

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

J. Hofmanová

Úloha genů a prostředí ve vývoji nádorů

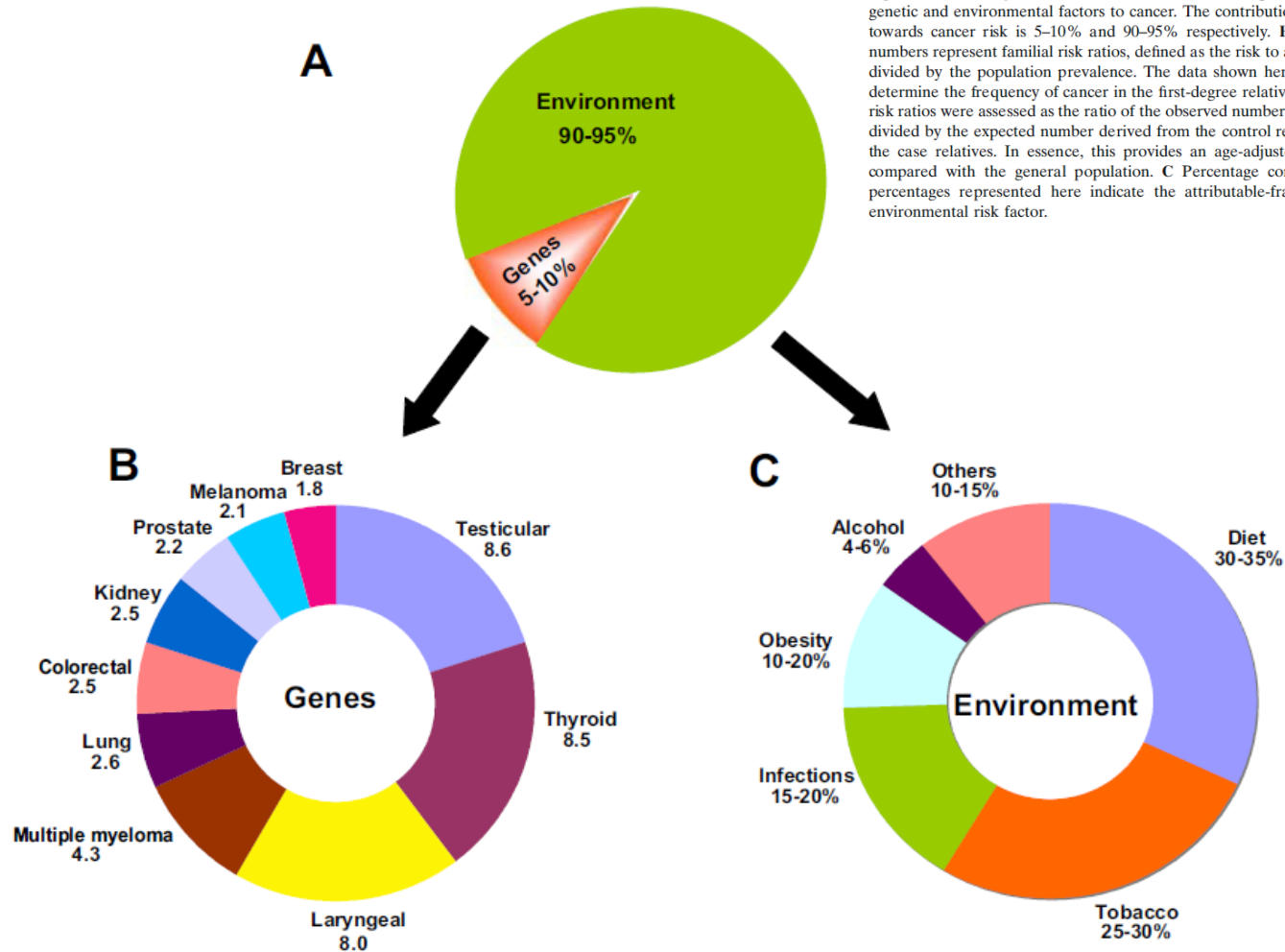
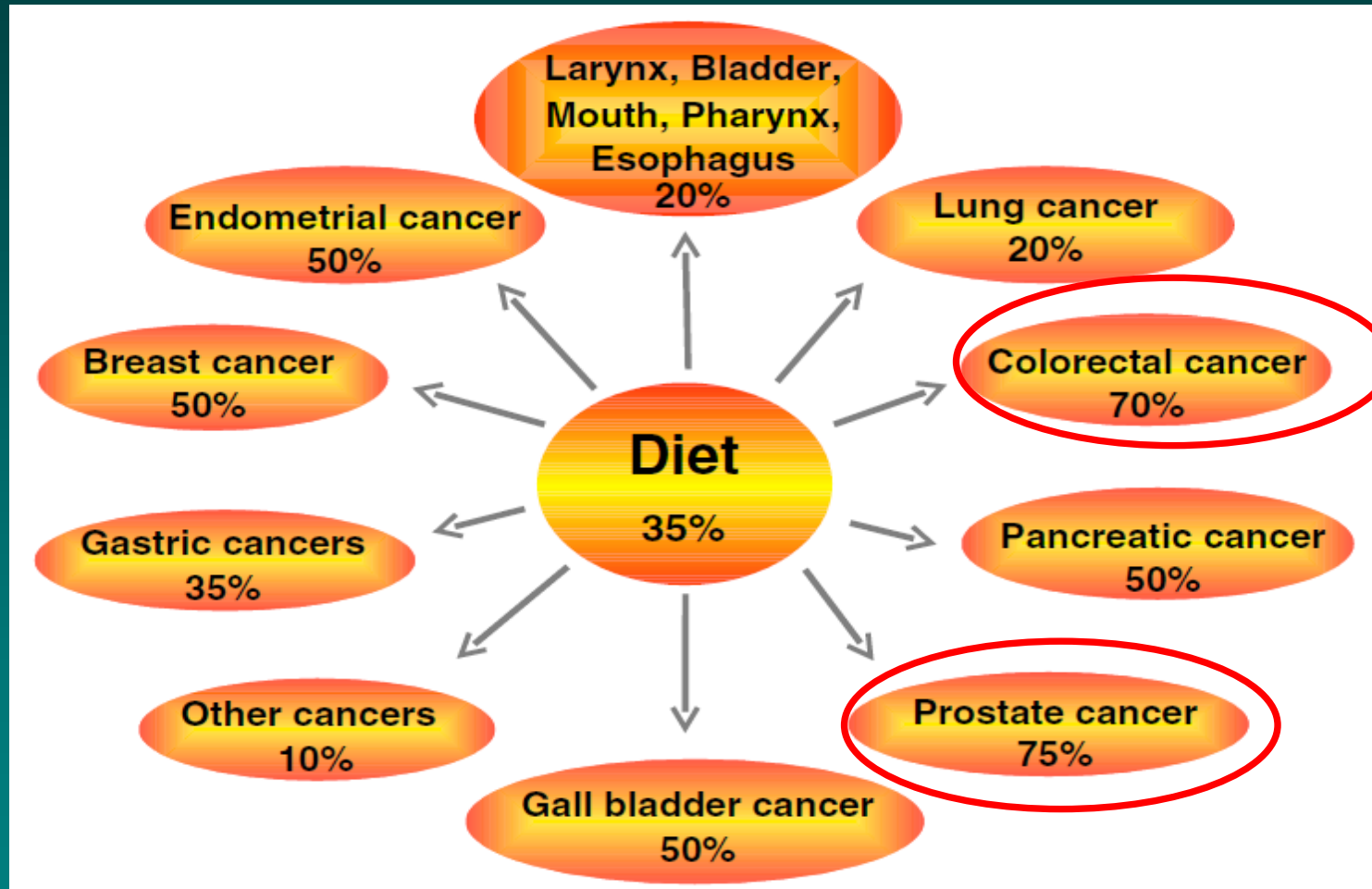


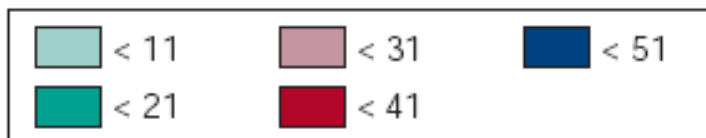
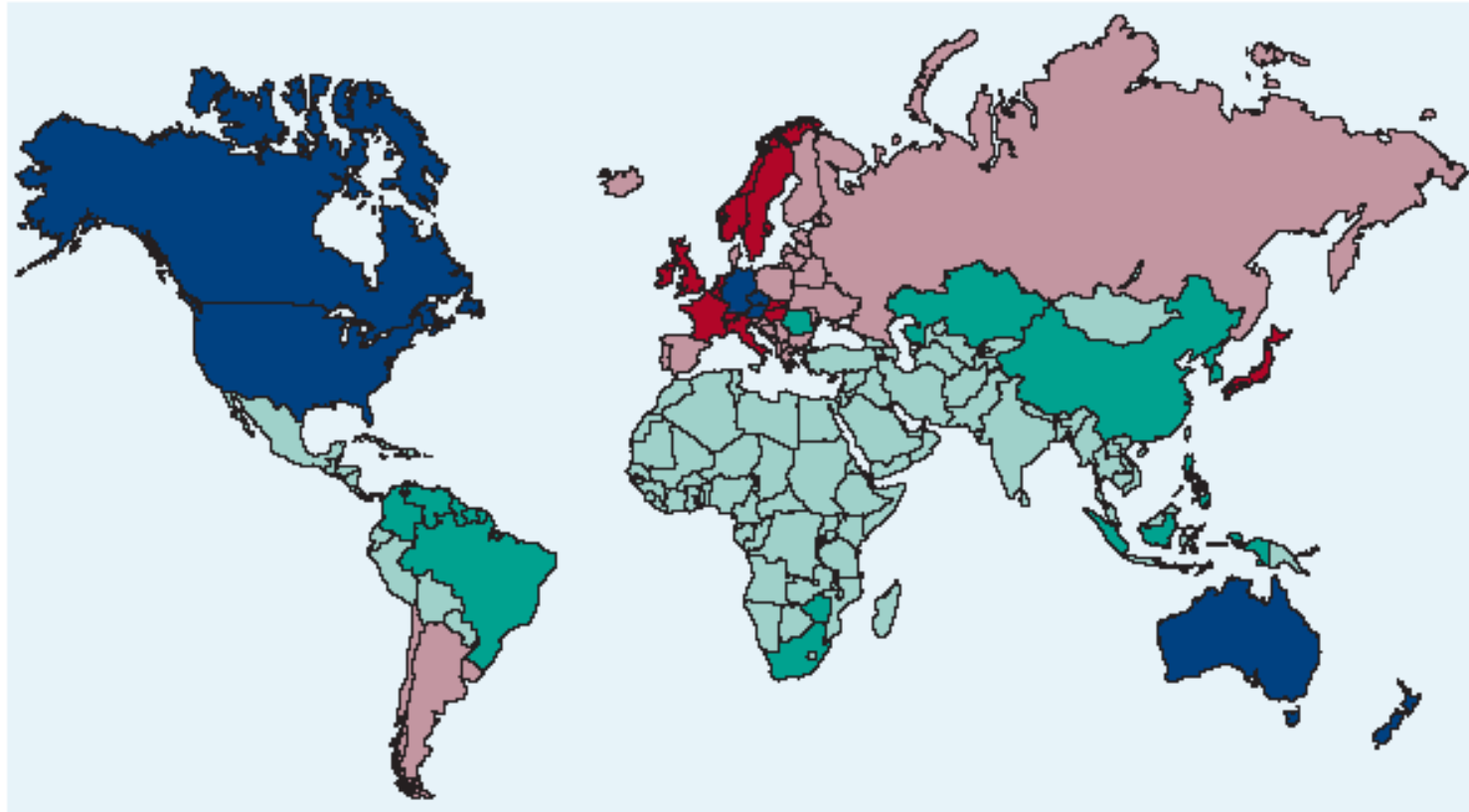
Fig. 1. The role of genes and environment in the development of cancer. **A** The percentage contribution of genetic and environmental factors to cancer. The contribution of genetic factors and environmental factors towards cancer risk is 5–10% and 90–95% respectively. **B** Family risk ratios for selected cancers. The numbers represent familial risk ratios, defined as the risk to a given type of relative of an affected individual divided by the population prevalence. The data shown here is taken from a study conducted in Utah to determine the frequency of cancer in the first-degree relatives (parents + siblings + offspring). The familial risk ratios were assessed as the ratio of the observed number of cancer cases among the first degree relatives divided by the expected number derived from the control relatives, based on the years of birth (cohort) of the case relatives. In essence, this provides an age-adjusted risk ratio to first-degree relatives of cases compared with the general population. **C** Percentage contribution of each environmental factor. The percentages represented here indicate the attributable-fraction of cancer deaths due to the specified environmental risk factor.

Podíl diety v úmrtí na nádorová onemocnění ??? stále diskutováno



Frekvence výskytu kolorektálních nádorů ve světě

a Incidence rates of colorectal cancer



Incidence a mortalita na kolorektální nádory v EU

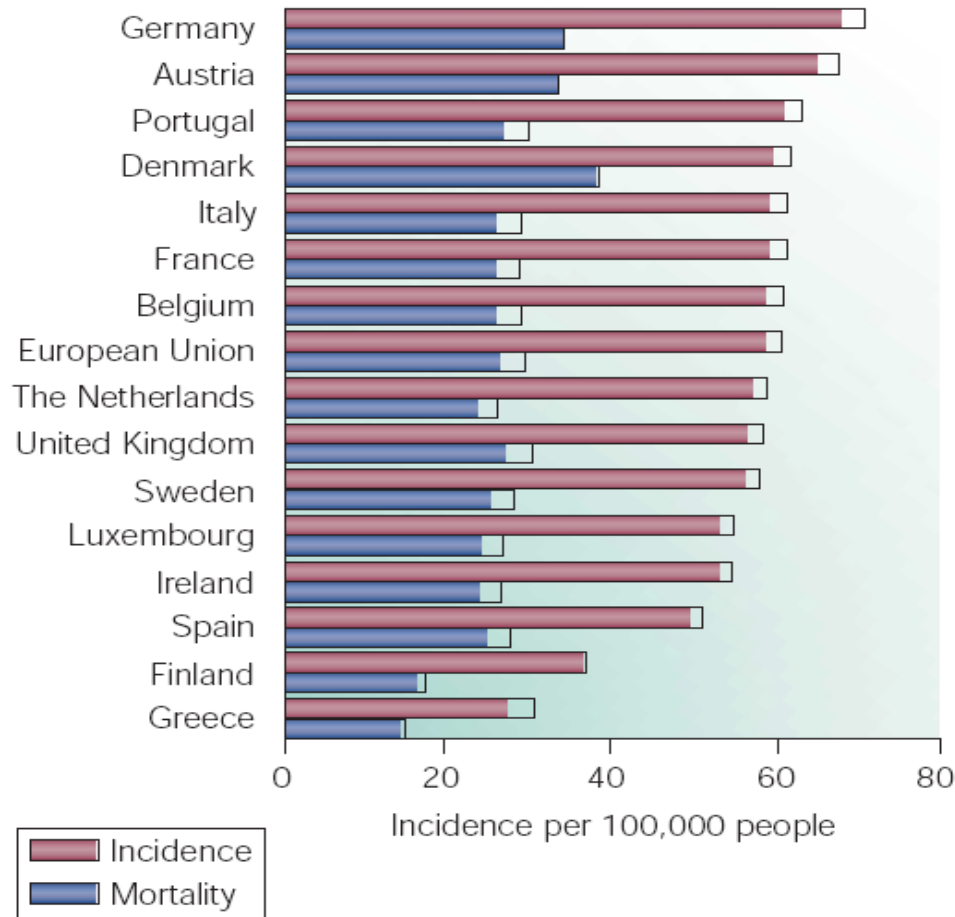


Figure 1 | **Colorectal cancer incidence in males in the European Union.** Rates of colorectal cancer by incidence, per 100,000 people, and mortality during 1996. Data were collected from Eucan — a service that provides data on the incidence and mortality of 24 key cancers in 15 member states of the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

V r. 2008 celosvětově
třetí nejčastější nádorové
onemocnění u mužů
druhé nejčastější u žen

Asi 1 200 000 nově
diagnostikovaných případů

V ČR asi 8000/rok a 4500 lidí
umírá

Asi 60% industrializované
země (USA, Austrálie,
Evropa)

Nejčastější skupina nad 60-
75 let.

