11 37 Brno, Czech Republic

Received 24 November 1997; revised 25 March 1998; accepted 31 March 1998

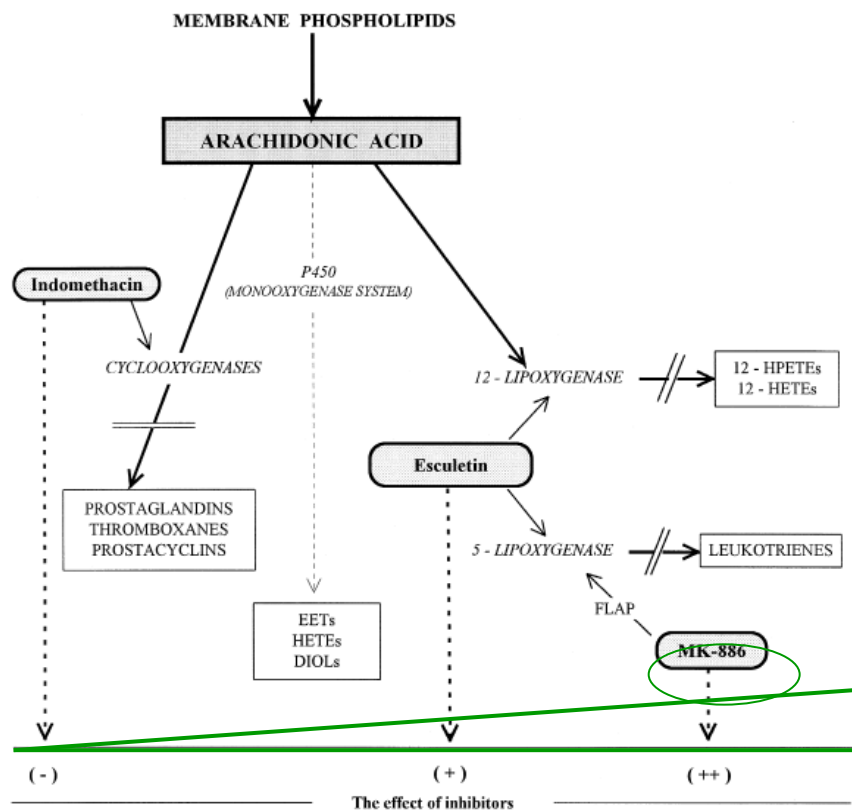


Fig. 1. Formation of arachidonic acid metabolites by lipoxygenases, cyclooxygenases and the P450-monooxygenase system and the mechanism of action of specific inhibitors of selected metabolic pathways. The effects of inhibitors on HL-60 cell differentiation induced by retinoic acid or DMSO in the experiments presented are shown schematically under the figure: (-) no effect; (+) the level of potentiation. HPETEts = hydroperoxy acids; HETEts = monohydroxy acids; EETts = epoxy-eicosatrienoic acids; FLAP = 5-lipoxygenase activating protein.

NĚKTERÉ HLAVNÍ CÍLE SOUČASNÉHO VÝZKUMU

Poznání mechanismů působení látek lipidové povahy, zejména VNMK a jejich derivátů, v mezi- a vnitrobuněčných komunikacích podílejících se

v regulaci cytokinetiky (*proliferace, diferenciace a apoptózy*)
v kontextu jejich interakcí s

- fyziologickými regulátory růstu,
- environmentálními polutanty
- vybranými farmaky.

Jedním z praktických cílů je využít tyto znalosti v rámci přípravy lipidových nutričních preparátů, případně cytostatik.

PREVENCE

VYUŽITÍ ω -3 PUFA

TERAPIE

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 epitelálních buněk kolonu u pacientů s adenomy a vysokým rizikem nádorového onemocnění

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

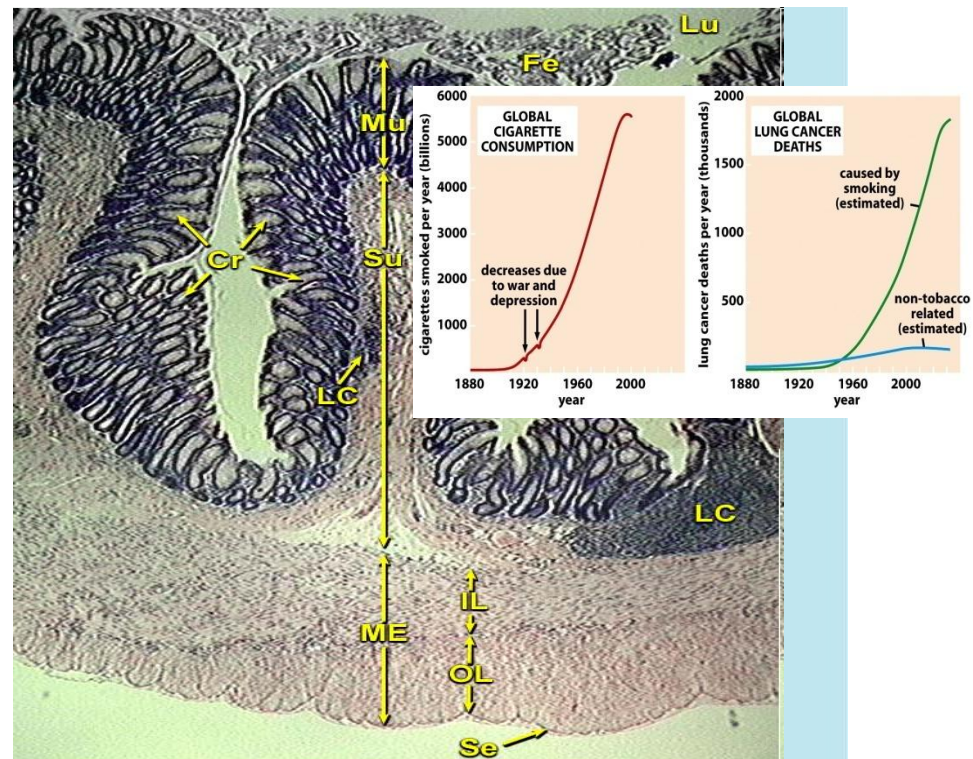
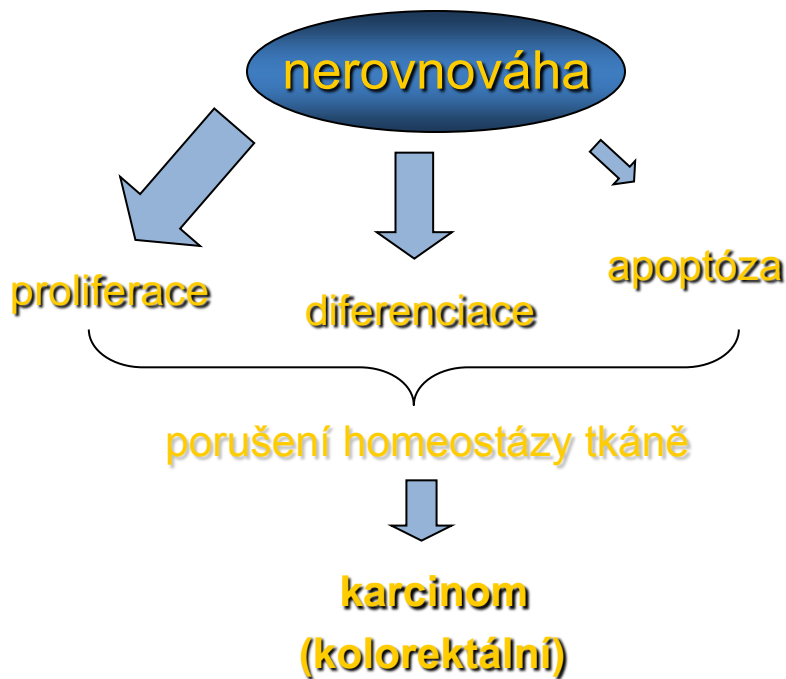
Kombinace se standardní terapií

(chemoterapie, záření)

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

Rakovina tlustého střeva

- druhým nejčastějším nádorem u mužů hned po nádoru plic a u žen po nádoru prsu
- **ČR** – vysoká incidence, přední ve statistikách, alarmující růst



