

CL Laboratoř **cytokinety**

Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i.

VÝZKUM V LABORATOŘI CYTOKINETIKY BFÚ AV ČR

Výzkum je zaměřen zejména na působení lipidových složek výživy a mechanismy působení látek lipidové povahy v kontextu jejich interakcí s fyziologickými regulátory růstu, environmentálními polutanty a vybranými farmaky.

Jsou studovány procesy vedoucí ke změnám regulace buněčné kinetiky a komunikace.

Získané výsledky mají význam jak pro obecné studium procesu karcinogeneze (negenotoxické mechanismy) tak pro oblast ekotoxikologie, nádorové prevence a hledání nových protinádorových terapeutických postupů.

Poznatky o úloze specifických lipidových složek výživy mohou být podkladem pro optimalizaci lipidové výživy (oblast prevence a podpůrné terapie) ve spolupráci s klinickými pracovišti a výrobní sférou.

Cílem je prohloubit poznání a nově definovat potenciální úlohu látek lipidové povahy zejména vysoce nenasycených mastných kyselin a jejich derivátů v mezi- a vnitrobuněčných komunikacích podílejících se na regulaci buněčného dělení, diferenciaci a apoptózy.

Scientific interests:

- ▶ Lipid dietary compounds in regulation of cytokinetics
- ▶ Growth regulators in cancer cell signalling
- ▶ Interaction of lipids and cytokines
- ▶ Effects of anticancer drugs
- ▶ Molecular and cellular mechanisms of toxicity of organic compounds

INICIACE

PROMOCE

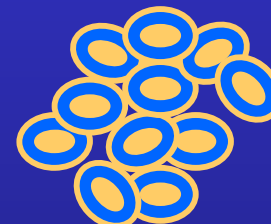
PROGRESE

MUTAGENY
RADIACE
VIRUSY....

NEGENOTOXICKÉ
KARCINOGENY

GENOTOXICKÉ
+NEGENOTOXICKÉ
FAKTORY

GENOTOXICITA



NORMÁLNÍ
BUŇKA

INICIOVANÁ
BUŇKA

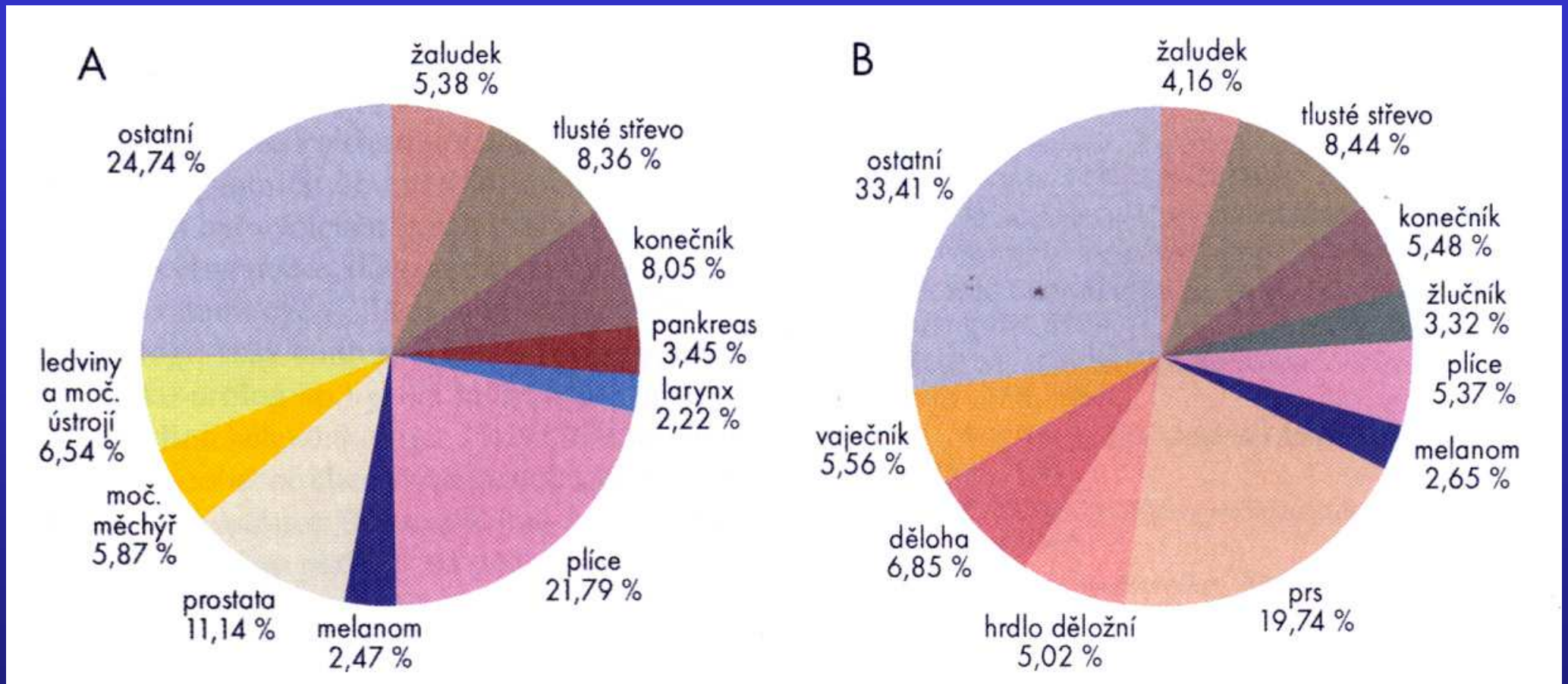
PRENEOPLASTICKÉ
PORUCHY

MALIGNÍ
NÁDOR

INVAZE
METASTÁZY

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

Mnohostupňový proces karcinogeneze



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

▶ **Výzkum interakce VNMK s endogenními regulátory růstu, diferenciaci a apoptózy** (cytokiny, růstové faktory, induktory apoptózy - zejména vliv na cytokinetiku, odhalování mechanismů) - terapeutické aplikace, lipidové výživy

▶ **Výzkum interakce VNMK s environmentálními polutanty** (rozpuštěnost v tucích, aktivace metabolismu lipidů a jejich úloha v působení polutantů - cytokinetika, transdukce signálů, mezibuněčná komunikace)

▶ **Výzkum interakce VNMK s vybranými farmaky** (mechanismy působení NSAID-nesteroidních antiflogistik, mechanismy a modulace účinků cytostatik - terapeutické aplikace)

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

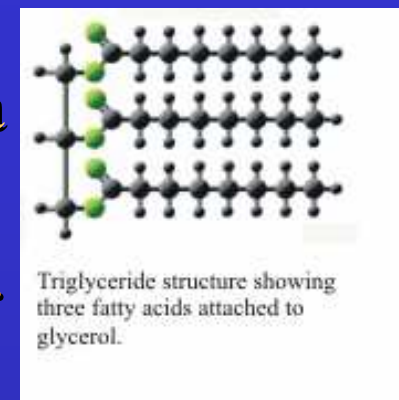
vysoce nenasycené mastné kyseliny (VNMK, PUFAs)

tříd n-3 a n-6

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, diferenciace 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.

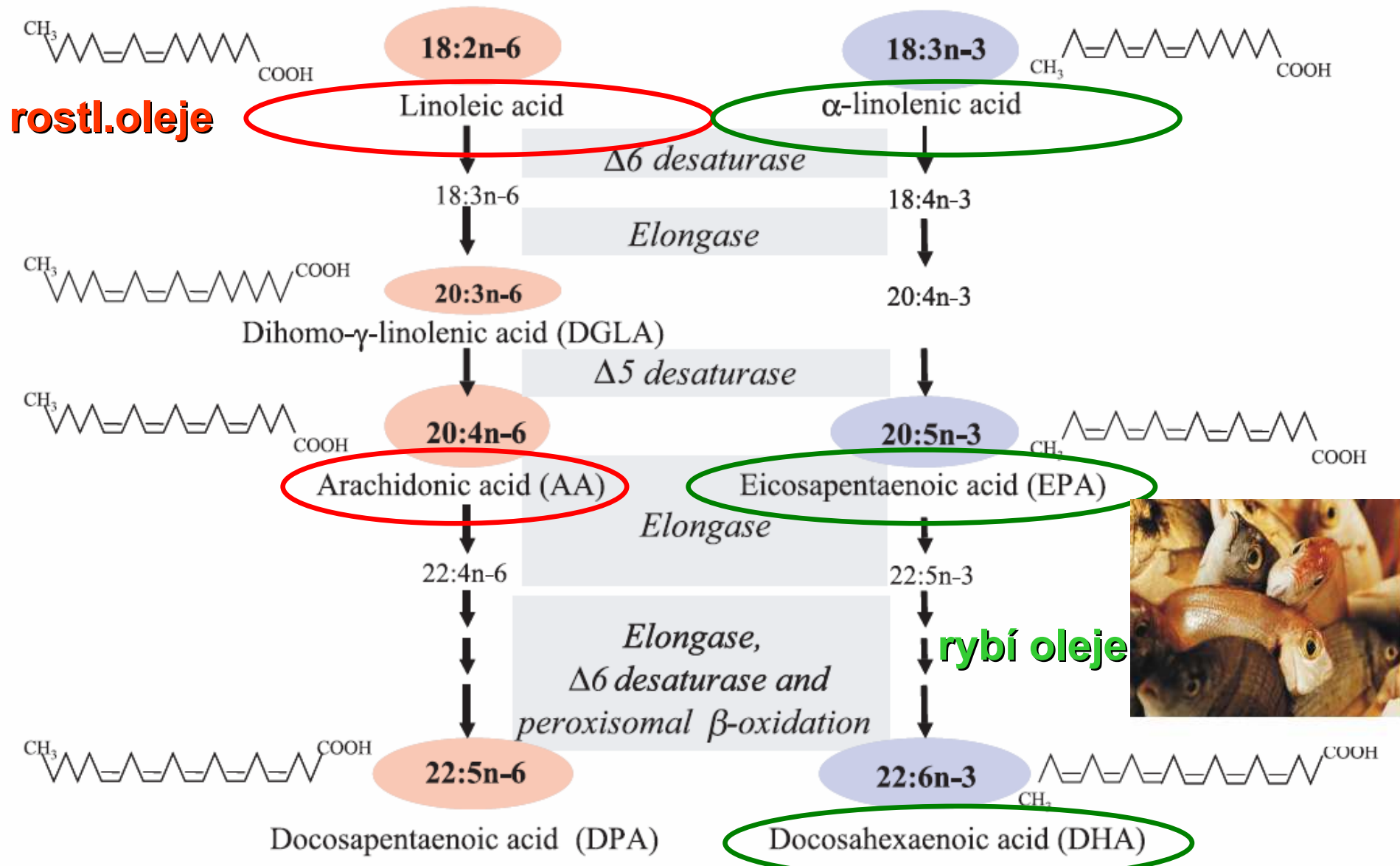
▶ Lipidy produkované buňkami imunitního systému jsou zahrnuty v zánětlivých onemocněních jako je revmatoidní artritida, sepse, astma, zánětlivé onemocnění střeva.

▶ Lipidy hrají úlohu také v psychických a neurodegenerativních onemocněních (deprese, schizofrenie, Alzheimerova choroba)

▶ Lipidy ovlivňují počátek a rozvoj nádorových onemocnění

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



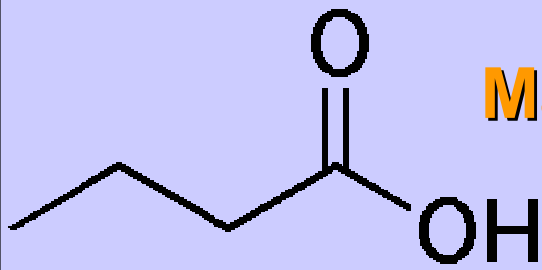
LIPIDOVÉ SLOŽKY VÝŽIVY

VÍCE, NEŽLI JEN ZDROJ ENERGIE!!!!

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

- ▶ úloha v karcinogenezi

(etiologie nádorů tlustého střeva, prostaty, prsu)



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*

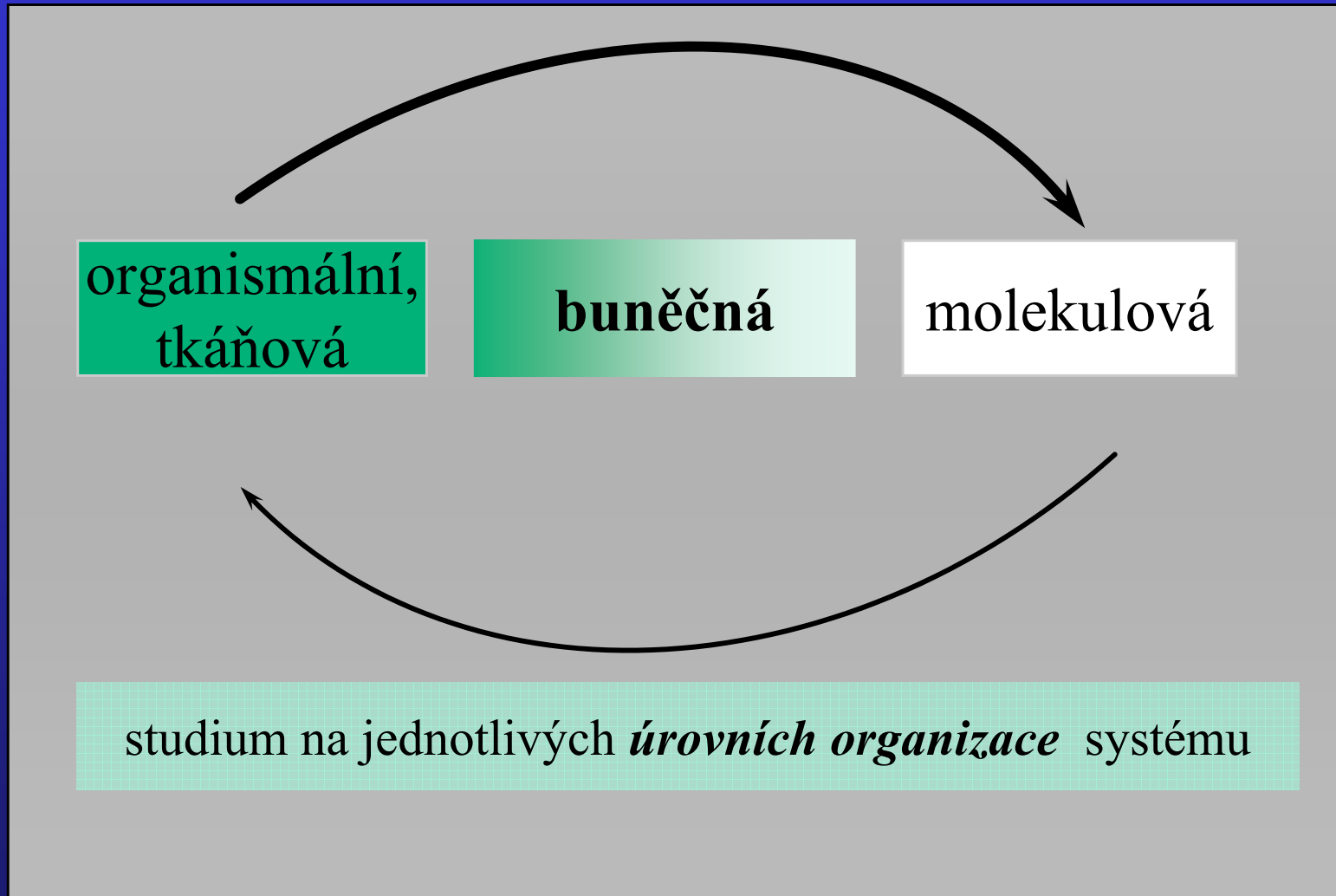
Prevence NÁDORŮ TLUSTÉHO STŘEVA

Laboratoř cytokinetiky BFÚ
(hlavní oblasti výzkumu
a odborného směřování)

