

Lipidové komponenty

význam pro zachování homeostázy,
zdraví a regeneraci organismu:
(Možnosti modulace II)

A. Kozubík

Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i., (*Oddělení cytokinetiky*)

Ústav experimentální biologie, PřF MU

(*Oddělení fyziologie a imunologie živočichů*)

Brno

VYBRANÉ VÝSLEDKY



VÝZNAM A NĚKTERÉ MOŽNOSTI MODULACE LIPIDOVÉHO METABOLISMU

Důsledky změněného potravního režimu

Úroveň:
Org., tkáň, buněčná, subbuněčná



POTRAVA: Základní podmínka existence,
(zdroj živin, základ veškerých regulací)

Významné je

Složení (kvalita)

Množství (kvantita)

Časové rozložení (frekvence příjmu)

Krasy:

Střídání 24 h hladovění a následné realimentace

Intermitentní krmení

(Pokusy z 50.-60. let 20.stol.)



Změny regulace CNS, aktivace nespecifických mechanismů adaptace (osy hypofýza-nadledvinka)



Omezení pohybové aktivity

Periodická hyperfagie

Adaptace trávicího ústrojí



- Hypertrofie žaludku
- Adaptace enzymových systémů ve střevní sliznici
- Zvětšení resorpční plochy střeva

Zvýšená resorpce tuků a glycidů

Periodicky zvýšený přívod živin tkáním, včetně zvýšeného přívodu glukosy portální krví do jater

Vysokoglycidová dieta!

Zvýšené vyplavování insulinu z buněk

Zvýšená aktivita jaterní hexokinasy, akcentovaná fosforylace glukosy na glukosa-6-fosfát

Adaptace glycidového a lipidového metabolismu



Celkově zvýšená utilizace GLUKOSY
Zvýšená syntéza GLYKOGENU
Zvýšená konverze glycidů na TUK

- a) Zvýšená růstová a migrační aktivita explantovaných tkání in vitro
- b) Zvýšená repopulační aktivita buněk obnovných křetvorných populací u adaptovaných zvířat (in vivo)

Zvýšená metabolická aktivita tkání projevující se též vyšší tkáňovou respirací



Adaptace tkáňových systémů

Vyšší bazální metabolismus adaptovaného zvířete

Nižší celkový metabolismus adaptovaného zvířete

Důsledky modulace pomocí potravního režimu

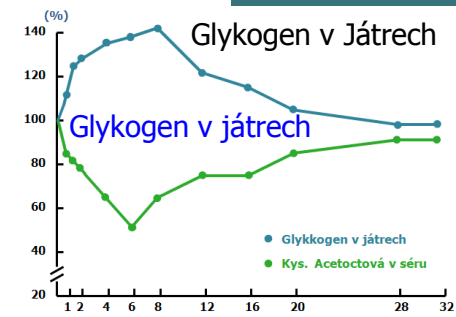
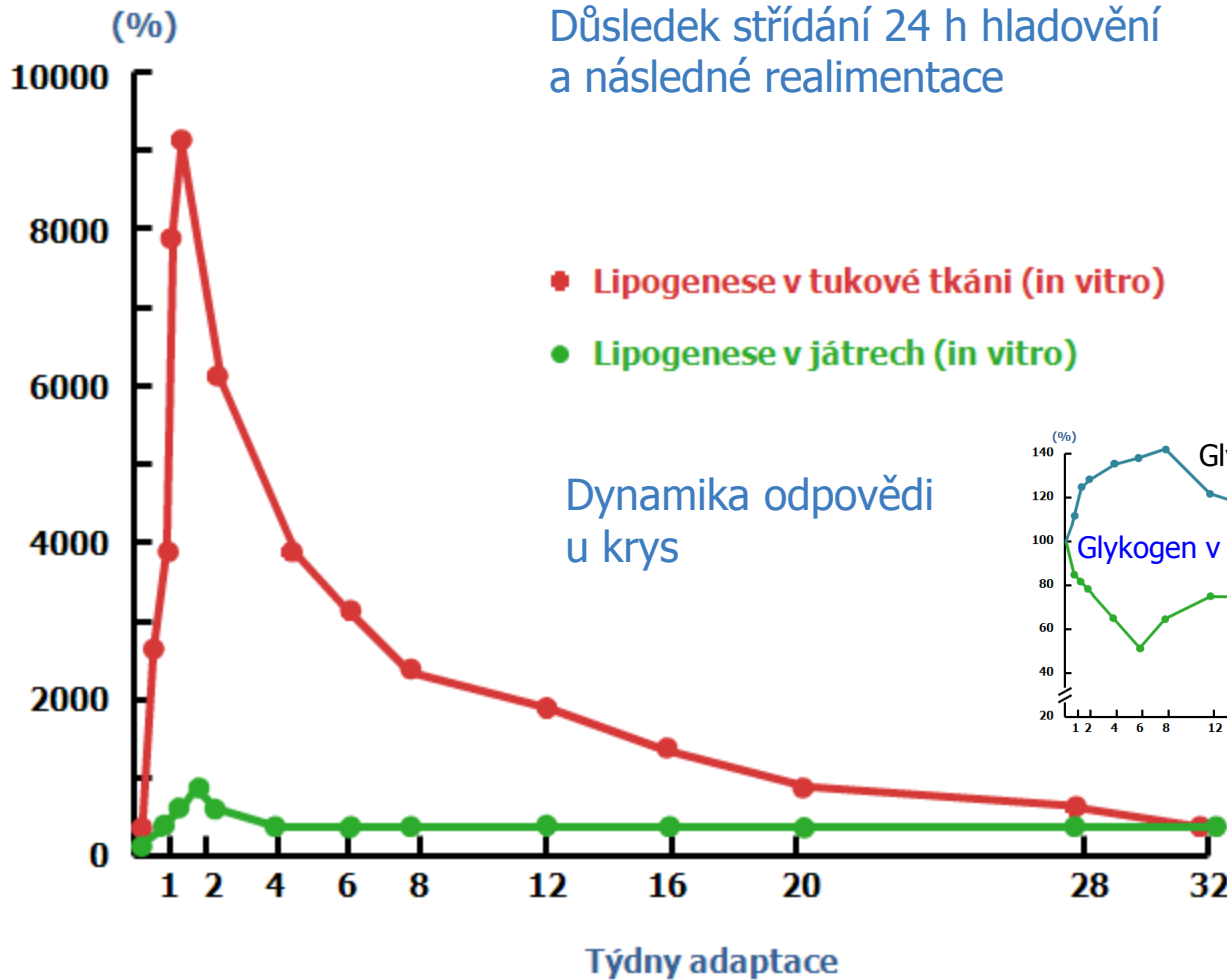
IF ?

je nutriční model spočívající ve změně frekvence příjmu potravy.

Významně moduluje metabolismus všech živin (zejména však metab. energetický a lipidový)

Současně významně moduluje růstové vlastnosti tkání

Důsledek střídání 24 h hladovění
a následné realimentace



Upraveno podle: **Petrásek R.** et al.,
1970

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

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.

Další východiska vztahující se k problematice

Prof. Milan Pospíšil – oddělení radiosenzitivity BFÚ

Dřívější náhodná pozorování *in vivo* ukázaly, že: zvířata se spontánně vyšší kapacitou lipogeneze a aktivovaným energetickým metabolismem se vyznačují celkově **vyšší radiosenzitivitou !!!!!!!!!!!**

(RQ >1)

Otázky:

Do jaké míry a jakým způsobem může určitá metabolická orientace jedince

- ovlivnit celkovou zdatnost a **odolnost** vůči pronikavé radiaci ?
- jak lze tyto **vtahy detailněji studovat**, metodicky podchytit ?
(výsledek: vhodné metodické propojení)

cíl: *podrobnější vymezení vztahů mezi*
specifickou metabolickou orientací a
chováním obnovných buněčných populací

Vlastní výsledky u myši

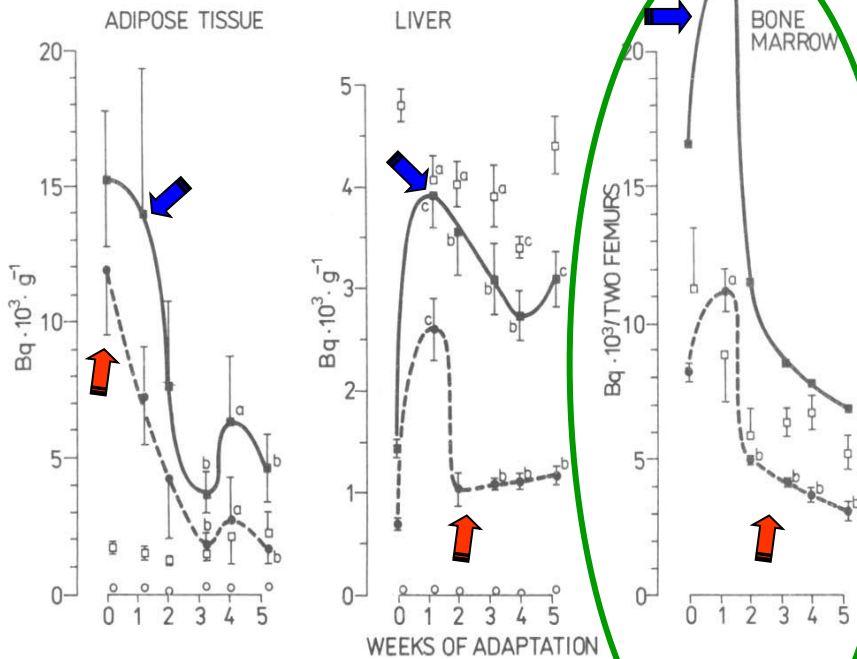


Fig. 1. Incorporation of $U^{14}C$ -glucose into total lipids (■) and total fatty acids (●) in reallimented and fasted mice (open symbols) in the adipose tissue, liver and bone marrow of control (interval "0") and 1—5 weeks adapted animals. *a*: $p < 0.05$, *b*: $p < 0.01$, *c*: $p < 0.001$ as compared with control values.

neozářené

ozářené

Kozubík A., et al.: Gen. Physiol. Biophys. 7, 293-302, 1988

IF x Model r. utlumené hemopoézy:
Detailnější vymezení vztahů

RQ > 1

upraveno podle: Petrásek R. et al., 1970

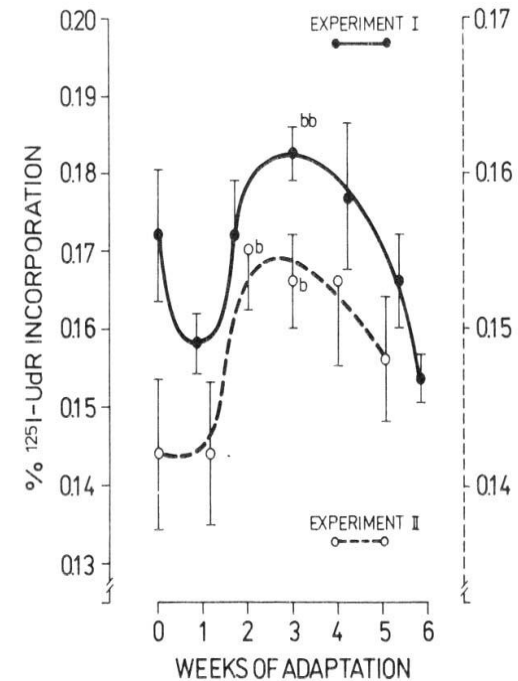
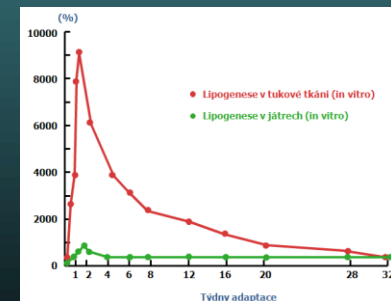
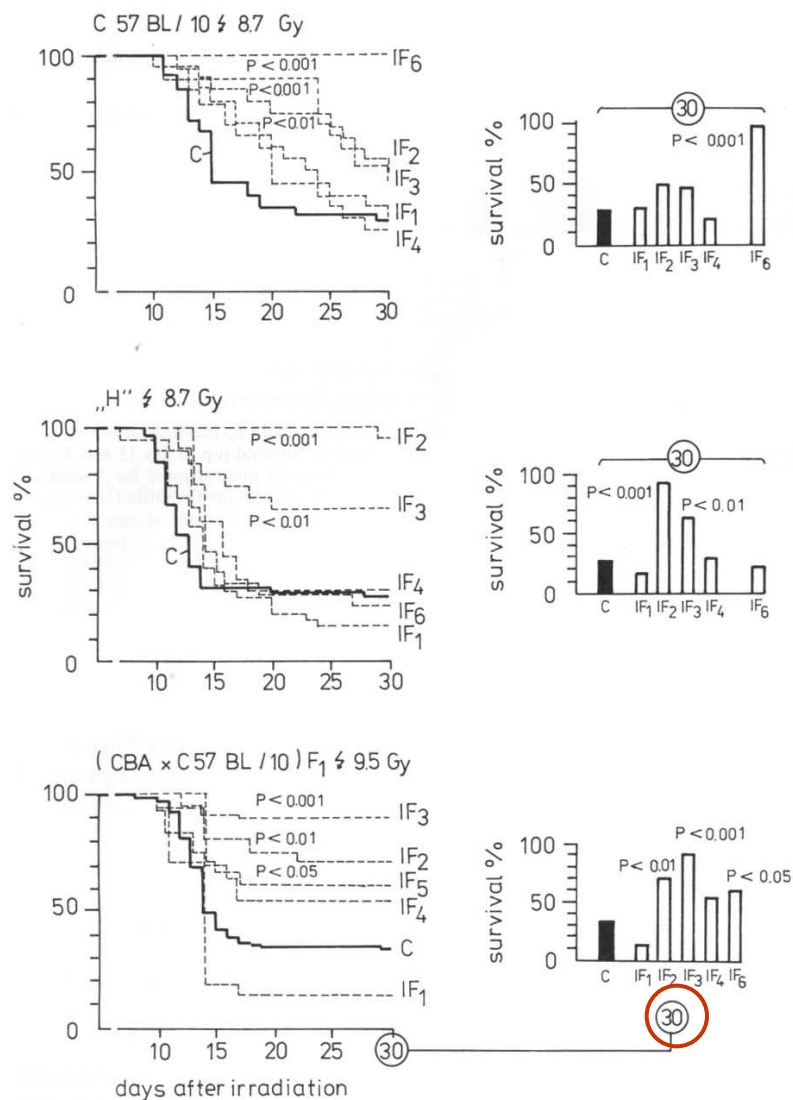


Fig. 2. Incorporation of ^{125}I -UdR into DNA synthesising bone marrow cells of control (interval "0") and 1—6 weeks adapted mice measured on day 10 after sublethal (5 Gy) whole-body irradiation; two independent experiments. *b*: $p < 0.01$ vs. control animals (experiment II); *bb*: $p < 0.01$ vs. animals adapted for 1 week to intermittent feeding (experiment I).