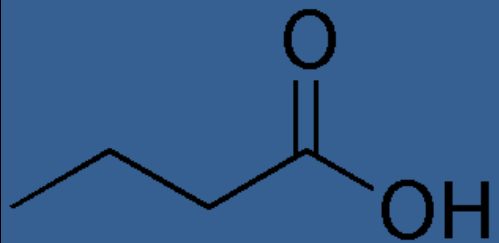
<http://cellbio.utmb.edu/microanatomy/digestive/Intestine.htm>

rozvoj nádorů kolonu - vlivy genetické

- vlivy zevního prostředí (genotoxická činidla

a negenotoxické promotory)

(©-6 VNMK)



Proti nepříznivým účinkům některých VNMK (ω -6) mohou působit

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 řízením proliferace, diferenciaci a apoptózy (*microarray analýza průkaz – změna exprese 19 400 genů*), exportní protein MCT1

▶ butyrát sodný (NaBt) snižuje proliferaci a indukuje diferenciaci a apoptózu neoplastických kolonocytů *in vitro* a *in vivo*



Prevence NÁDORŮ TLUSTÉHO STŘEVA

Buněčné linie

fetální colon

FHC

adenomy

AA/C1

RG/C2

adenocarcinomy

HT-29

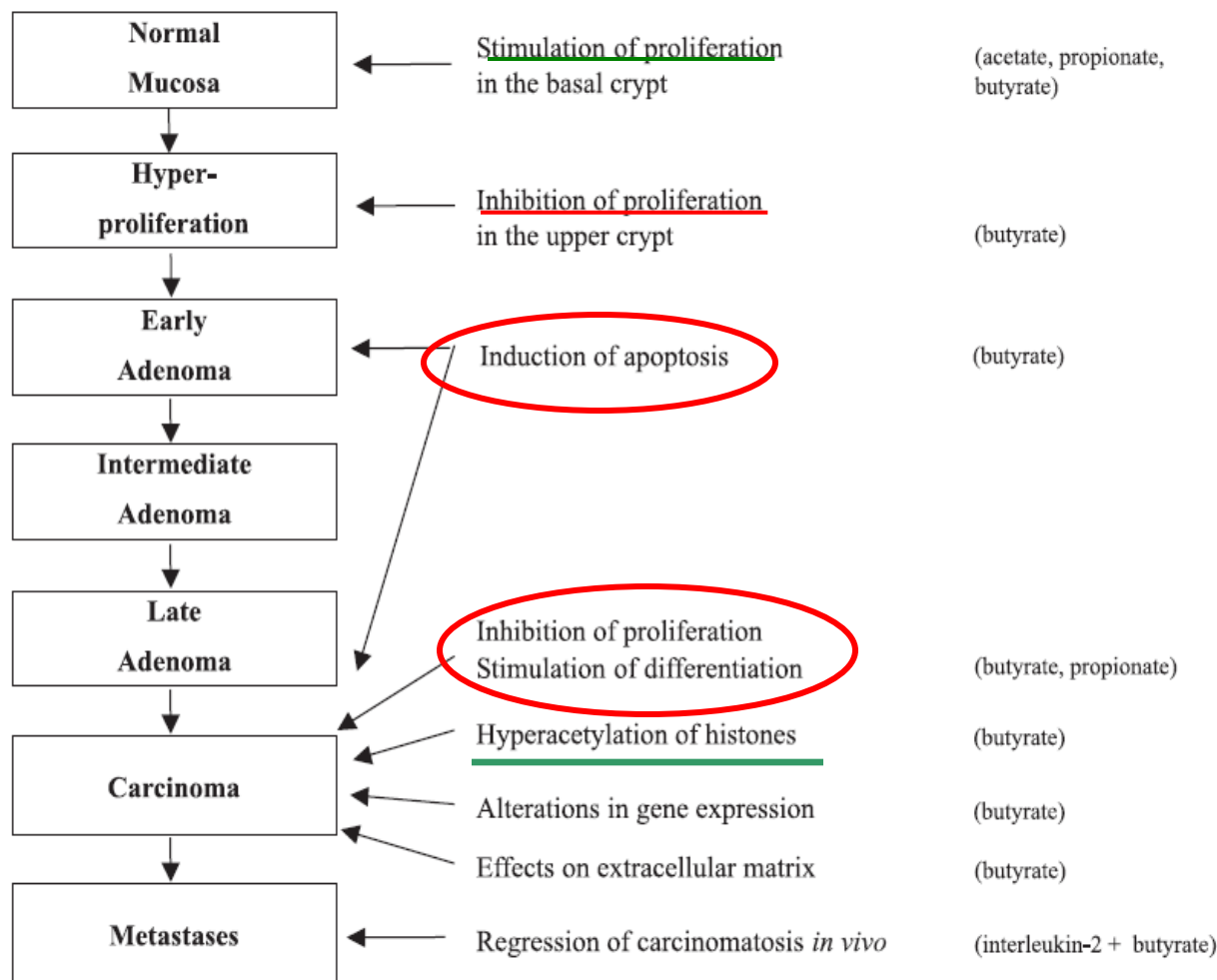
HCT116

lymf.
metastáza

SW-620

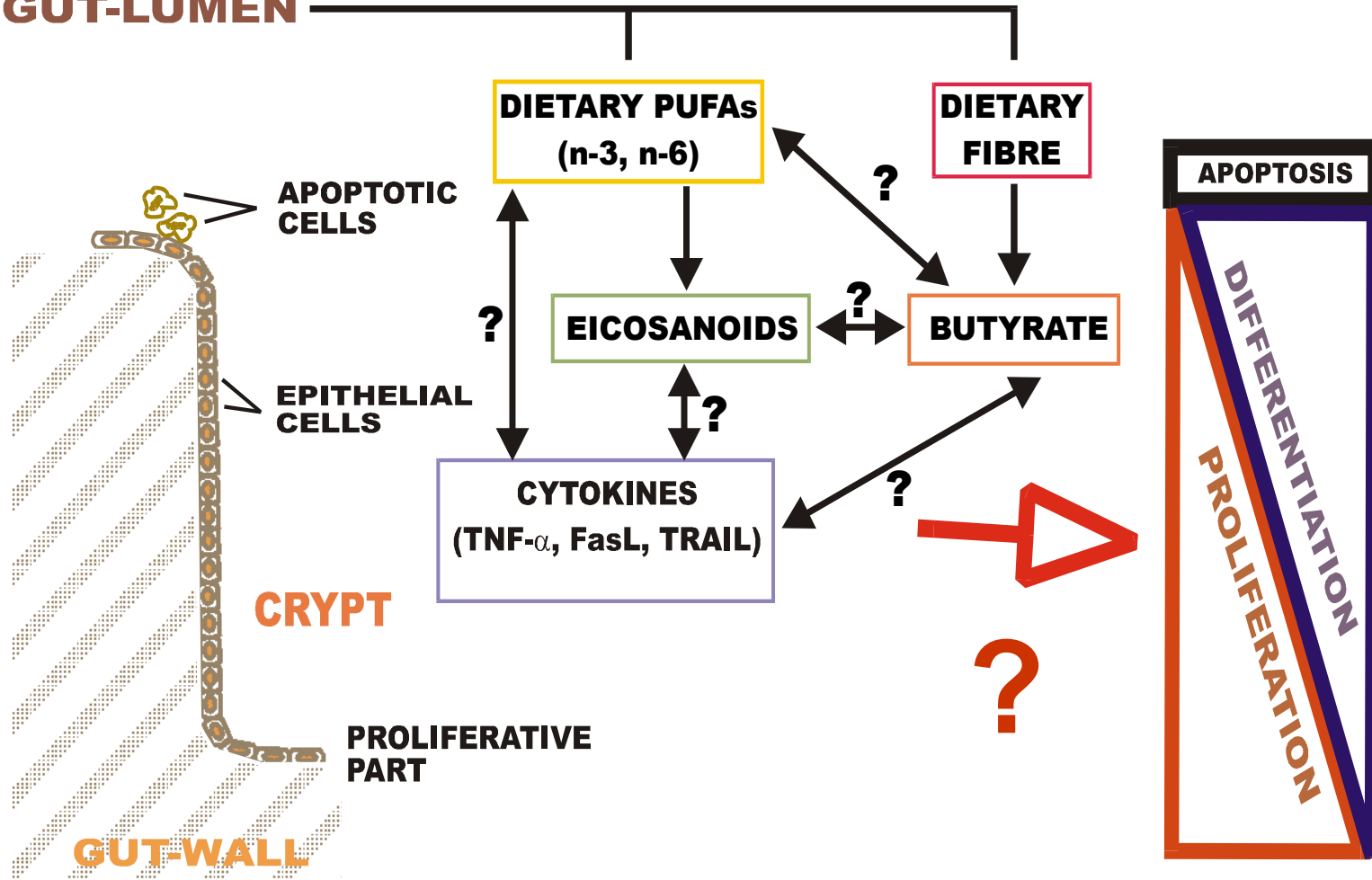
**Carcinogenic
potential**

Účinky butyrátu



Předpokládané interakce tukových složek diety a endogenních regulátorů cytokinetiky epiteliálních buněk kolonu (exp. přístup)