23% mladších 60 let
50% diagnostikováno v
pokročilém stádiu

Rakovina tlustého střeva a rekta (CRC)

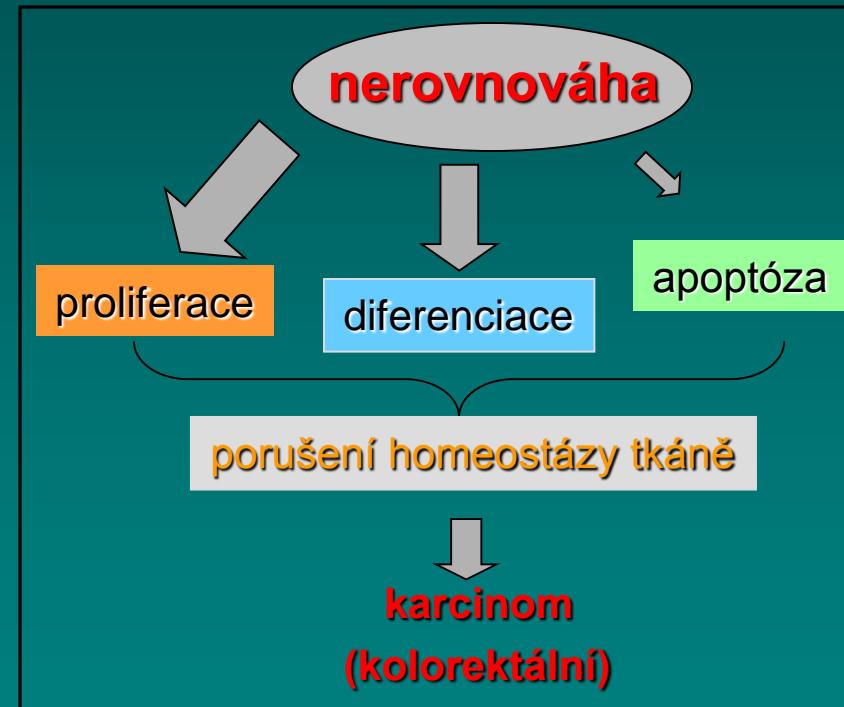
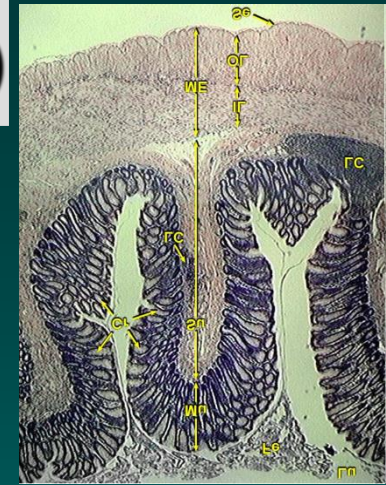
Jeden z nejčastějších nádorů v ČR – vysoká incidence, přední ve statistikách, alarmující růst

CRC založena na sekvenci molekulárních dějů v enterocytech zahrnujících

- genové mutace
- epigenetické modifikace
- aberantní signálování v základních buněčných drahách vedoucích k transformaci normálního střevního epitelu do adenokarcinomu

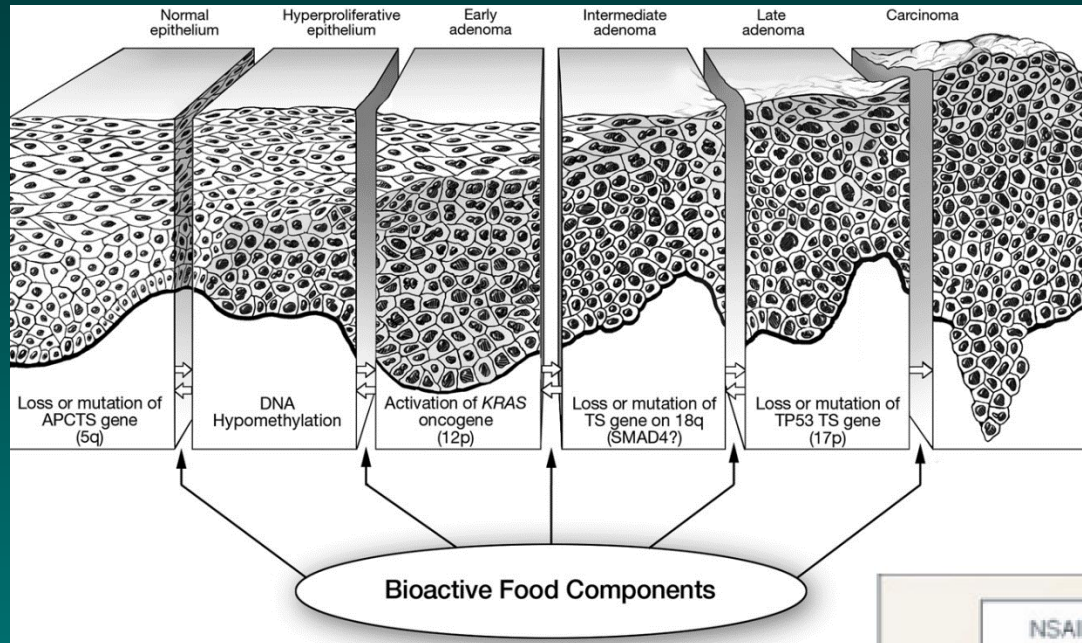
Tyto děje však závisí na dalších faktorech

- složení mimobuněčné matrix
- mikrobiom (podpůrné vs. protektivní účinky)
- aktivita imunitního systému
- chronický zánět
- VLIV PROSTŘEDÍ A SLOŽEK DIETY



Rozvoj nádorů kolonu

Multifaktoriální a komplexní etiologie - Genetické změny, životní styl, výživa

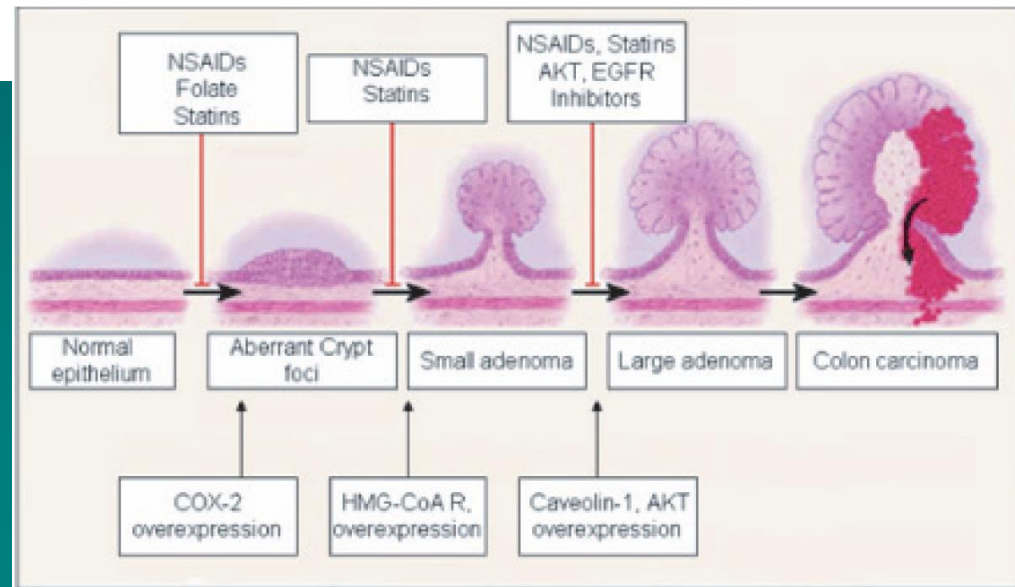


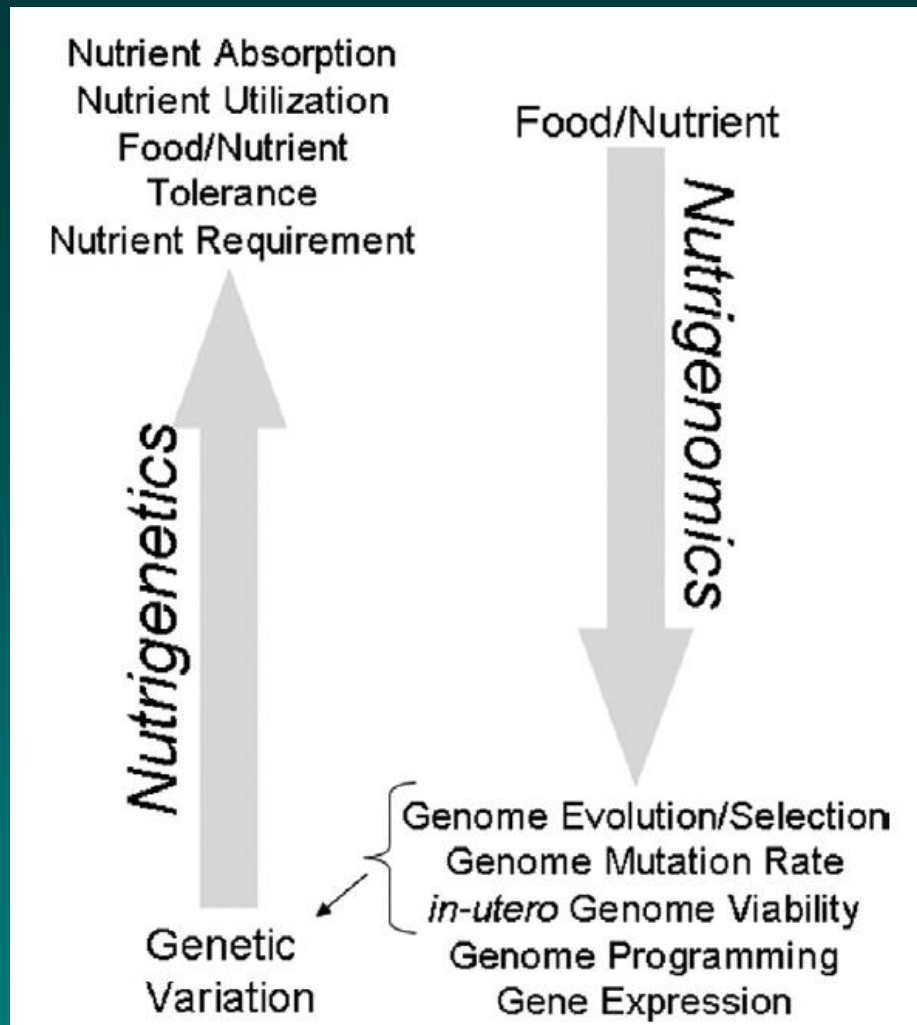
Ve všech stádiích rozvoje karcinomu se mohou uplatňovat **bioaktivní složky potravy** ve smyslu stimulace či zástavy progresu jednotlivých stádií

Vývoj nádoru provázejí **změny biochemických a metabolických drah** odrážející se ve změnách proliferace, diferenciace a apoptózy buněk.

Chemopreventivní látky

Využívány na základě znalosti mechanismů





NUTRIGENETIKA

Podmíněnost požadavků, příjmu, využití a tolerance potravy genotypem

NUTRIGENOMIKA

Jak potrava přispívá ke genetickým změnám pozorovaným uvnitř geneticky odlišné lidské populace (genová evoluce, poměr mutací, *in-utero* genomová viabilita, programování genomu, genová exprese)

Figure 1. Nutrient-genome interactions. Nutritional genomics encompasses both nutrigenetics, the influence of genetic variation on nutrient utilization/metabolism, food tolerances, and nutrient requirements; and nutrigenomics, the modulatory role of nutrients on genome evolution, mutation rate, *in-utero* viability, programming, and expression. In turn, several of the nutrigenomic outcomes (ie, genome evolution) contribute to the genetic variation observed within genetically diverse human populations. NOTE: This figure is available online at www.adajournal.org as part of a PowerPoint presentation.



ÚLOHA VÝŽIVY



Složky výživy a jejich metabolity (oxidanty, mutageny, karcinogeny) přímo nebo nepřímo ovlivňují

- střevní metabolickou rovnováhu,
- mikrofloru,
- imunitní systém,
- indukci zánětu
- rovnováhu mezi přírůstkem a úbytkem buněk

Epidemiologické, experimentální a dnes již i klinické studie prokazují **protektivní úlohu n-3 VNMK** přítomných v rybím oleji a mastné kyseliny z krátkým řetězcem **BUTYRÁTU z vlákniny** **v zánětu i karcinogenezi kolonu.**

Různá biologická úloha lipidů

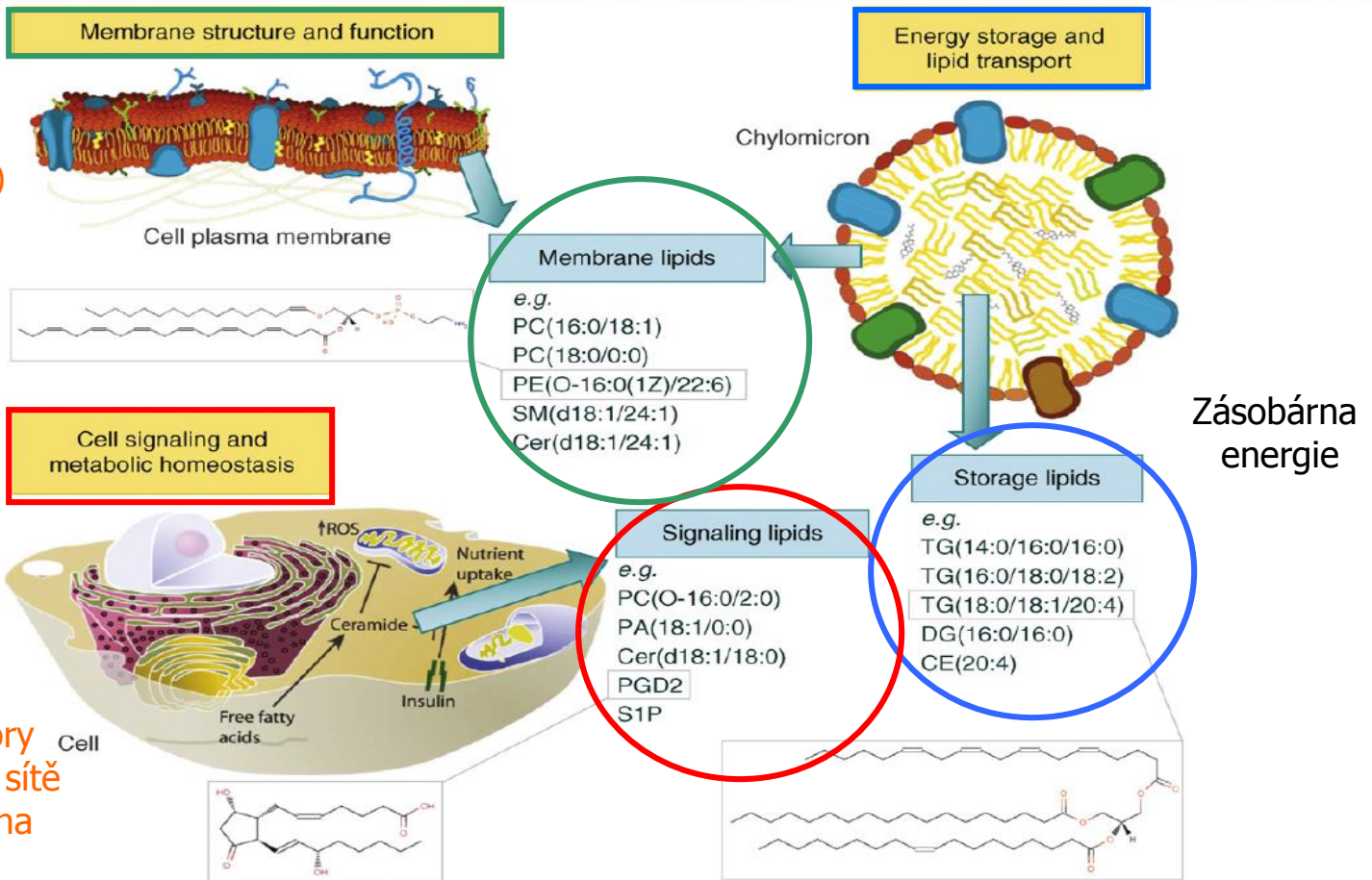
TUKY (lipidy) NEJSOU POUZE ZDROJ ENERGIE !!!

Strukturální a regulační úloha s významným dopadem na fyziologické funkce organismu
Úloha v patofyziologii - nádory

Aktivita proteinů
(přenašečů, receptorů)

**ODPOVĚĎ a
CHOVÁNÍ BUNĚK**

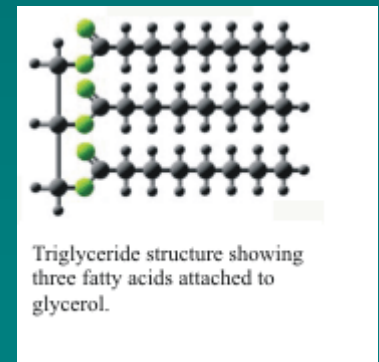
Mediátory a modulátory
vnitrobun. signalizační sítě
Metabolická rovnováha



TRENDS in Biotechnology

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



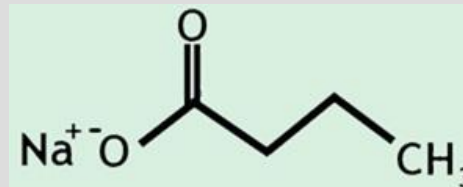
HYPOTÉZA

- ▶ **Interakce lipidů a vlákniny (VNMK a butyrátu) příznivě ovlivňující kinetiku buněk střeva**
- ▶ **Modulace účinků endogenních regulátorů (induktorů apoptózy rodiny TNF) mastnými kyselinami**



Psyllium

Butyrát sodný



MASTNÉ KYSELINY S KRÁTKÝM ŘETĚZCEM
 Anaerobní mikrobiální fermentace **VLÁKNINY**
 Fyziologický význam pro zdravou střevní tkáň

Specifické působení na



Normální kolonocyty

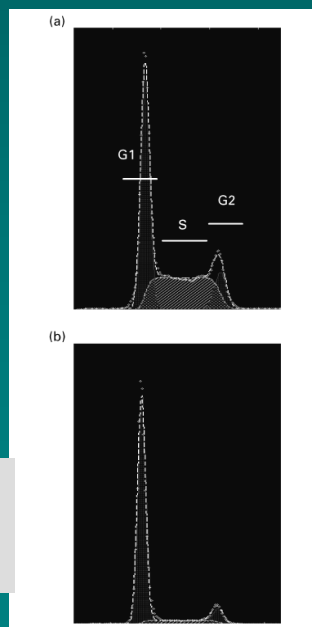
- zdroj energie
- zvýšená proliferace
- pokles apoptózy

Prevence a terapie
NÁDORŮ TLUSTÉHO STŘEVA ???