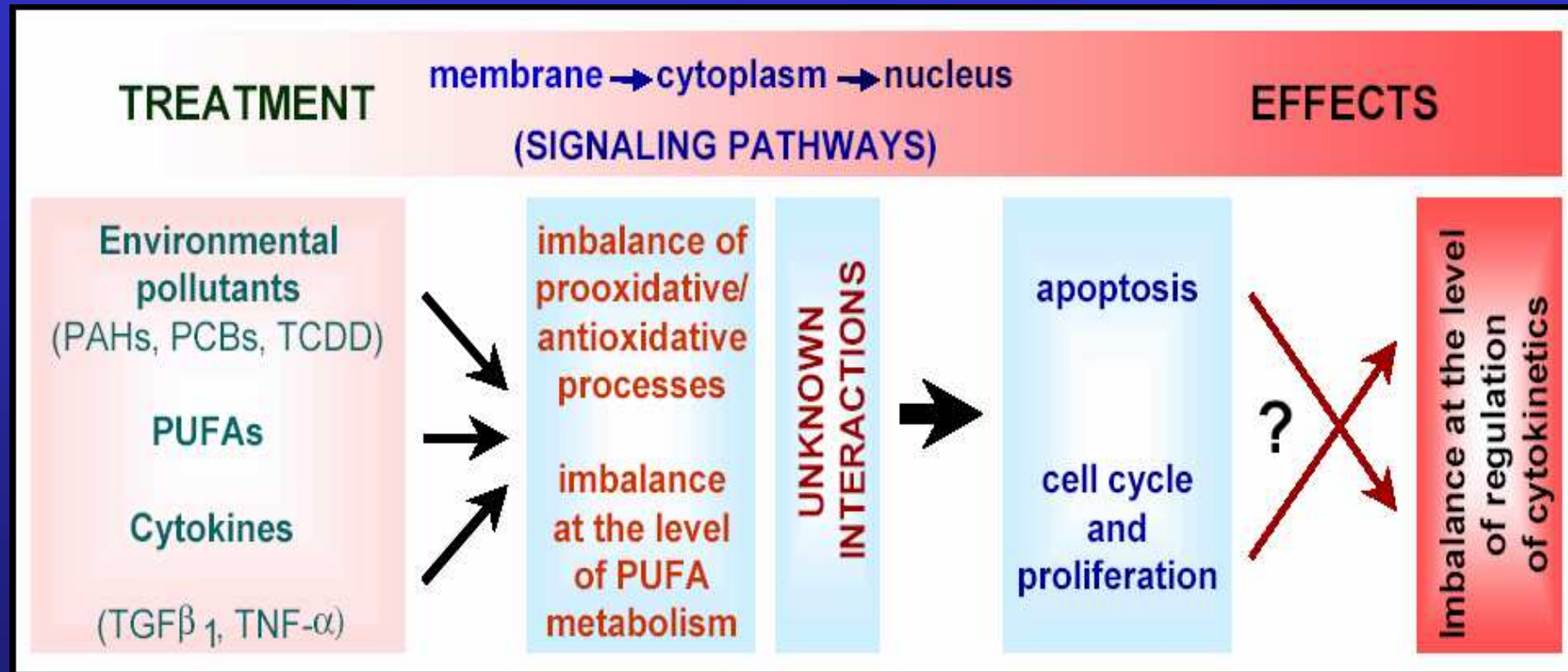


- Používané modely a metodický potenciál
- Příklady výsledků s využitím tkáňových kultur
- Některá úskalí, klady a omezení modelů *in vitro*

Komplexní povaha biologických systémů vyžaduje komplexní přístupy k jejich studiu



General Suggestion of Treatment and its Impact

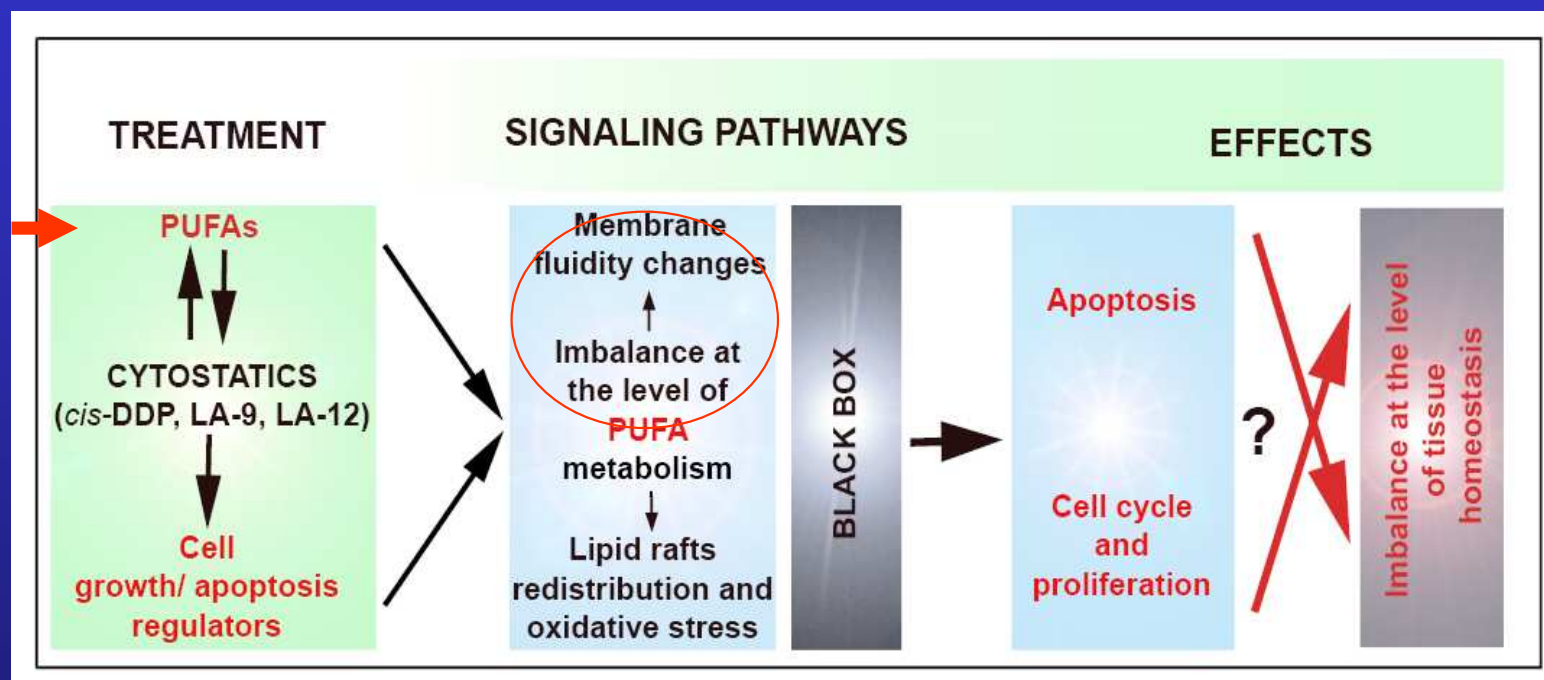


Targeted modulation of phospholipid metabolism, (e.g. based on lipid nutr.) might be a possible innovative strategy leading to increasing of Pt-based cytotoxicity.

Increasing of therapeutic effects ? →

Lipid nutrition of appropriate composition

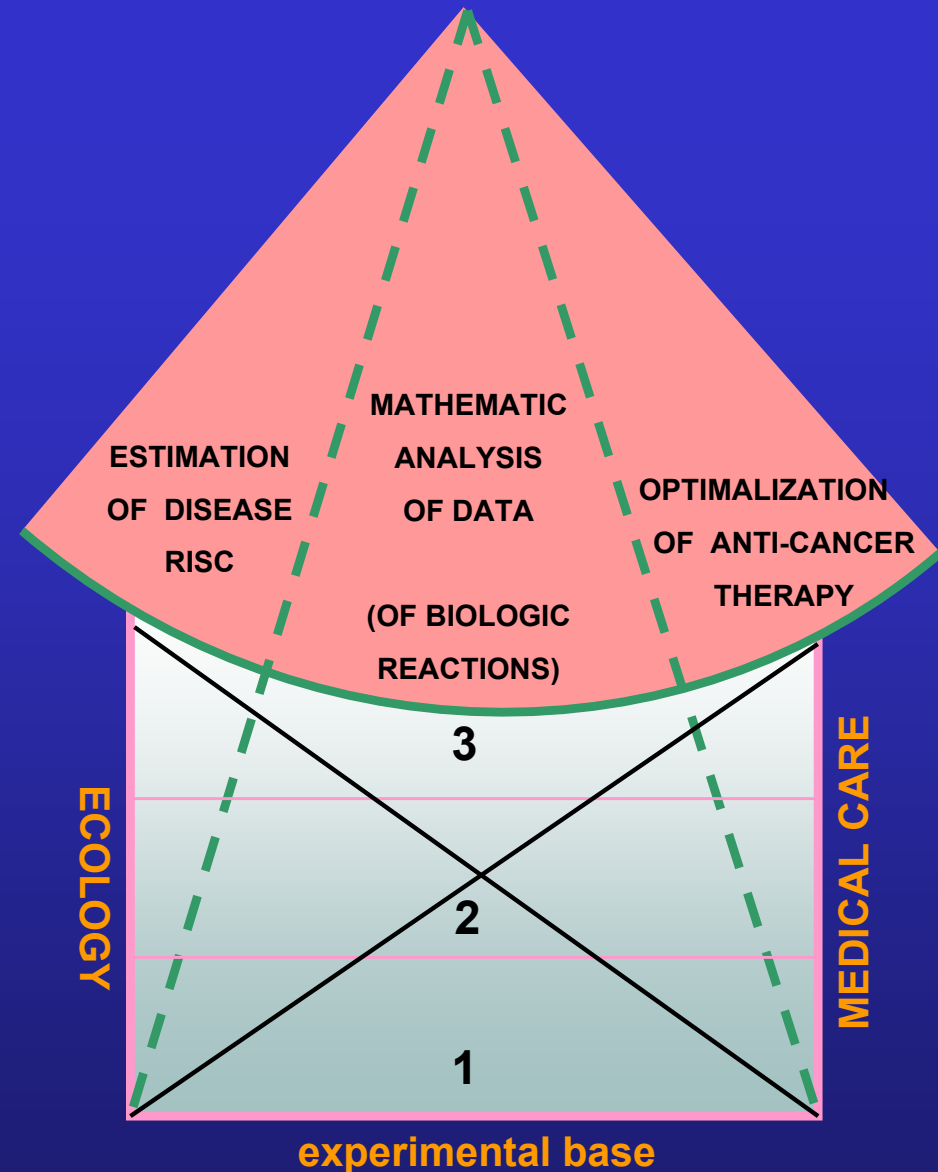
Combined Treatment with



TOXICOLOGY



ECOTOXICOLOGY ←



REGULATION OF CELL KINETICS
(PROLIFERATION, DIFFERENTIATION, APOPTOSIS)
1 - molecular level
2 - cellular level
3 - systemic level (organism, population, ecosystem)

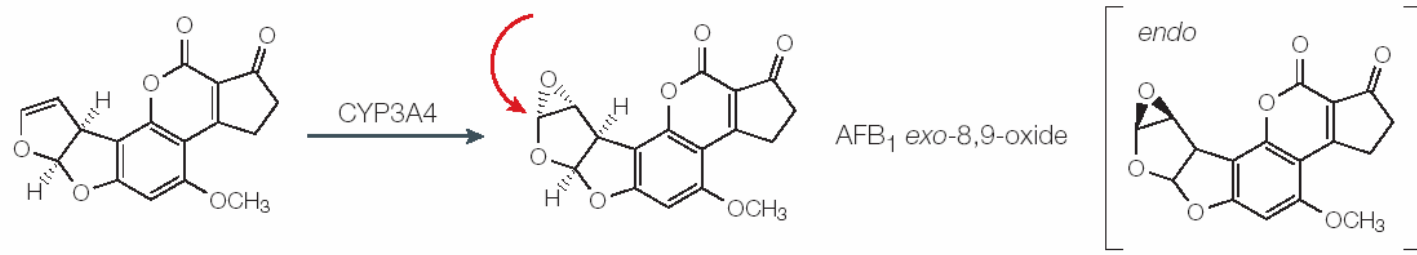
Indirect-acting carcinogens

- Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)
- Produced by incomplete combustion of organic materials
- Present in chimney soot, charcoal grilled meats, auto exhaust, cigarette smoke

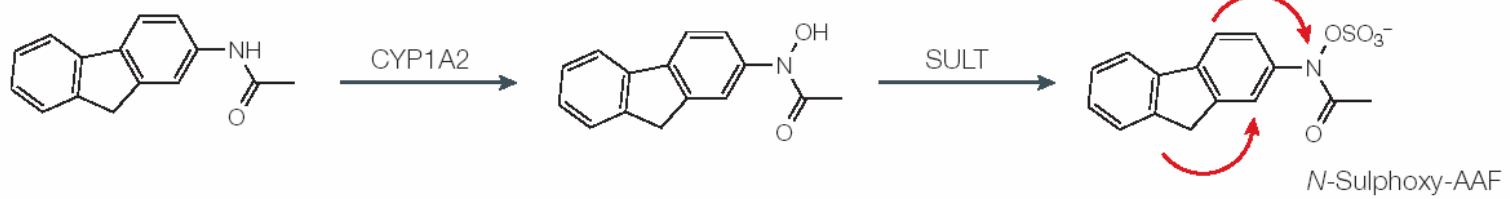
Human exposure to PAH

- Benzo(a)pyrene – 1300 tons per year into atmosphere
- In clean air – 0.02 ug/day inhaled
- In polluted air – 1.5 ug/day inhaled