Přežívání C a IF myši po ozáření

(3 kmeny)



Dynamika vyjadřující
vliv délky adaptace
na celkové radiorezistenci
ke 30. dni po ozáření

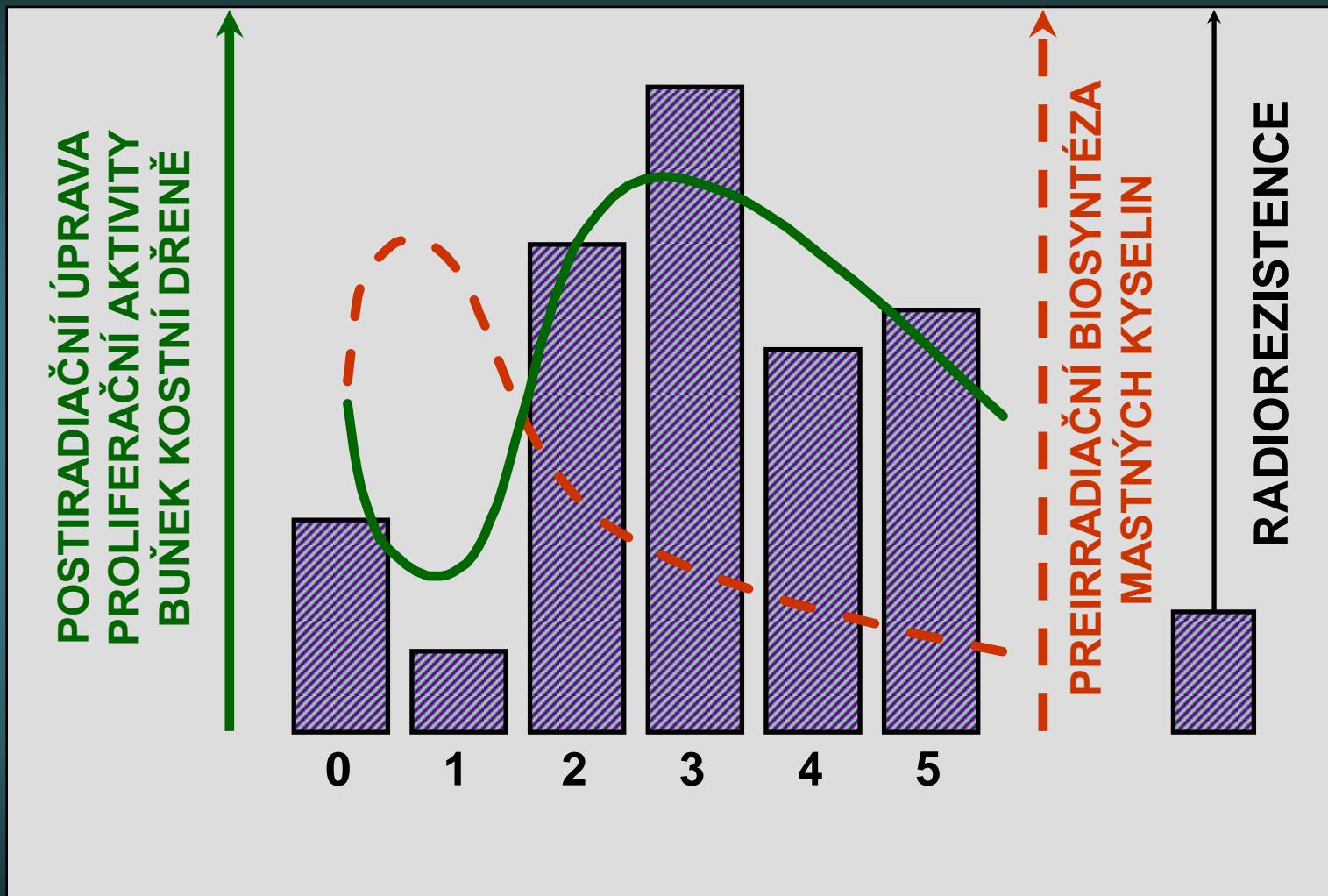
Figure 1. Influence of the extent of intermittent feeding regimen on the survival of mice irradiated after 24 h realimentation. C = controls, IF₁ - IF₆ = animals adapted to intermittent fasting for a period of 1 to 6 weeks. 20 to 40 animals per group were used. The informations on statistical significance refer to differences between control and experimental groups.

Protective effect of intermittent fasting on the mortality of gamma-irradiated mice

A. Kozubík, M. Pospíšil

Institute of Biophysics, Czechoslovak Academy of Sciences, Brno, Czechoslovakia

Dílčí shrnutí



VYBRANÉ VÝSLEDKY



VÝZNAM A NĚKTERÉ MOŽNOSTI MODULACE LIPIDOVÉHO METABOLISMU



Zásahy do regulací složek
lipidového metabolismu

Úroveň:
Org., tkáň, buněčná, subbuněčná



DALŠÍ MOŽNÉ OBLASTI UPLATNĚNÍ

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

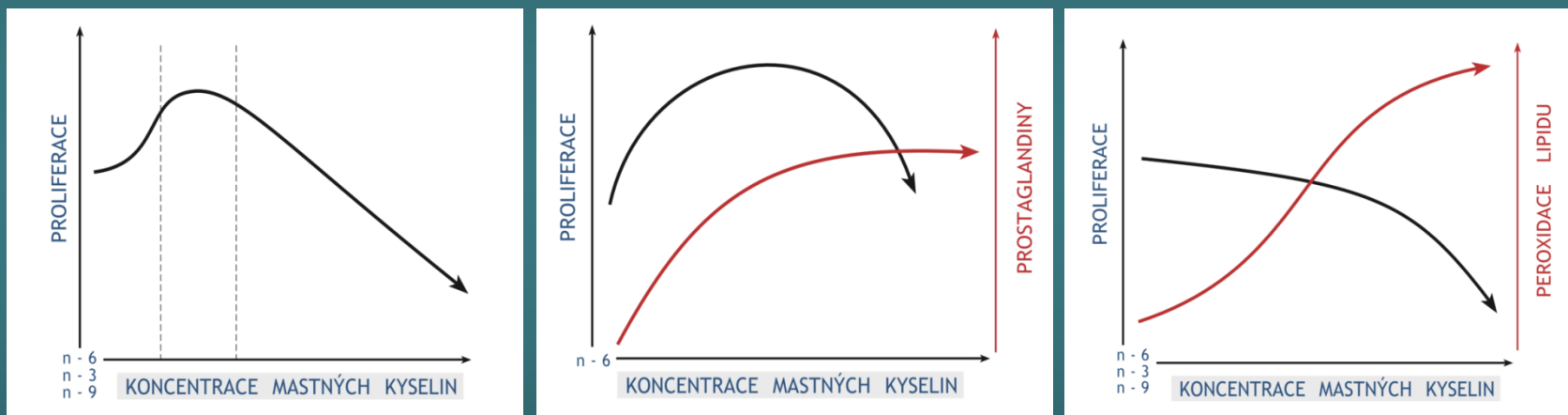
- fyziologickými regulátory růstu,
- environmentálními polutanty
- vybranými farmaky.

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

Efekty závisí na koncentraci – další důkazy z oblasti nádorové problematiky:

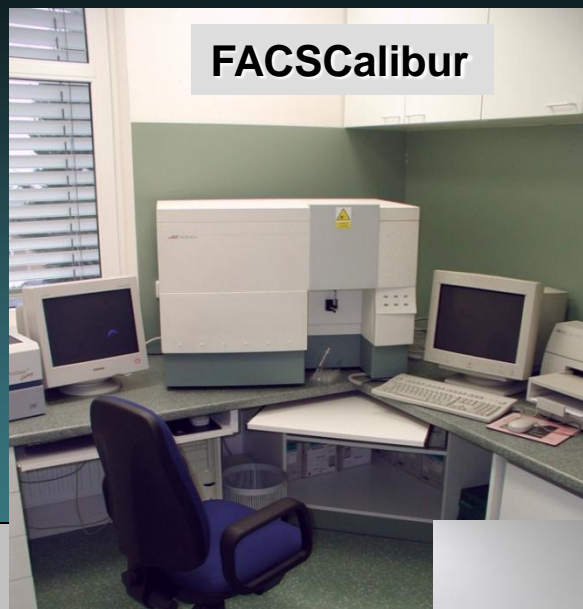
VLIV KONCENTRACE NENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN NA PROLIFERACI NÁDOROVÝCH BUNĚK – shrnutí (do r. 1985)

(„FATTY ACID PARADOXES“)