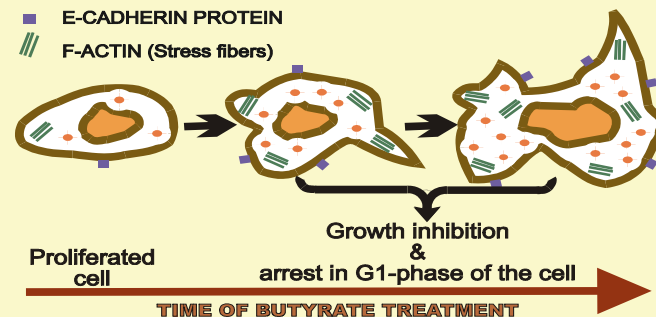


Nádorové buňky kolonu

- snížená proliferace
- indukce diferenciac
- indukce apoptózy
- změny genové exprese inhibitor histondeacetyláz



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



Předpokládané mechanismy účinku butyrátu

- ▶ inhibice histondeacetyláz - acetylace histonů – ovlivnění exprese genů (regulace buněčného cyklu, diferenciace, apoptózy)
- ▶ modulace specifických signálních drah (PI3K/Akt, ERK1/2, p38) a transkripčních faktorů (NFkB, PPAR)
- ▶ ovlivnění oxidativního metabolismu (zejména oxid/antiox enzymy)
- ▶ ovlivnění mitochondrií, Bcl-2 rodina, kaspázy
- ▶ indukce antimetastatických genů (suprese matrix metaloproteináz, FAK, indukce E-kadherinu)

Přechod adenom x karcinom

Buněčné linie

normální epitel
NCM460

fetální colon
FHC

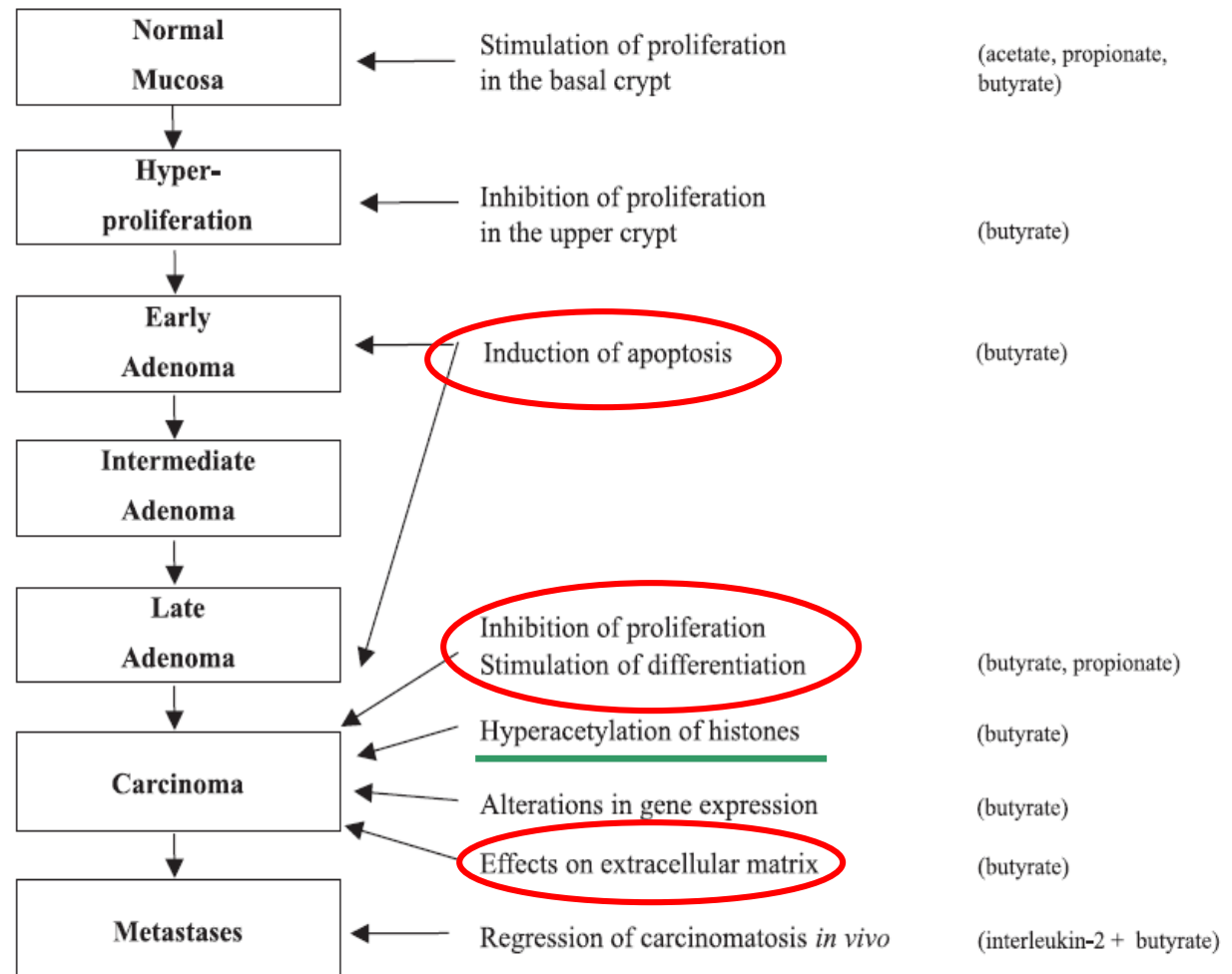
adenom
AA/C1
RG/C2

adenocarcinom
HT-29
HCT-116
SW480

lymf.
metastáza
SW-620

**Carcinogenic
potential**

Účinky butyrátu



AA (50µM)
Rostl. oleje

DHA
Rybí oleje

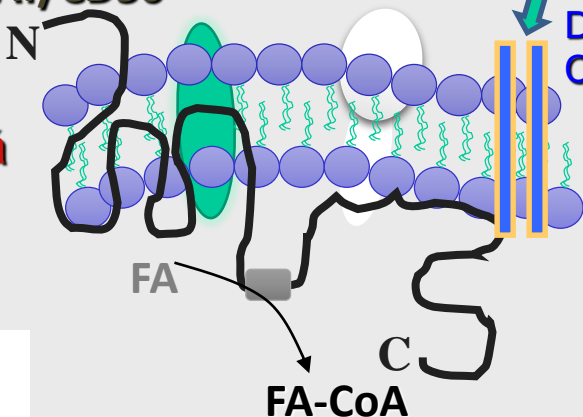
NaBt (3mM)
vláknina

Endogenní regulátory
TRAIL, TNFα,
anti-Fas

Detekované parametry
(různý stupeň bun. organizace)

Plasmatická membrána

FAT/CD36



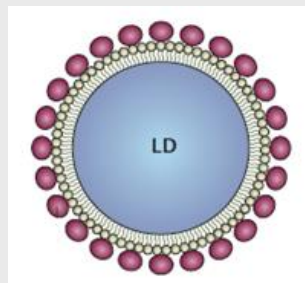
Receptory smrti
DR4, DR5
CD95

Cytoplasm. membrána
Struktura lipidů (lipid packing)
průtoková cytometrie - FCM (merocyanin 540)

Analýzy lipidů

Fosfolipidy (LC-MS)
Složení MK (GC-MS)

Akumulace lipidů v cytoplasmě
(lipid droplets, FCM - Nile red)



Cytoplasma

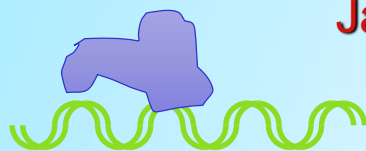


Mitochondrie

Produkce ROS – FCM (DHR-123)
Mit. membrán. potenciál – FCM (TMRE)
Expres proteinů rodiny Bcl-2 (Western blot)

PPAR

Jádro



PPRE

Jádro

Transkripční faktory, genová exprese



Proliferace **Diferenciace** **Apoptóza**

Vysoce nenasycené mastné kyseliny

ESENCIÁLNÍ VYSOCE NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY (VNMK)

dlouhé C řetězce a 2 i více dvojných vazeb

Řada n-6 a n-3

v záp dietě
až 20:1
(1:1)



rostl.oleje

18:2n-6

Linoleic acid

18:3n-3

α -linolenic acid



$\Delta 6$ desaturase

18:3n-6

Elongase

18:4n-3

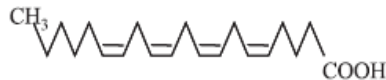


20:3n-6

Dihomo- γ -linolenic acid (DGLA)

20:4n-3

$\Delta 5$ desaturase



20:4n-6

Arachidonic acid (AA)

20:5n-3

Eicosapentaenoic acid (EPA)



Elongase

22:4n-6

Elongase,
 $\Delta 6$ desaturase and
peroxisomal β -oxidation

22:5n-3

rybí oleje
plankton, řasy



22:5n-6

Docosapentaenoic acid (DPA)

22:6n-3

Docosahexaenoic acid (DHA)



Změny spektra MK v tukové tkáni krys po podávání alfa-linolenové a dokosahexaenové kyseliny

Diet, Cancer, and the Lipidome

Table 1. Changes in rat WAT fatty acid composition induced by either α -linolenic acid or DHA supplementation (16, 19)

Fatty acids (mol%)	α -Linolenic acid		DHA	
	Control (<i>n</i> = 12)	Supplemented (<i>n</i> = 14)	Control (<i>n</i> = 7)	Supplemented (<i>n</i> = 6)
Saturates				
16:0	15.2	17.3	22.9	20.8
18:0	2.7	2.9	2.8	3.4
Total*	19.4	21.8	27	28.9
Monounsaturates				
<i>c</i> -18:1 ω 9	56.9	48.3 [†]	52.7	43.8 [†]
Total [†]	62.4	54.7 [†]	57.9	48.9 [†]
ω6 PUFA				
18:2 ω 6	13.9	13.4	12.2	11.1
Total [§]	14.4	13.7	12.7	11.3
ω3 PUFA				
18:3 ω 3	1.3	6.9 [†]	0.6	0.8 [†]
22:6 ω 3	0.1	0.1	0.1	8.2 [†]
Total	1.4	7.0 [†]	0.7	9.3 [†]
Ratio				
ω 6/ ω 3	10.3	1.9 [†]	18.1	1.2 [†]

*Including: 14:0, 15:0, 17:0, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, and 24:0.

[†]Within diet, significantly different from control values (*P* < 0.05).

[‡]Including: 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, *c*-18:1 ω 7, and 20:1.

[§]Including: 18:3 ω 6, 20:2 ω 6, 20:3 ω 6, and 20:4 ω 6.

^{||}Including: 20:3 ω 3, 20:5 ω 3, 22:5 ω 3, and 22:6 ω 3.

WAT – white adipose tissue

Nebyl prokázán protektivní vliv proti nádorům

Došlo ke zvýšení n-3 VNMK, snížení poměru n-6/n-3, ale rovněž ke snížení cis-mononenasyc. kyselin

Je potřeba komplexnější dietetická modifikace

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

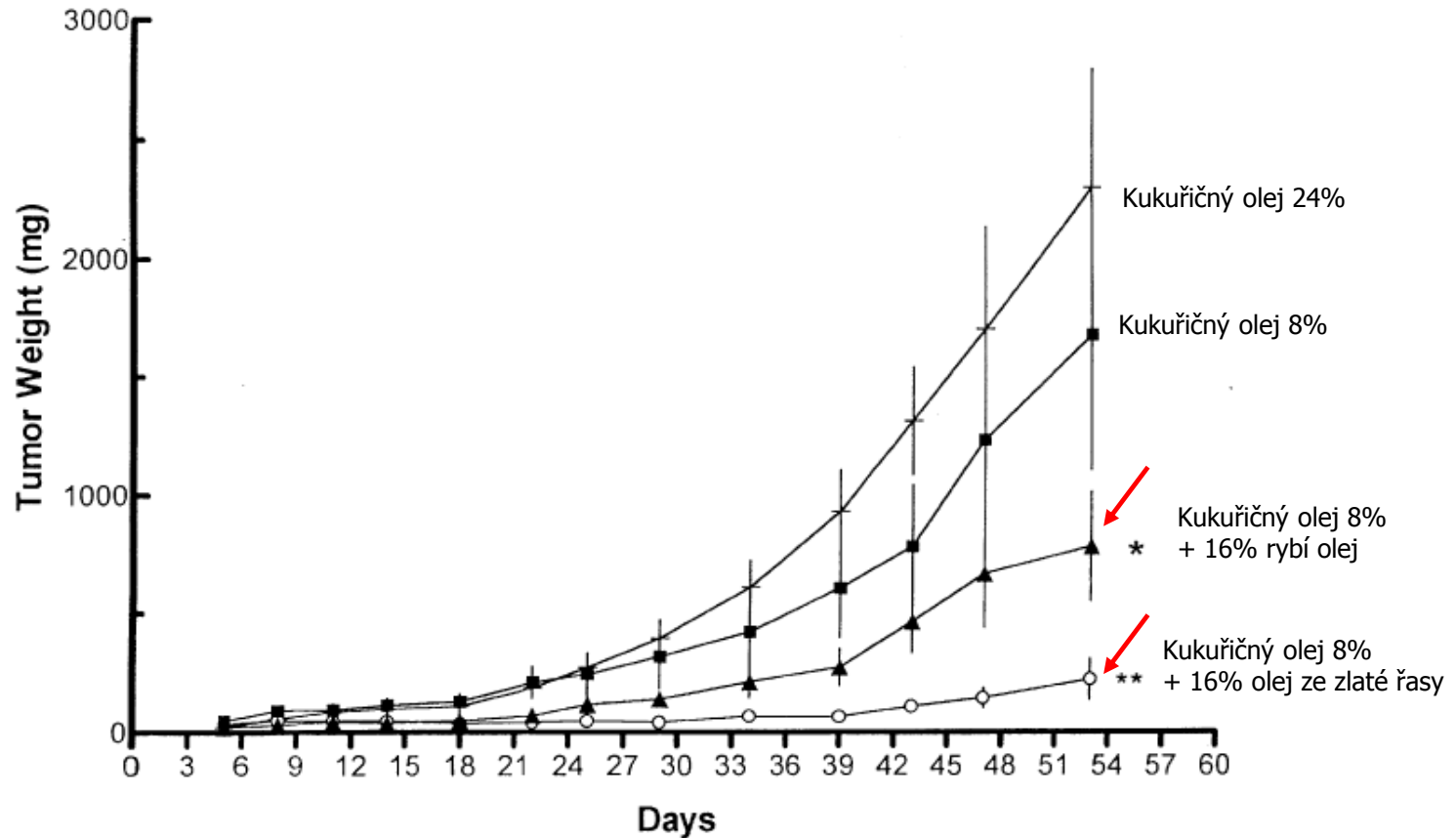


Fig. 1. Effect of dietary fatty acids (corn oil, menhaden oil, golden algae oil) on the growth of WiDr tumor in athymic mice. Tumor weights were estimated using the formula (tumor weight in mg = $A \times B \times C/2$) where A , B , C represent the three perpendicular diameters of the tumor in millimeters.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