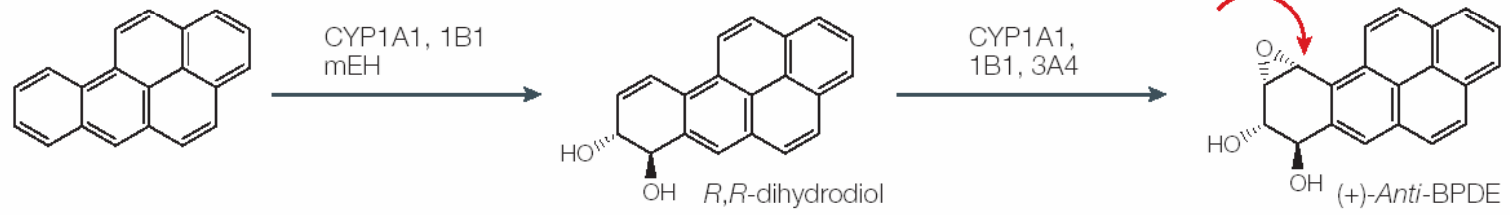
AFB₁



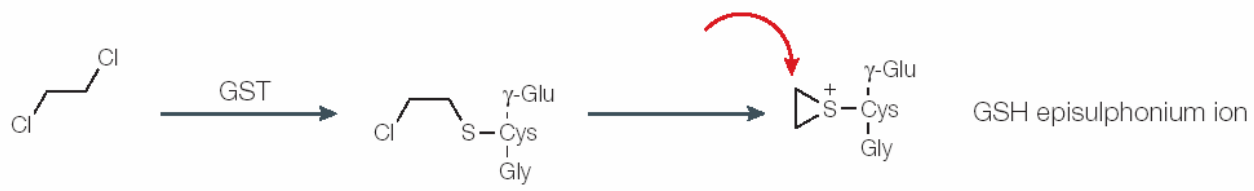
AAF



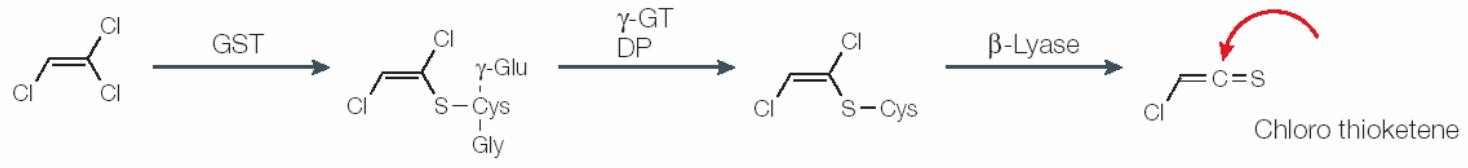
BP

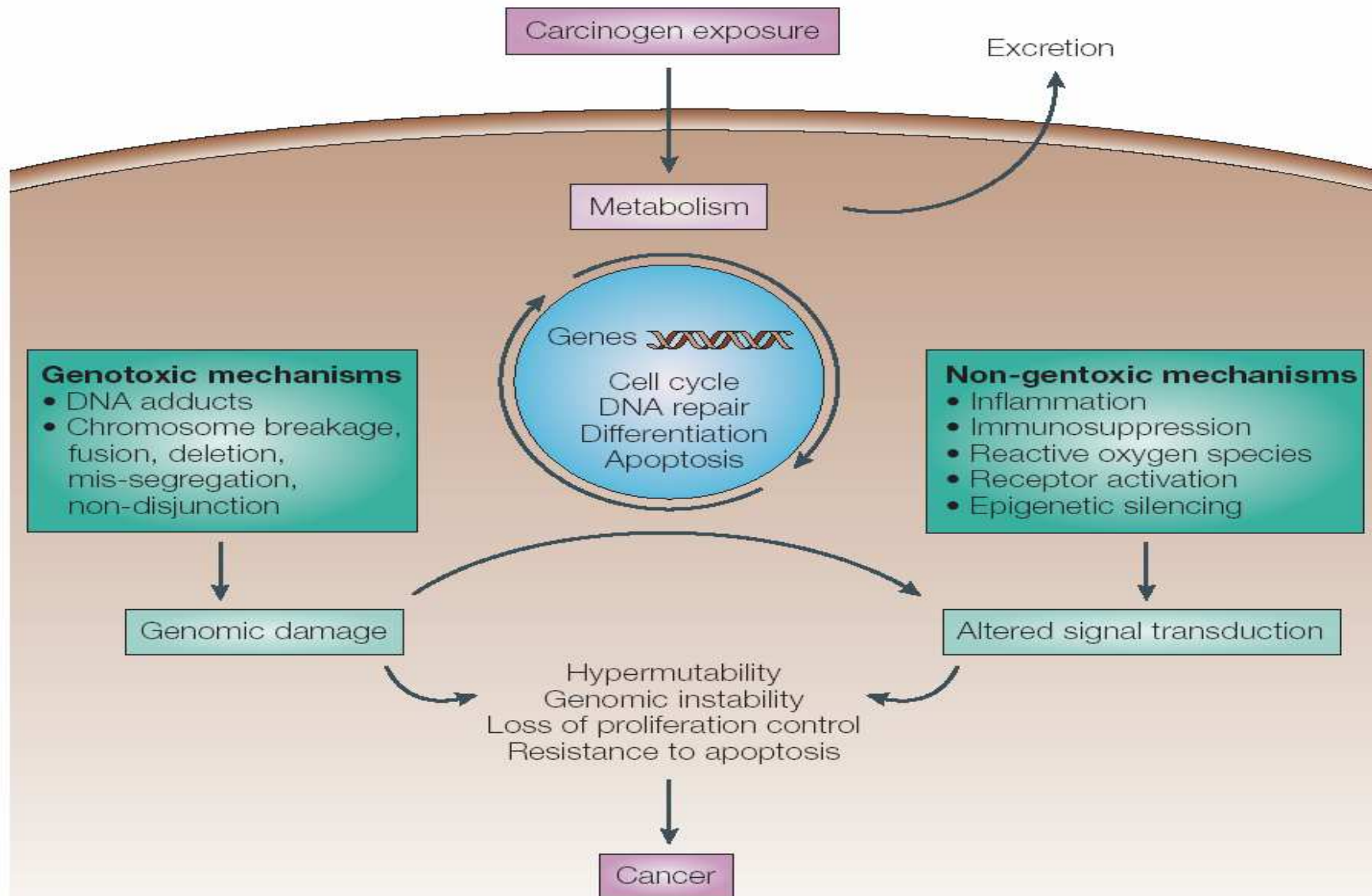


DCE



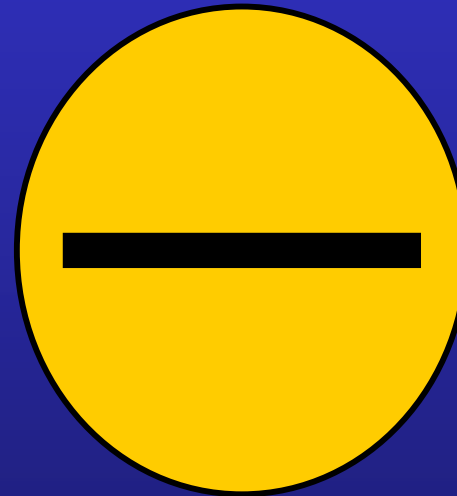
TCE



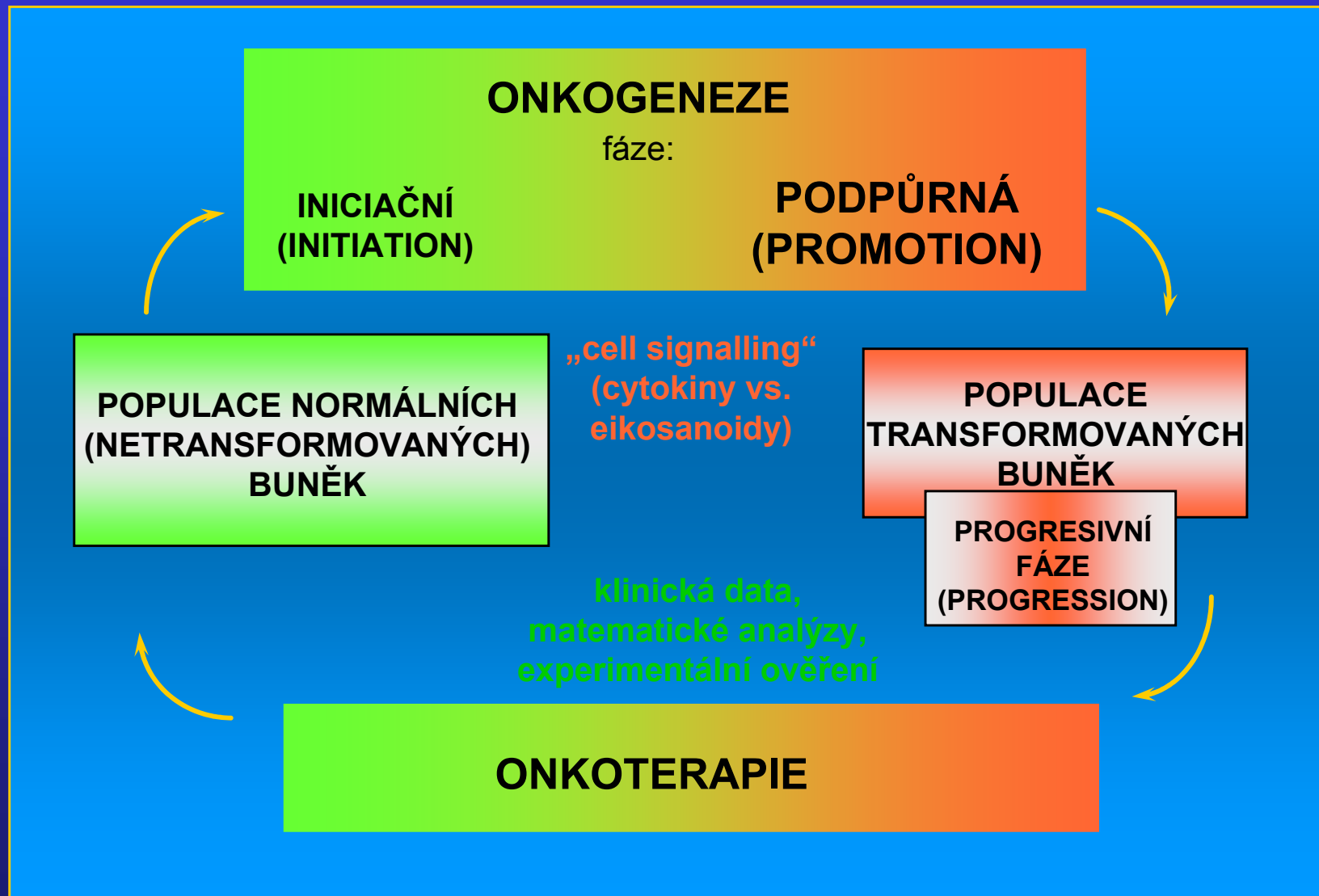


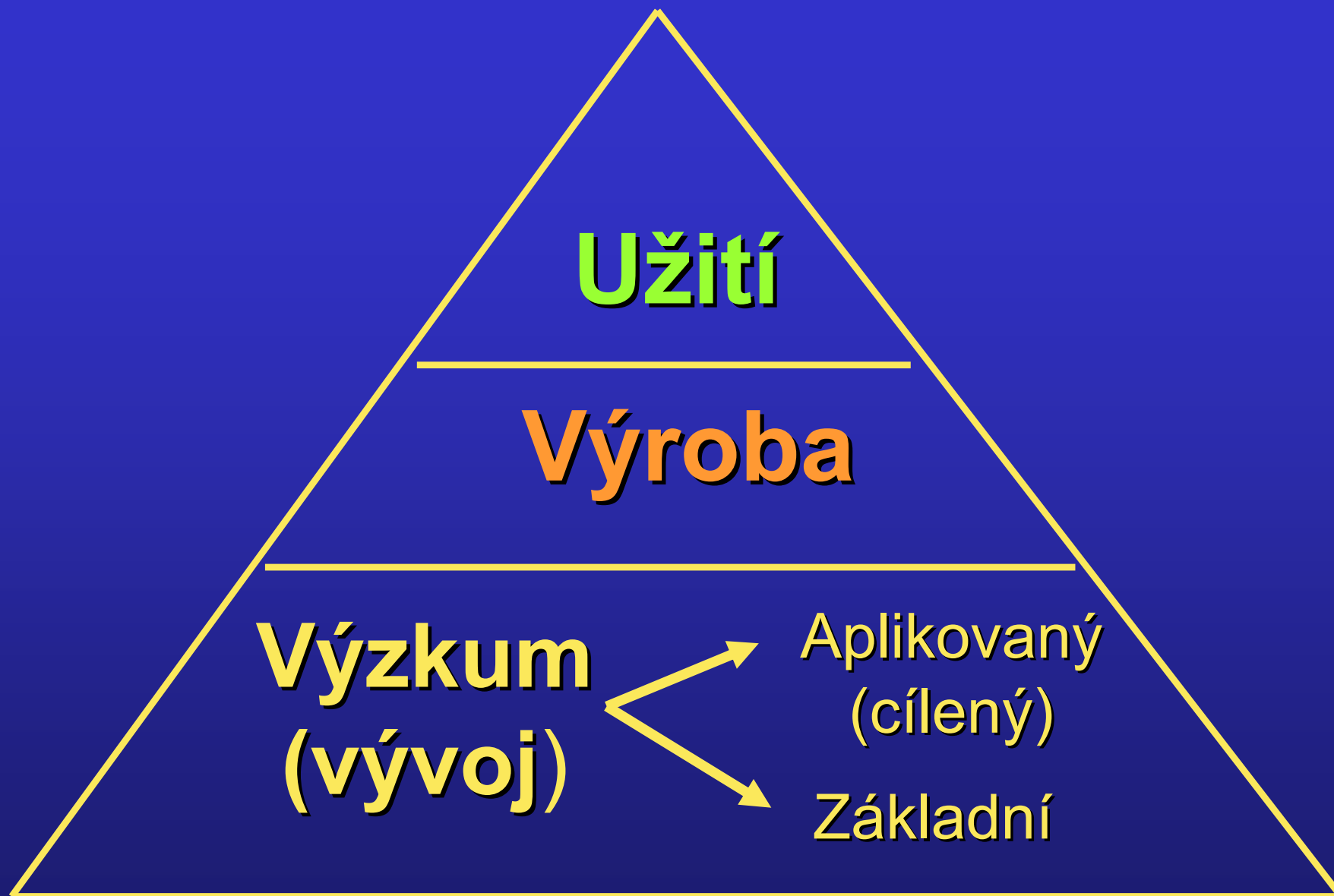
Homeostasis Generally

Outcome of Multiple Feedback Effects



VÝZKUMNÉ CÍLE A OBLASTI PRAKTICKÉHO VYUŽITÍ





Snaha o naplnění cyklu
a důsledky pro finanční zajištění

Používané metody a metodický potenciál (východiska)



Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

FACSCalibur

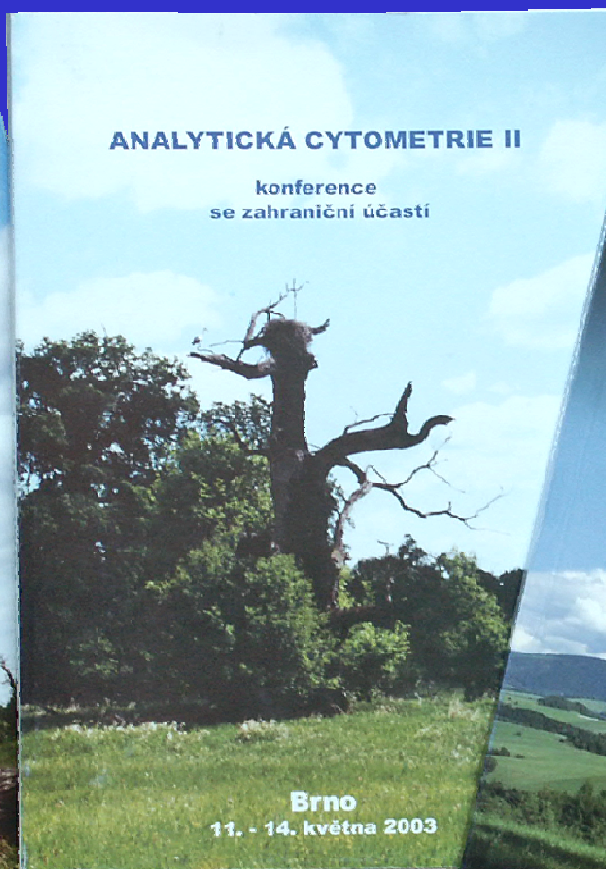
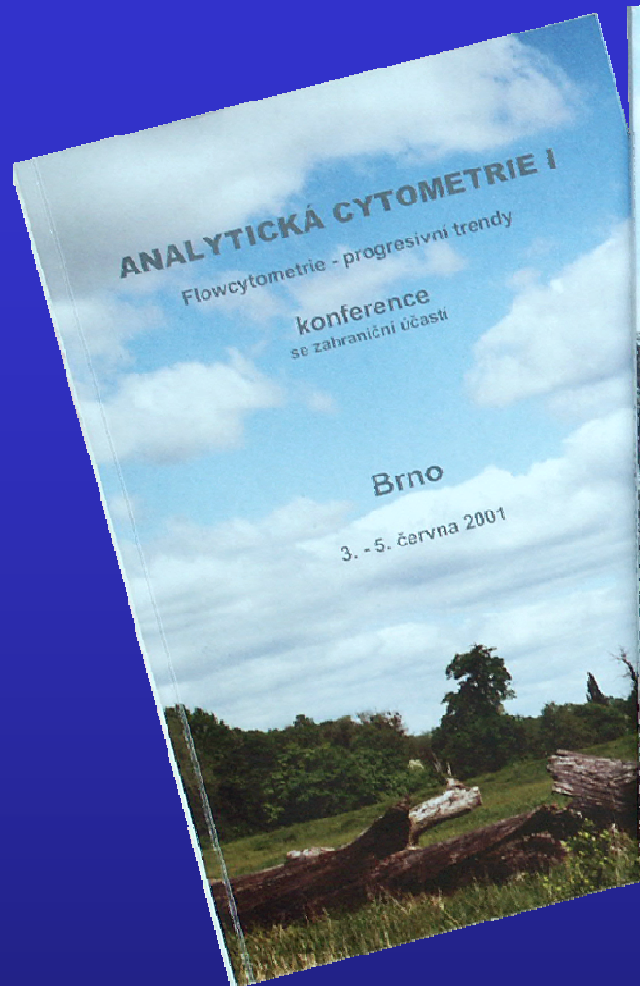


Flow cytometrie:

**jedna z hlavních
používaných
metodologií**

**Laboratory
of
cytokinetics**

**Institute of Biophysics, Brno
Academy of Sciences
Czech Republic**



Registrovaní
účastníci:

65

137

180

Zvaní zahraniční
odborníci:

0

3

7

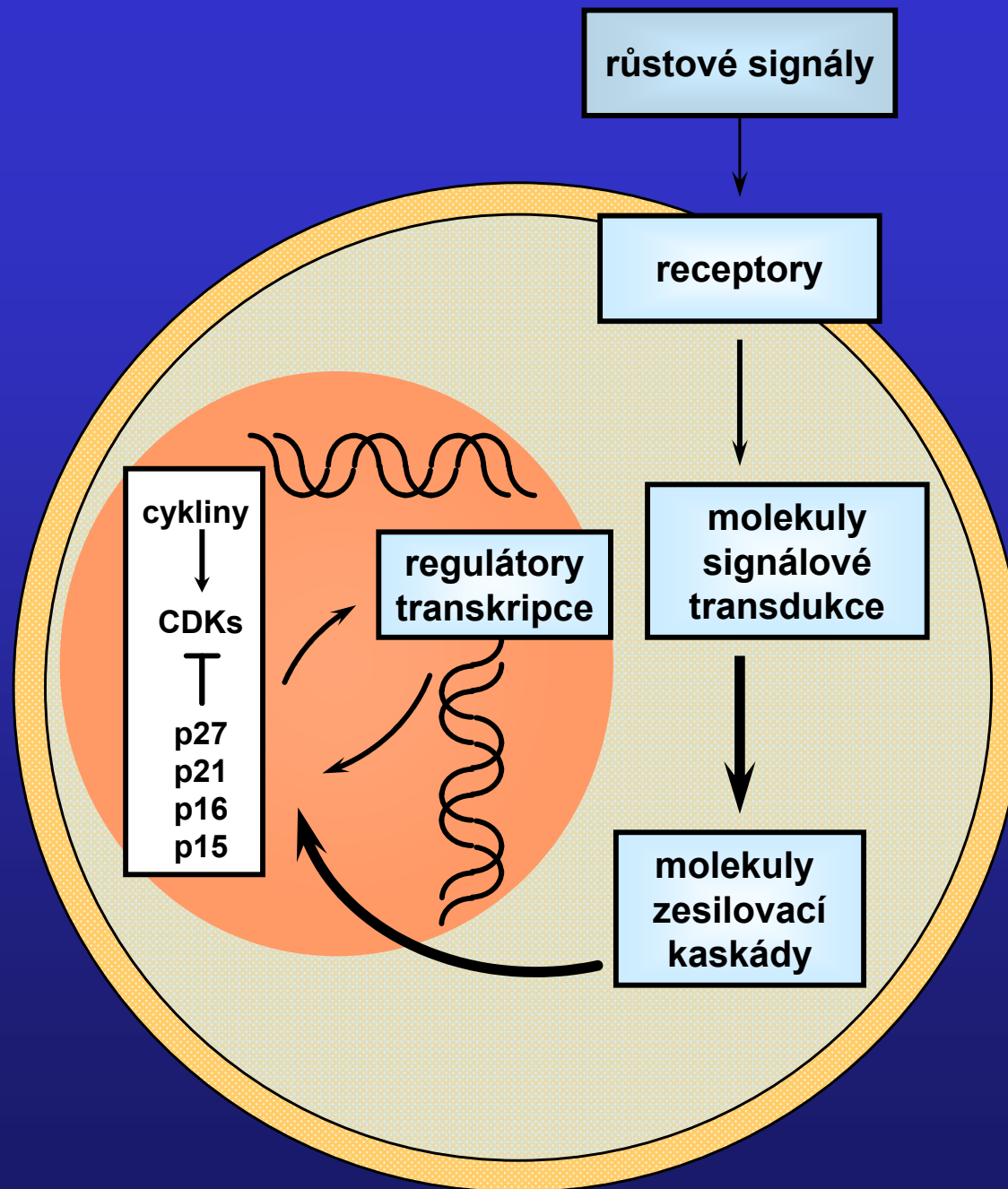
(Angl.)

**„Multifaktoriální povaha“
odpovědi
biologických (živých) systémů**

**na působení přirozených regulátorů „růstu“
(toxických látek, farmak)**



Biofyzikální ústav AVČR, BRNO



FAKTORY SPECIFICKÉ

-



růst



+

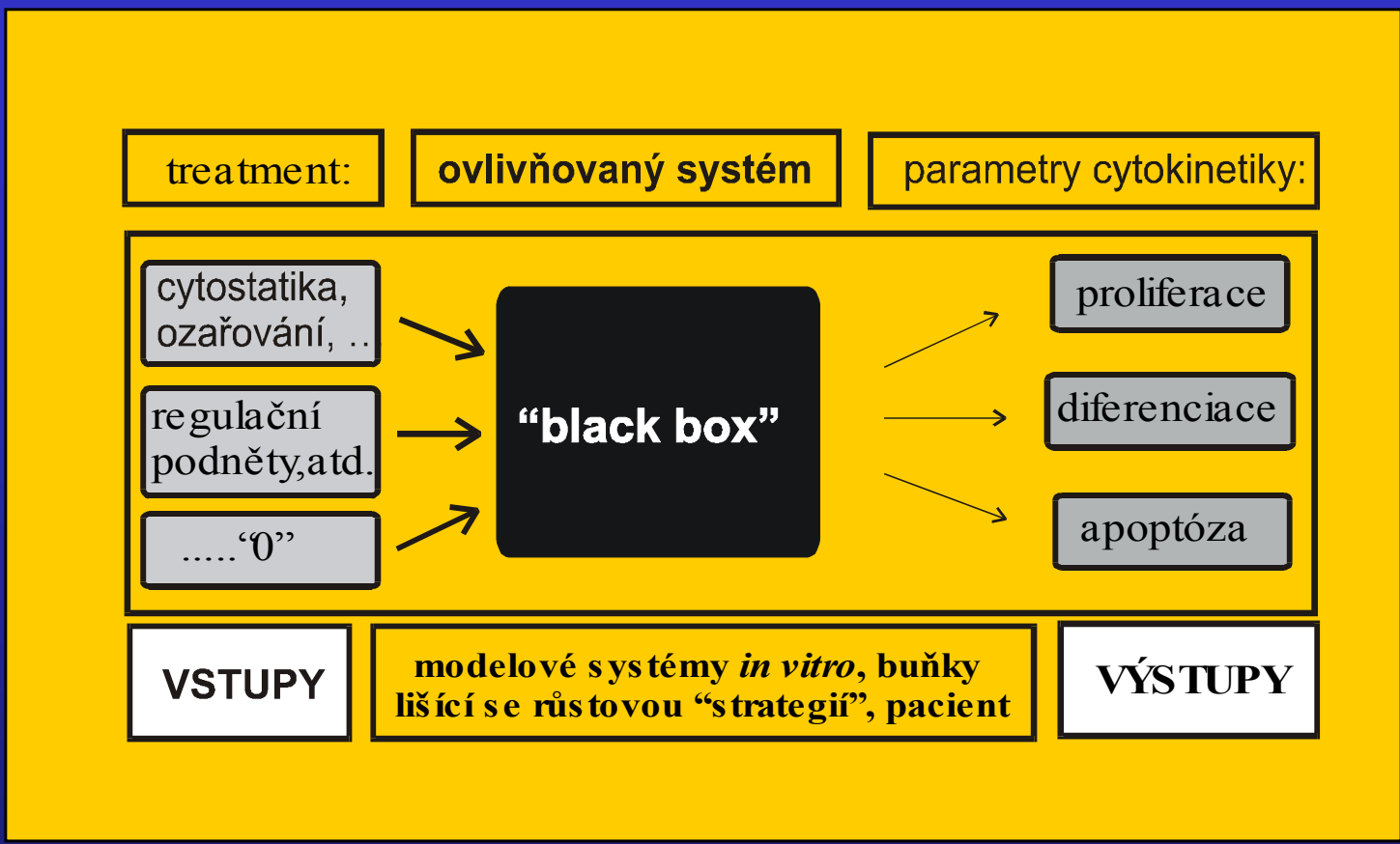
FAKTORY NESPECIFICKÉ

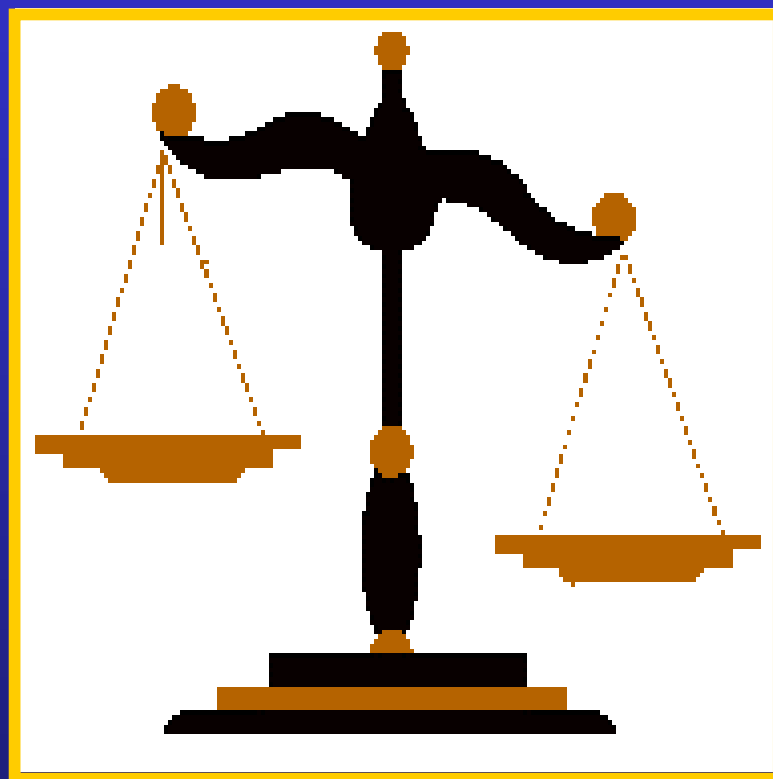
membrána



jádro
(DNA)