GUT-LUMEN



Kovaříková M. et al. Eur J Cancer 2000
 Kovaříková M. et al. Differentiation 2004
 Hyžďalová M. et al. Cytokine 2008

Hofmanová J. et al. Eur J Nutr 2005
 Hofmanová J. et al. Cancer Letters 2005
 Vaculová A. et al. Cancer Letters 2005
 Hofmanová J. et al. Mol Nutr Food Res 2009

AA (50µM)
Roslinné oleje

DHA
Rybí oleje

NaBt (3mM)
Vláknina

Endogenní regulátory
TRAIL, TNFα, anti-Fas

Receptory smrti
DR4, DR5, CD95

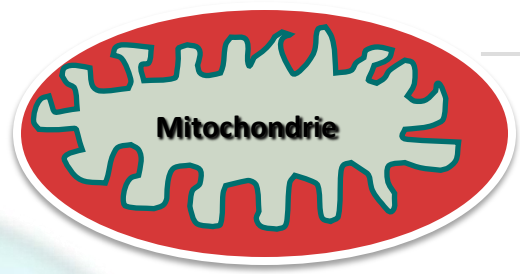
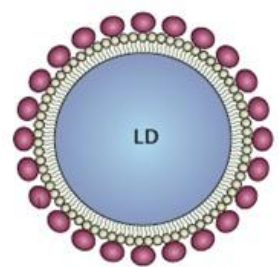
Plasmatická membrána

FAT/CD36

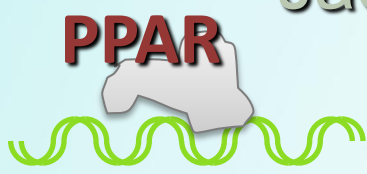
FA

FA-CoA

Cytoplasma



Jádro



PPRE

Metody využívané na různých úrovních buněčné organizace

plasmatická membrána

Lipid packing
flow cytometrie (merocyanin 540)
Lipidové analýzy
Phospholipidy (LC-MS-MS)
Zastoupení MK (GC-MS)

cytoplasma

Lipid droplets *flow cytometrie - Nile Red*

mitochondrie

ROS – *flow cytometrie (DHR-123)*
MMP – *flow cytometrie (TMRE)*
Bcl-2 rodina (*Western blotting*)

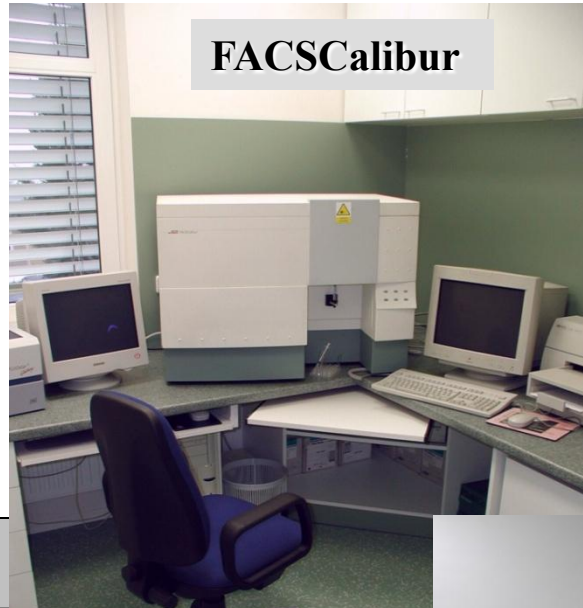
Jádro

Transcriptční faktory, genová exprese

parametry

Proliferace Diferenciace **Apoptóza**

FACSCalibur



Laboratoř buněčné biofyziky

FACS ARIA SORP II



KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP LEICA

PUFAs (AA, DHA) zvyšují citlivost nádorových buněk kolonu k apoptóze indukované butyrátem nebo cytokiny rodiny TNF

Eur J Nutr (2005) 44: 40–51
DOI 10.1007/s00394-004-0490-2

ORIGINAL CONTRIBUTION

DOI 10.1002/mnfr.200800175

Mol. Nutr. Food Res. 2009, 53, S102–S113

Jiřina Hofmanová
Alena Vaculová
Antonín Lojek
Alois Kozubík

Interaction of polyunsaturated fatty acids and sodium butyrate during apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells

Research Article

Human fetal colon cells and colon cancer cells respond differently to butyrate and PUFAs

Jiřina Hofmanová, Alena Vaculová, Zuzana Koubková, Martina Hýžd'alová and Alois Kozubík

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Cancer Letters 218 (2005) 33–41

CANCER
Letters
www.elsevier.com/locate/canlet



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Cancer Letters 229 (2005) 43–48



www.elsevier.com

Polyunsaturated fatty acids sensitize human colon adenocarcinoma HT-29 cells to death receptor-mediated apoptosis

Jiřina Hofmanová*, Alena Vaculová, Alois Kozubík

Laboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, CZ-612 65 Brno, Czech Republic

Received 15 June 2004; received in revised form 26 July 2004; accepted 29 July 2004

ONCOLOGY REPORTS 19: 567-573, 2008

TRAIL and docosahexaenoic acid cooperate to induce HT-29 colon cancer cell death

Alena Vaculová^a, Jiřina Hofmanová^a, Ladislav Anděra^b, Alois Kozubík^a

^aLaboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic

^bLaboratory of Cell Signalling and Apoptosis, Institute of Molecular Genetics, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, Czech Rep

Received 6 November 2004; received in revised form 10 December 2004; accepted 13 December 2004

Response of normal and colon cancer epithelial cells to TNF-family apoptotic inducers

JIRINA HOFMANOVÁ, ALENA VACULOVÁ*, MARTINA HYZD'ALOVÁ* and ALOIS KOZUBÍK

Laboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Královopolská 135, CZ-612 65 Brno, Czech Republic

Závěry

Lipidy patří spolu s proteiny a sacharidy mezi hlavní složky výživy. Jsou nejen významným zdrojem energie, ale kromě DNA, bílkovin a cukrů představují i jedny z hlavních stavebních kamenů buněk.

Významné je nejen jejich množství a kvalita v potravě, ale i frekvence příjmu.

Kromě strukturní úlohy (jako složky membránových fosfolipidů) je neméně podstatná řada jejich funkčních vlastností.

Změny spektra mastných kyselin (MK) v membránových strukturách mají dopad na membránovou fluiditu a další fyzikálně-chemické vlastnosti a tím zejména na interakce receptorů s jejich ligandy a další membránou zprostředkované buněčné funkce.

MK/VNMK tak hrají důležitou úlohu v přenosu signálů z extracel. prostoru a fungují jako intra- i intercelulární mediátory a modulátory buněčné signalizační sítě.

Hlavní mechanismy působení PUFAs v buněčných signalizacích

- 1) přímé ovlivnění aktivity transkripčních faktorů regulujících expresi genů významných z hlediska cytokinety
- 2) produkce eikosanoidů působících na přenos signálů růstových faktorů, cytokinů a imunitní systém
- 3) produkce ROS vznikajících peroxidací lipidů.