Rozdílné účinky omega-3 a omega-6 VNMK na genovou expresi nádorových buněk prsu

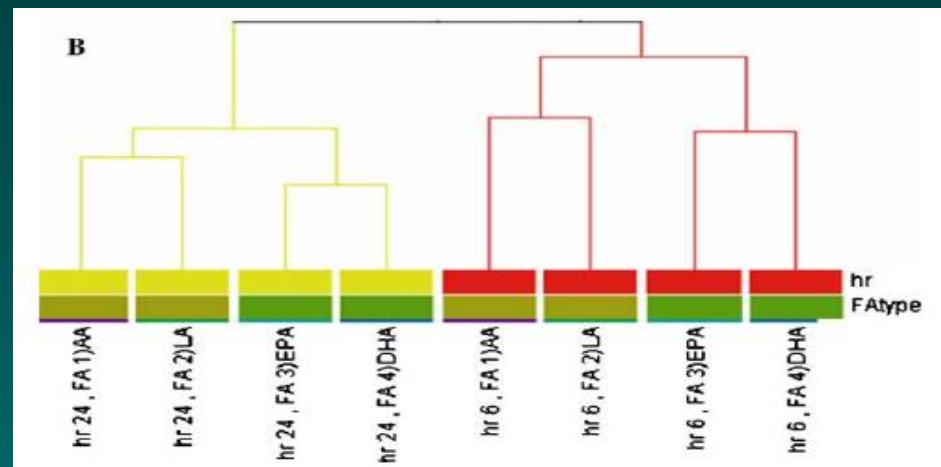
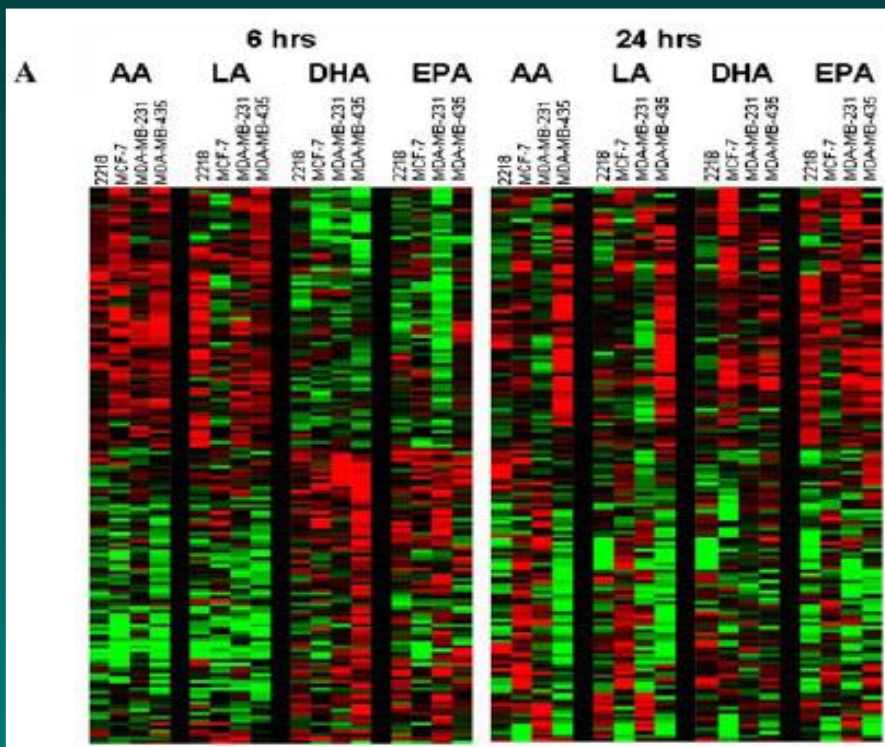


Fig. 1 (A) Pseudo color cluster view of genes differentially expressed between omega-3 (ω -3) and omega-6 (ω -6) fatty acids. Cells were treated with the four fatty acids at 6 and 24 h. RNA was isolated and hybridized on the cDNA microarray slides as detailed in materials and methods. Images were analyzed using GenePix 4.0 and data were analyzed using GeneSpring 7.0. **(B)** Conditional tree-view of genes showing the most variation between the four pre-designed groups. This figure shows that the period of incubation with the fatty acids has an important effect on cell responses to the treatments. Red and yellow color branches are representative of the 6 and 24 h time points, respectively

Různé buněčné linie ovlivněné AA, LA, DHA a EPA
Významná je doba působení PUFAs

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

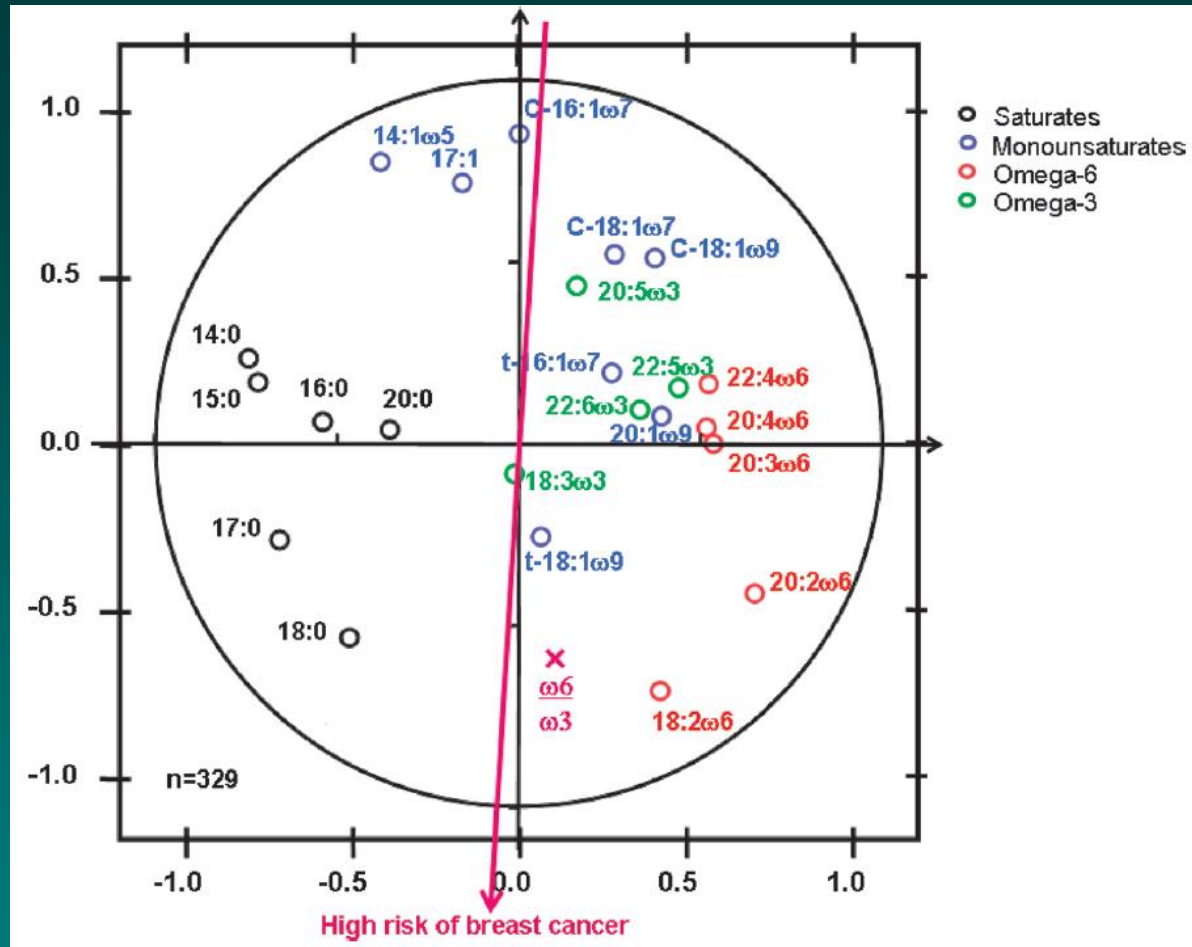
Prokázány změny ve složení a metabolismu lipidů

- v plazmě nádorových pacientů
- v nádorové tkáni a buňkách ve srovnání s nenádorovými

Zejména snížení obsahu n-3 VNMK (DHA) ve srovnání s n-6 (kys. linolová a arachidonová)

S protekcí určitých typů nádorů (např. prsu) spojen složený indikátor kombinující zvýšené mononenasyčené MK a nízký poměr omega6/omega3. Tento lipidom by se mohl stát templátem pro detekci rizika nádorů prsu ve vztahu k dietě.

Analýza základních komponent mastných kyselin v tukové tkáni



Zvýšené riziko nádoru prsu ve spojitosti s poměrem omega-6/omega-3 VNMK

Figure 3. Principal component analysis of adipose tissue fatty acids. In the scatter plot of the second principal component against the first principal component (in which the X axis represents the first principal component and the Y axis represents the second principal component), the coordinates of each fatty acid equals the coefficients of correlation between the fatty acid and the principal components. The unity correlation circle drawn defines the limits in which the fatty acids locate: the closer a fatty acid to this unity circle, the higher its contribution to the definition of the principal components, but it is positioned in the scatter plot according to its correlation with the two principal components. *Red arrow*, increased risk of breast cancer, taking into account the OR associated with both the X and Y axis, adjusted for BMI, age, menopausal status, and height. The position of this arrow is almost superposed on the Y axis because the OR associated with the first component is close to 1, whereas the OR associated with the second principal component is 1.28 (95% CI, 1.11-1.49; $P = 0.001$).

Analýza (array) hladiny MK u benigních a maligních nádorů prsu

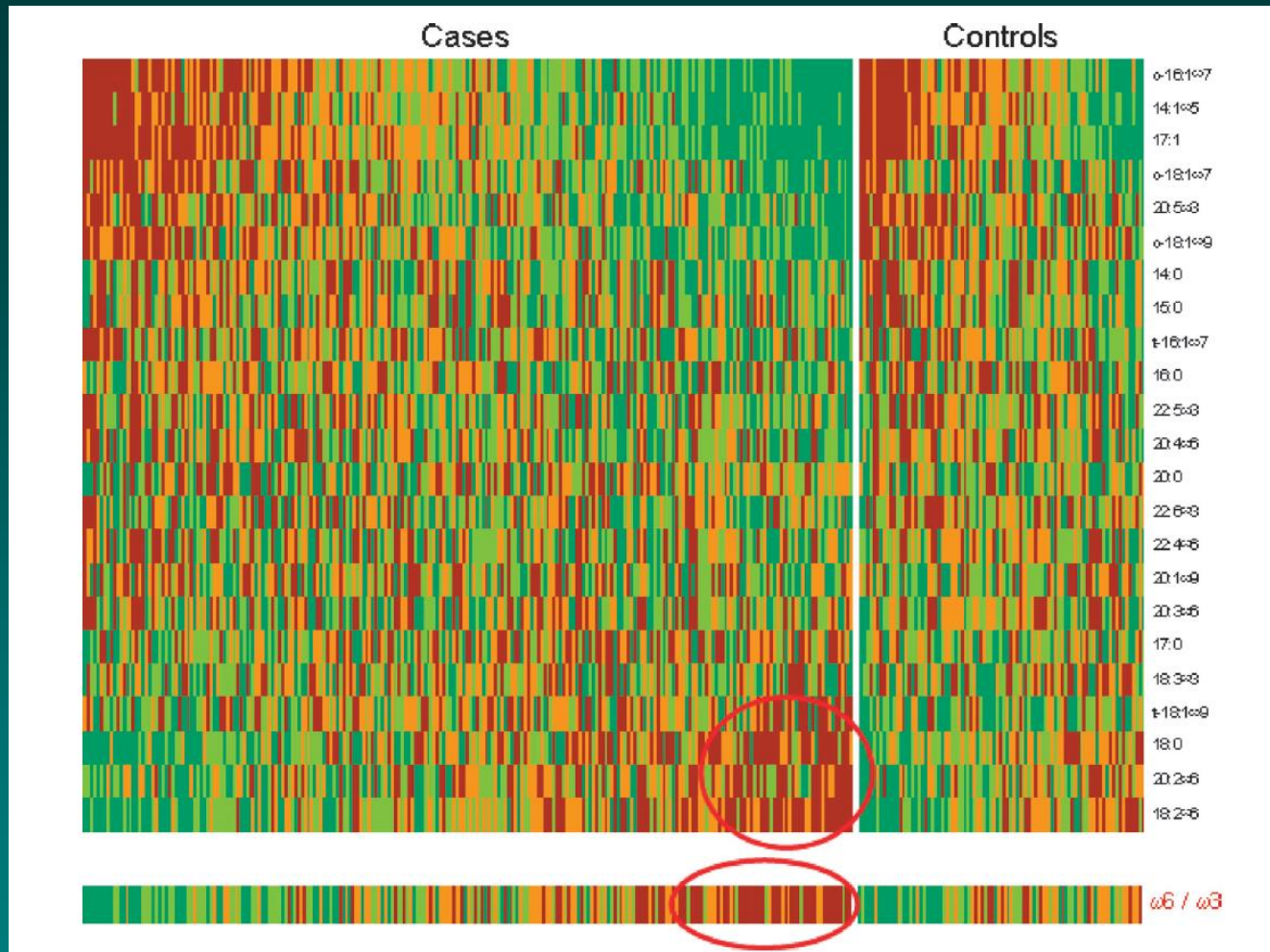


Figure 4. Fatty acid level array in patients with benign (controls) or malignant (cases) breast tumors. Each lane represents a patient, sorted according to its position on the second principal component as shown in Fig. 3. Each line represents one fatty acid, according to its correlation with the second principal component. Fatty acid values are represented as different colors for each quartile, from green (low) to red (elevated). *Bottom*, the $\omega 6 / \omega 3$ ratio of PUFAs.

Bougnoux P. et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006, 15:416

Nádorové buňky kolonu vykazují:

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

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

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

Během karcinogeneze se vyvíjí tzv. lipogenní charakter buněk

Zvýšená endogenní syntéza mastných kyselin a snížená citlivost k nutričním zásahům

FASN – fatty acid synthase (syntéza mastných kyselin) pod transkripční kontrolou SREBP1c (sterol regulatory element-binding protein)

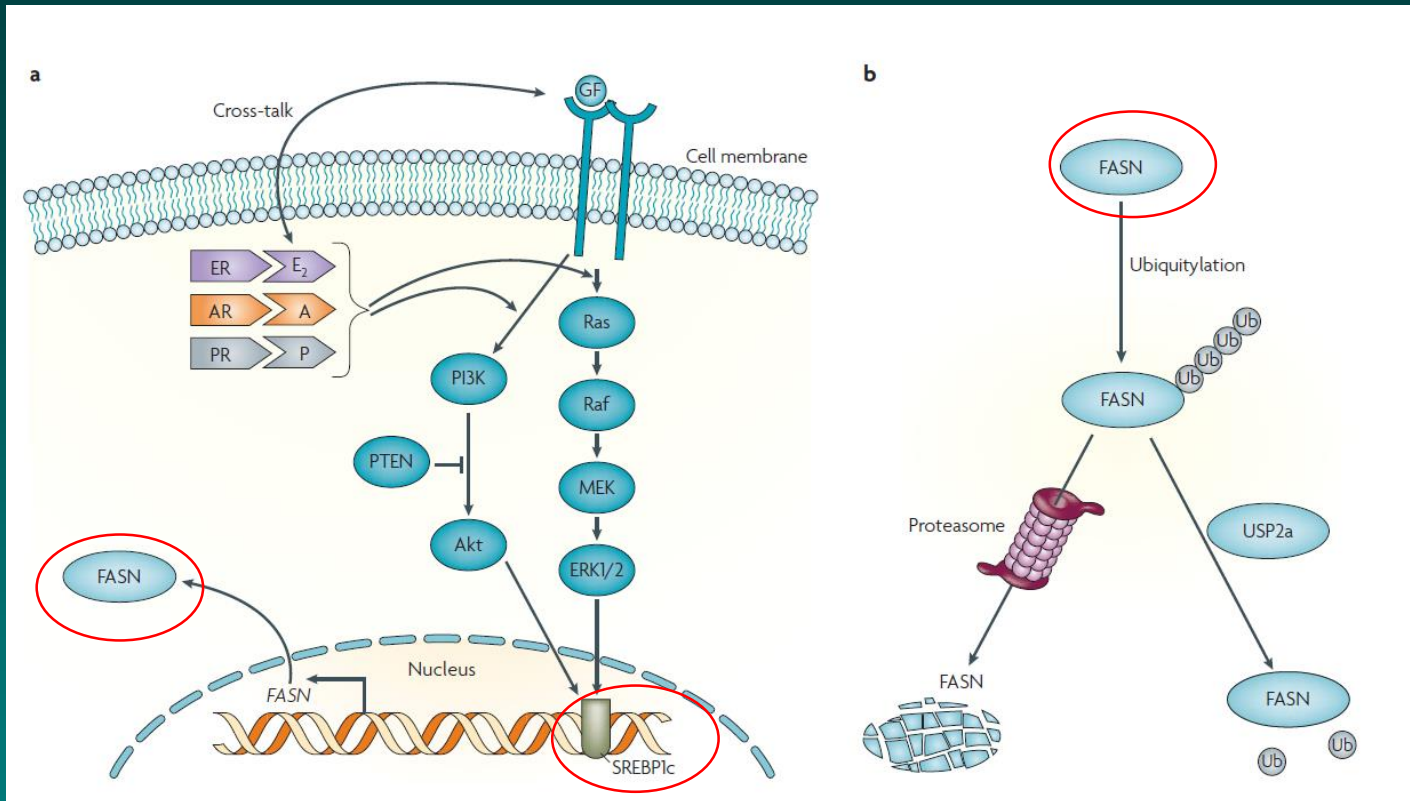
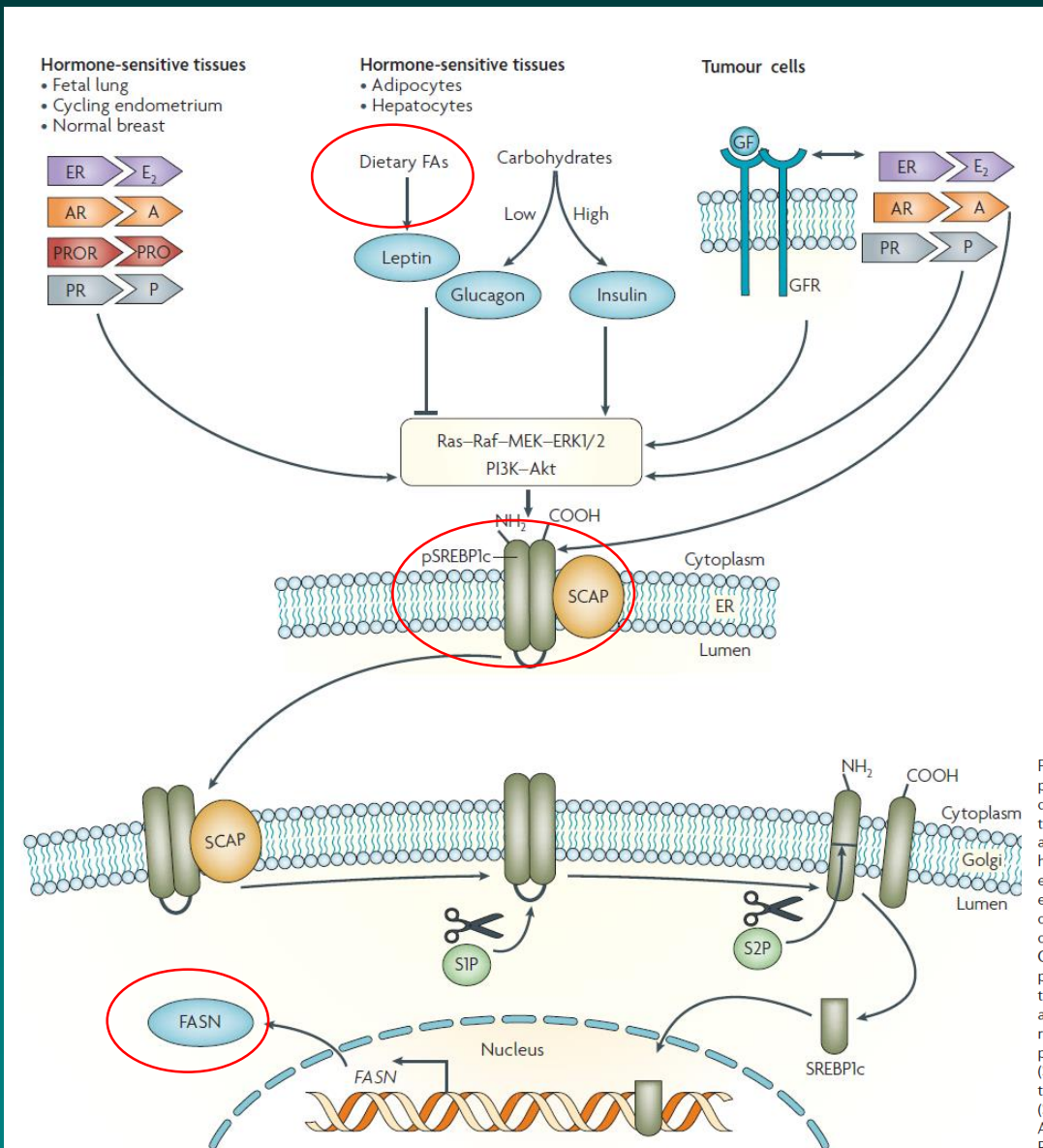