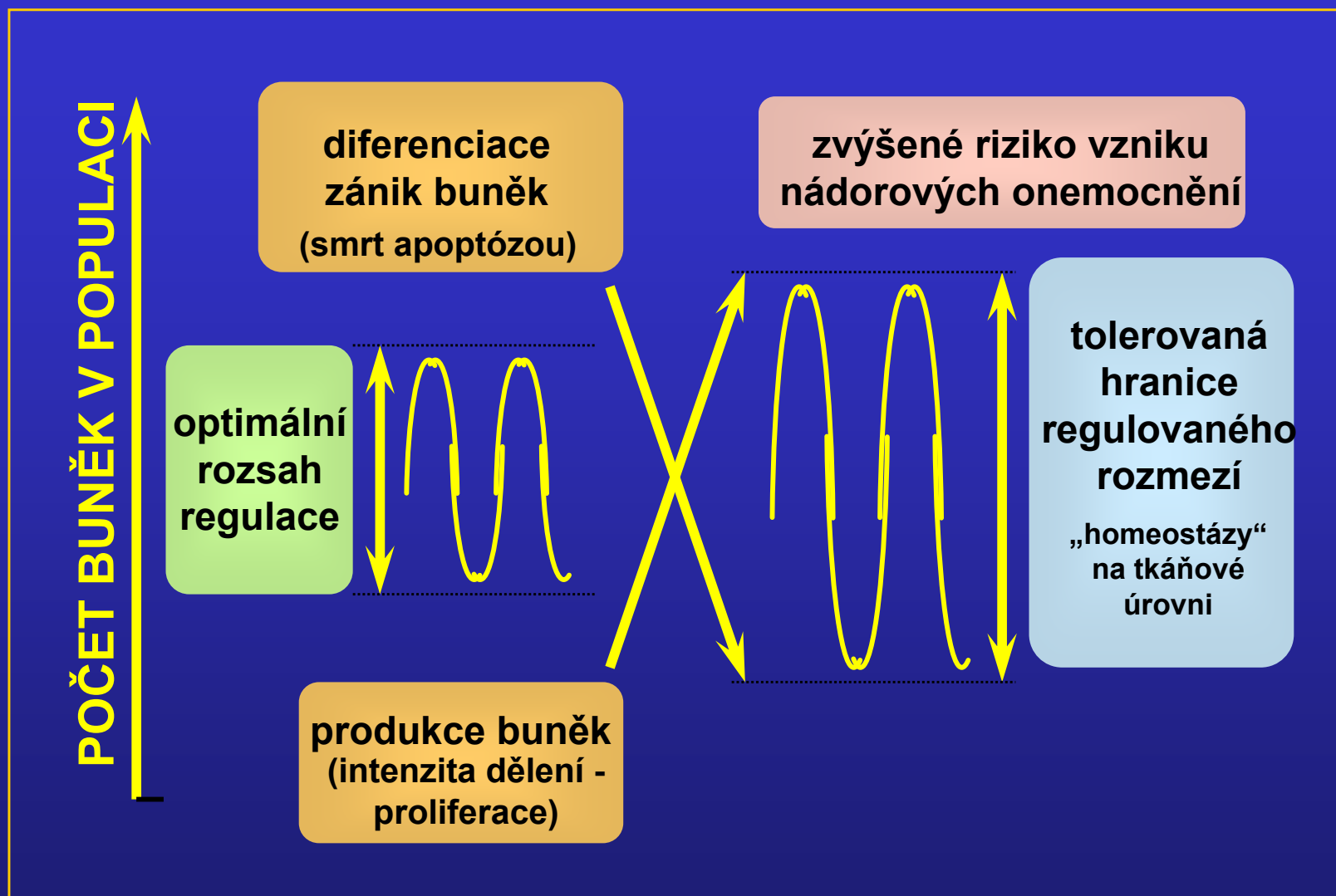
cytosol



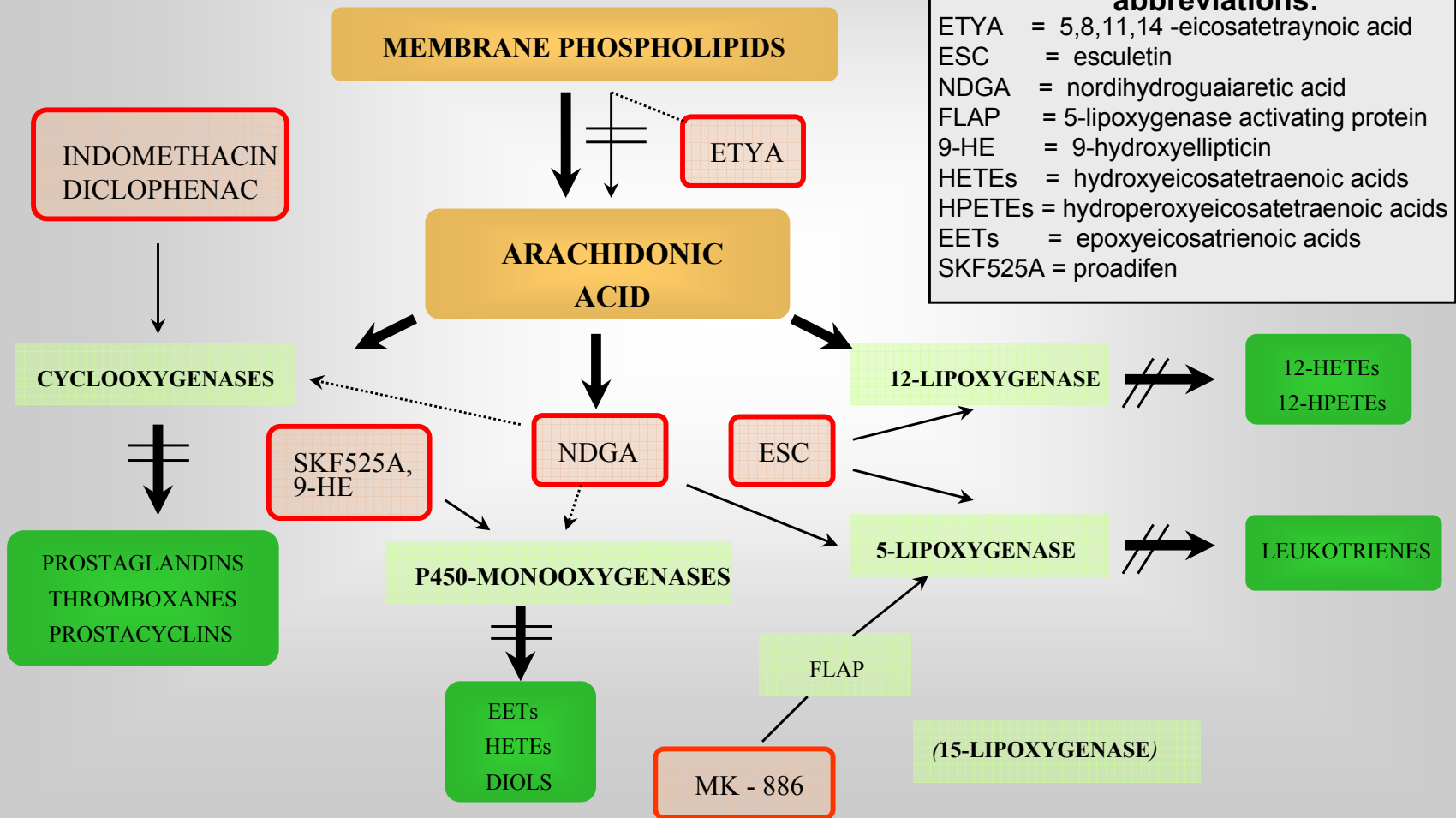


Laboratoř
čytokinetiky

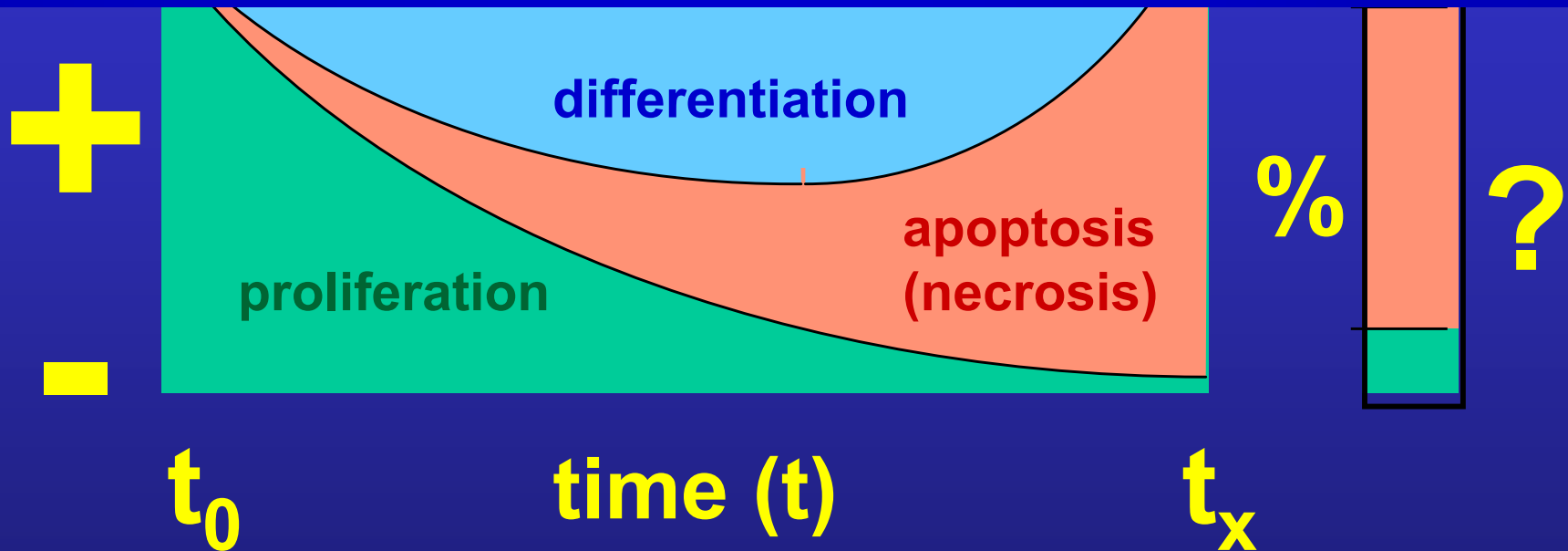
Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