Modulace cytokinetiky látkami tukové povahy

Lipidy a zejména jejich složky **VNMK** včetně jejich metabolitů *eikosanoidů*, patří mezi **významné faktory** schopné ovlivnit jak dělení a zánik jak normálních, tak rovněž transformovaných buněk

Tyto procesy lze příznivě modulovat, např. pomocí lipidových výživ anebo inhibicí produkce eikosanoidů pomocí NSAIDs

Vše, co chcete vědět o lipidech <http://www.cyberlipid.org/>

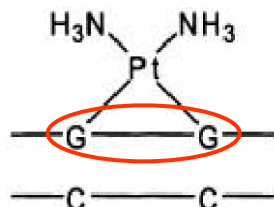
Biologické „cíle“ cisplatiny (adukty s DNA)

Novel Concepts in the Development of Platinum Antitumor Drugs

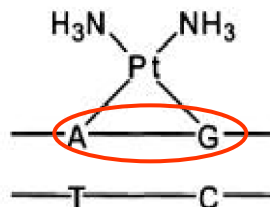
Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents, 2002, Vol. 2, No. 4 3

Typy DNA !
aduktů

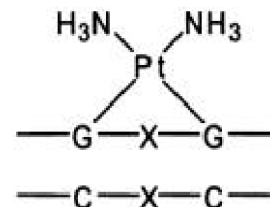
Intra-
(80-90%)



1,2 GpG intrastrand
(60-65%) !!



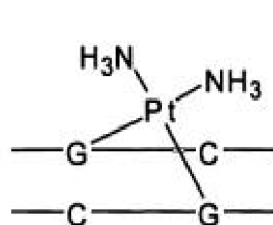
1,2 ApG intrastrand
(20-25%) !



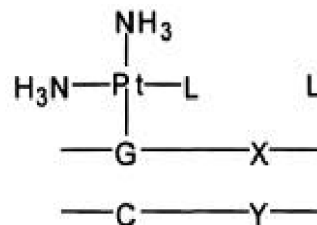
1,3 GpXpG intrastrand
(~2%)

a frekvence
jejich výskytu

Inter-



1,2 GpG interstrand
(<1%)



monofunctional
G-adduct

L = Cl⁻, H₂O, S-R

mono-

Fig. (2). Types of cisplatin-DNA adducts and their frequency of formation.

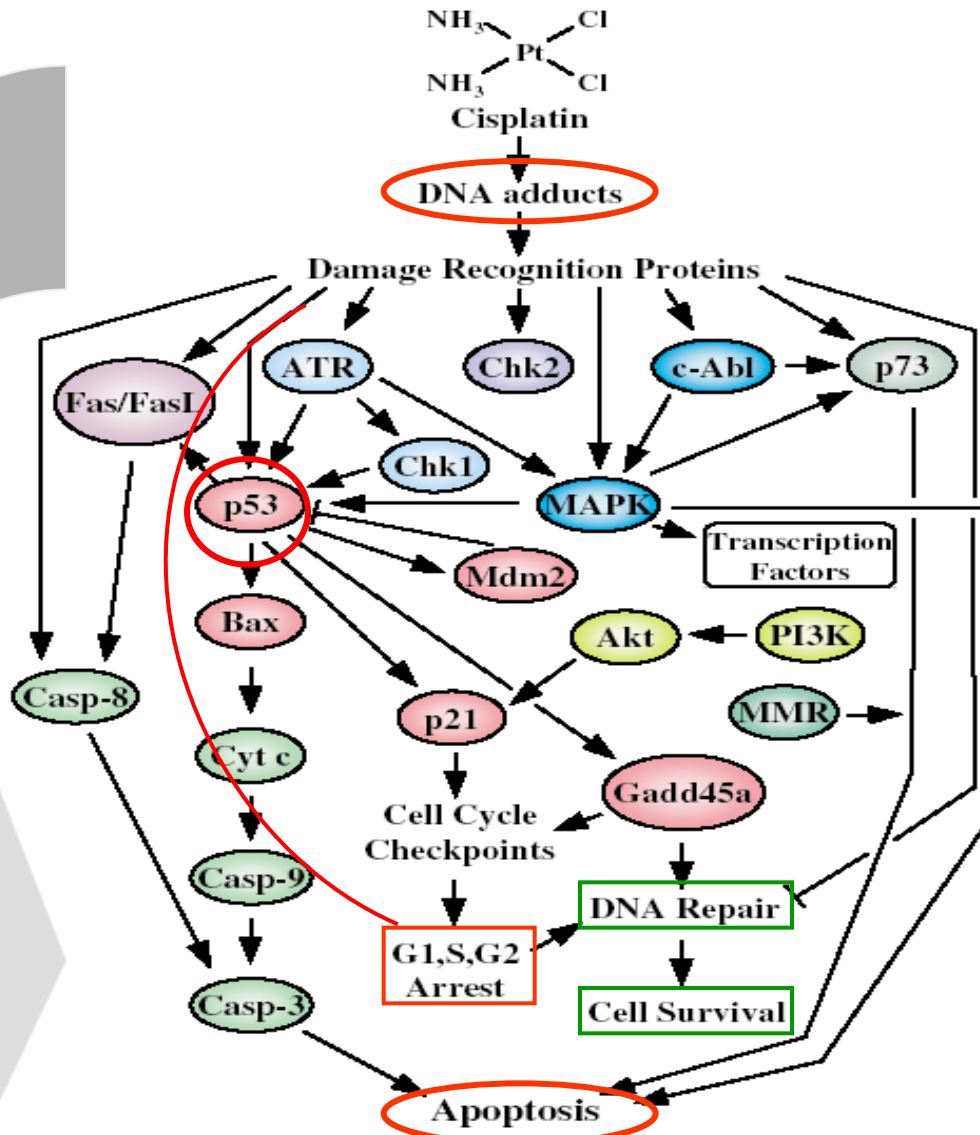


Figure 1 An overview of pathways involved in mediating cisplatin-induced cellular effects. Cell death or cell survival will depend on the relative intensity of the signals generated and the crosstalk between the pathways involved. Some of the signaling discussed in the text has been omitted for clarity

Molekulární podstata
cytotoxického
působení **cisplatin**
iniciované adukty DNA

B. smrt závisí na
relativní intenzitě
Signálů

LA-12 ?

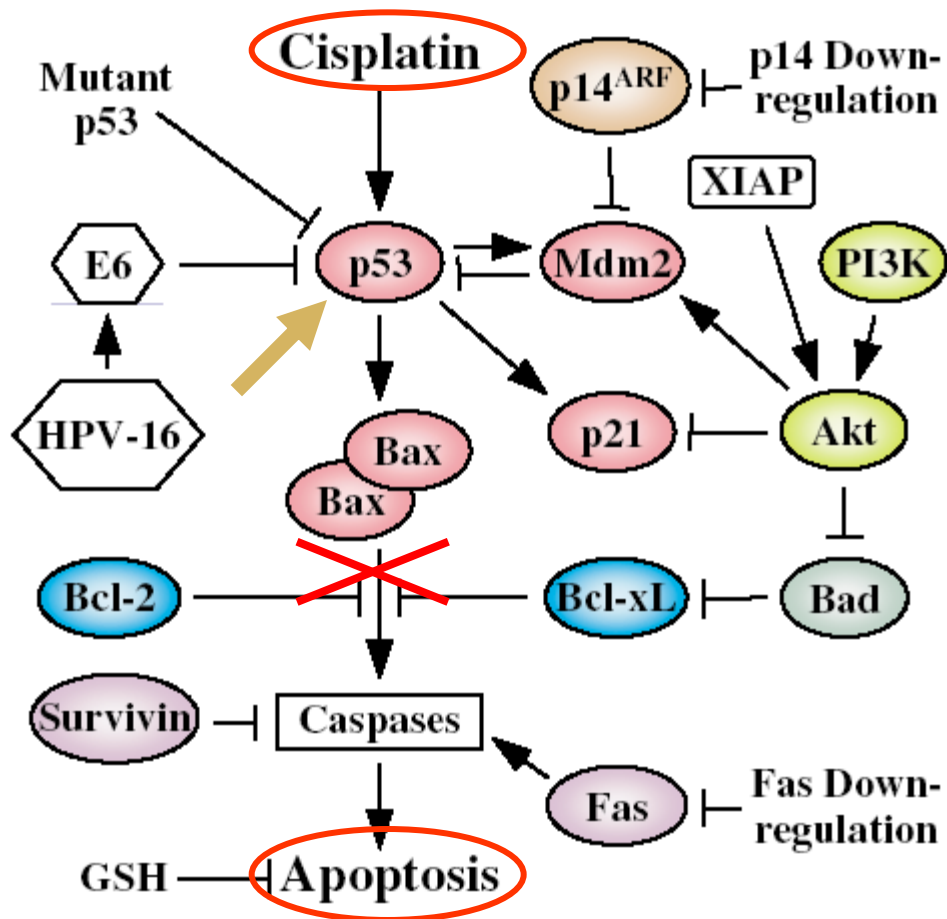


Figure 6 Disruption of p53-dependent apoptotic pathway in cisplatin-resistant tumor cells

U buněk rezistentních k cisplatině je funkce p53 (dráhy vedoucí k apoptóze) narušena.