Figure 2 | Two main pathways to regulate the expression of tumour-associated FASN. **a** | On the surface of tumour cells, growth factor (GF)-dependent or independent autophosphorylation of receptor tyrosine kinases (RTKs) such as the GF receptors (GFRs) epidermal growth factor receptor (EGFR, also known as ERBB1) and ERBB2 (also known as HER2) leads to downstream activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)–Akt and extracellular signal-regulated kinases (ERK1 and ERK2) signal transduction cascades. Steroid hormones (SH) including oestradiol (E₂), progestins (P) and androgens (A) bind to their corresponding SH receptors (SHRs; ER, PR and AR, respectively) can also trigger identical transduction mechanisms. These ultimately stimulate fatty acid synthase (FASN) expression through the modulation of the expression and/or nuclear maturation of the transcription factor sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c), which binds to and activates sterol regulatory elements in the promoter region of FASN (see FIG. 3). Cross-talk between GFs–GFRs and SHs–SHRs converging on PI3K–Akt and mitogen-activated ERK kinase (MEK)–ERK cascades amplify the responses of FASN expression in hormone-responsive cancer cells. **b** | Tumour-associated FASN overexpression can also be achieved at the post-translational level through interaction with USP2a, a pre-proteasomal ubiquitin-specific protease that, by removing ubiquitin from FASN, strongly stabilizes the enzyme. It should be noted that these two pathways regulating FASN might concurrently take place in tumour cells. PTEN, phosphatase and tensin homologue.

Modulace traskripčního faktoru SREBP1c



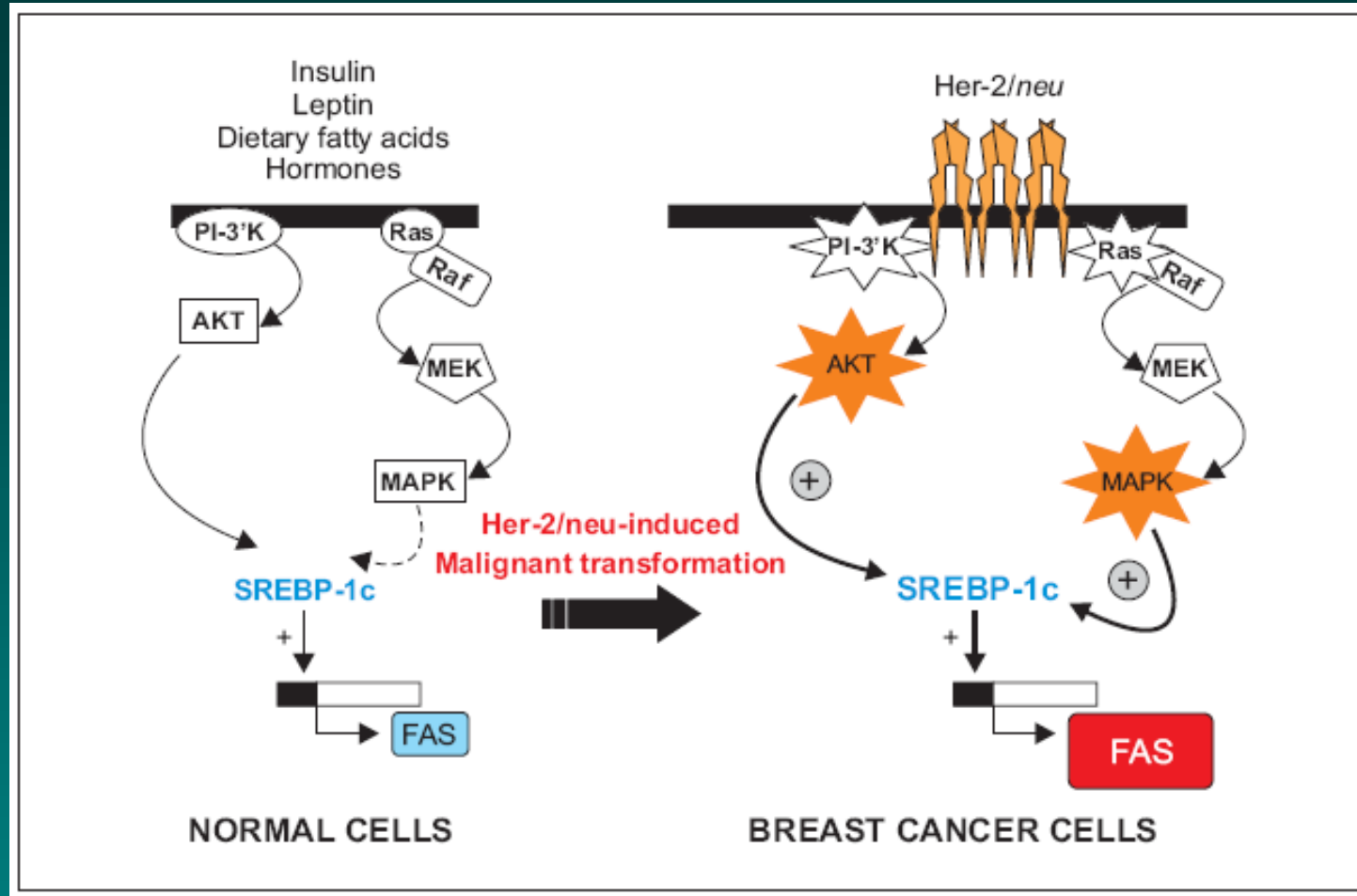
Souvislost s regulací FASN u normálních a nádorových buněk.

Hormonální a nutriční regulace FASN napojena částečně na PI3K/Akt a ERK1/2 signálovou transdukcí regulující expresi a maturaci SREBP.

U nádorových buněk hyperaktivace této dráhy v důsledku onkogenní deregulace (nadprodukce růst. faktorů, hyperaktivace receptorů, nebo ztráta funkce negativních regulátorů (např. PTEN) způsobí konstitutivní expresi či maturaci SREBP a transkripci FASN.

Figure 3 | Modulation of SREBP1c: a common partner for FASN regulation in normal and tumour cells. The pathways that regulate fatty acid synthase (FASN) expression in normal and tumour cells share identical downstream elements including sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP1c). In hormone-sensitive tissues (such as fetal lung, cycling endometrium and normal breast) and lipogenic tissues (such as hepatic and adipose tissues), FASN expression is regulated by hormones, carbohydrates, fatty acids (FAs) and fasting. This hormonal and nutritional regulation converges, at least in part, on phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-Akt and extracellular signal-regulated kinases (ERK1 and ERK2) signal transduction cascades that modify either the expression and/or the maturation of SREBP1c. In tumour cells, SREBP1c expression and/or maturation will be constitutively driven by the aberrant hyperactivation of these pathways in response to a variety of oncogenic changes including overproduction of growth factors (GFs), ligand-dependent or independent hyperactivation of GF receptors (GFRs), and/or gain or loss of function of components of the signalling cascade such as loss of phosphatase and tensin homologue (PTEN) function. The inactive SREBP1c precursor (pSREBP1c) is anchored in the membrane of the endoplasmic reticulum (ER). The release of active SREBP1c requires SREBP cleavage-activating protein (SCAP), which forms a complex with pSREBP1c. When cellular demand for endogenous FAs rises, the pSREBP1c-SCAP complex exits the ER and travels to the Golgi apparatus to encounter active site-1 protease (S1P), which cleaves pSREBP1c into two halves that remain bound in the membrane. Site-2 protease (S2P) then cleaves the N-terminal half of pSREBP1c, releasing the cytoplasmic portion (SREBP1c) so it can travel to the nucleus and transcribe FASN. Cross-talk between GFs, GFRs, steroid hormones (SHs) and SH receptors (SHRs) converging on SREBP1c ensures robust responses to FASN expression in tumour cells. A, androgens; AR, androgen receptor; E₂, oestradiol; ER, oestrogen receptor; P, progestins; PR, progesterone receptor; PRO, prolactin; PROR, prolactin receptor.

Ovlivnění exprese a aktivity FASN



Zvýšení exprese a aktivity FAS během buněčné transformace, spojitost s působením a signálními drahami epidermálního růstového faktoru -EGF
Zvýšená exprese a aktivace receptoru Her-2/neu a aktivace PI3K/Akt a MAPK signálních drah u nádorů prsu.

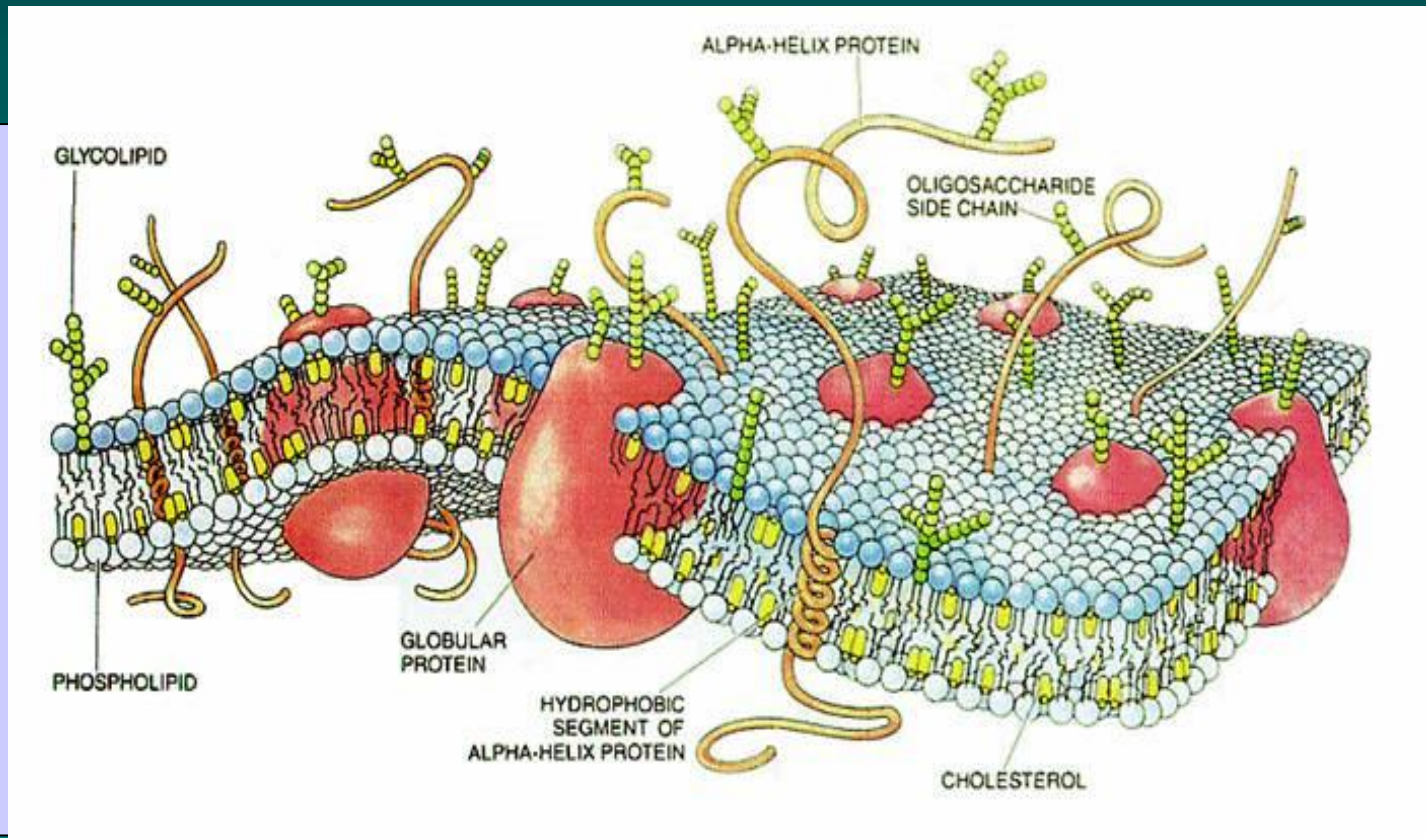
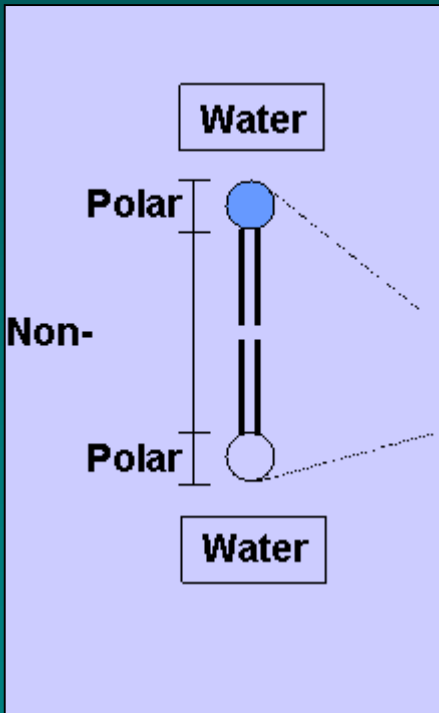
Molekulární mechanismy působení VNMK

- změny vlastností buněčných membrán (fluidita, lipidové rafty)
- biosyntéza eikosanoidů – změna imunitní odpovědi a modulace zánětu, proliferace, apoptózy, tvorby metastáz a angiogeneze
- ovlivnění signálové transdukce, aktivity transkripčních faktorů (NFκB, PPARγ) a genové exprese – změny metabolismu, buněčného růstu a diferenciacce
- změny metabolismu estrogenů – redukce estrogeny stimulovaného růstu
- zvýšená nebo snížená produkce volných radikálů (kyslíku, dusíku)
- mechanismy zahrnující citlivost k insulinu

BUNĚČNÉ MEMBRÁNY

MODEL BUNĚČNÉ MEMBRÁNY

tekutá mozaika, komplexní struktura složená z různých částí (fosfolipidy, glykolipidy, cholesterol, proteiny - transmembránové). Relativní množství komponent i typy lipidů se mění v různých membránách i působením různých faktorů zejména diety.