D.G.Cornwell and N.Morisaki, Free Radicals in Biology. Vol.6, 1984

FACSCalibur



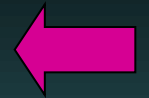
FACS ARIA SORP II



KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP LEICA



STRUKTURNÍ ÚLOHA FOSFOLIPIDŮ V BUŇKÁCH



VNMK



**MEMBRÁNOVÉ
SYSTÉMY
a buněčné
kompartmenty**

protientropické
důsledky

NEODDĚLITELNÁ OD BUNĚČNÝCH FUNKCÍ

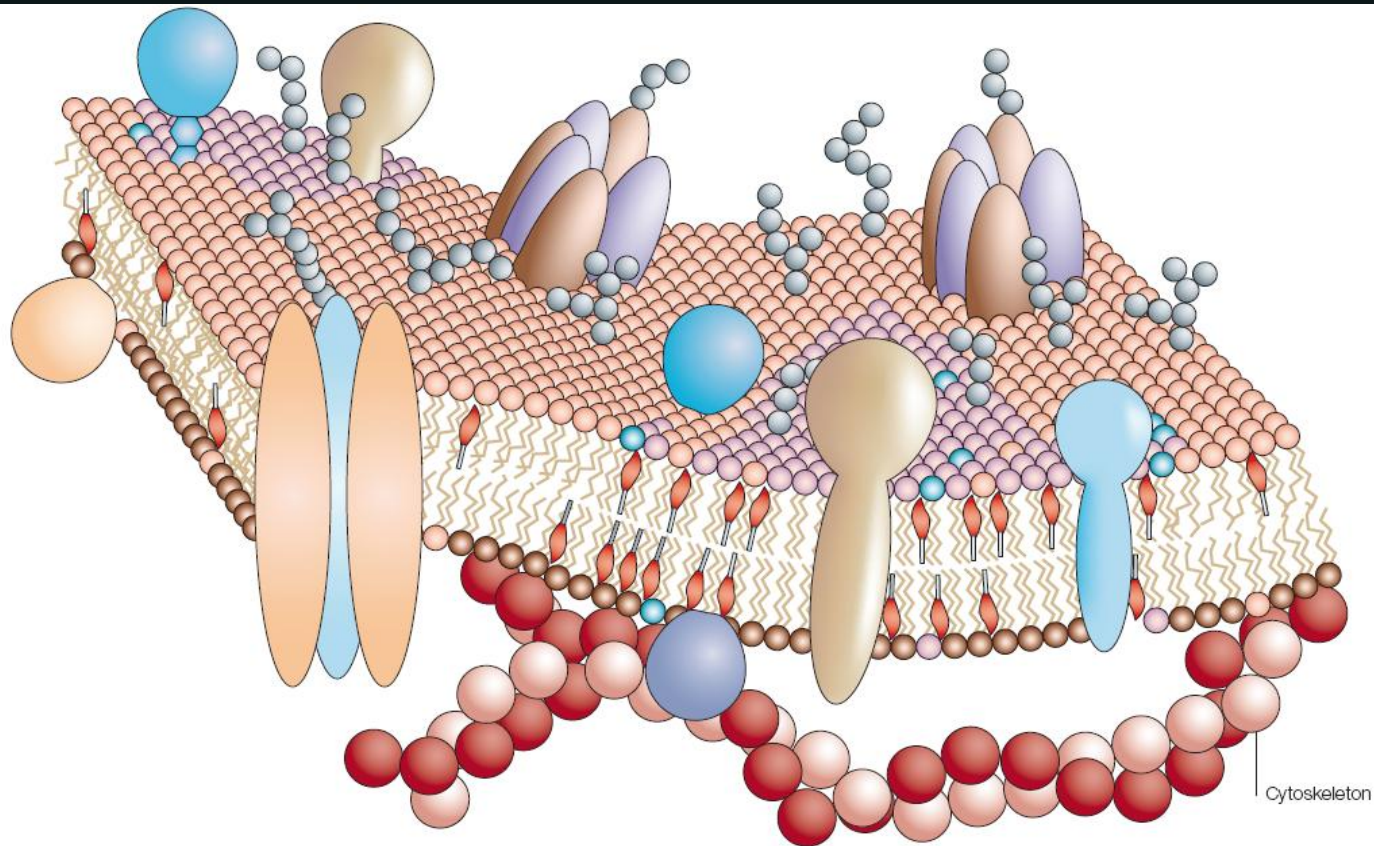


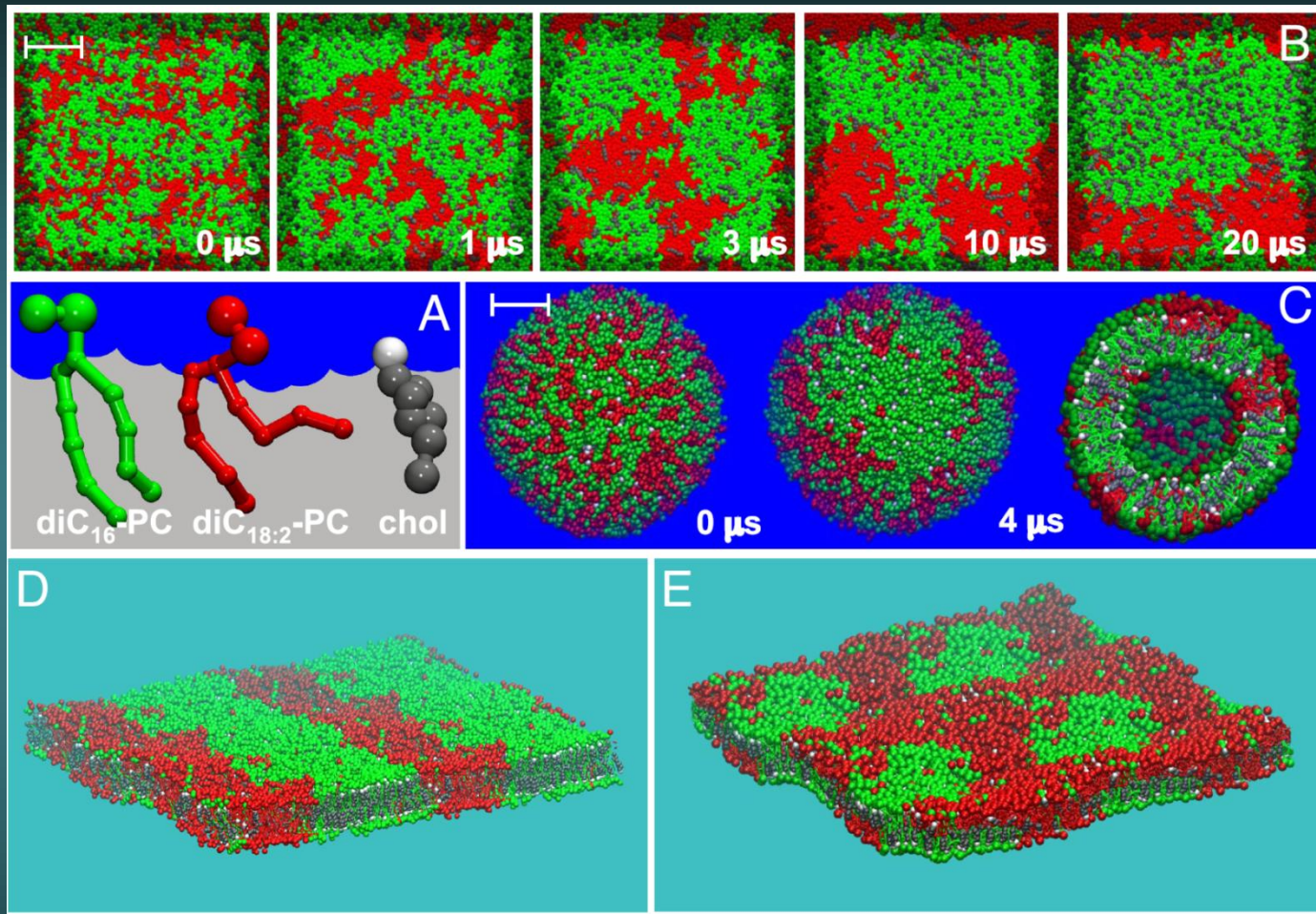
Figure 2 | **The Fluid-Mosaic-Model of the cell membrane.** Like a mosaic, the cell membrane is a complex structure made up of many different parts, such as proteins, phospholipids and cholesterol. The relative amounts of these components vary from membrane to membrane, and the types of lipids in membranes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

Pietzsch J et al.,
Nature Reviews,
October 2004

Zajištění většiny biologických funkcí se neobejde bez unikátních interakcí lipidových komponent ¹⁾ s dalšími biologicky významnými molekulami. Jejich modulace mohou významně měnit intenzitu a také směr sign. transdukce

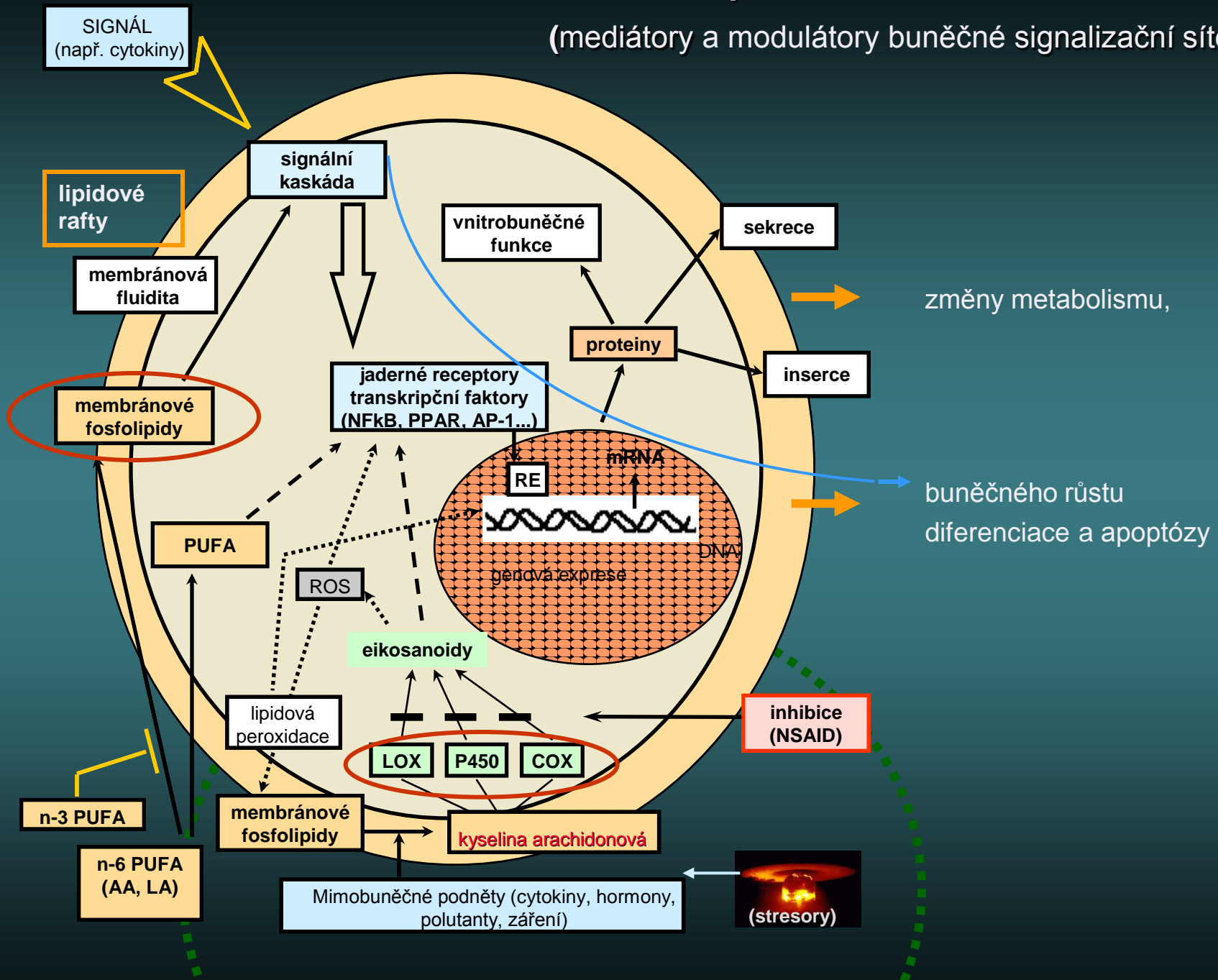
1) např. tzv. **lipidových raftů** – membránových **lipidových mikrodomén** obohacených o **glykosfingolipidy** a **cholesterol**

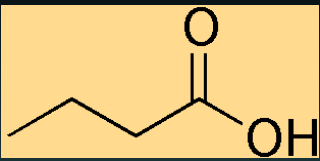
Dynamický charakter biologických membrán (model)



MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY působení ω -3 a ω -6 VNMK

(mediátory a modulátory buněčné signalizační sítě)





Přechod adenom x karcinom

Inhibiční účinky butyrátu

Buněčné linie

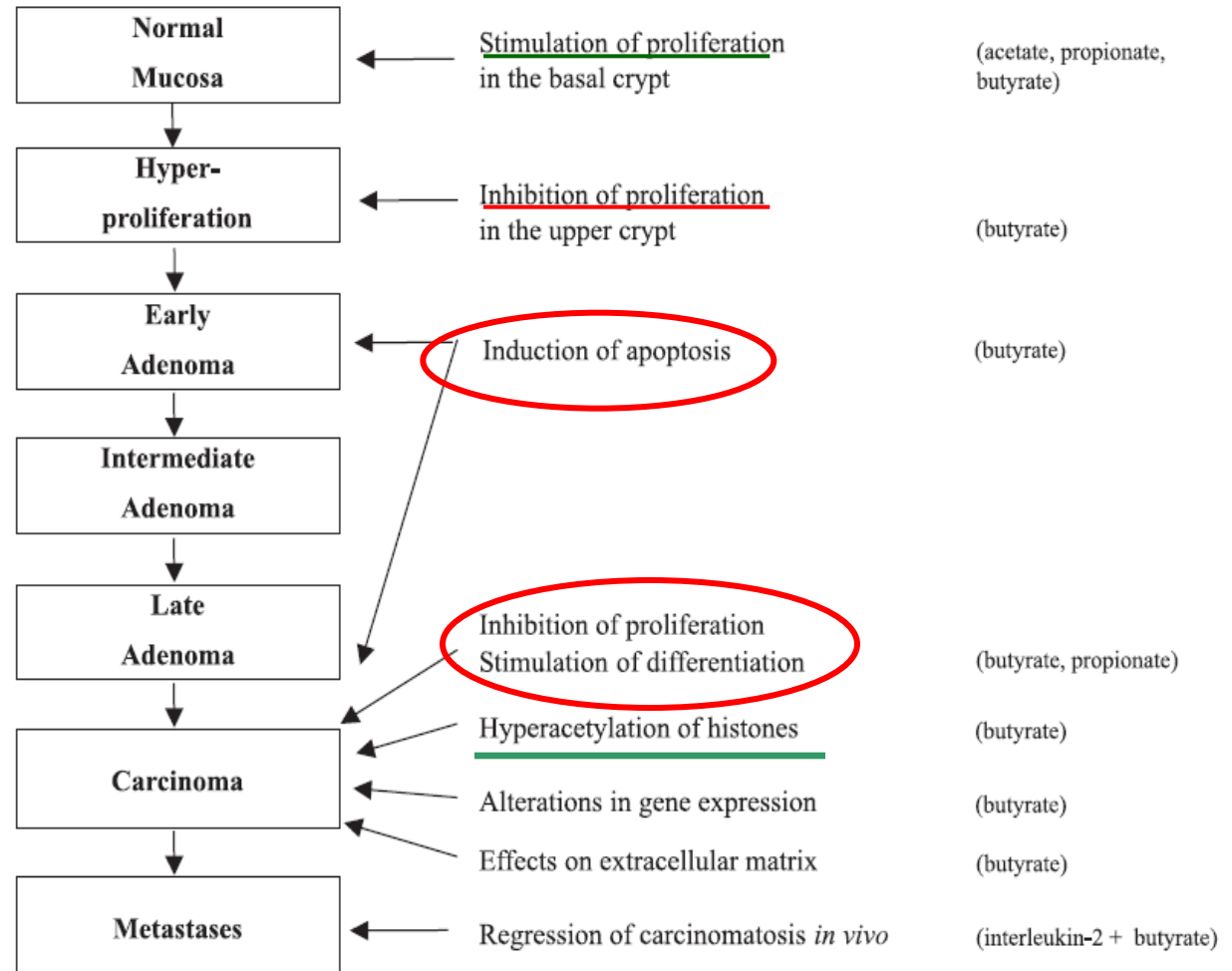
fetální colon
FHC

adenomy
AA/C1
RG/C2

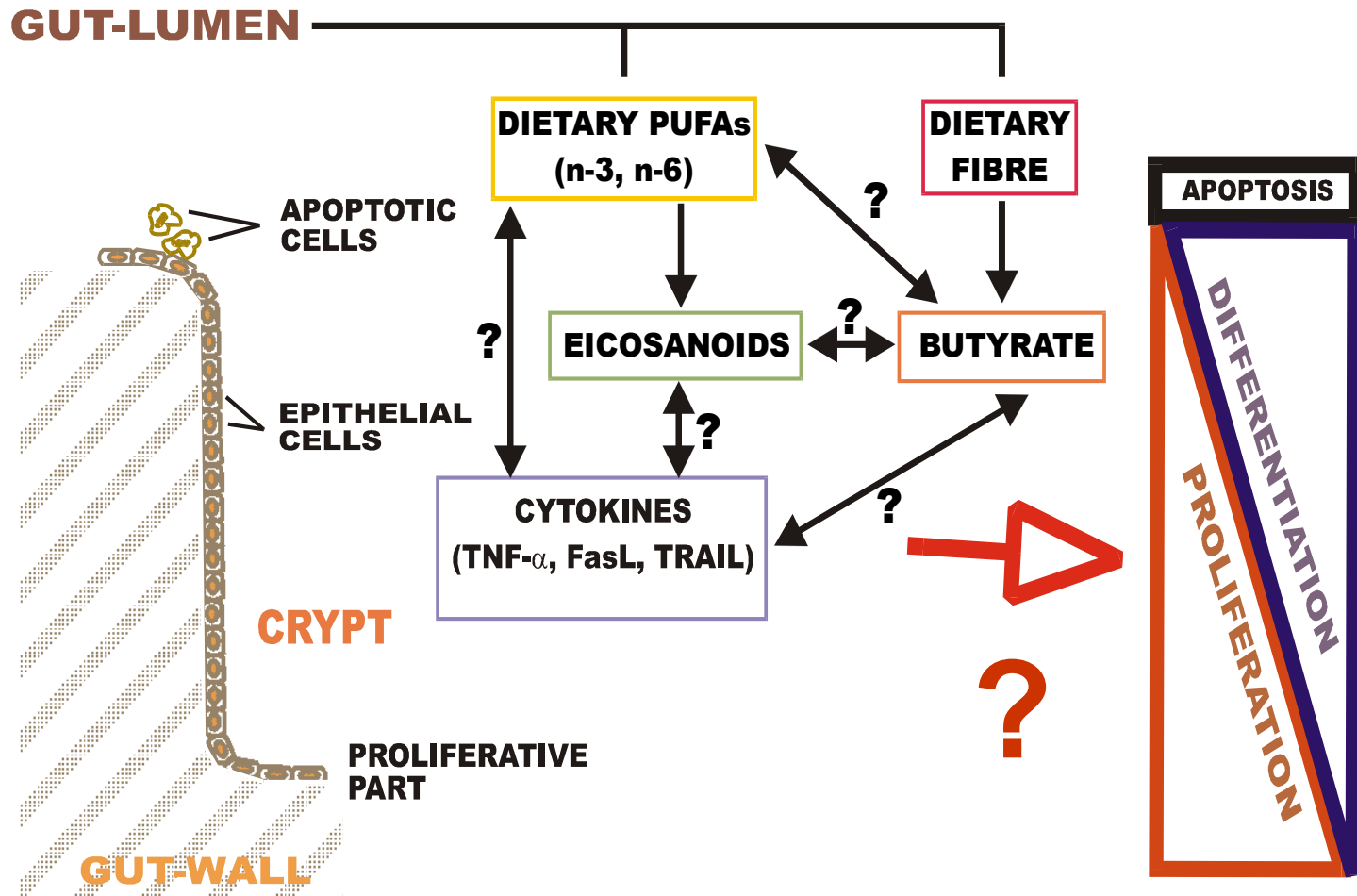
adenocarcinomy
HT-29
HCT116

lymf.
metastáza
SW-620

**Carcinogenní
potenciál**



Předpokládané interakce složek diety a endogenních regulátorů cytokinetiky epiteliálních buněk kolonu (experimentální přístup)