Přispívají k tomu

změny v regulaci proteinů r. Bcl, Fas,

Survivinu, Glutathionu

„Dose-response“ křivky (MTT test)

Nejcitlivější k cis-DDP z panelu senzitivních ovariálních buněk (H134, IGROV-1, OVCAR-3), s najnižším % apoptózy (6-14%) (Kolfshoten, G.M. et al., Gyn. Oncol., 2002)

Získaná rezistence udržovaná přidavkem cisplatiny do kultivačního média (výsl. konc. 1 uM, každá 2. pasáž)

Řada nádorů
k cis-DDP
Rezistentní

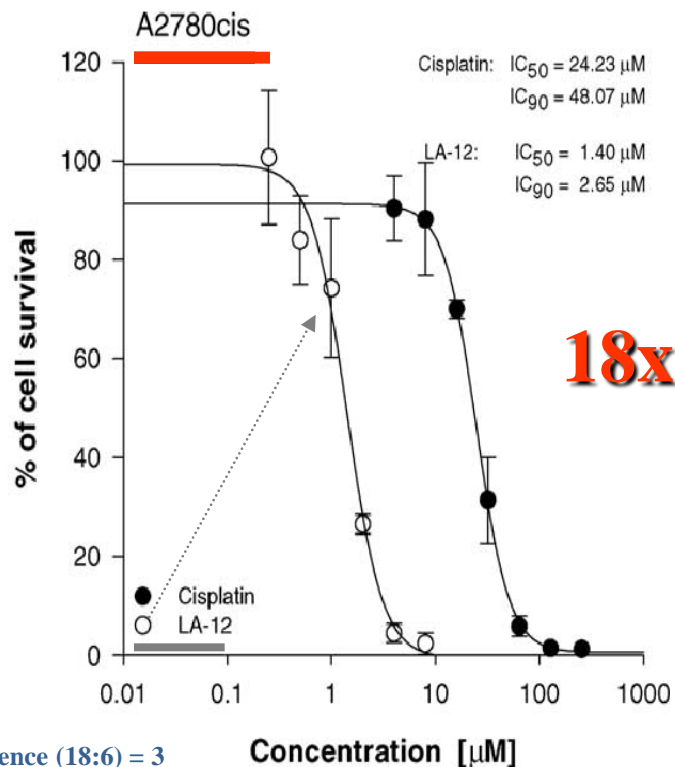
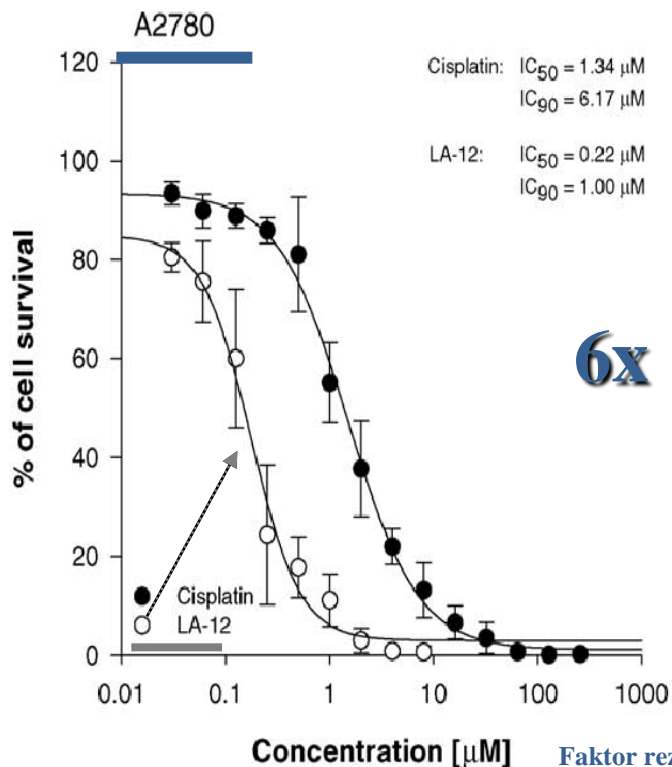


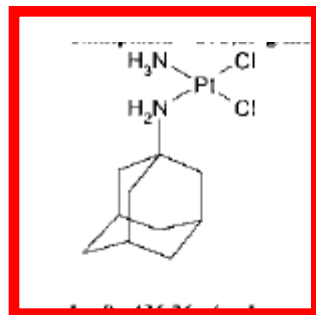
Fig. 2. Time- and dose-response effects on the survival of A2780 and A2780cis cancer cell lines. The effects after 72 h exposure to cisplatin or LA-12 in a concentration range between 0.3 μM and 256 μM were determined by MTT assay. The calculated drug concentrations inhibiting metabolic activity of cells by 50% (IC₅₀) and 90% (IC₉₀) are displayed for both derivatives. The results are expressed as mean ± standard deviations (S.D.) of at least three independent experiments; all concentrations were tested in three replicates.

Adamantylaminové Pt(II) a Pt(IV) komplexy

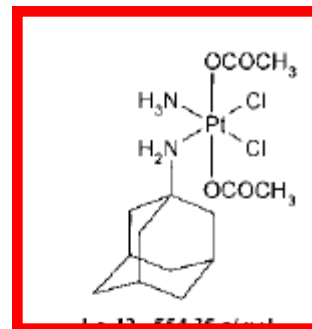
příklad
praktického využití:
látky lipofilní povahy

Dvojmocné Pt(II)
(reaktivní s DNA)

LA-9



redukce

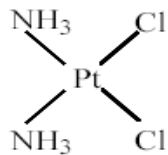


Výhoda: lipofilní

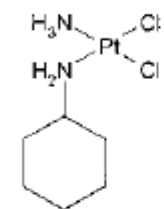
čtyřmocné Pt(IV)
(s DNA nereaktivní)

LA-12

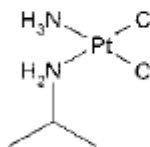
JM-216 1. z řady
v klinickém zkoušení



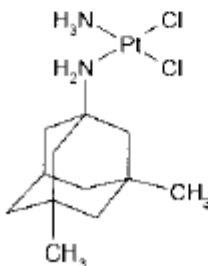
Cisplatin (II)