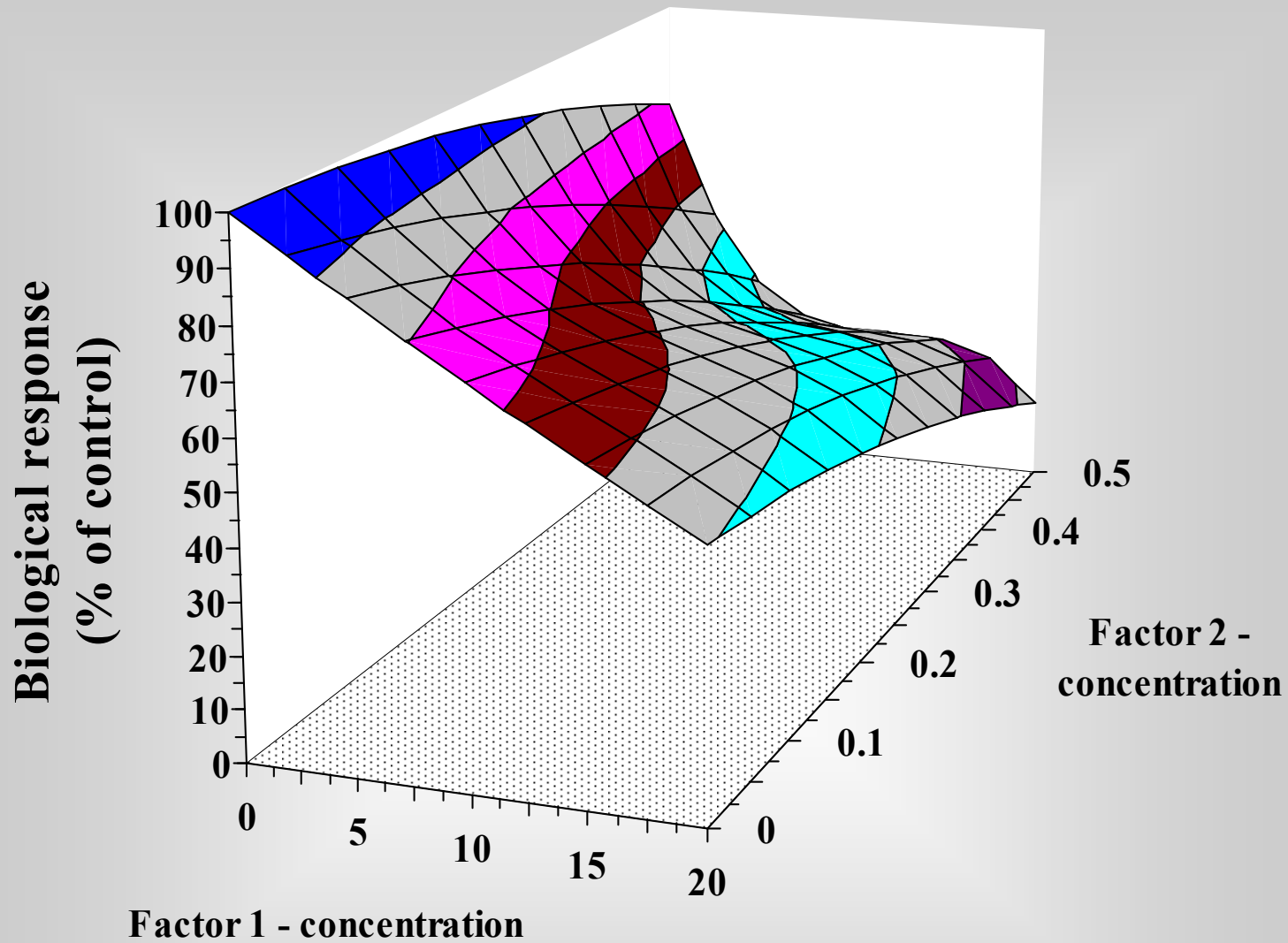


Arachidonic acid: metabolic pathways and its possible modulations



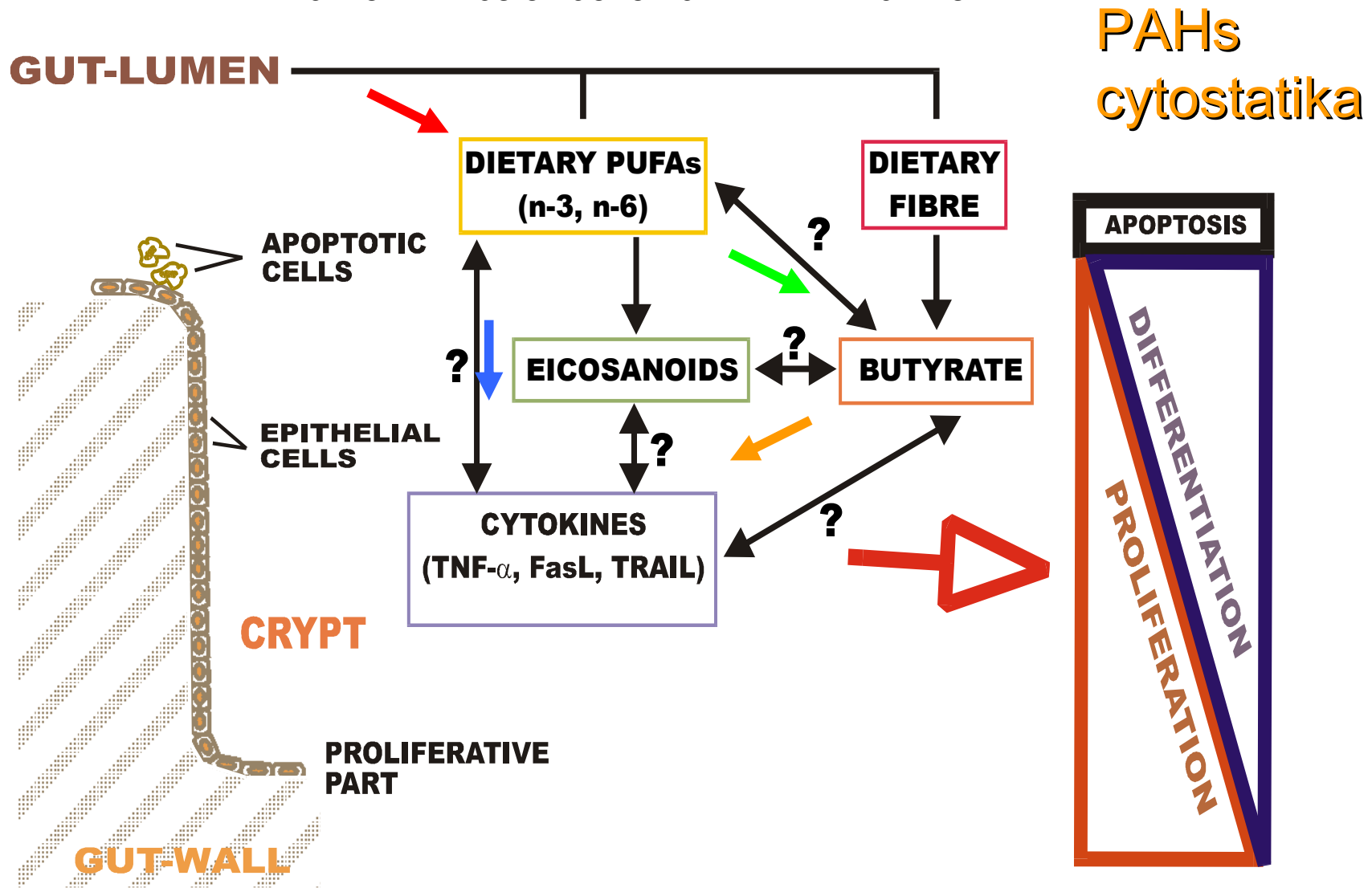
Základní přístup k postižení cytokinetiky: detekce hlavních parametrů (dynamiky) a jejich *ronováhy/nerovnováhy* v čase





An example of interactions of two factors (data from Eur. J. Pharmacol. 316, 349-357, 1996, see [Publications.](#))

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



Kovaříková M. et al. Eur J Cancer 2000
 Kovaříková 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

Vhodnost volby modelu

Studie *in vivo*

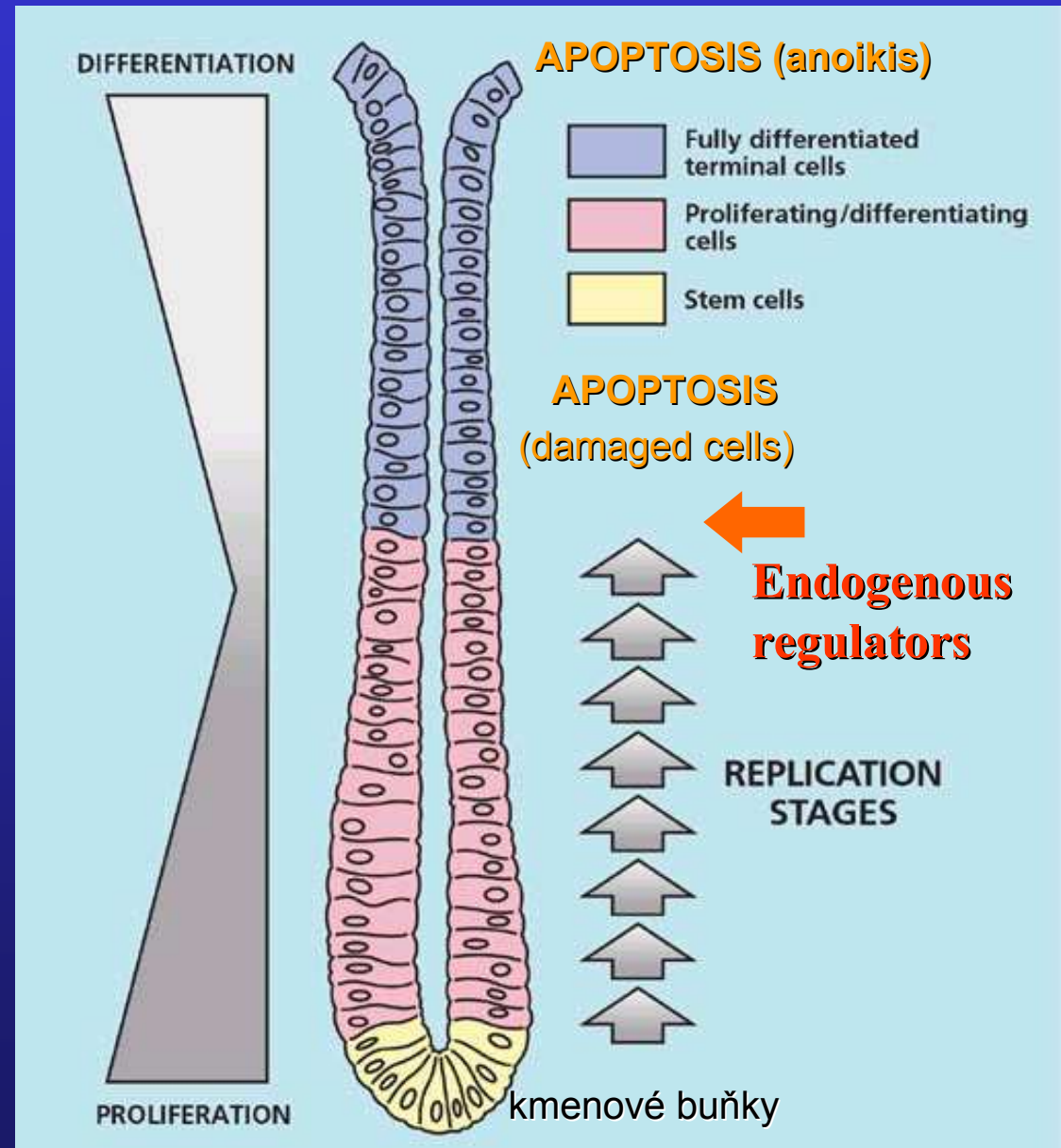
– poskytují informaci o celkové (systémové) odpovědi organismu, relativně méně vhodné ke studiu mechanismu účinků na subbuněčné úrovni

Studie *in vitro*

- nelze z nich mechanicky zobecňovat závěry pro systémy *in vivo* (chybí zapojení vyšších regulačních systémů), ideální pro studium mechanismů účinků na subbuněčné úrovni

EPITEL TLUSTÉHO STŘEVA (kolonu)

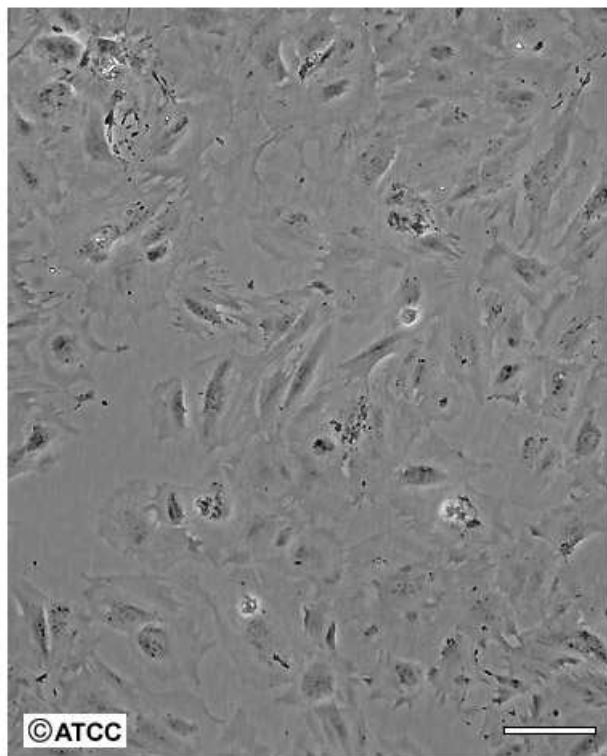
- ◆ kontinuálně se obnovující buněčné populace
- ◆ řada zásadních fyziologických funkcí
- ◆ dynamická rovnováha mezi přírůstkem buněk na bázi krypty (proliferace) a úbytkem (apoptóza-anoikis) na povrchu
- ◆ regulace endogenními faktory (hormones and cytokines), ale rovněž složkami diety přítomnými v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



Linie lidských epiteliálních buněk kolonu

FHC

normální
fetální střevo

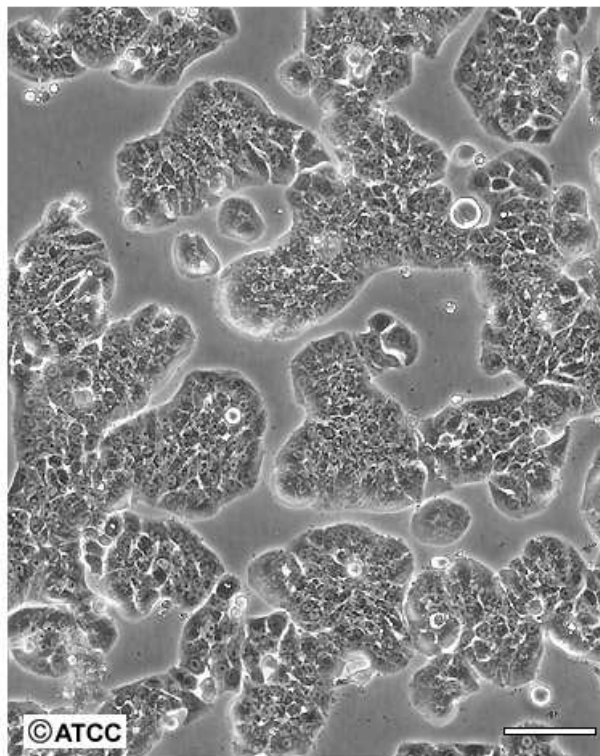


High Density

Scale Bar = 100µm

HT-29

diferencující
neinvazivní

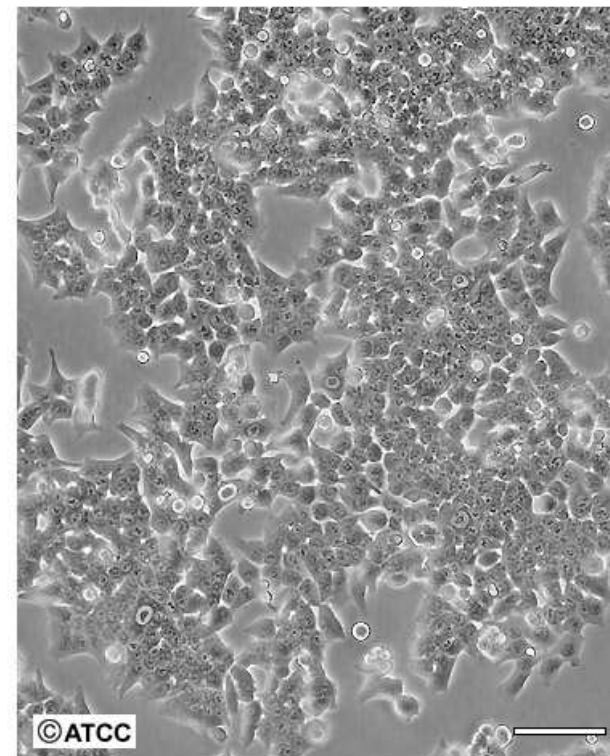


High Density

Scale Bar = 100µm

HCT-116

nediferencující
invazivní



High Density

Scale Bar = 100µm

Adenokarcinom kolonu

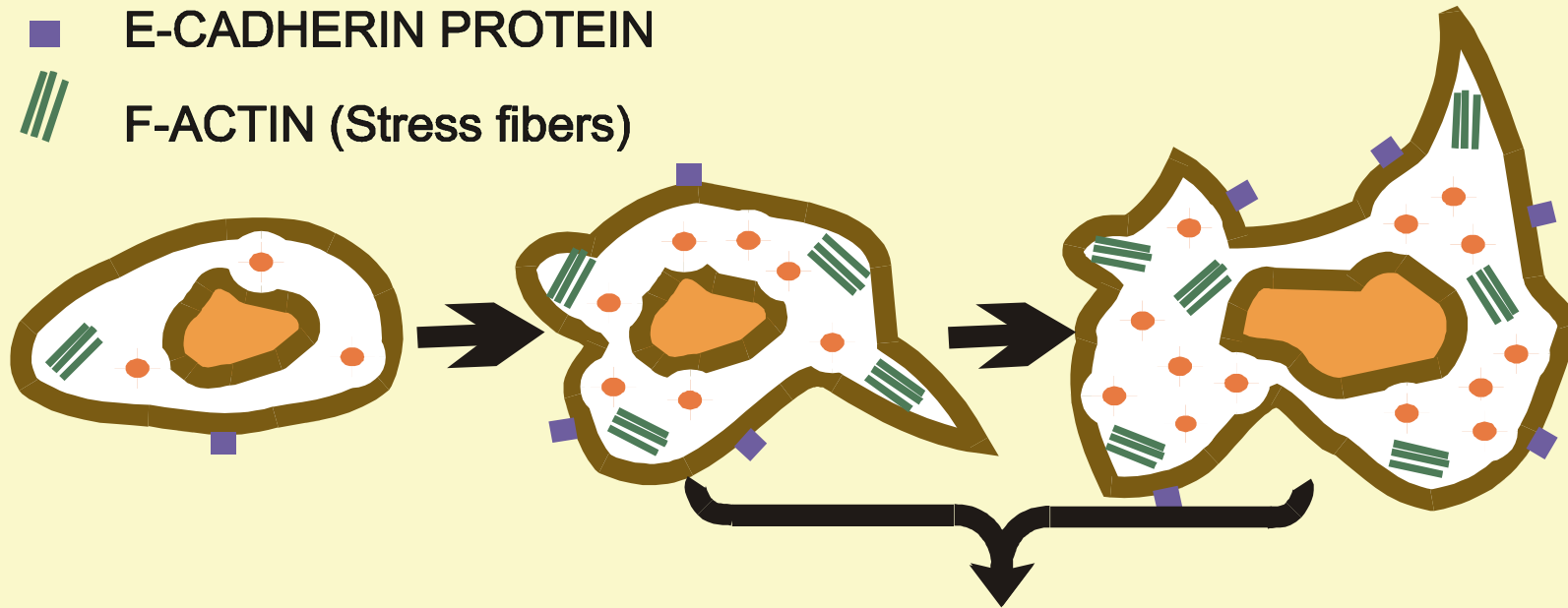
CaCo-2

SW 620 – lymf. uzlina

Znaky diferenciace indukované butyrátem

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

EXPRESSE KARCINOEMBRYONÁLNÍHO ANTIGENU



Proliferated cell

Growth inhibition & arrest in G1-phase of the cell

TIME OF BUTYRATE TREATMENT

0mM

1mM

3mM

5mM

Cytokiny rodiny TNF (tumor necrosis factor)