Kovaříková M. et al. Eur J Cancer 2000
 Kovaříková M. et al. Differentiation 2004
 Hýžd'alová 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)

Vláčina

Endogenní regulátory

TRAIL, TNFα,

anti-Fas

Receptory smrti
DR4, DR5
CD95

Metody využívané
na různých úrovních
buněčné organizace

plasmatická membrána

Plasmatická
membrána

FAT/CD36

N

FA

FA-CoA

C

Lipid packing

flow cytometrie (merocyanin 540)

Lipidové analýzy

Phospholipidy (LC-MS)

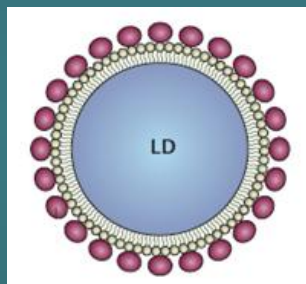
Zastoupení MK (GC-MS)

parametry

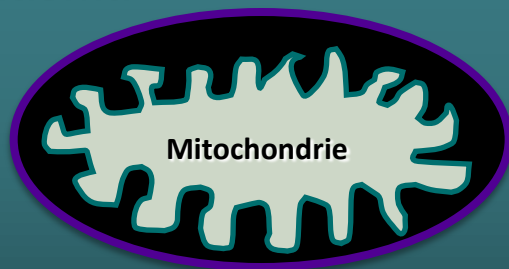
cytoplasma

Cytoplasma

Lipid droplets *flow cytometrie - Nile Red*



mitochondrie



ROS – *flow cytometrie (DHR-123)*

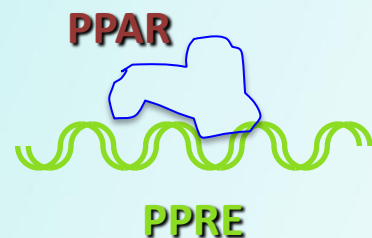
MMP – *flow cytometrie (TMRE)*

Bcl-2 rodina (*Western blotting*)

Jádro

Jádro

Transcriptční faktory, genová exprese



Proliferace

Diferenciace

Apoptóza

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

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

DOI 10.1002/mnfr.200800175

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

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

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

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

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

Shrnutí a závěry (teoreticko praktické dopady)

Lipidy patří spolu s proteiny a sacharidy **mezi hlavní složky výživy**. **Důležité je** nejen jejich množství a kvalita těchto živin, ale také časové rozložení jejich příjmu.

Lipidy jsou nejen významným **zdrojem energie**, ale představují i **jedny z hlavních stavebních kamenů buněk**.

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

Změny spektra mastných kyselin (**MK/VNMK**) v membránových strukturách mají **dopad nejen na fyzikálně-chemické vlastnosti** (*fluiditu, konformaci apod.*), ale zejména na **interakce receptorů s jejich ligandy**.

MK/VNMK tak **hrají důležitou úlohu v přenosu signálů** a fungují jako intra- i intercelulární mediátory a modulátory b. signalizační sítě.

Proto patří mezi významné faktory schopné ovlivnit jak dělení a zánik normálních, ale i transformovaných buněčných populací, tak proces maligní transformace.

Hlavní mechanismy působení PUFA 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 reaktivních kyslíkových metabolitů (ROS)** vznikajících *peroxidací lipidů*.

Významným faktorem je množství lipidů v potravě.

Vysoké koncentrace VNMK (anebo přílišná aktivace lipidového/fosfolipidového Metabolismu) mohou **nepříznivě ovlivnit buněčné funkce.**

Tyto **negativní účinky VNMK** lze účinně **inhibovat** (např. NSAIDs) a tak **napomáhat navrátit** deregulovaný systém k **homeostáze.**

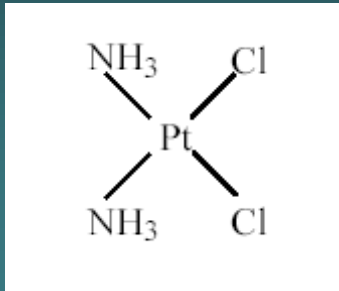
UPLATNĚNÍ

látek lipidové povahy v kontextu

regulace cytokinetyky (*proliferace, diferenciace a apoptózy*)
v kontextu jejich interakcí s
vybranými farmaky.

Cisplatin

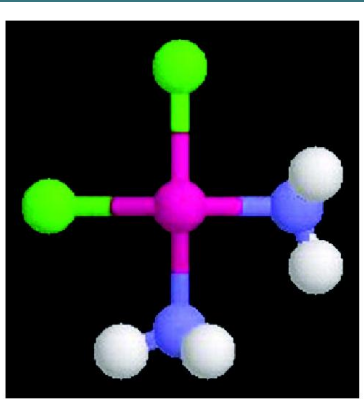
(*cis*-diamminedichloroplatinum(II), *cis*-DDP)



- one of the most effective and potent anticancer drugs;
- displaying clinical activity against a wide variety of epithelial malignancies, such as lung, head-and-neck, bladder cancer, and most notably in the treatment of testicular and ovarian cancer.

LIMITATIONS

- 1) serious **unfavorable side effects** (adverse reactions), including renal and gastrointestinal toxicity, peripheral neuropathy, etc;
- 2) both **inherent (intrinsic)** and **acquired resistance** of cells to the drug limit its application.



Cisplatin structure courtesy of Mitch Miller (Net-Genics, Cleveland).

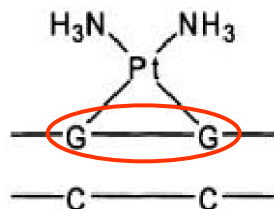
Biologické „cíle“ cisplatiny (adukty s DNA)

Novel Concepts in the Development of Platinum Antitumor Drugs

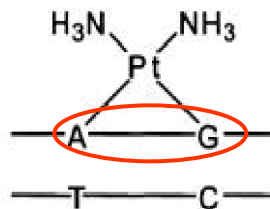
Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents, 2002, Vol. 2, No. 4 3

Typy DNA !
aduktů

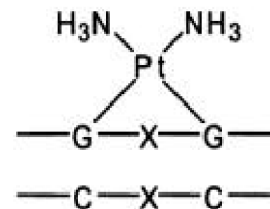
Intra-
(80-90%)



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



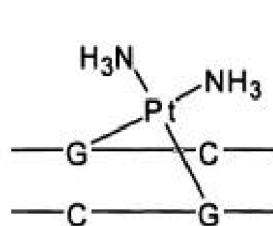
1,2 ApG intrastrand
(20-25%) !



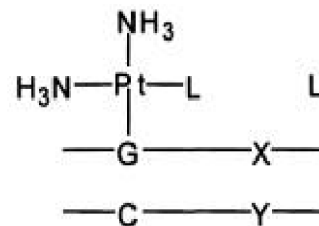
1,3 GpXpG intrastrand
(~2%)

a frekvence
jejich výskytu

Inter-



1,2 GpG interstrand
(<1%)



monofunctional
G-adduct

L = Cl⁻, H₂O, S-R

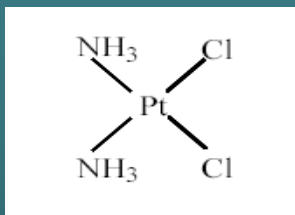
mono-

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

Adamantylaminové Pt(II) a Pt(IV) komplexy

Dvojmocné Pt(II)
(reaktivní s DNA)

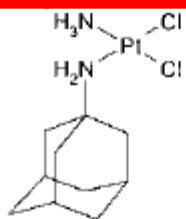
LA-9



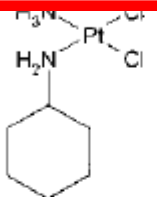
Cisplatina (II)

Syntetizované F. Žákem a spol.,
PLIVA – Lachema

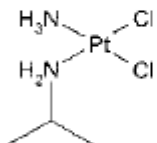
Zak *et al.*, 2004, J Med Chem,



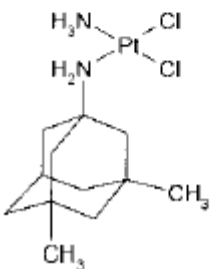
La-9 436,26 g/mol



LA-5 382 g/mol

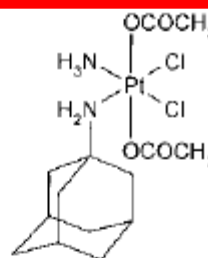


LA-6 344,12 g/mol

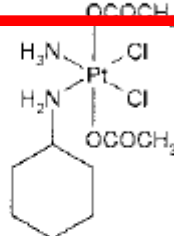


LA-13 464,32 g/mol

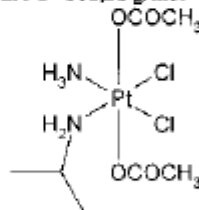
redukce



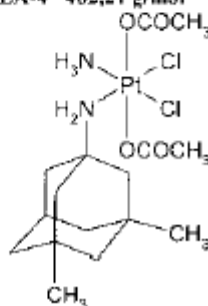
La-12 554,35 g/mol



LA-2 502,28 g/mol



LA-4 462,21 g/mol



La-15 582,78 g/mol

Výhoda: lipofilní

čtyřmocné Pt(IV)
(s DNA nereaktivní)

LA-12

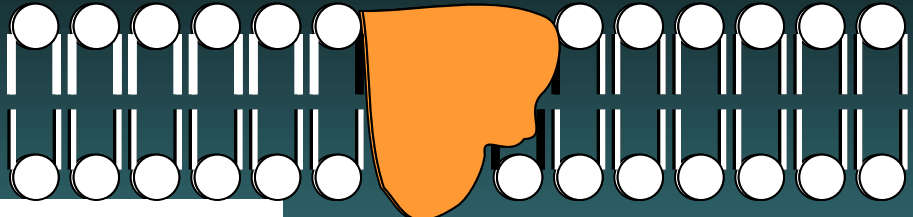
JM-216
(1. z řady
v klinickém
zkoušení)

$[Cl^-]_{ex} \approx 100mM$

plasma

Cisplatin (II)

plasma



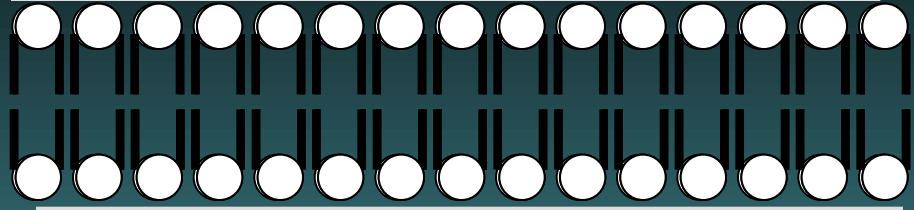
cytoplasm

$[Cl^-]_{in} \approx 2-30mM$

cytoplasm

- Proteins ?
- Peptides ?
- ◆ Glutathione ◆
- RNA?
- ◆ Metallothioneins ◆
- Cytoskeletal proteins?

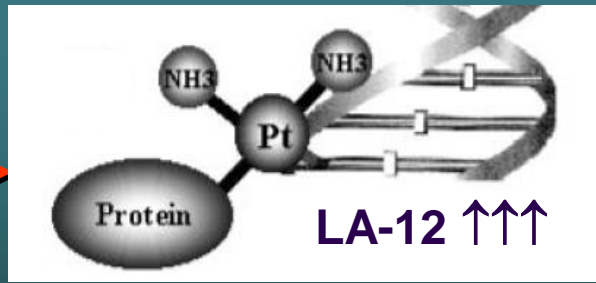
LA-12 (IV)
↓ reactivity
↑ **Hydrophobicity** (capacity factor HPLC)



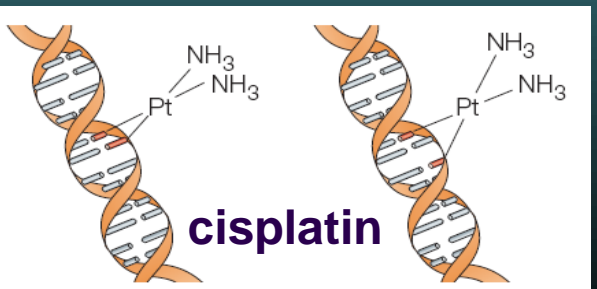
- **Increased LA-12 uptake (FAAS)** (19.5× in A2780; 29.3× in A2780cis)
- **Decreased reactivity with target biomol.**

→ **Forms special type of a large DNA-protein adducts** unreparable by Nuclear Excision Repair System

NUCLEUS



- Replication inhibition
- Transcription inhibition
- Cell-cycle arrest**
- DNA repair
- Cell death