Struktura fosfolipidů a jejich orientace v membráně

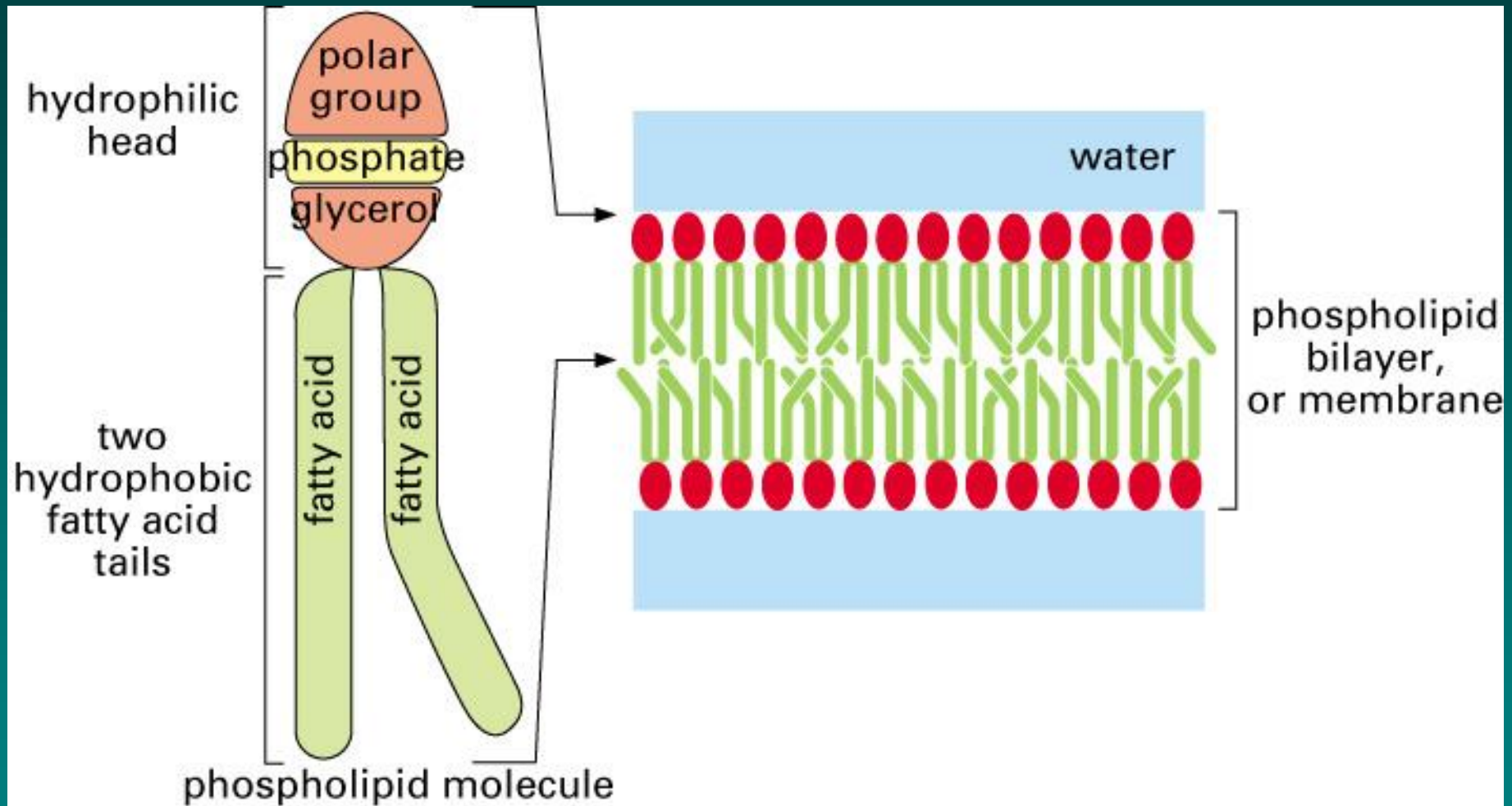
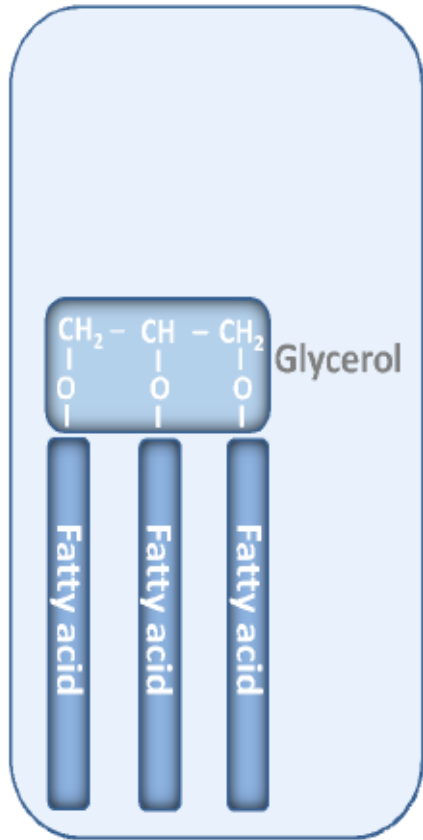


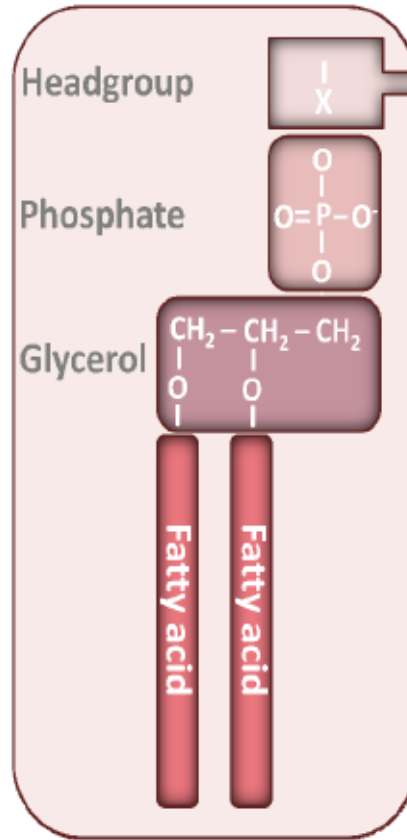
Figure 2-22. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

A



Triglyceride structure

B



Phospholipid structure

C

- Choline
- Ethanolamine
- Inositol
- Serine
- Glycerol

LIPIDOVÉ MIKRODOMÉNY (RAFTY)

malé oblasti proteinů a lipidů v membráně s unikátním složením lipidů – bohaté na cholesterol (mikrodomény). Tyto struktury jsou funkčně zahrnuty v kompartmentalizaci, modulaci a integraci buněčných signálů a tak modulují důležité procesy jako buněčný růst, přežití a adhezi.

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

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

Lipidové rafty a caveolae v plazmatické membráně modifikují aktivaci membránových receptorů a signálních proteinů

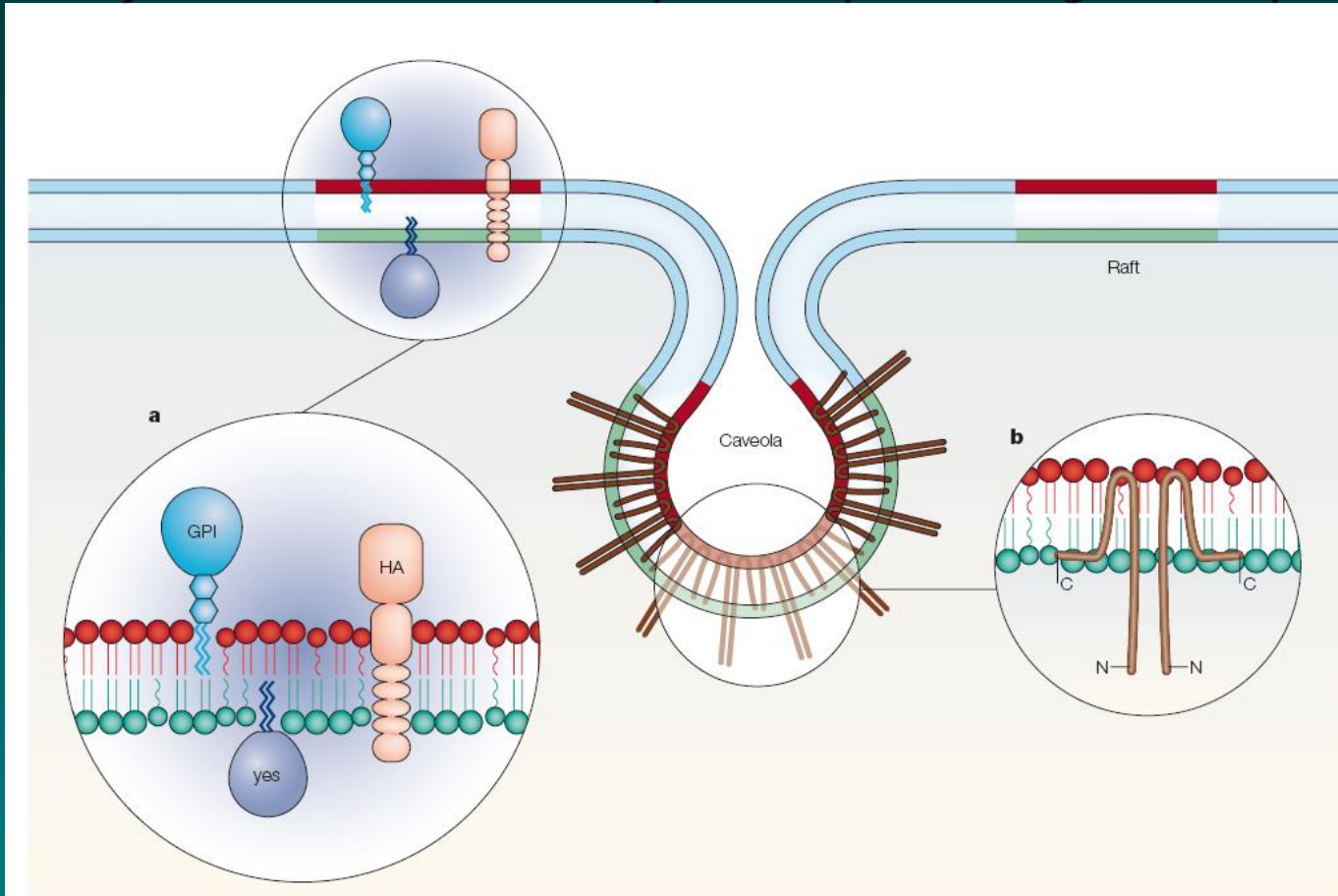
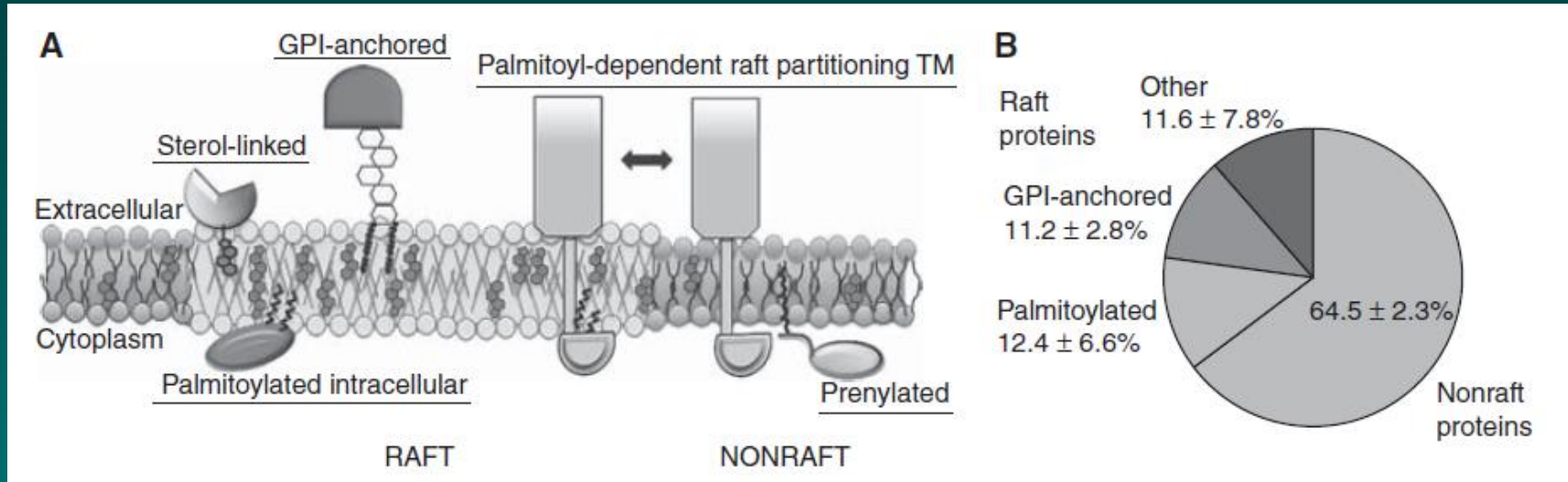


Figure 4 | **Model for the organization of rafts and caveolae in the plasma membrane.** Lipid rafts (red/green) segregate from the other regions (blue) of the bilayer, which have a different lipid composition. The lipid bilayer in rafts is asymmetric, with sphingomyelin and glycosphingolipids (both red) enriched in the 'outer' layer known as the exoplasmic leaflet, and glycerolipids (green) in the 'inner' layer known as the cytoplasmic leaflet. **a** | Rafts contain proteins attached to the bilayer by their GPI anchors, by acyl tails (for example, the Src-family kinase Yes), or through their transmembrane domains, like the influenza virus proteins neuraminidase and haemagglutinin (HA). **b** | Caveolae are formed by self-associating caveolin molecules making a hairpin loop in the membrane. Interactions with raft lipids may be mediated by binding to cholesterol (brown) and by acylation of carboxy-terminal cysteines (not shown). Figure modified from Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997) © Macmillan Publishers Ltd.

LIPOVÁ MODIFIKACE PROTEINŮ

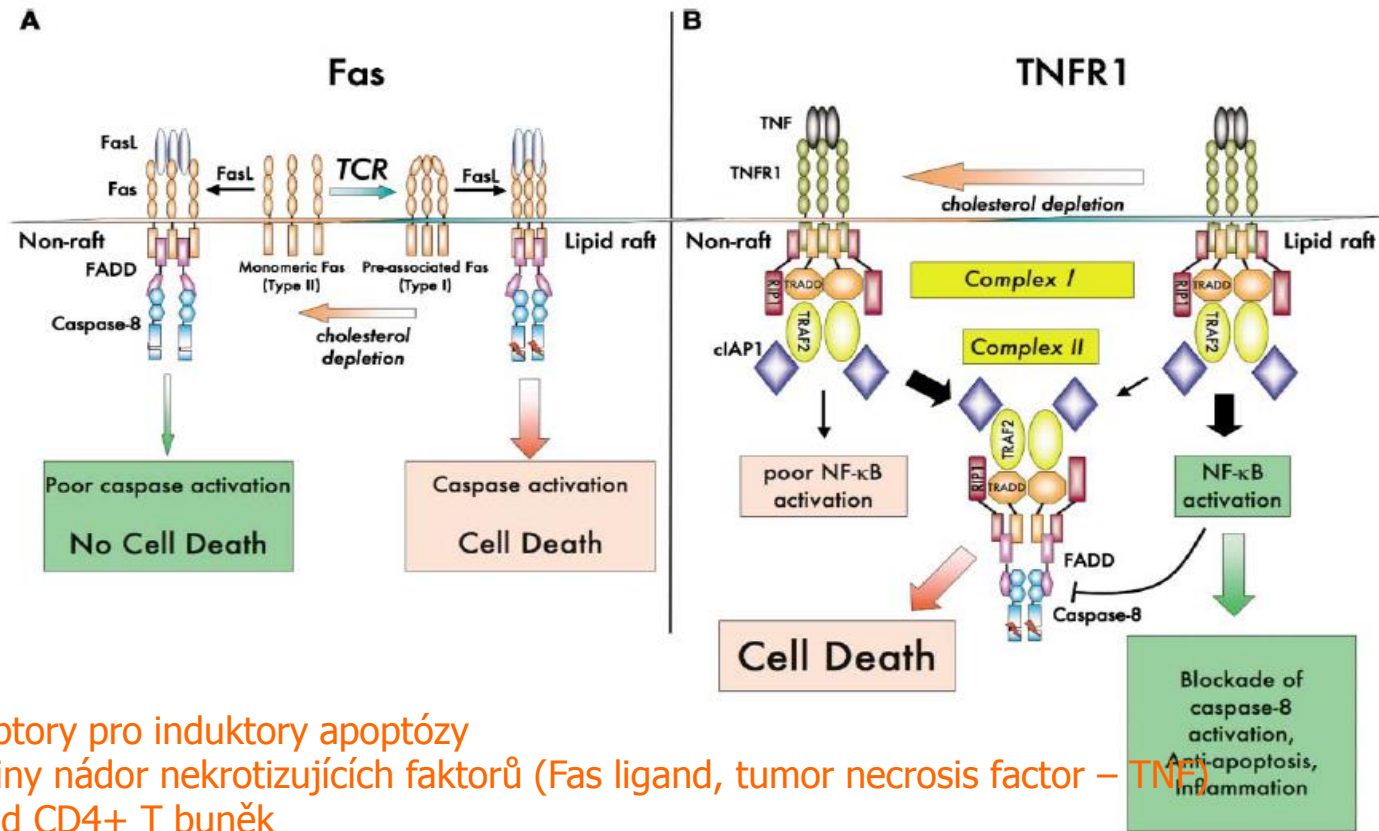
Lipidy hrají důležitou úlohu v transportu, membránovém umístění a správné funkci proteinů zprostředkováním jejich afinity k lipidovým raftům (LR).