Ligand

TNF- α
Fas ligand (FasL)
TRAIL
(TNF-related apoptosis-inducing ligand)

Receptor

TNFR1, TNFR2
Fas (CD95, APO-1)
DR4, DR5, DcR1, DcR2

Výzkum zaměřen na

- ▶ úlohu v regulaci buněčné smrti epiteliálních střevních buněk a
- ▶ příčiny rezistence nádorových buněk

Aplikace v nádorové terapii

Zvýšení citlivosti buněk zásahy do signálních drah nebo kombinací s dalšími faktory

METODOLOGIE



CYTOKINETIKA

Detekce proliferace- regulace buněčného cyklu a zapojených proteinů,

diferenciace -buněčná morfolgie, 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

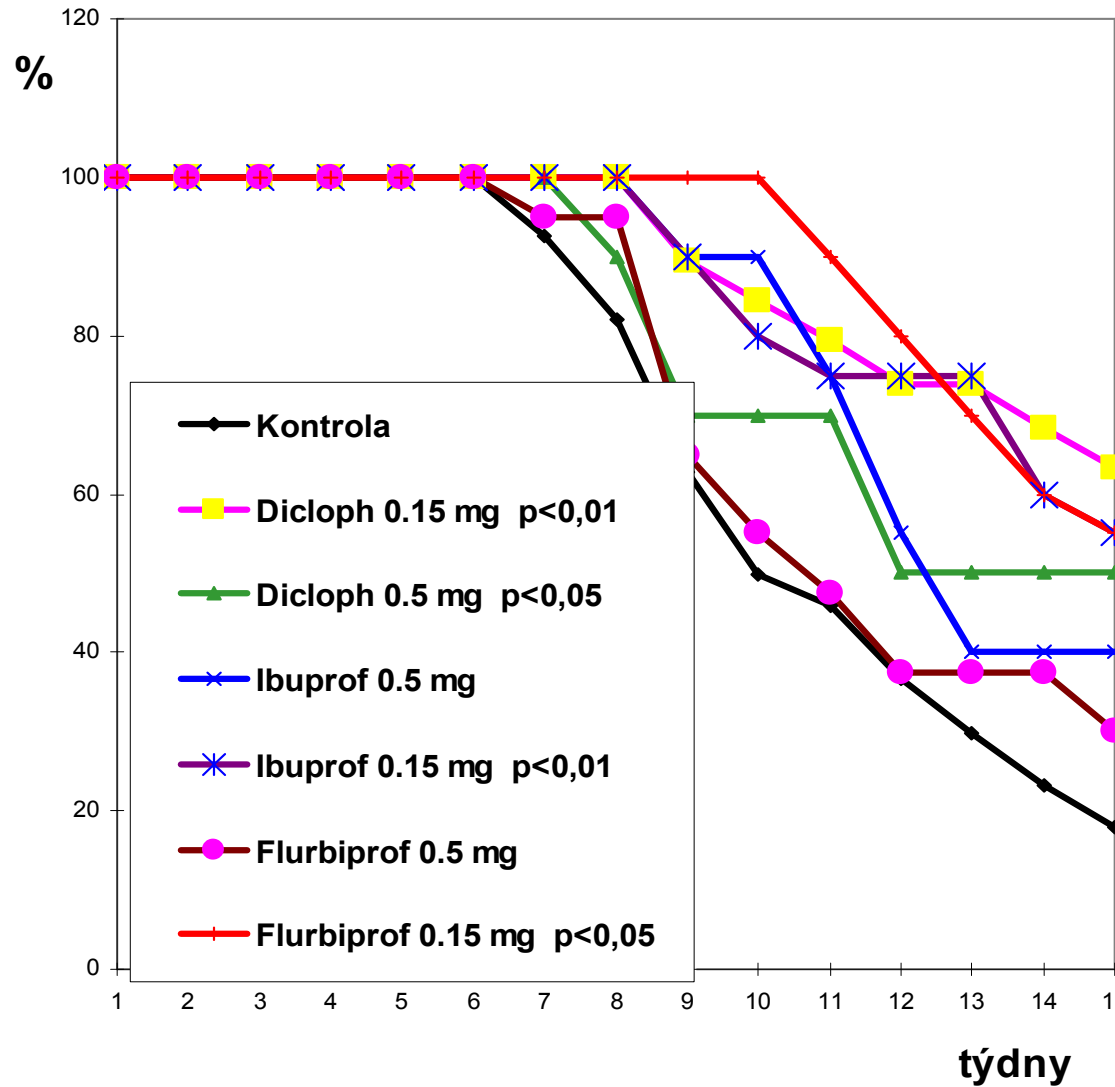
-změny spektra MK v bun. lipidech, „lipid packing“ v membránách, akumulace triglyceridů, detekce kardiolipinu, membránový potenciál

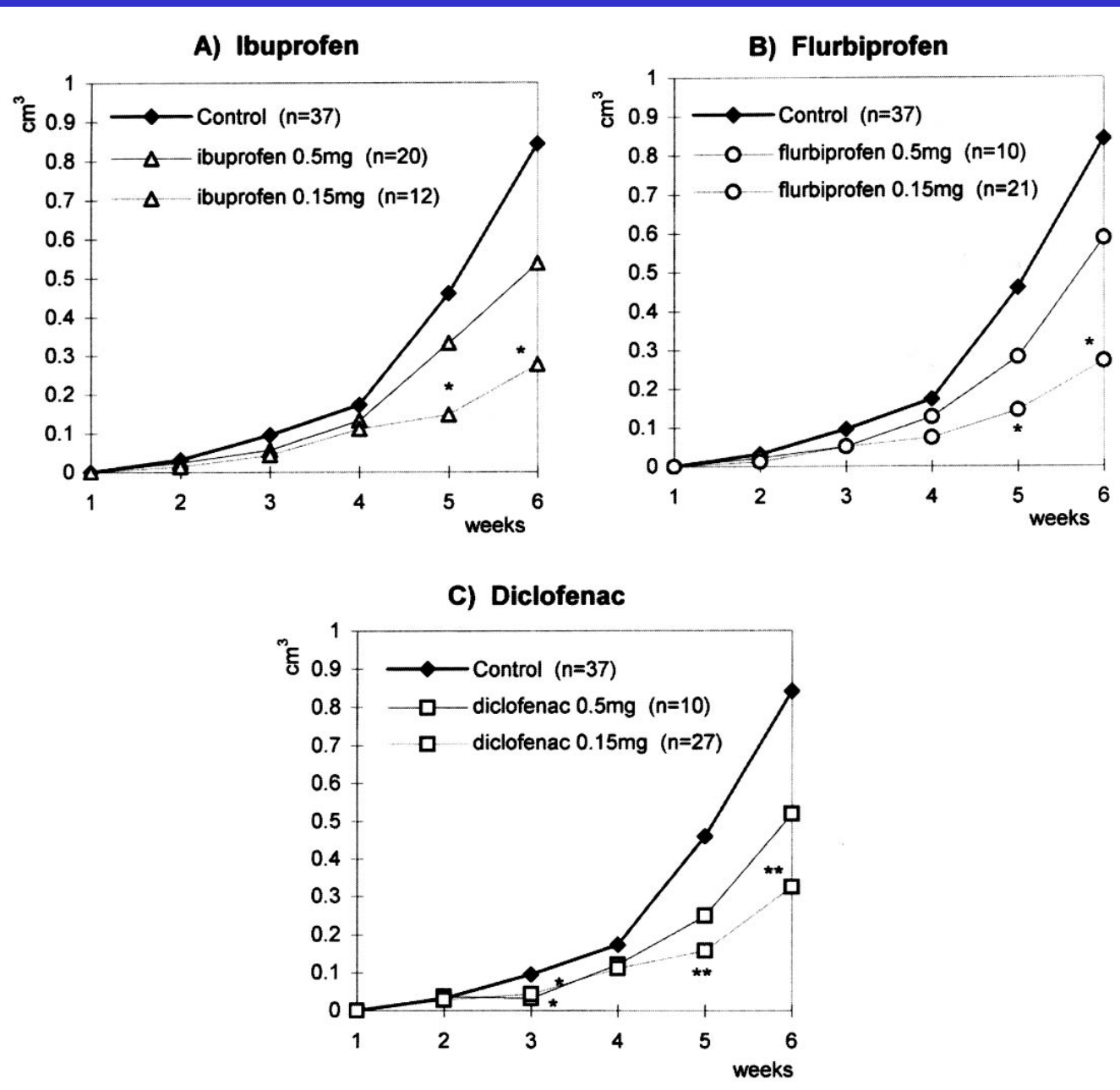
ZMĚNY OXIDATIVNÍHO METABOLISMU

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

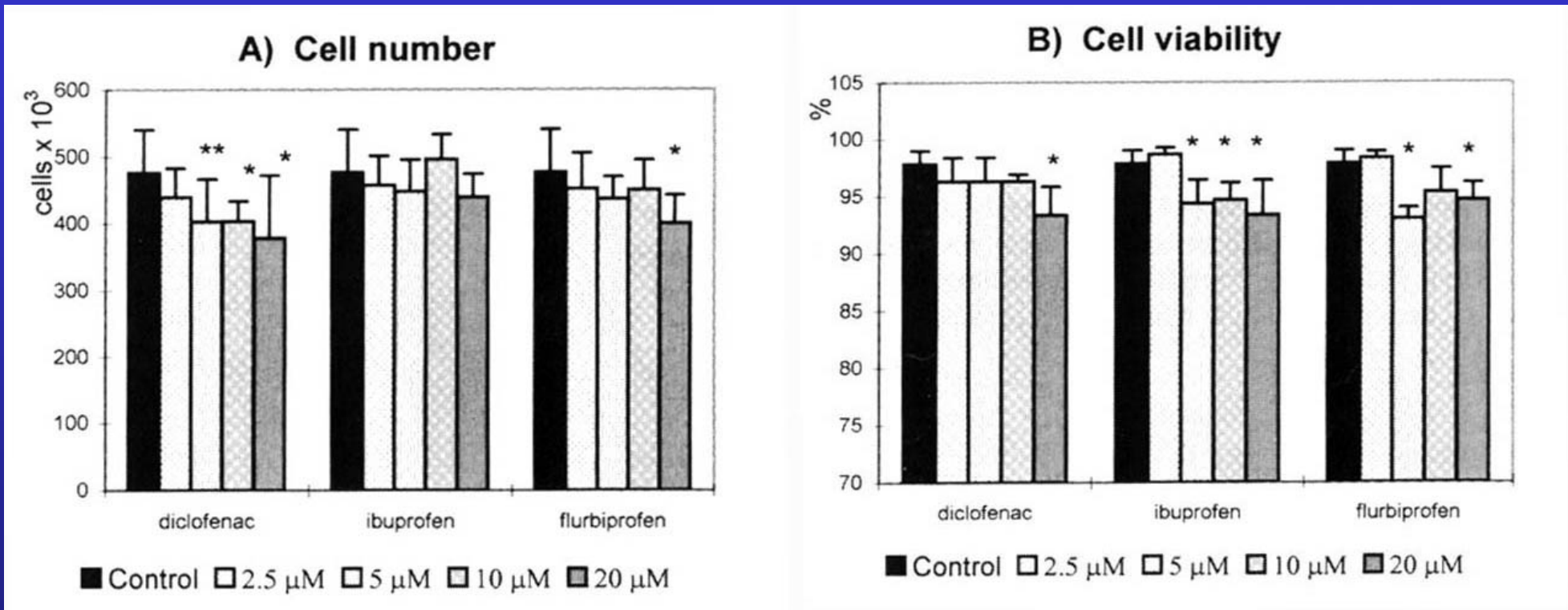
Využití moderních metod průtokové cytometrie, fluorescenční mikroskopie, fluorimetrie, spektroskopie, metod molekulární biologie...