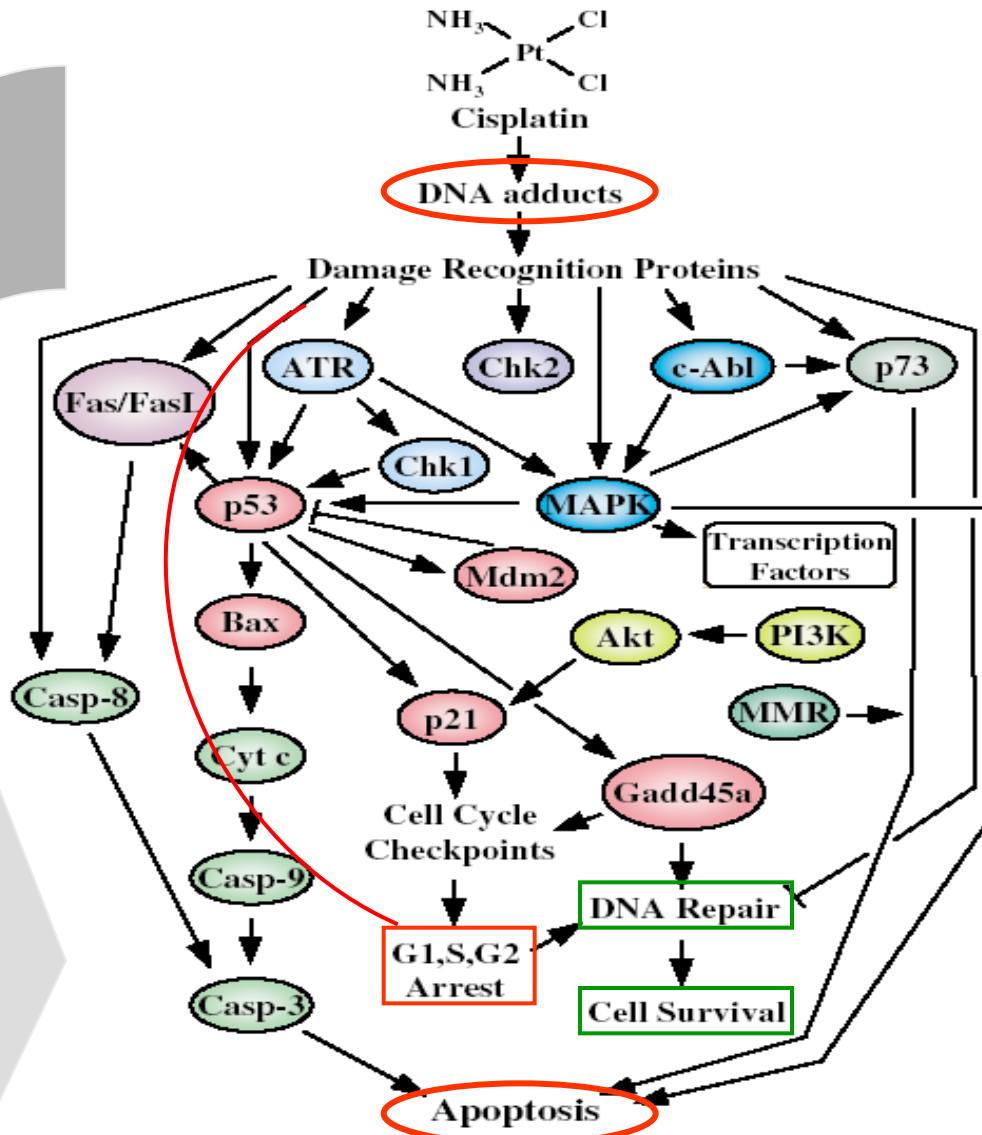


Figure 1 An overview of pathways involved in mediating cisplatin-induced cellular effects. Cell death or cell survival will depend on the relative intensity of the signals generated and the crosstalk between the pathways involved. Some of the signaling discussed in the text has been omitted for clarity

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

B. smrt závisí na
relativní intenzitě
Signálů

LA-12 ?

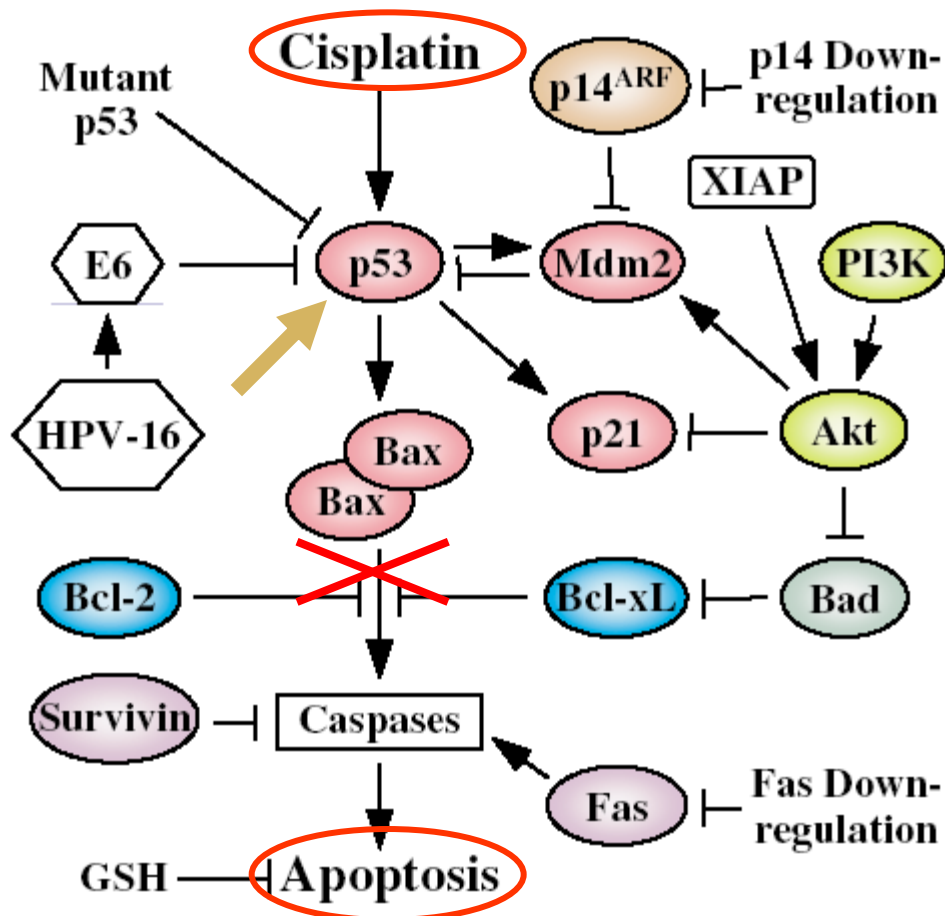


Figure 6 Disruption of p53-dependent apoptotic pathway in cisplatin-resistant tumor cells

U buněk rezistentních k cisplatině je f-ce 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%) (Kofschoten, G.M. et al., Gyn. Oncol., 2002)

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

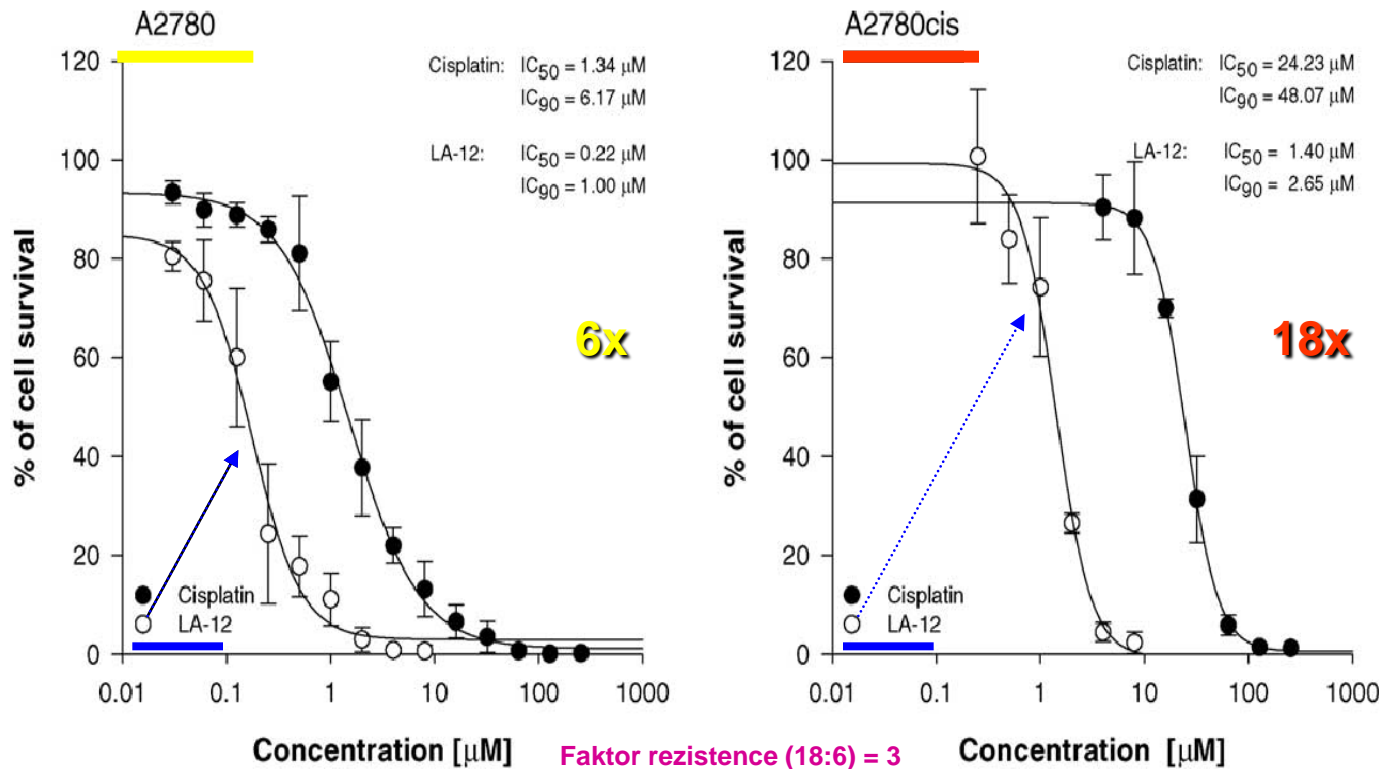
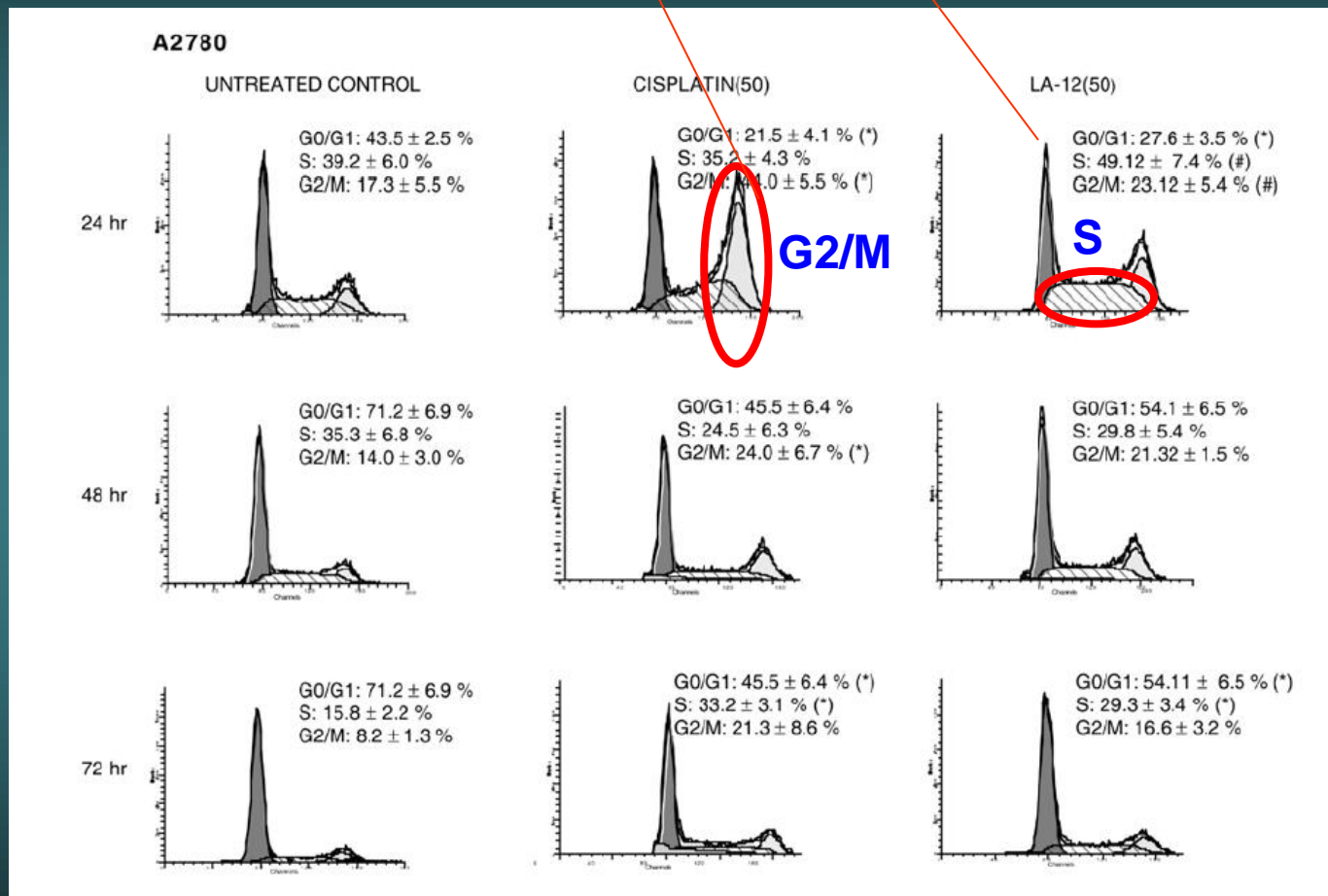