Obecně ukotvení přes nasycené MK a steroly směřuje proteiny do těsnějšího (tightly packed) prostředí LR, kdežto nenasyčené a rozvětvené uhlovodíkové řetězce upřednostňují méně omezující neraftové části membrány. Palmitoylace proteinů reguluje rozdělení v raftech.

Figure 4. Lipid modifications of proteins as determinants of raft association. (A) Examples of lipid modification of proteins. Various lipid anchors play important roles in protein trafficking, membrane partitioning and proper function, likely mediated by their affinity for lipid rafts. The general paradigm is that anchoring by saturated fatty acids and sterols targets proteins to the more tightly packed environment of lipid rafts, whereas unsaturated and branched hydrocarbon chains tend to favor the less restrictive nonraft membranes. Palmitoylation of proteins can regulate raft partitioning. (A, Adapted from Levental et al. 2010a; reprinted with permission from the American Chemical Society © 2010.) (B) Quantification of raft protein abundance following removal of palmitoylated TM proteins by DTT or GPI-anchored proteins by GPI-specific phospholipase in GPMVs (average \pm SD from three independent experiments). (B, Adapted from Levental et al. 2010b; reprinted with permission from The National Academy of Sciences © 2010.)

Modulace lipidů (DHA)– lipidové rafty modulace signálů růst. faktorů a cytokinů



Receptory pro indukci apóptózy z rodiny nádor nekrotizujících faktorů (Fas ligand, tumor necrosis factor – TNF). Příklad CD4+ T buněk

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

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

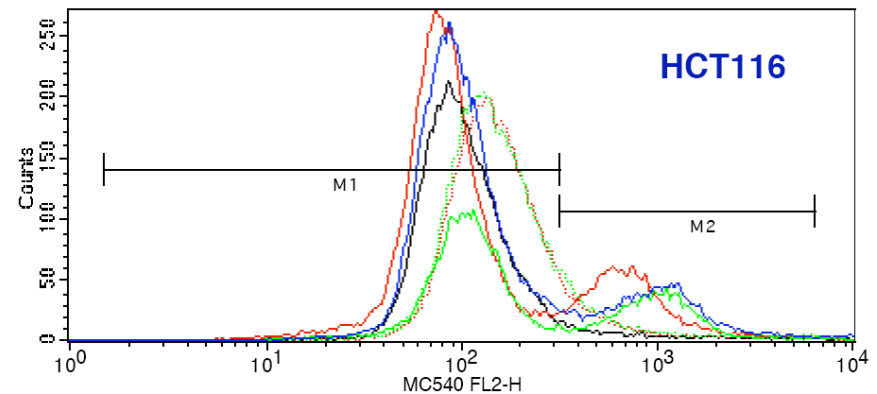
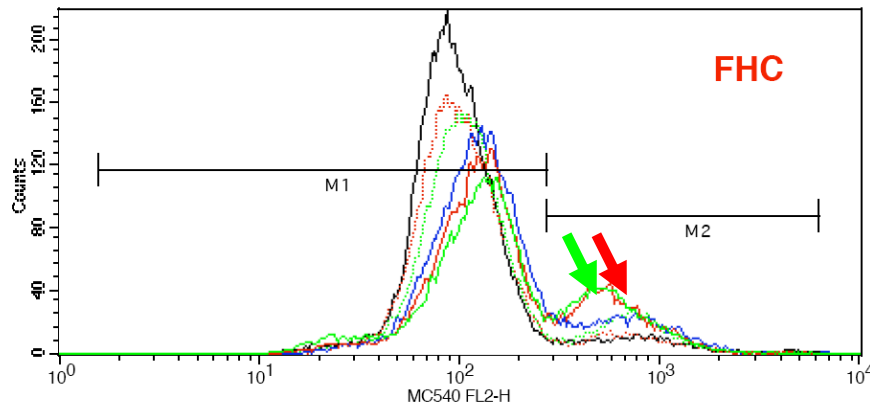
(B) Upon TNF binding, TNFR1 translocates into lipid rafts wherein complex I formation takes place and results in the activation of NF-κB. Through mechanisms described in Figure 1, NF-κB can inhibit caspase activation within complex II. When cholesterol is depleted, lipid raft structure is disrupted and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

Změny struktury membránových lipidů tzv. lipid packing (merocyanin 540, FL-2)

MC540 se v membráně váže preferenčně do tekuté krystalické fáze a jeho fluorescence se tak zvyšuje. Při přechodu do gelové fáze se fl. snižuje.

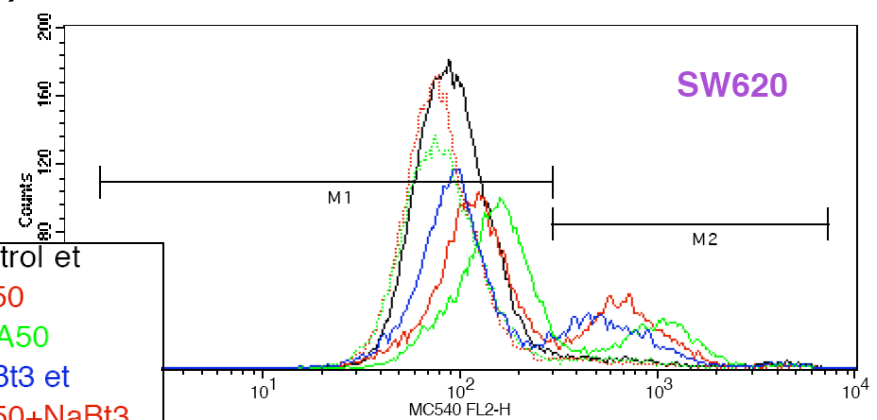
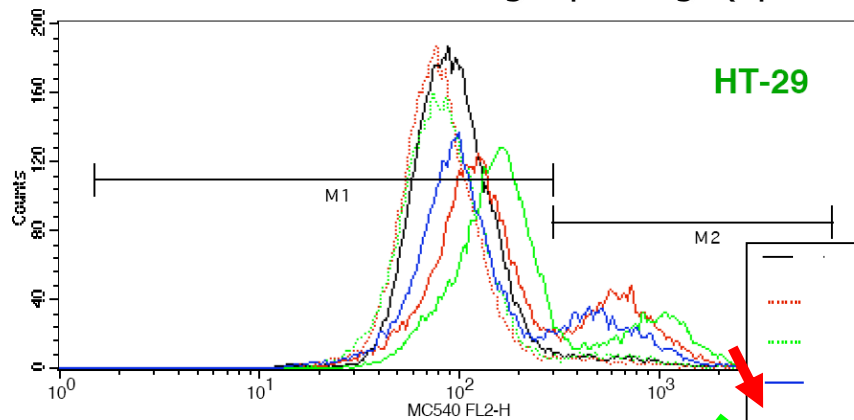
Odráží tak **jemné změny ve struktuře membránových lipidů i fluidity**.

Možná souvislost s indukcí diferenciacce a apoptózy.



"looser lipid packing" (rozvolňování)
"more tight packing" (upevňování)

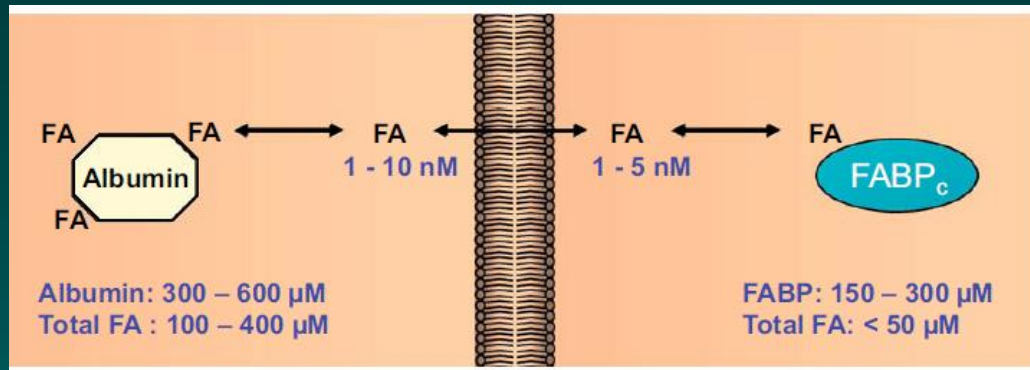
→ zvýšená fluorescence
← snížená fluorescence



- control et
- AA50
- DHA50
- NaBt3 et
- AA50+NaBt3
- DHA50+NaBt3

TRANSPORT, AKUMULACE A SYNTÉZA MK

TRANSPORT MASTNÝCH KYSELIN DO BUNĚK



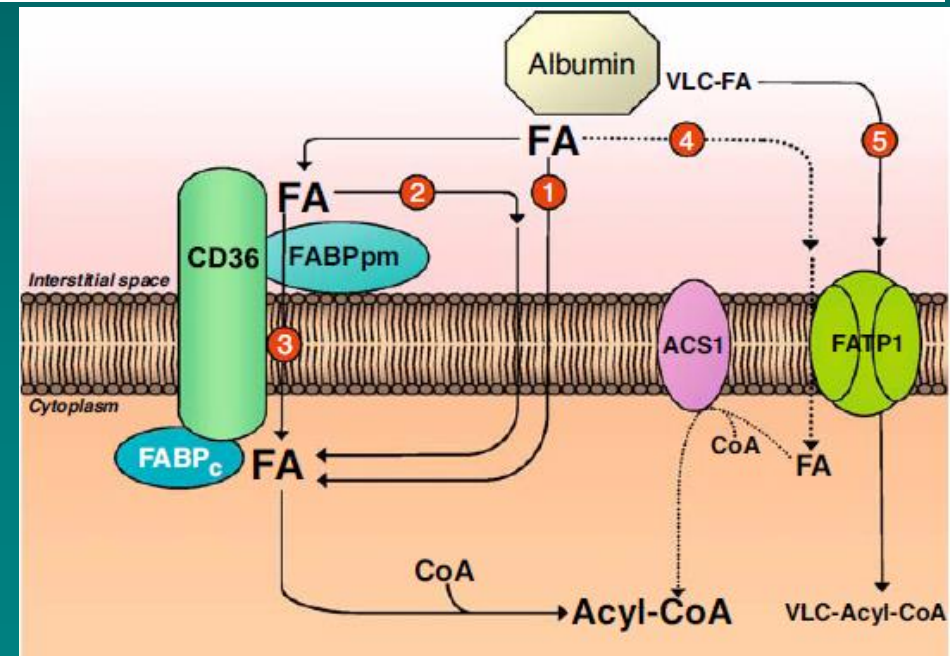
Vazba MK na albumin (plasma) a vazebné proteiny (FABP) uvnitř buněk.

Transport přes membránu – pasivní difúze nebo vazba na transportní proteiny (FATP – CD36).

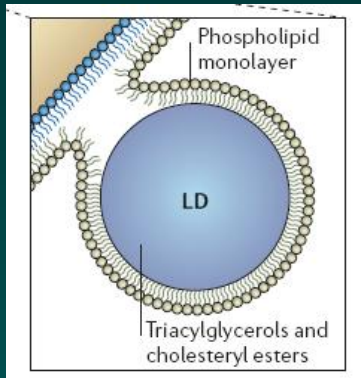
Aktivace acylCoA syntázou (ACS1) a tvorba acyl-CoA esterů

Fig. 1. Quantitative comparison of the presence of albumin in the extracellular space, cytoplasmic fatty acid-binding protein (FABP_c) inside cells, and fatty acid concentrations under normal physiological conditions. Albumin and FABP_c provide a buffer for the extremely low aqueous concentration of (long-chain) fatty acids. Albumin has 3–6 binding sites for fatty acids. FABP_c occurs in 9 distinct types of which liver-type FABP_c has two ligand binding sites while all other types have only a single ligand binding site [58,59].

Fig. 2. Schematic representation of the current view of fatty acid transport across the cell membrane. Because the exact mechanism of transmembrane translocation of fatty acids is still unknown, different models have been suggested. (1) In view of their hydrophobic nature, fatty acids could cross the membrane by simple diffusion. (2) Alternatively, CD36 (88 kDa; also referred to as 'fatty acid translocase'), alone or together with the peripheral membrane protein FABP_{pm} (plasma membrane-associated fatty acid-binding protein; 43 kDa) accepts fatty acids at the cell surface to increase their local concentration and thus increase the number of fatty acid diffusion events. (3) It is also possible that CD36 itself actively transports fatty acids across the membrane. Once at the inner side of the membrane fatty acids are bound by cytoplasmic FABP (FABP_c) before entering metabolic or signalling pathways. (4) Additionally, a minority of fatty acids are thought to be transported by fatty acid transport proteins and rapidly activated by plasma membrane acyl-CoA synthetase (ACS1) to form acyl-CoA esters. (5) Very-long-chain fatty acids (> C22) are preferentially transported by FATPs and by action of their synthetase activity directly converted into very-long-chain acyl-CoA esters (uptake by vectorial acylation). Adapted from [27].