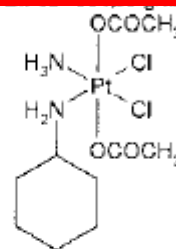
LA-5 382 g/mol



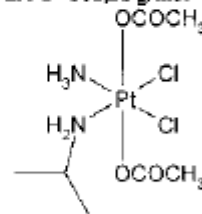
LA-6 344,12 g/mol



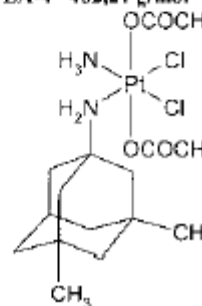
LA-13 464,32 g/mol



LA-2 502,28 g/mol



LA-4 462,21 g/mol



LA-15 582,78 g/mol

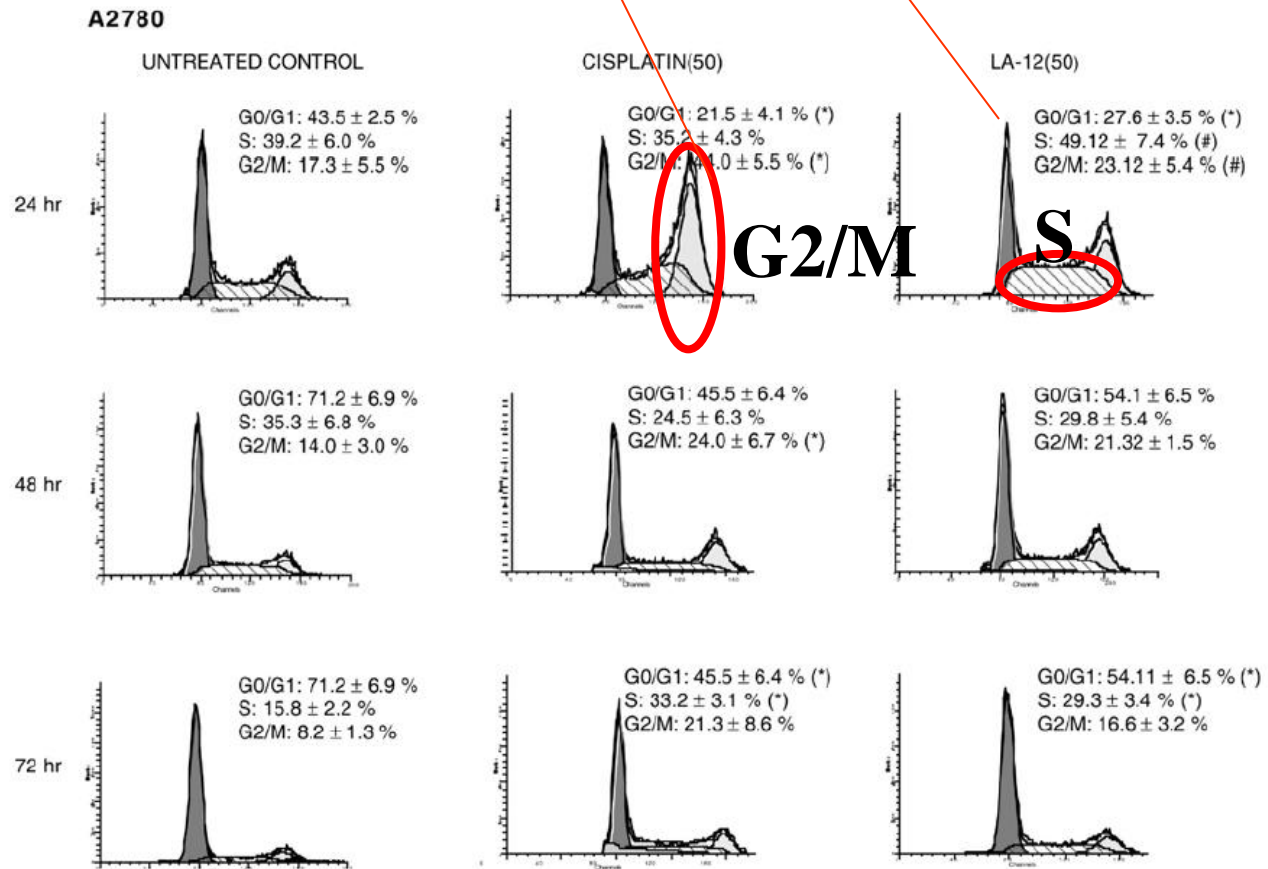
Opakovaně prokazovaná
vysoká účinnost LA-12
in vitro i *in vivo*
**!!!! 1. fáze klin.
hodnocení**

Syntetizované F. Žákem a spol.,
PLIVA – Lachema

Zak et al., 2004, J Med Chem,

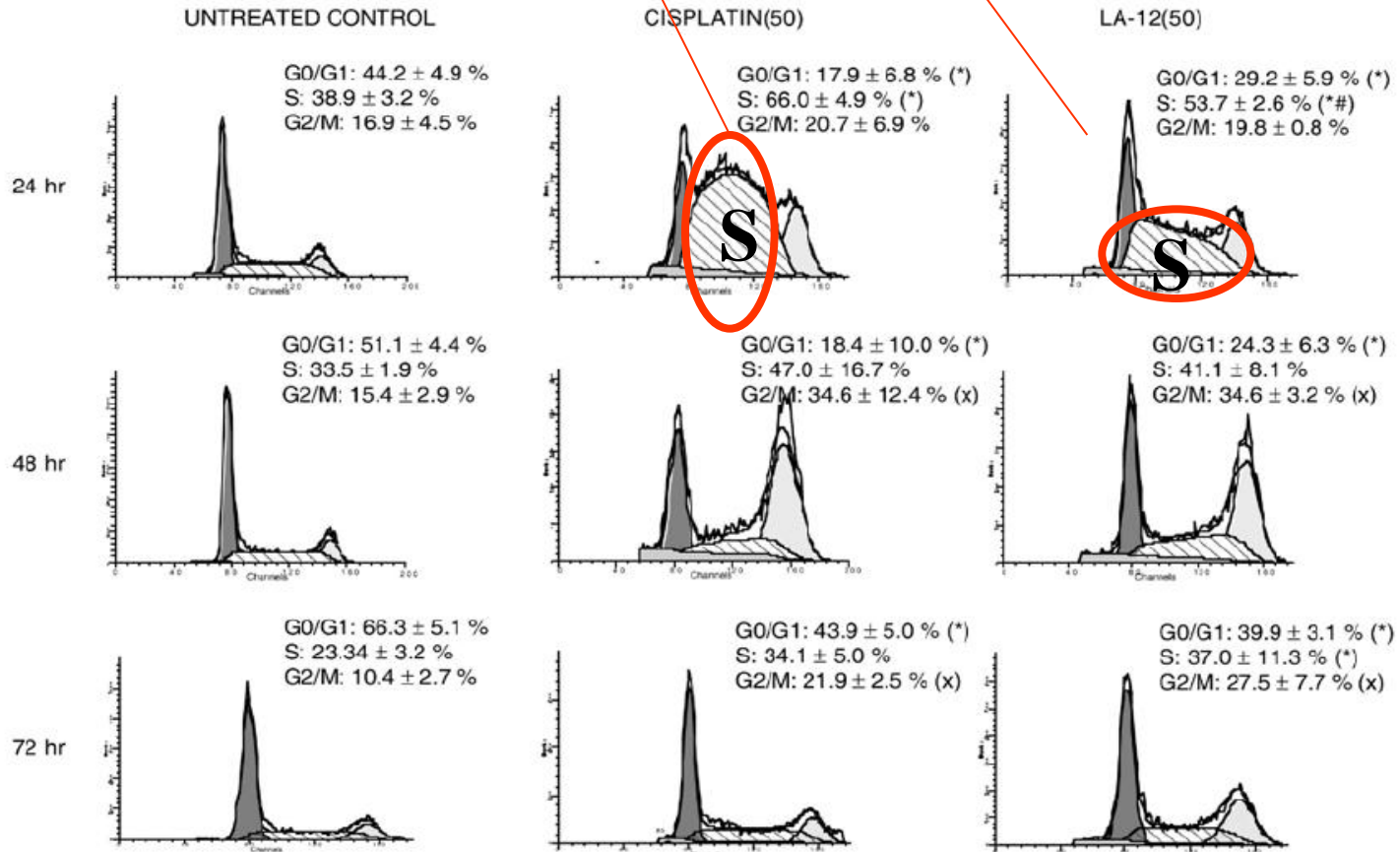
Rozdílný vliv cisplatiny a LA-12 na buněčný cyklus „citlivé“ A2780 (single staining)

Souvisí změny v proliferaci se změnami v regulaci b.c.?