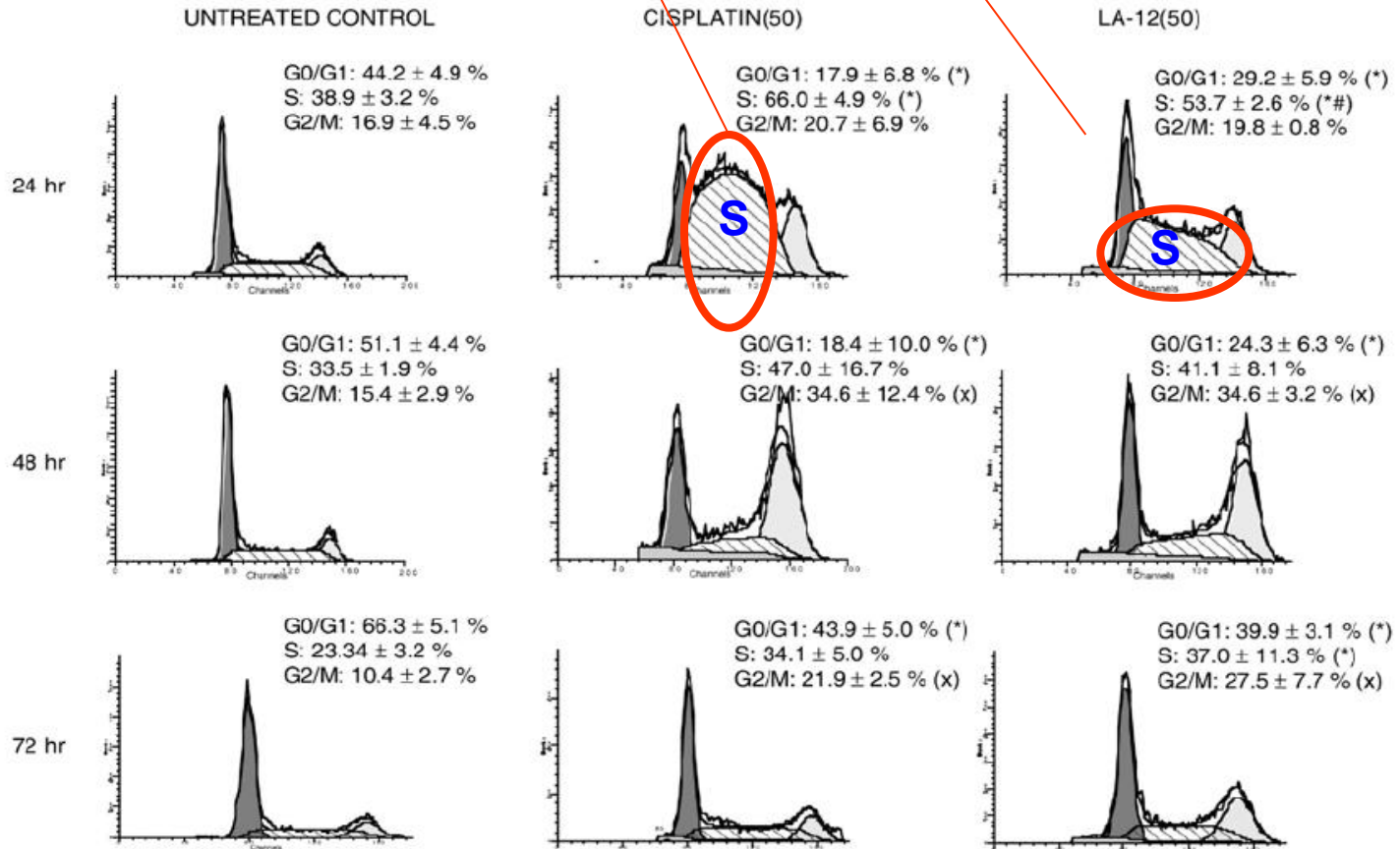
Fig. 2. Time- and dose-response effects on the survival of A2780 and A2780cis cancer cell lines. The effects after 72 h exposure to cisplatin or LA-12 in a concentration range between 0.3 μM and 256 μM were determined by MTT assay. The calculated drug concentrations inhibiting metabolic activity of cells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

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



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

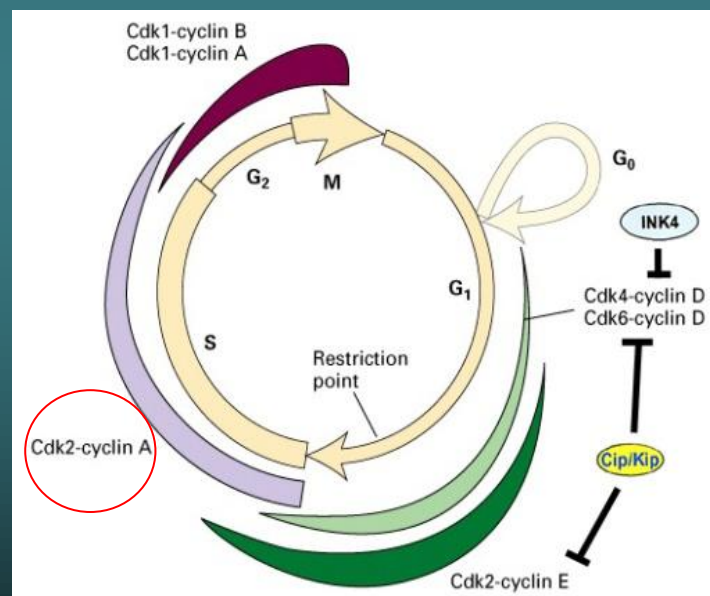
A2780cis



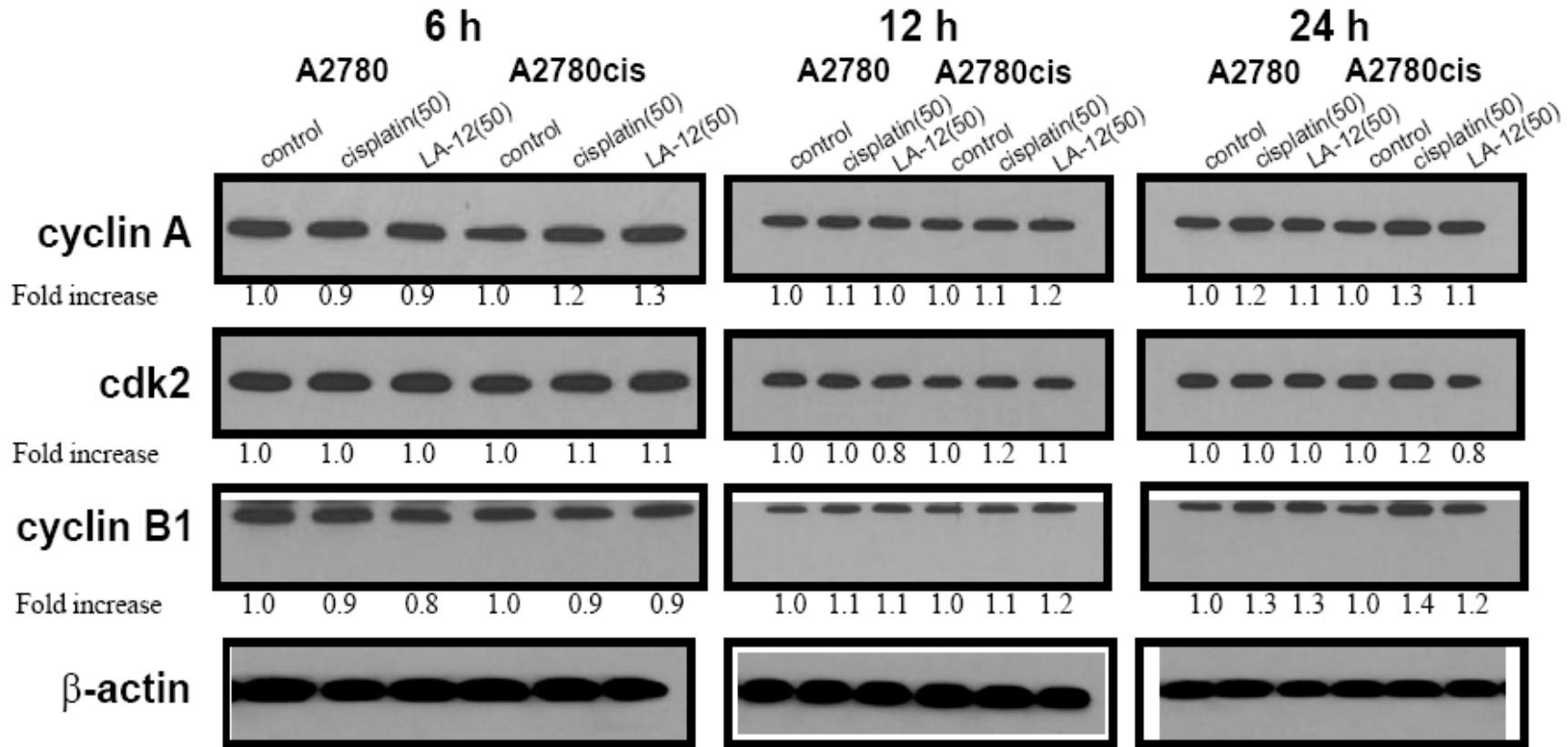
Závěr: účinky LA-12 a cisplatiny na b. cyklus se liší dynamikou a jsou u ovariálních nádorových linií lišících se rezistencí rozdílné.

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)



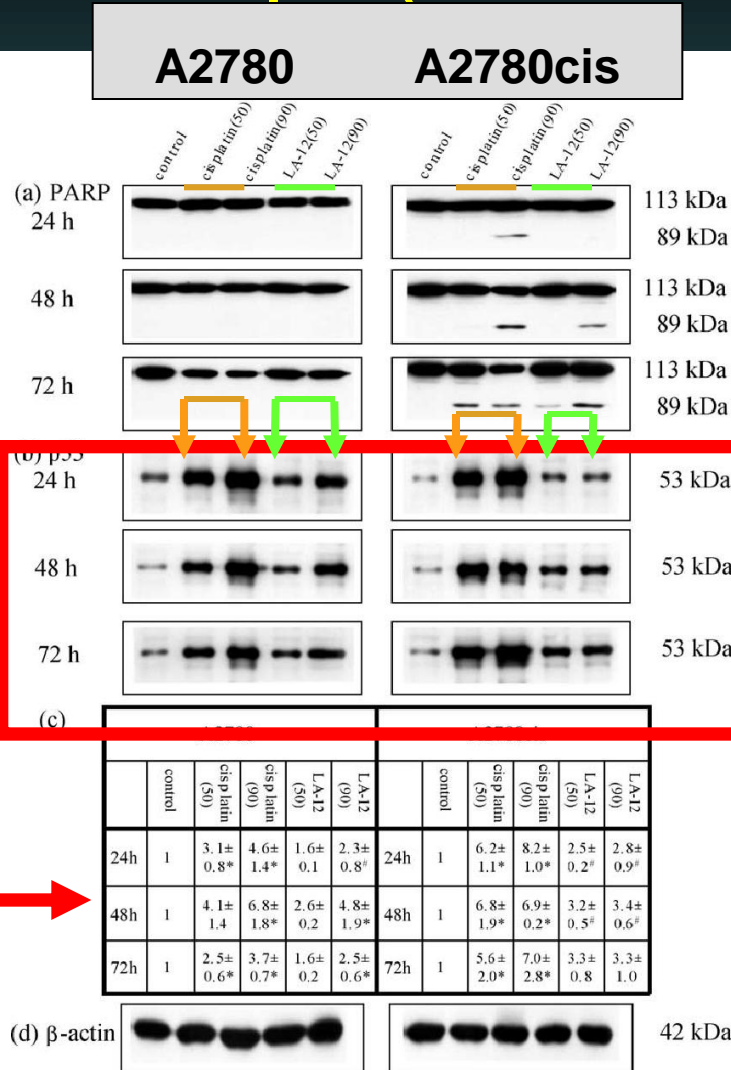
Hladiny proteinů regulujících buněčný cyklus (*cyklin A, B1, cdk2*) u buněk A2780 a A2780cis po působení LA-12 a cisplatiny



Nebyly pozorovány žádné změny

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

p53

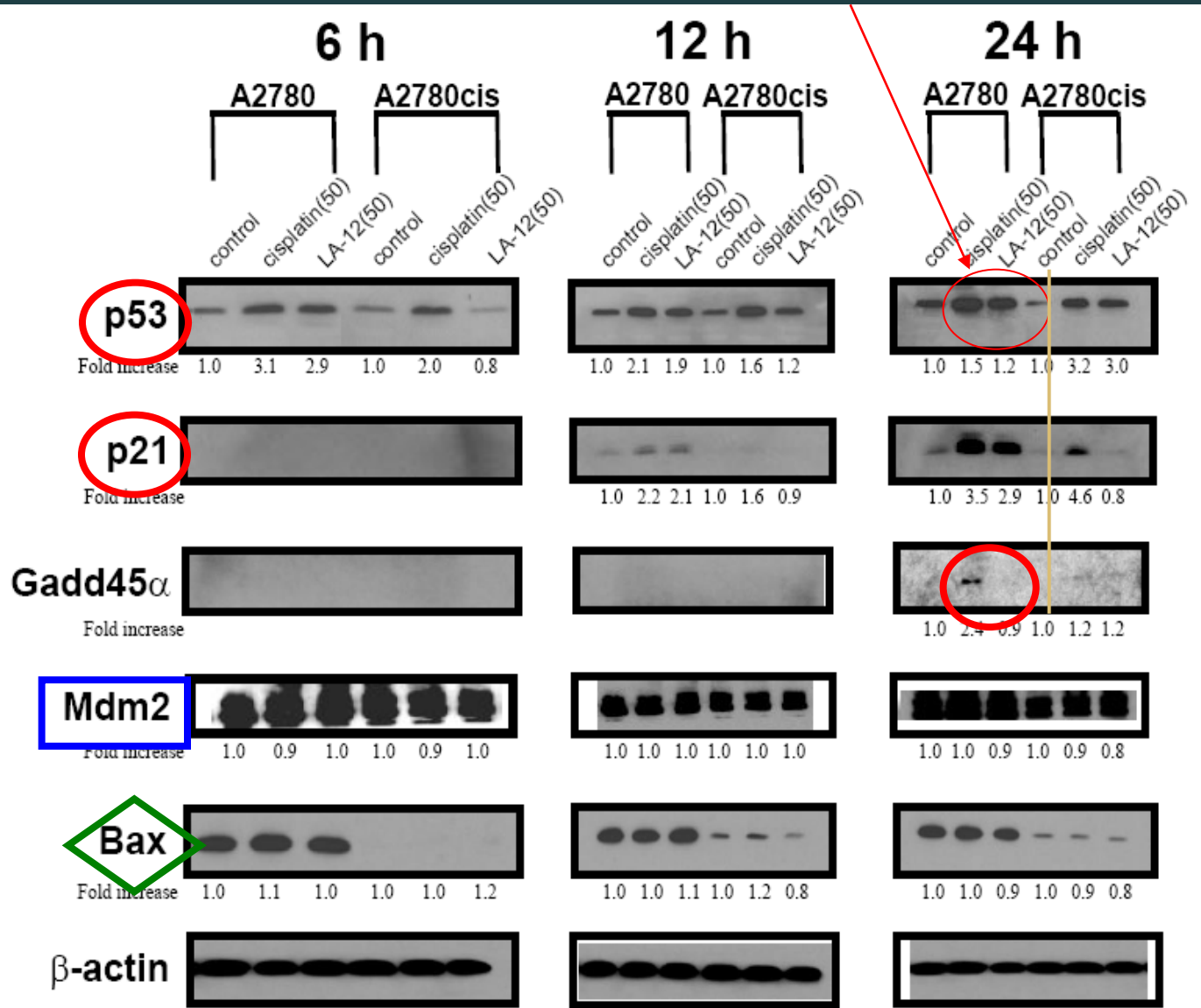


Equitoxické koncentrace cis-DDP indukují vyšší expresi proteinu p53 (teoreticky vyšší poškození DNA, než po apl. LA-12 a tudíž by cis-DDP měla působit efektivněji),

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).