PŘEŽÍVÁNÍ ZVÍŘAT s nádorem (G:5:113) PO TERAPII S INHIBITORY CYKLOOXYGENÁZ

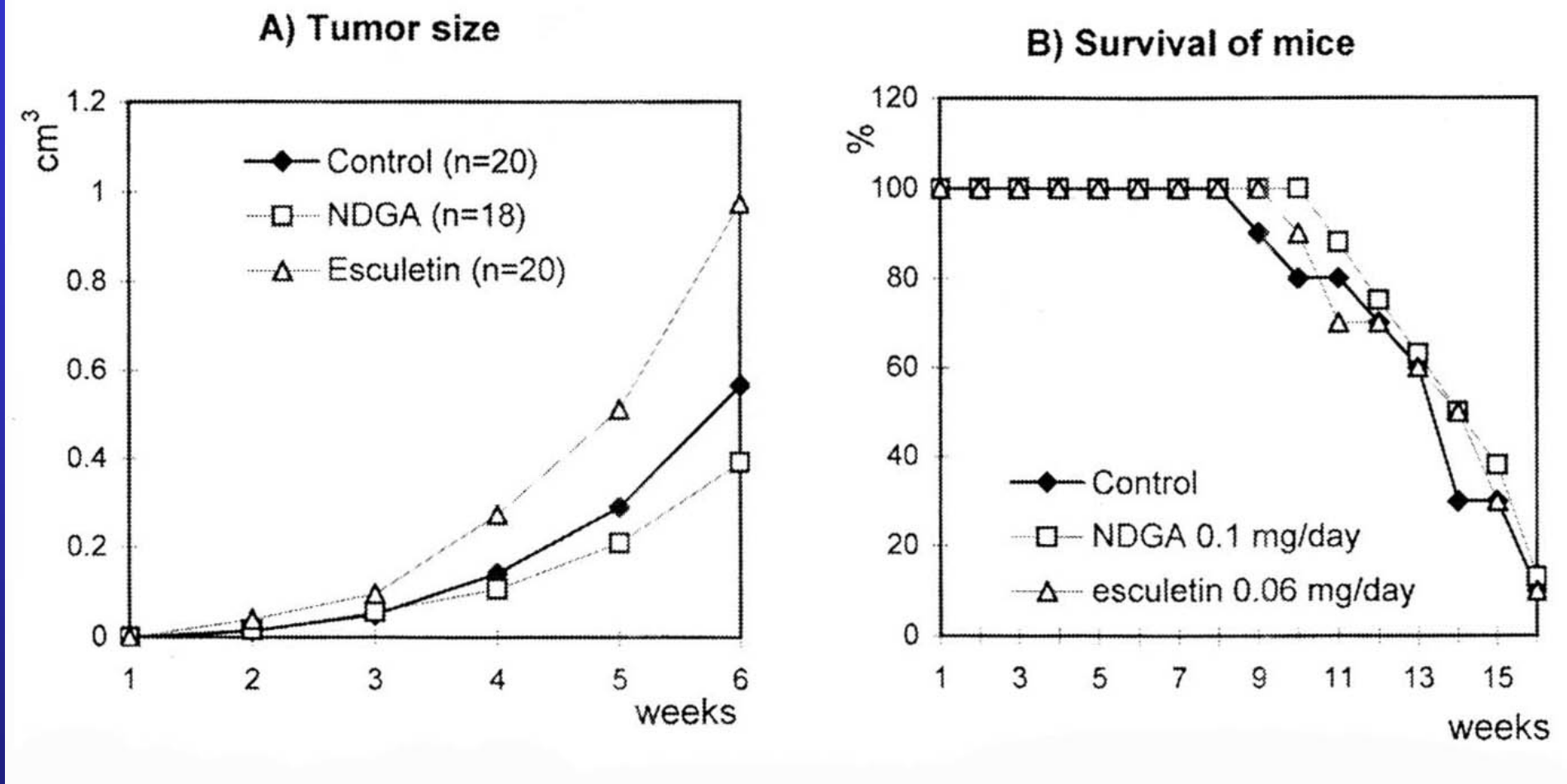




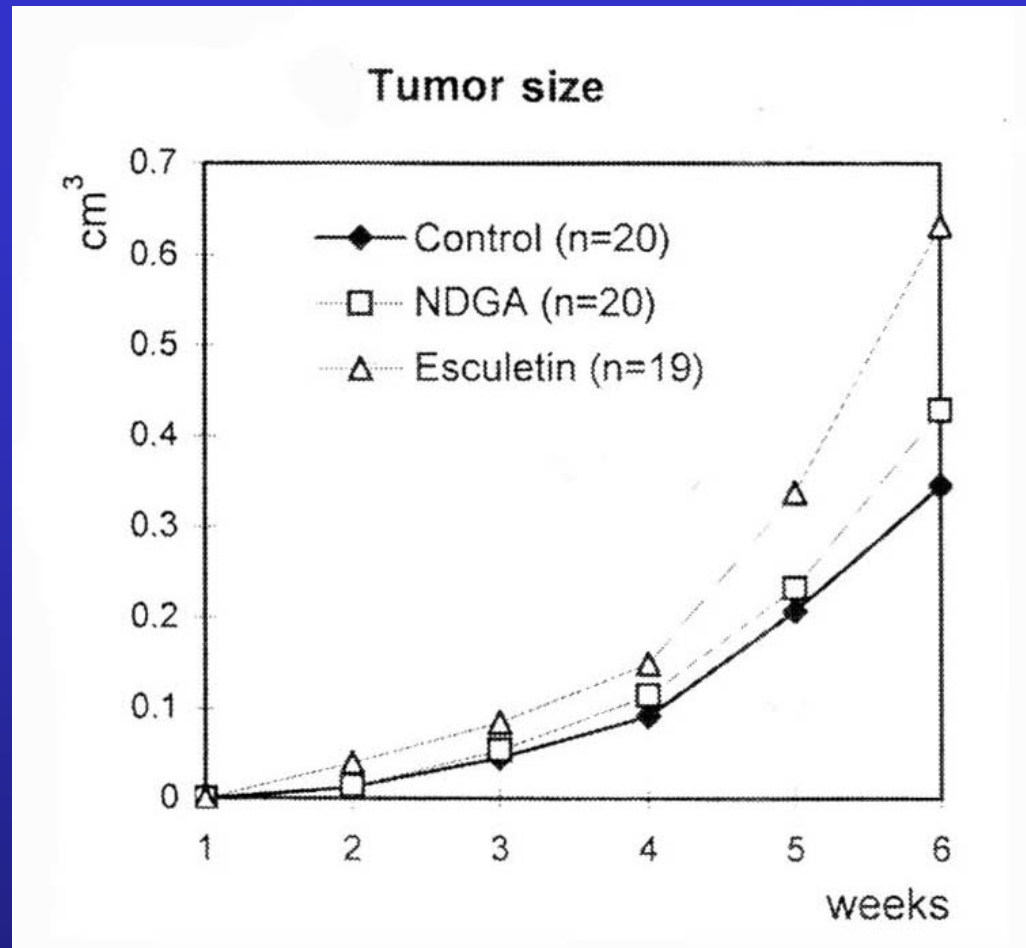
Růst fibrosarkomových buněk G:5:113 *in vivo* v syngenních myších ovlivněných nesteroidními protizánětlivými látkami. Pět dní po injekci buněk G:5:113 byla zvířata ovlivněna COX inhibitory a každý týden byla stanovena velikost tumoru.



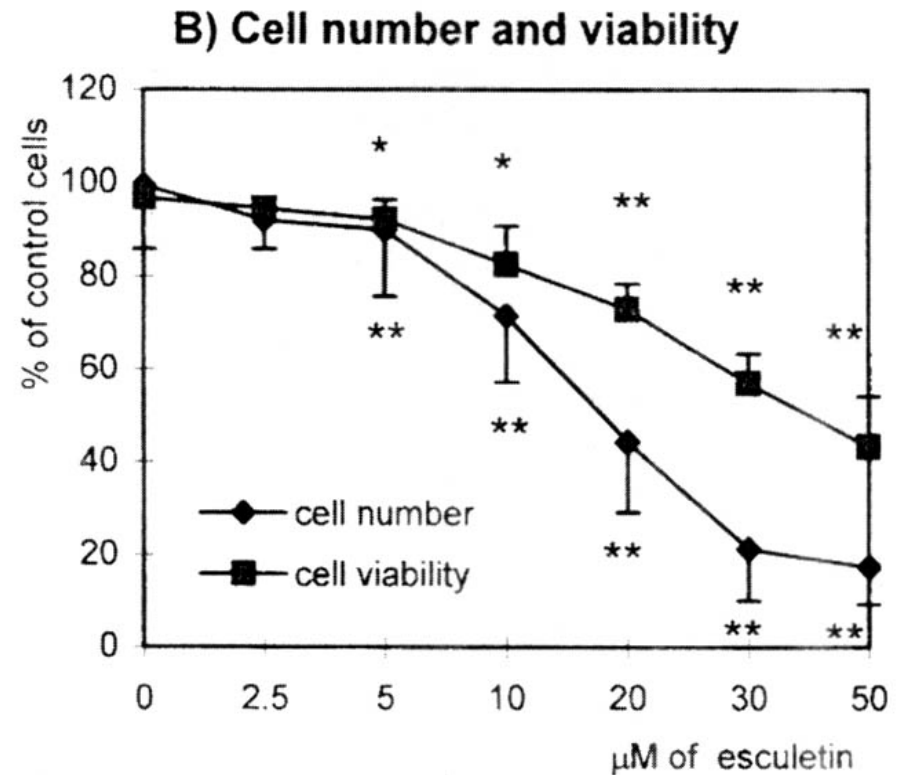
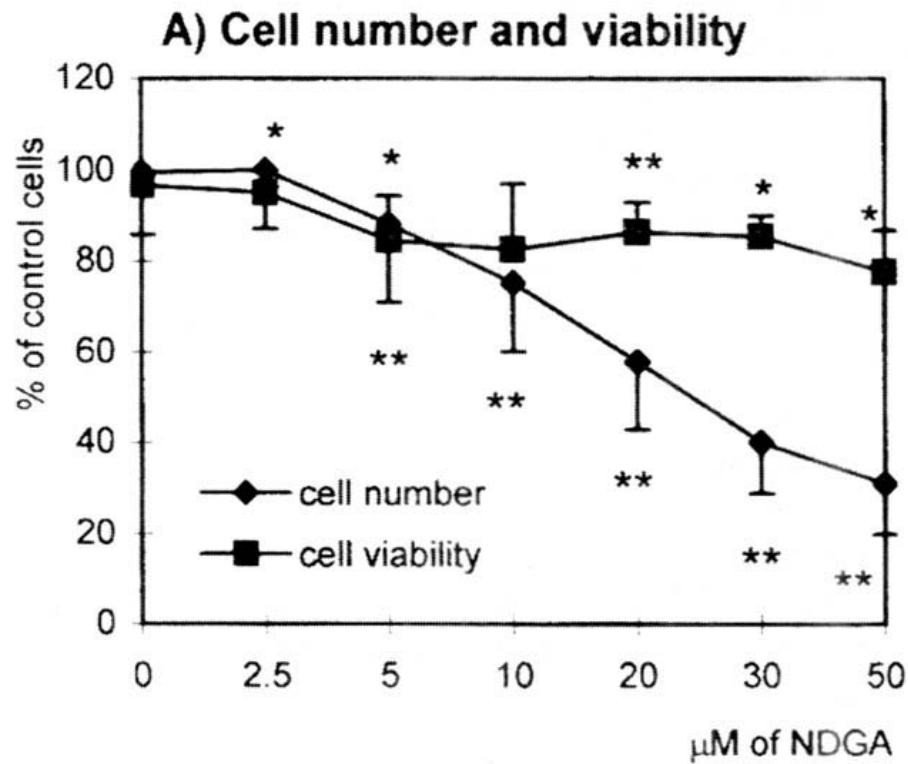
Nízké *In vitro* efekt nesteroidních protizánětlivých látek (inhibitorů COX) na proliferaci a viabilitu buněk G:5:113. Stanoveno po dvou dnech inkubace.



Růst buněk G:5:113 *in vivo* v syngenních myších a přežívání myši nesoucích tumor ovlivněných NDGA nebo esculetinem. Pět dní po injekci buněk G:5:113 byla zvířata ovlivněna LOX inhibitory a každý týden byla stanovena velikost tumoru, přežití zvířat bylo monitorováno každý den.



Studium tumorigenicity buněk G:5:113 *in vitro* ovlivněných NDGA a eskuletinem. Buňky byly ovlivněny 48 h inhibitory LOX, poté byly přeneseny s.c. do syngenních myší a bez další terapie byly ponechány do konce experimentu. Velikost tumorů byla stanovována týdně.



Významný efekt (LOX inhibitoru) NDGA a esculetinu na *in vitro* proliferaci buněk G:5:113 po 48 hodinovém působení.

buněčné linie (tkáňové kultury)

Laboratoř
cytokinetiky

Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

Buňky epiteliálního původu

Označení	Lokalizace	Organismus	Patologie
A2780	ovárium	člověk	karcinom, Pt - citlivé
A2780cis	ovárium	člověk	karcinom, Pt - rezistentní
A549	plíce	člověk	karcinom
BEAS-2B	plíce	člověk	tranformované virem
CaCo2	kolon	člověk	adenokarcinom
CCL-64	plíce	norek	normální
CH-1	ovarium	člověk	karcinom, Pt- citlivé
COR-L23	plíce	člověk	karcinom
COR-L23/CP3	plíce	člověk	karcinom, Pt - rezistentní
COR-L23R	plíce	člověk	karcinom, doxorubicin - rezistentní
CT26	kolorectum	myš	karcinom
E10	plicní	myš	normální
FHC	kolon	člověk	embryonální
H4IIELuc	játra	krysa	karcinom

Buňky epiteliálního původu

Označení	Lokalizace	Organismus	Patologie
HaCaT	epidermis	člověk	normální
HeLa	cervix	člověk	karcinom
Hepa1	játra	myš	karcinom
HepG2	játra	člověk	karcinom
HT-29	kolon	člověk	adenokarcinom
HT115	kolon	člověk	adenokarcinom
HUVEC	endotel	člověk	embryonální
LEP	plíce	člověk	embryonální (fibroblasty)
MCF-7	prs	člověk	adenokarcinom
MDA-MB-231	prs	člověk	adenokarcinom
MDCK	ledvina	pes	normální
MVLN	prs	člověk	adenokarcinom
SKOV-3	ovarium	člověk	adenokarcinom, Pt – primárně rezistentní
T47D	prs	člověk	karcinom
WB-F344	játra	krysa	normální

Buňky mezenchymálního původu

Označení	Lokalizace	Organismus	Patologie
G5:113		myš	fibrosarkom
HL-60	krev	člověk	leukemie
IMM	nervové		imortalizované
Jurkat	krev	člověk	leukemie (lymfoidní)
K562	krev	člověk	leukemie (erytroidní)
MOLT-4	krev	člověk	leukemie (lymfoidní)
ML-1	krev	člověk	leukemie (myeloidní)
NB4	krev	člověk	leukemie (myeloidní)
U937	krev	člověk	leukemie (monocytární)
V79	fibroblasty	křeček	normální (fibroblasty)
WEHI	krev	myš	leukemie (lymfoidní)

Metody používané v laboratoři cytokinetiky BFÚ AV ČR, Brno

Legenda: FACS - průtoková cytometrie

FM - fluorescenční mikroskop

SM - světelný mikroskop

WB - western blotting

FM - fluorimetrie (FluoStar)

CM - kolorimetrie (FluoStar nebo Elisa reader)

LM - luminometrie (VUVEL, Lojek)

PAGE - polyakrylamidová elektroforéza

RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction

RG - radiografie

ELFO – agarosová elektroforéza



**Laboratory
cytokinetics**

**Institute of Biophysics, Brno
Academy of Sciences
Czech Republic**

**Oddělení živočišné fyziologie a imunologie
Ústav experimentální biologie, PřF MU**

**Možnosti vypracování bakalářských a diplomových prací
Postgraduální studium**