Rozdílný vliv cis-DDP a LA-12 na buněčný cyklus A2780cis

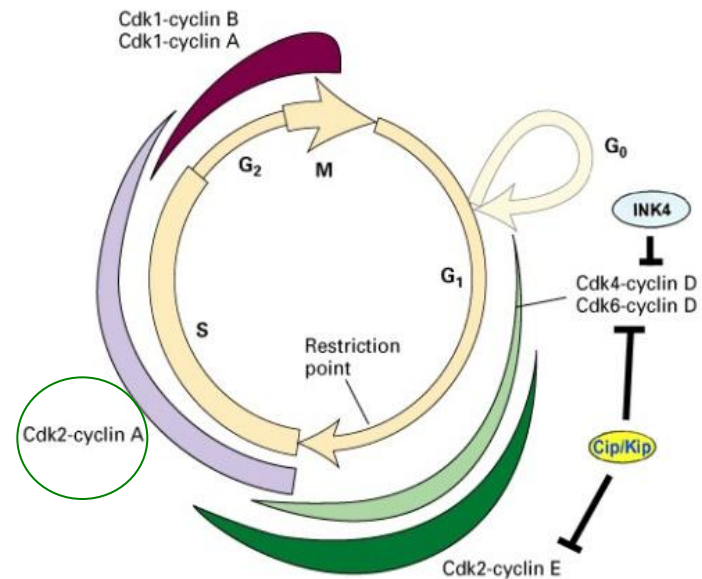
A2780cis



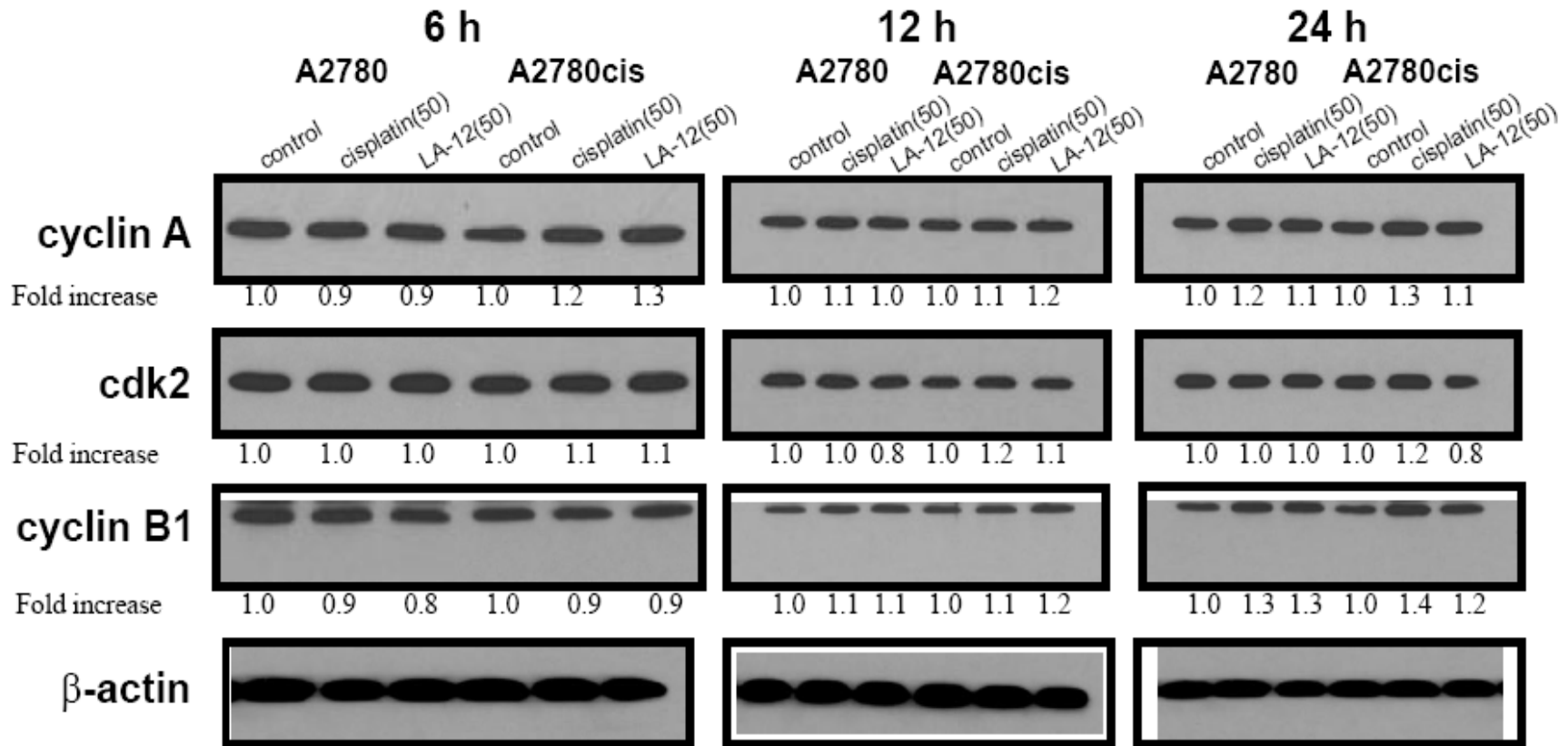
Účinky LA-12 a cisplatin na b. cyklus jsou u ovariálních nádorových linií rozdílné.

Detekovány hladiny proteinů:

- **Cyklin A, B1, cdk2** (⊕ regulace b. cyklu);
- **p21, Gadd45 α** („p53 target genes“ ⊖ regulace b. cyklu);
- **Bax** (apoptóza);
- **Gadd 45 α** („DNA repair“);
- **Mdm2** (regulace stability p53)



Hladiny proteinů regulujících buněčný cyklus (*cyklin A*, *B1*, *cdk2*) u buněk *A2780* a *A2780cis* po působení LA-12 a cisplatiny

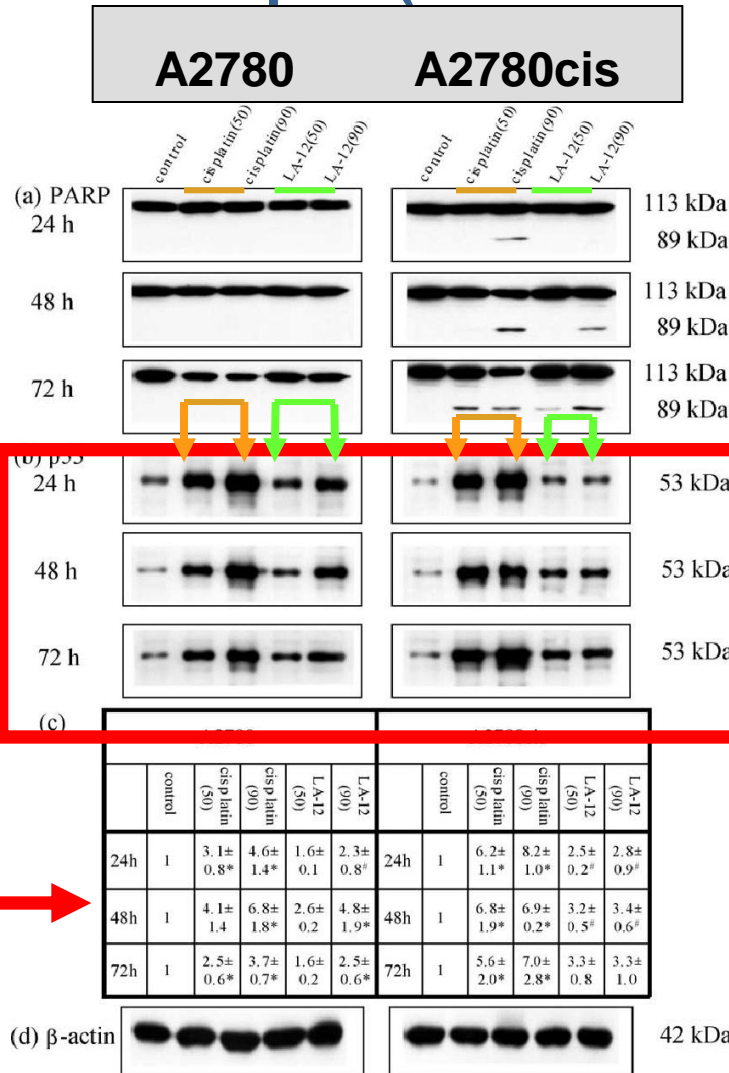


Nebyly pozorovány žádné změny vč.

Bax (apoptóza);
 Gadd 45a („DNA repair“);
 Mdm2 (regulace stability p53)

Expresse PARP a p53 (Western b.) u A2780 a A2780cis

p53



Equitoxické koncentrace cis-DDP indukují vyšší expresi proteinu p53 (teoreticky vyšší poškození DNA, než po apl. LA-12 a tudíž by cis-DDP měla působit efektivněji),

Nebylo tomu tak, tzn. že by musí existovat jiné. např. s poškozením DNA nesouvisející mechanismy působení LA-12 !!!!!