Detekce produktů genů activatelných p53 spojených se zástavou b. cyklu, „DNA repair“ a apoptózou po působení cisplatiny nebo LA-12



Analýzy potvrzující dřívější data u b. A2780

v časnějších int.

Zvýšení exprese Gadd45 α (repair)

u buněk A2780 po působení cisplatiny

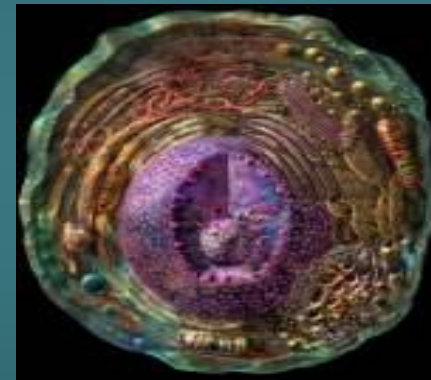
Žádné změny na úrovni hladin

Mdm2 a Bax

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

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

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

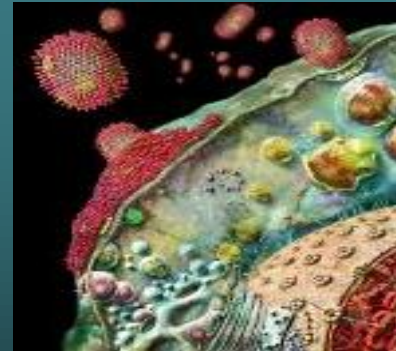


Odvozené mechanismy mohou být významnou součástí signálních kaskád regulujících dělení a smrt buněk

Předpoklad:

Vzhledem ke své lipofilicitě, lze očekávat, že alespoň některé **příznivé efekty působení LA-12** by mohly být **spojeny s interakcemi této látky se složkami buněčných membrán**

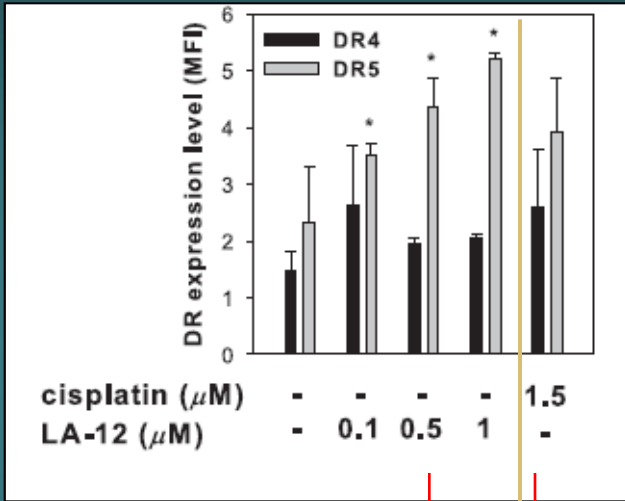
*(nebo by mohly být modulovány)
ovlivněním membranového složení.*



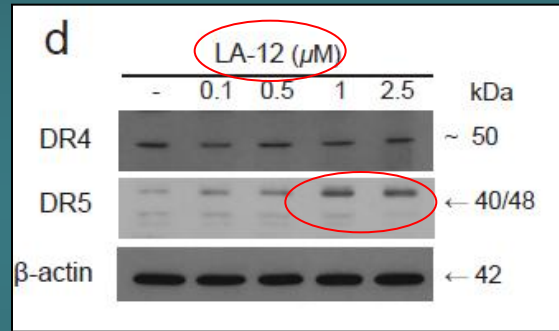
LA-12 indukuje „upregulaci“ proteinů DR5, mRNA a zvyšuje zastoupení DR5 v lipidových raftech

Zastoupení DR5 a DR4 v membránách

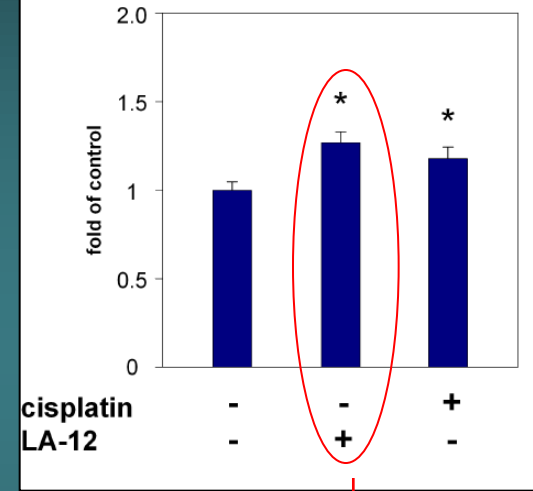
— HCT 116 —



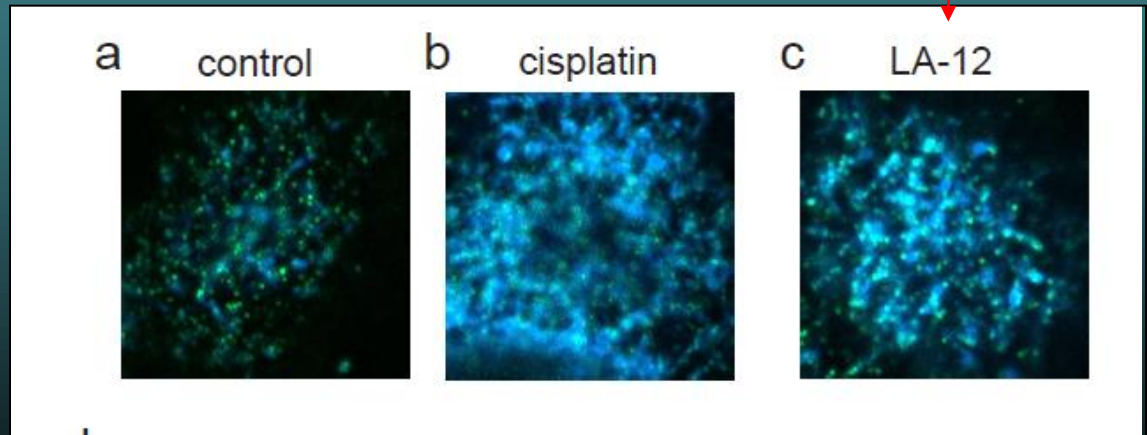
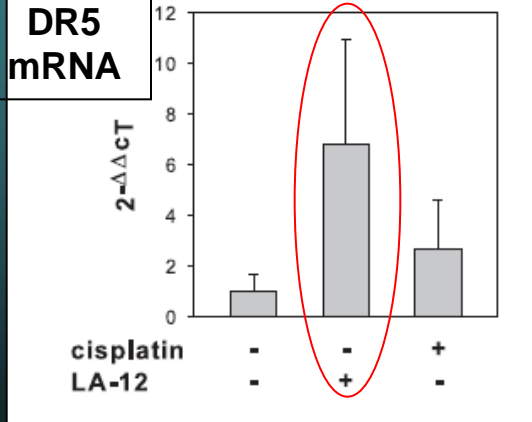
Celkové hladiny DR5



Celkové zastoupení DR5 (rafty)



DR5 mRNA



Lokalizace DR5 v lipidových raftech

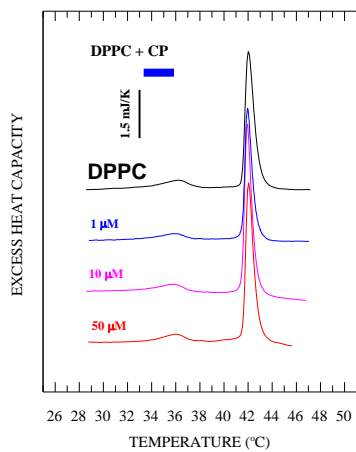
Naše další předběžné výsledky naznačovaly

(provedené na umělých lipozomálních strukturách využitím kalorimetrie)

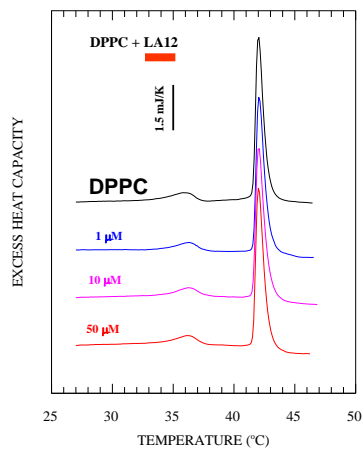
že zatímco ani cisDDP ani LA-12 samy o sobě **nemění vlastnosti lipozómů**, přidání AA významně mění charakter termogramu ve smyslu zvýšení membránové fluidity.

Kombinace AA s cis-DDP anebo s LA-12 naznačily tendence k fázové separaci (*změny nebo objevení se druhého píku*).

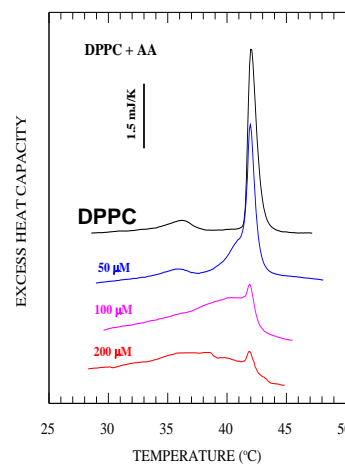
Tyto **píky se** po kombinaci AA s cis-DDP vs. AA s LA-12 **lišily**.



Vliv **CP** na DPPC multilamelární liposómy

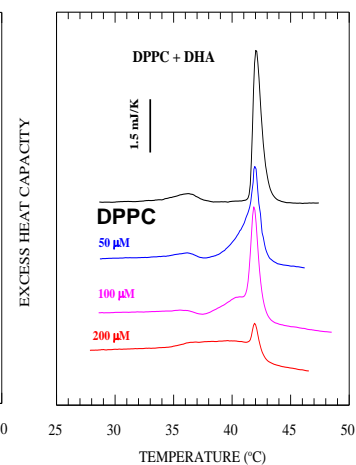


Vply **LA 12** na DPPC



Vliv AA

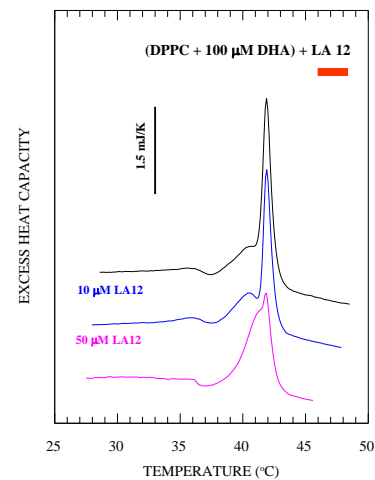
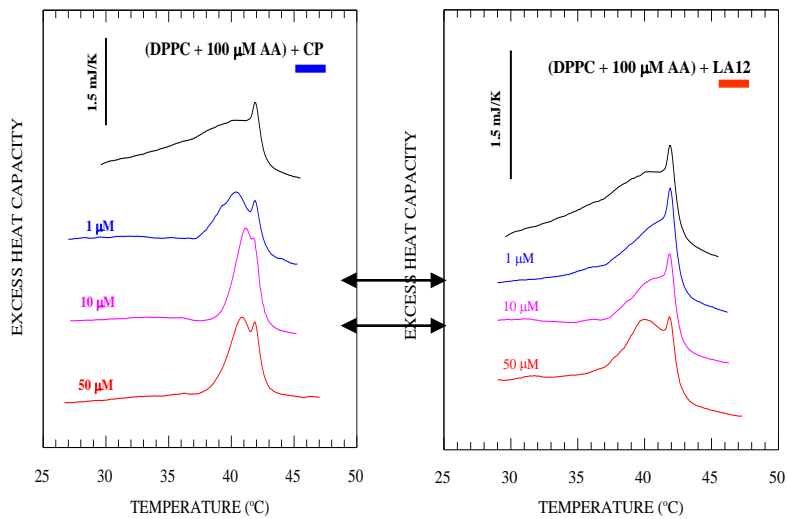
Po 50μM AA pozorujeme snížení píku odpovídajícího předpřechodu a zároveň rozšiřování hlavního fázového přechodu - zvýšení fluidity??? přičemž se entalpie přechodu nemění.



Vliv DHA

je zřejmé, že tendence změny je podobná jako po AA.

Rozdíly **CP** vs **LA-12**



Conclusions:

- In two ovarian cancer cell lines, differing in cisplatin sensitivity (resistance to cisplatin),
➤ **we observed a different type and dynamics of cell cycle modulations after cisplatin vs. LA-12 treatment. Although cisplatin is a markedly more potent activator of p53 and should be more effective in cell death induction, LA-12 was a significantly more potent cytostatic and cytotoxic agent;**
- **This might be related to a different mechanism of DNA repair** adducts (it has been shown that cisplatin-DNA and LA-12-DNA adducts differ from each other), or to **different mechanisms of cell cycle regulation**, including Gadd45 α accumulation and activity of CDKIs, such as p21^{waf1/cip1};
- **Our results indicate that also other mechanisms of the effects of LA-12, which are independent on DNA damage, may exist that are related to changes in phospholipid metabolism and cell membrane characteristics.**

In vitro studies:

Žák F., Turánek J., Kroutil A., Sova P., Mistr A., Poulová A., Mikolin P., Žák Z., Kašná A., Záluská D., Neča J., Šindlerová L., Kozubík A.:

*Platinum(IV) complex with adamantylamine as nonleaving amine group: **synthesis, characterization, and in vitro antitumor activity** against a panel of cisplatin-resistant cancer cell lines.*

J. Med. Chem. 2004 Jan 29; 47(3):761-3.

Turánek J., Kašná A., Neča J., Kvardová V., Knötigová P., Záluská D., Horváth V., Šindlerová L., Kozubík A., Sova P., Kroutil A., Žák F., Mistr A.:

*New platinum (IV) complex with adamantylamine ligand as a promising anticancer drug: **Comparison of in vitro cytotoxic potential** towards A2780/cisR cisplatin-resistant cell line within homologous series of platinum (IV) complexes.*

Anticancer Drugs. 2004; 15:537-543.

Kozubík A., Horváth V., Švihálková-Šindlerová L., Souček K., Hofmanová J., Sova P., Kroutil A., Žák, F., Mistr, A., Turánek J.:

*High effectiveness of platinum(IV) complex with adamantylamine in **overcoming resistance to cisplatin and suppressing proliferation of ovarian cancer cells in vitro.***

Biochem. Pharmacol. 2005; 69:373-383.

Horváth V., Blanářová, O., Švihálková-Šindlerová L., Souček K., Hofmanová J., Sova P., Kroutil A., Kozubík A.,:

*Platinum(IV) complex with adamantylamine **overcomes intrinsic resistance to cisplatin** in ovarian cancer cells.*

Gynecol. Oncol. 2006; 102:32-40

In vivo studies:

Sova P, Mistr A, Kroutil A, Zak F, Pouckova P, Zadinova M.:
Preclinical anti-tumor activity of a new oral platinum(IV) drug LA-12.
Anticancer Drugs. 2005;16:653-7.

Sova P, Chladek J, Zak F, Mistr A, Kroutil A, Semerad M, Slovak Z.:
Pharmacokinetics and tissue distribution of platinum in rats following single and multiple oral doses of LA-12 [(OC-6-43)-bis(acetato)(1-adamantylamine)amminedichloroplatinum(IV)].
Int. J. Pharm. 2005;288:123-9.

Cermanova J, Chladek J, Soval P, Kroutil A, Semerad M, Berankova Z, Siroky P, Surova I.:
Single-dose pharmacokinetics of a novel oral platinum cytostatic drug [(OC-6-43)-bis[acetato][1-adamantylamine]amminedichloroplatinum [IV]] in pigs.
Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 2004; 26:679-85.

UPLATNĚNÍ


látek lipidové povahy v kontextu

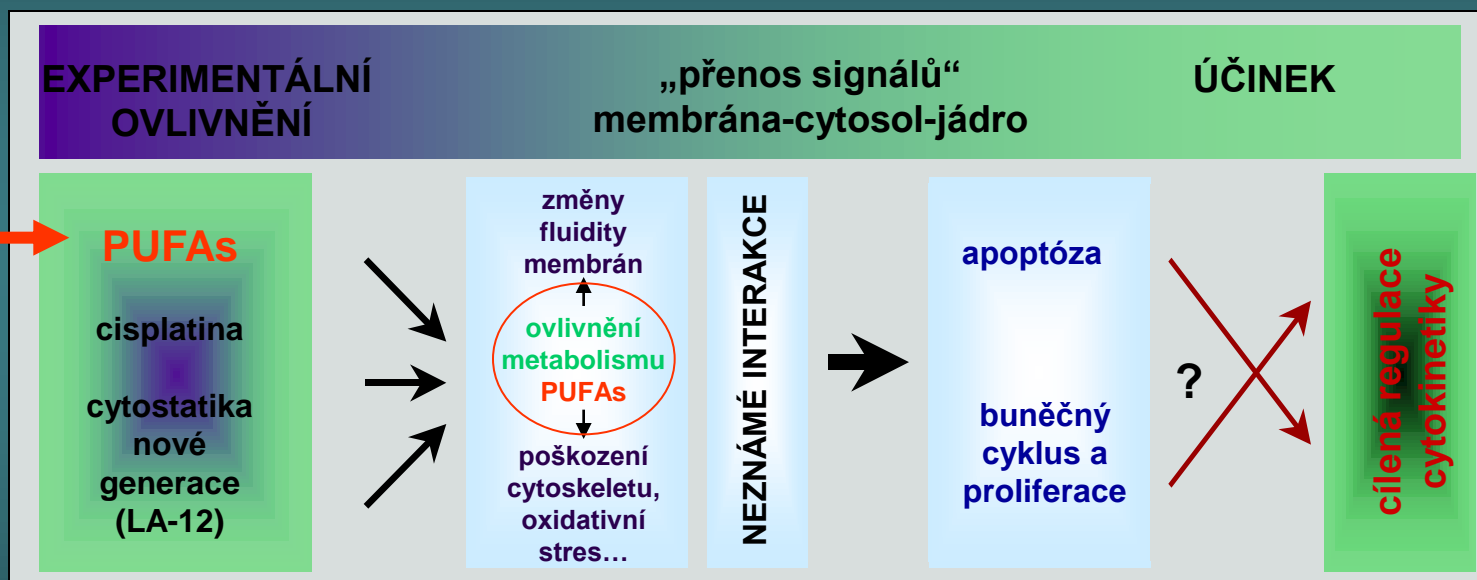
regulace cytokinetiky (*proliferace, diferenciace a apoptózy*)
v kontextu jejich interakcí s
vybranými farmaky.

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

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

Posílení terapeutických efektů ? 

Lipidové výživy vhodného složení 



Podstata možných návrhů projektů – prozatím neuzavřeno

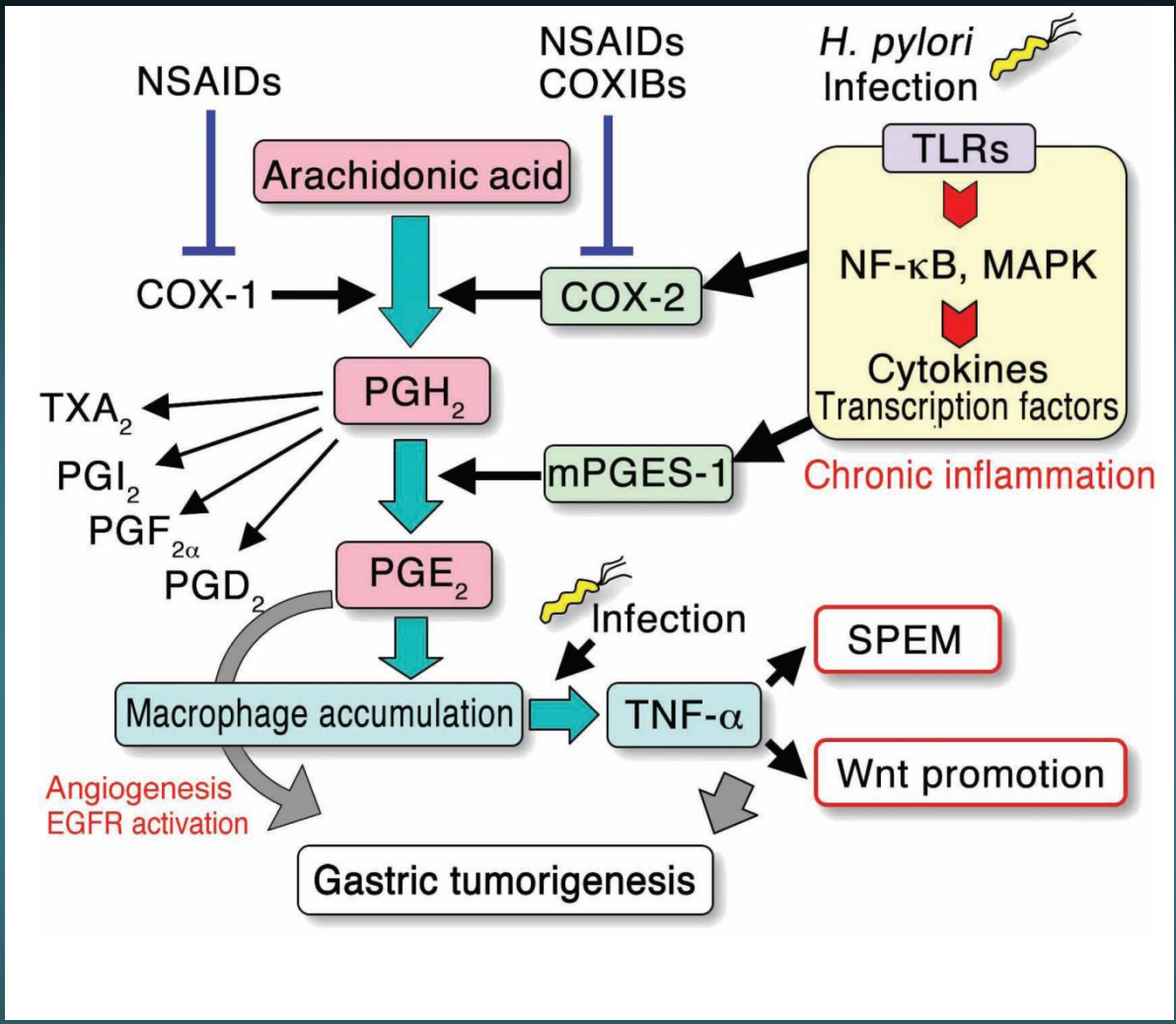
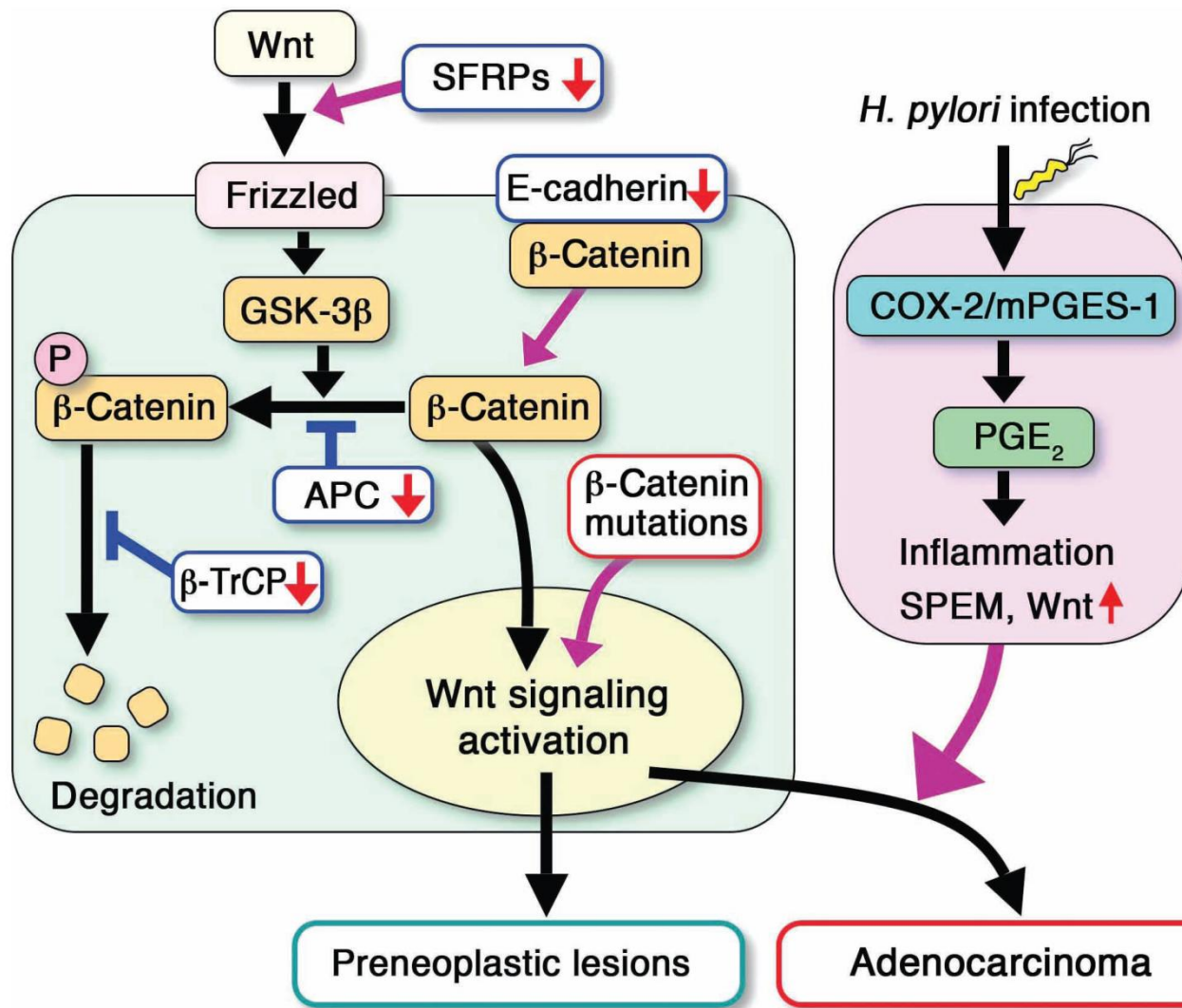


Fig. 1. Schematic presentation of arachidonic acid metabolism in the context of gastric tumorigenesis. The expression of cyclooxygenase (COX)-2 and microsomal PGE synthase-1 (mPGES-1) is induced by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)-associated inflammatory responses. The simultaneous expression of both COX-2 and mPGES-1 leads to induction of the prostaglandin PGE₂ pathway, which results in macrophage accumulation. These macrophages are activated by infectious stimuli, resulting in the induction of tumor necrosis factor (TNF)-α-dependent SPEM development and the promotion of Wnt signaling, which may contribute to gastric tumorigenesis. The induction of angiogenesis and activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling are also possible mechanisms of PGE₂ in tumorigenesis. COXIBs, COX-2 selective inhibitors; NF-κB, nuclear factor-κB; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; SPEM, spasmolytic polypeptide/TFF2-expressing metaplasia; TLRs, Toll-like receptors.



Cancer Sci. 2009 Oct;100(10):1779-85. Epub 2009 Jun 23.
 Prostaglandin E₂, Wnt, and BMP in gastric tumor mouse models.
[Oshima H](#), [Oguma K](#), [Du YC](#), [Oshima M](#).

Fig. 3. Schematic presentation of the canonical Wnt signaling and cyclooxygenase (COX)-2/prostaglandin PGE₂ pathway in gastric tumor development. β-Catenin mutations, SFRPs methylation, and downregulation of E-cadherin or β-TrCP can activate Wnt signaling in gastric cancer. Cooperation of the *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)-induced COX-2/PGE₂ pathway with Wnt activation leads to the development of gastric adenocarcinoma. Without the induction of the PGE₂ pathway, Wnt activation alone does not cause gastric cancer development. mPGES-1, microsomal PGE synthase-1.



Děkuji za pozornost