Fig. 8. Western blot analyses of (a) PARP (upper panel) and (b) p53 (middle panel) protein levels in A2780 (left panel) and A2780cis cells (right panel). The cells were not exposed (untreated controls) or exposed to IC₅₀ or IC₉₀ concentrations of cisplatin or LA-12 and harvested at 24 h, 48 h, and 72 h of sustained drug treatment. One representative experiment of at least three is presented. Table (c) contains values of p53 expression quantified by densitometry (mean ± S.D. of at least three independent experiments). The symbols (*) denote significant difference ($p < 0.05$) from untreated control; (#) denote significant difference ($p < 0.05$) between equitoxic cisplatin and LA-12 effects. Equal loading is documented by detection of (d) β-actin (bottom panel).

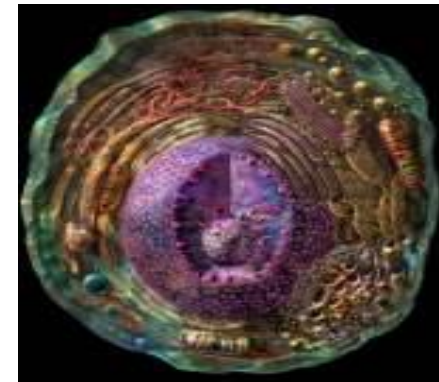
Tyto výsledky se zařazují mezi ty přístupy, i když plně nevysvětlují působení **cisplatiny a LA-12**, které **výzkum platinových cytostatik posouvají do nových oblastí.**

Studie z poslední doby ukazují, že **cisplatina inhibuje růst nádorových buněk v koncentracích, které jsou významně nižší, než konc. potřebné pro inhibici syntézy DNA.**

To naznačuje, že mohou existovat i jiné mechanismy působení než ty, které jsou primárně založeny na poškození DNA

Platinová cytostatika mohou reagovat s dalšími buněčnými strukturami (komponenty) jako jsou:

- **RNA,**
- **proteiny,**
- **cytoskeletální filamenta,**
- **thioly- obsahující molekuly**
- **membranové fosfolipidy.**



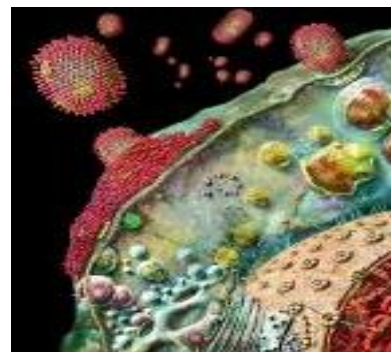
Odvozené mechanismy mohou být významnou součástí signálních kaskád regulujících dělení a smrt buněk

Předpoklad:

Vzhledem ke své lipophilicitě, lze očekávat, že alespoň některé příznivé efekty působení LA-12 by mohly být (alespoň částečně),

spojeny s interakcemi této látky se složkami b. membrán.

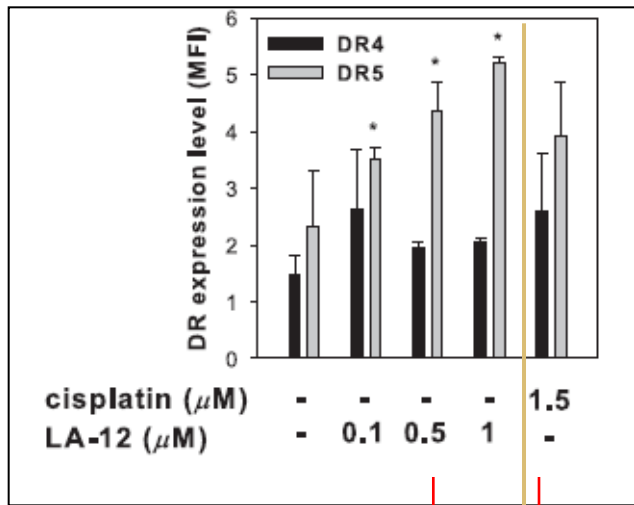
(anebo by mohly být modulovány ovlivněním membranového složení)



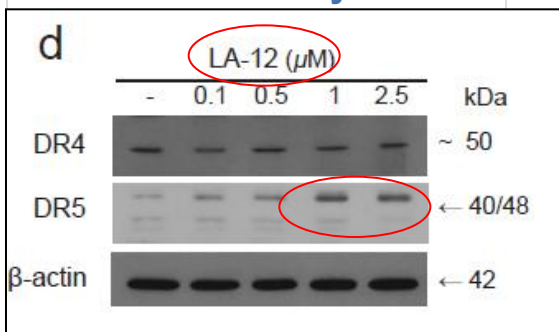
LA-12 indukuje „upregulaci“ proteinů DR5, mRNA a zvyšuje zastoupení DR5 v lipidových raftech

Zastoupení DR5 a DR4 v membránách

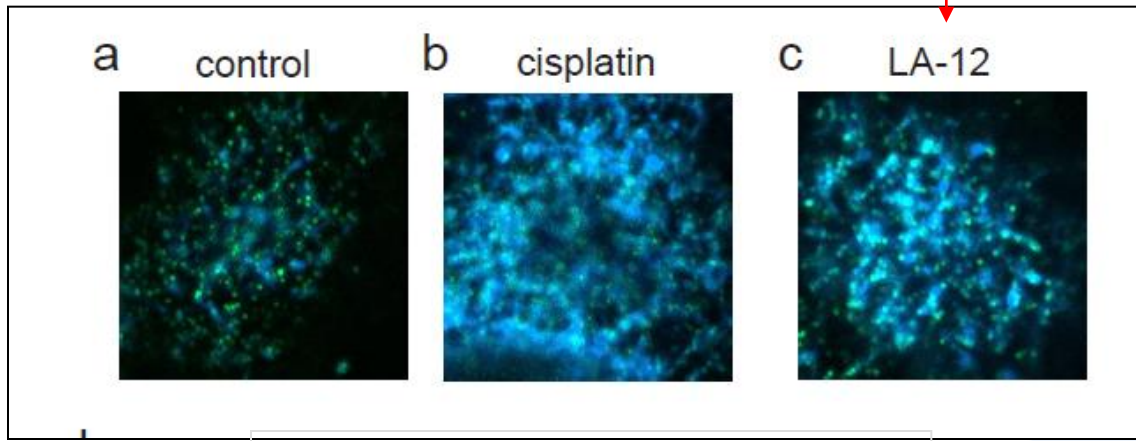
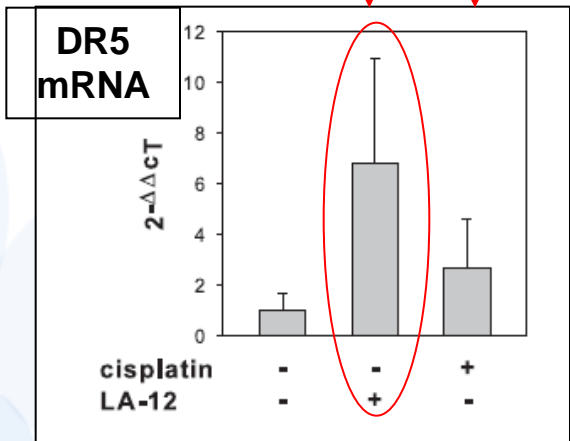
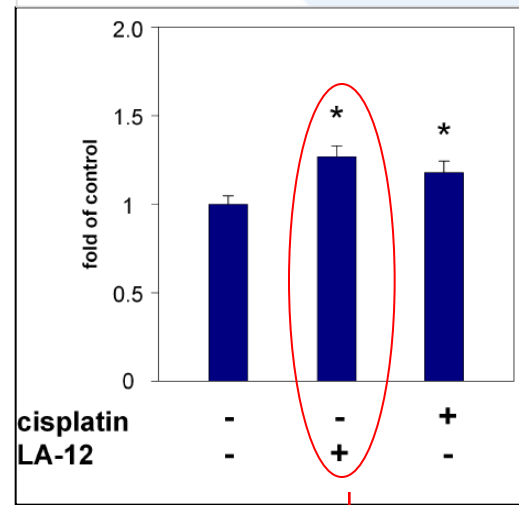
— HCT 116 —



Celkové hladiny DR5



Celkové hladiny DR5 (rafty)



Lokalizace DR5 v lipidových raftech

Využití mechanismů působení pt-cytostatik jiných než těch, které přímo souvisí s poškozením DNA

Posílení terapeutických efektů ?

Lipidové výživy vhodného složení