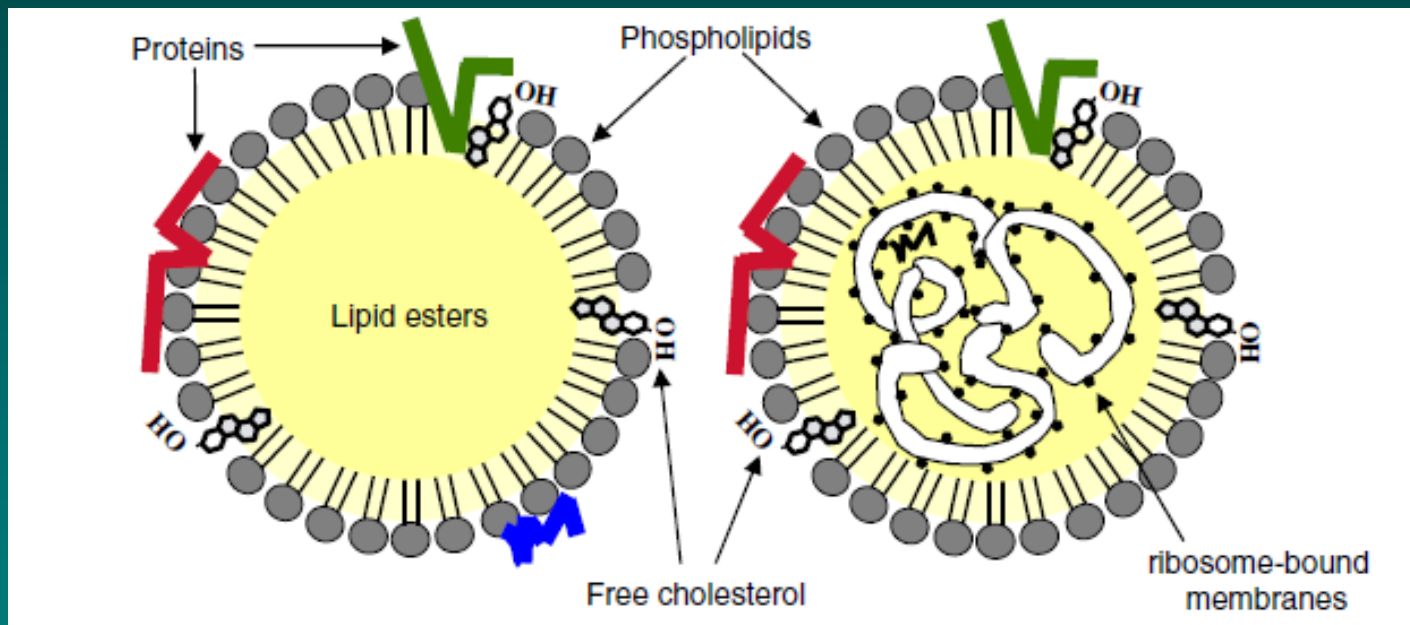


AKUMULACE LIPIDŮ V CYTOPLAZMĚ „LIPID DROPLETS (BODIES)“

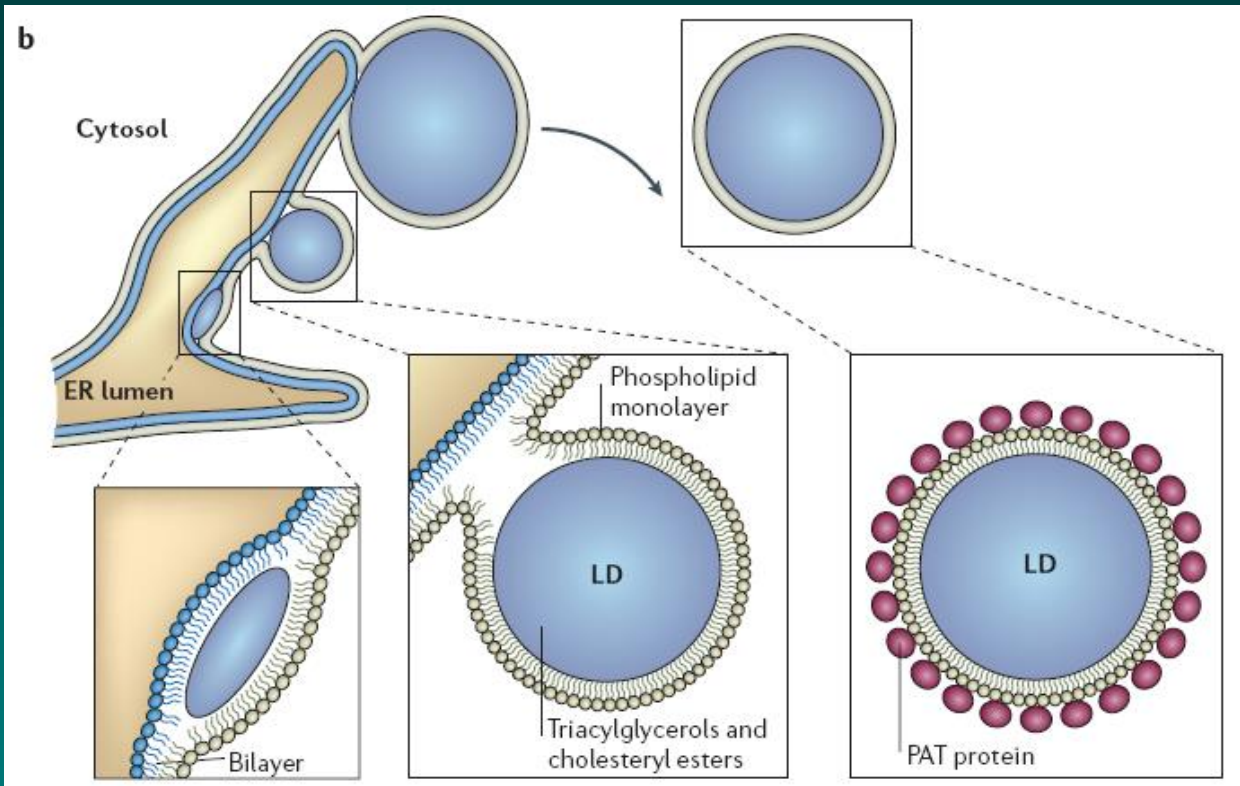


- ▶ akumulace lipidových kapének (lipid droplets) v cytoplazmě buněk (působení lipidových látek, indukce diferenciace a apoptózy)
- ▶ obsahují neutrální lipidy (obvykle triacylglyceroly nebo estery cholesterolu), obklopeny monovrstvou fosfolipidů
za normálních podmínek - zásobárna energie a cholesterolu
- ▶ důležité pro udržení homeostázy lipidů, pro lipidový metabolismus a signálování
- ▶ souvislost s regulací procesů diferenciace a apoptózy není zcela objasněna
- ▶ fluorescenční barvivo Nile Red citlivé vitální barvení lipidových kapének

Struktura lipidových kapének



Tvorba (LDs) v endoplasmatickém retikulu

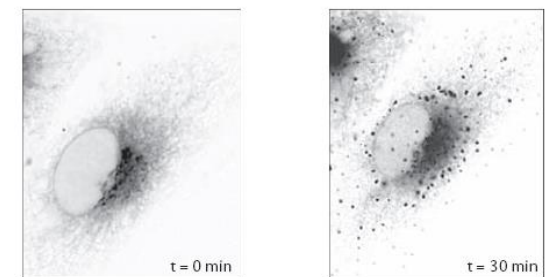


Po přidání mastných kyselin se syntetizují neutrální lipidy v membráně endopl. retikula (ER).

Zralé LD se odštěpují z ER membrány a tvoří samostatné organelly ohraničené monovrstvou fosfolipidů a spojené se specifickými proteiny.

Rodina PAT proteinů (perilipin, ADRP, TIP-47).

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



AKUMULACE LIPIDŮ v cytoplasmě (lipid droplets, lipid bodies)

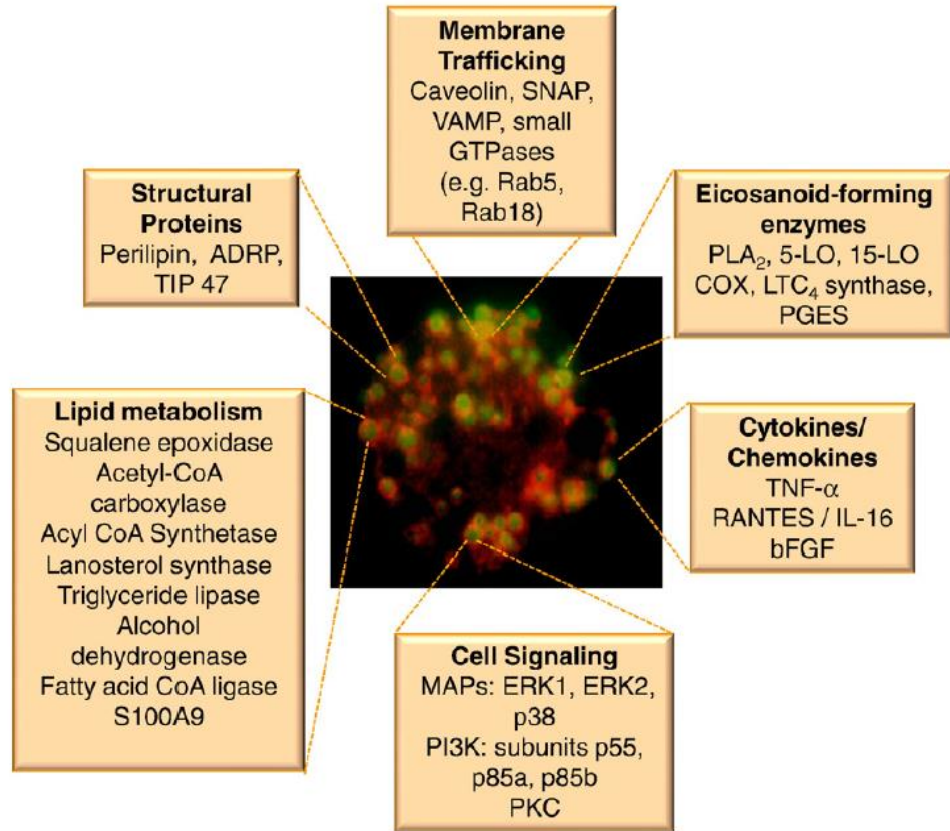
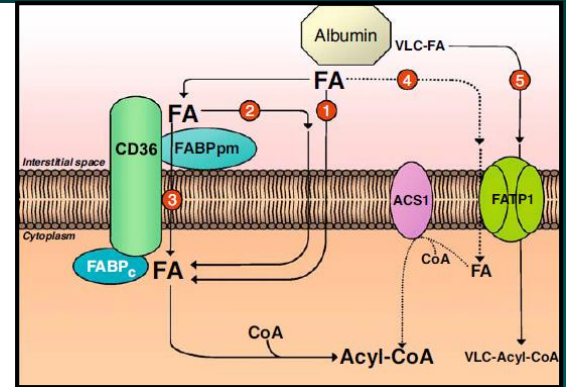
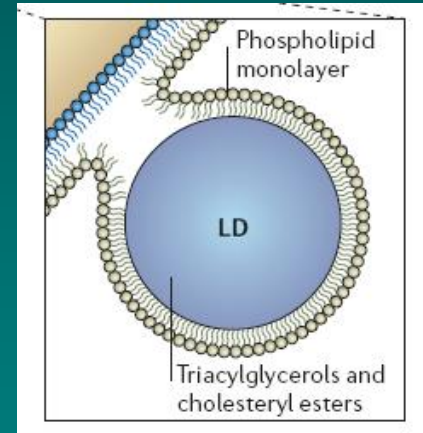


Fig. 1. Lipid body-associated proteins.



Aktivní přenos MK do buněk



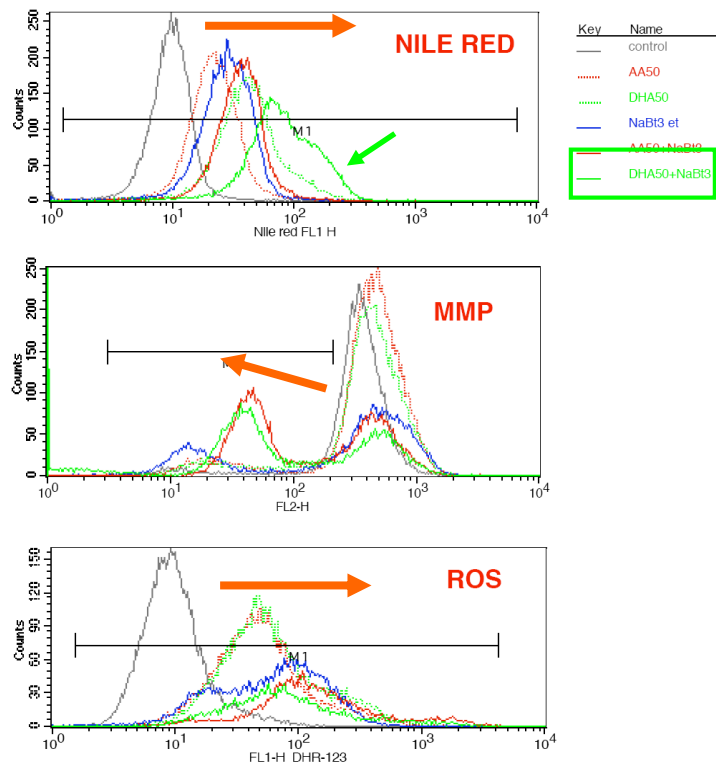
► **metabolicky aktivní organely** – tvoří se v cytoplasmě v odpověď na zvýšenou hladinu MK, ochrana před lipotoxicitou

► funkce – **zásobárna triglyceridů a cholesterolu, lipidová homeostáza, metabolismus a transport, přenos signálů**, spojeny s činností řady **enzymů a regulátorů**

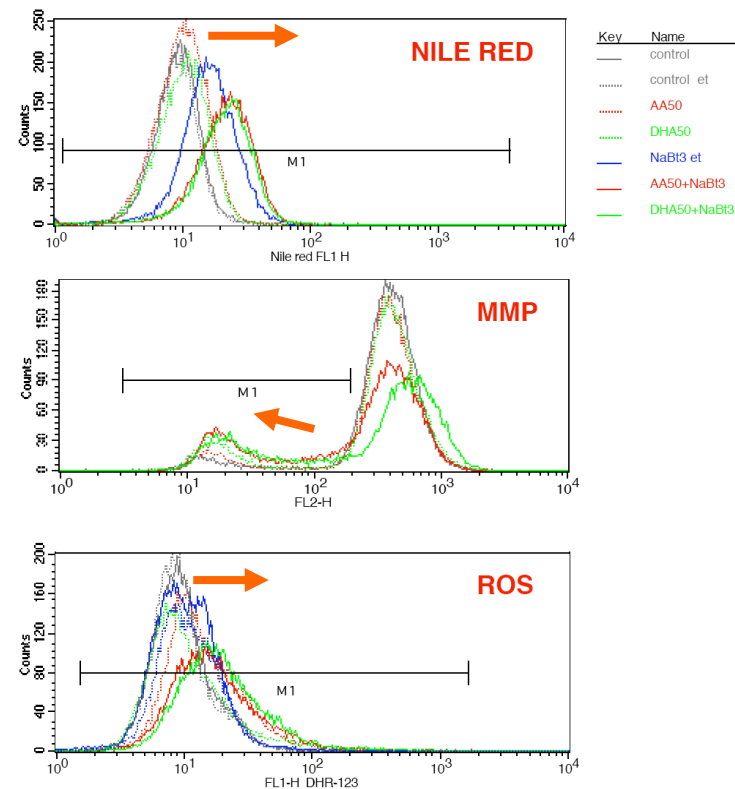
► akumulace LD může korelovat s indukcí diferenciace či apoptózy
(Moreira LS, *Biochim Biophys Acta* 2009, Schwenk RW et al *Prostagl Leuk Ess Fatty A* 2010)

AKUMULACE LIPIDŮ v cytoplasmě (Nile red, FL-1)

FHC fetal

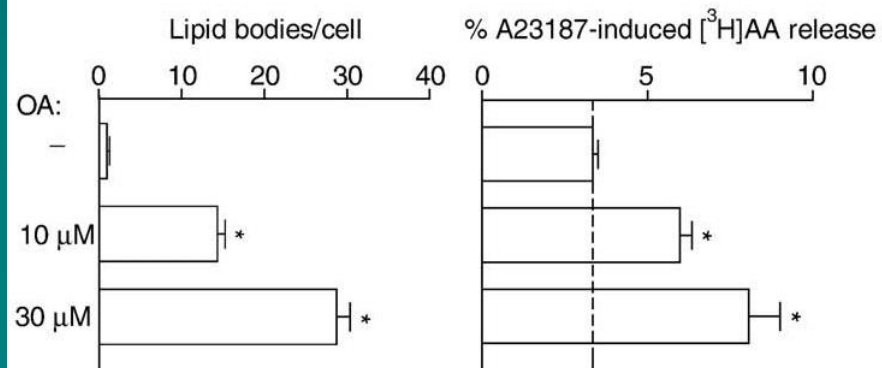
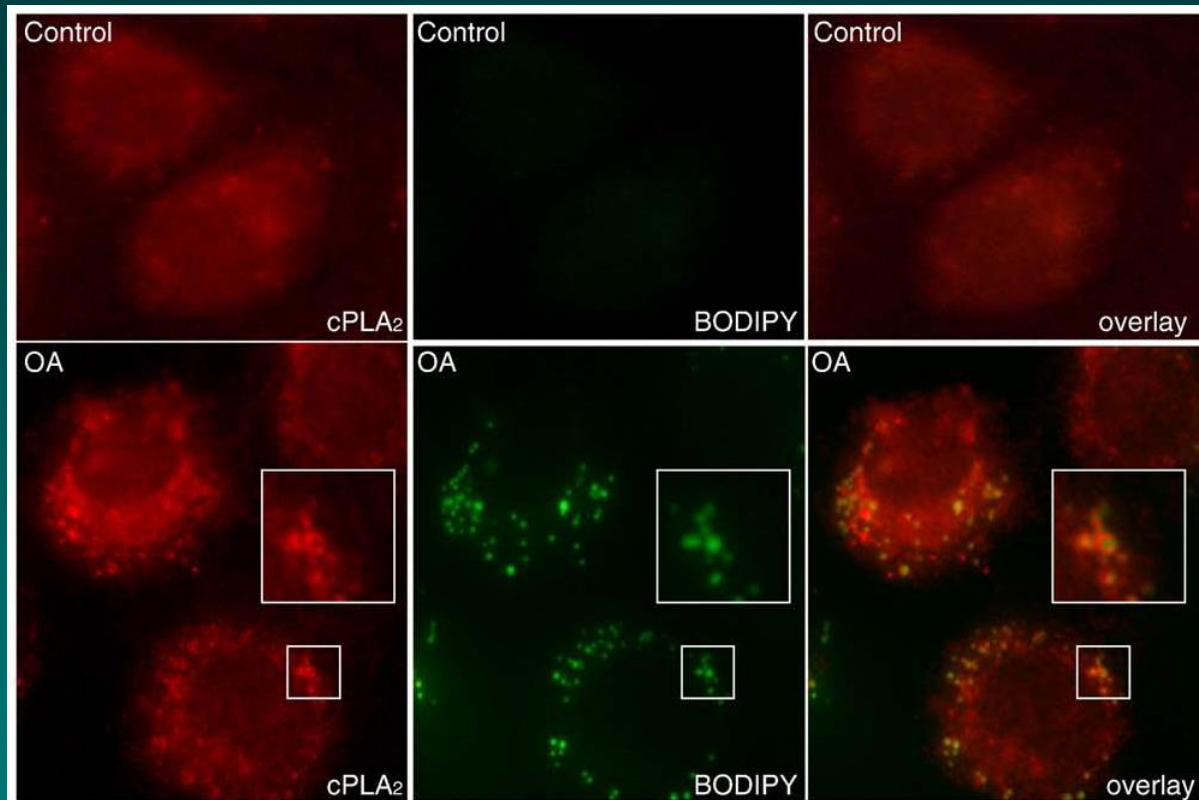


HT-29 adenocarcinoma

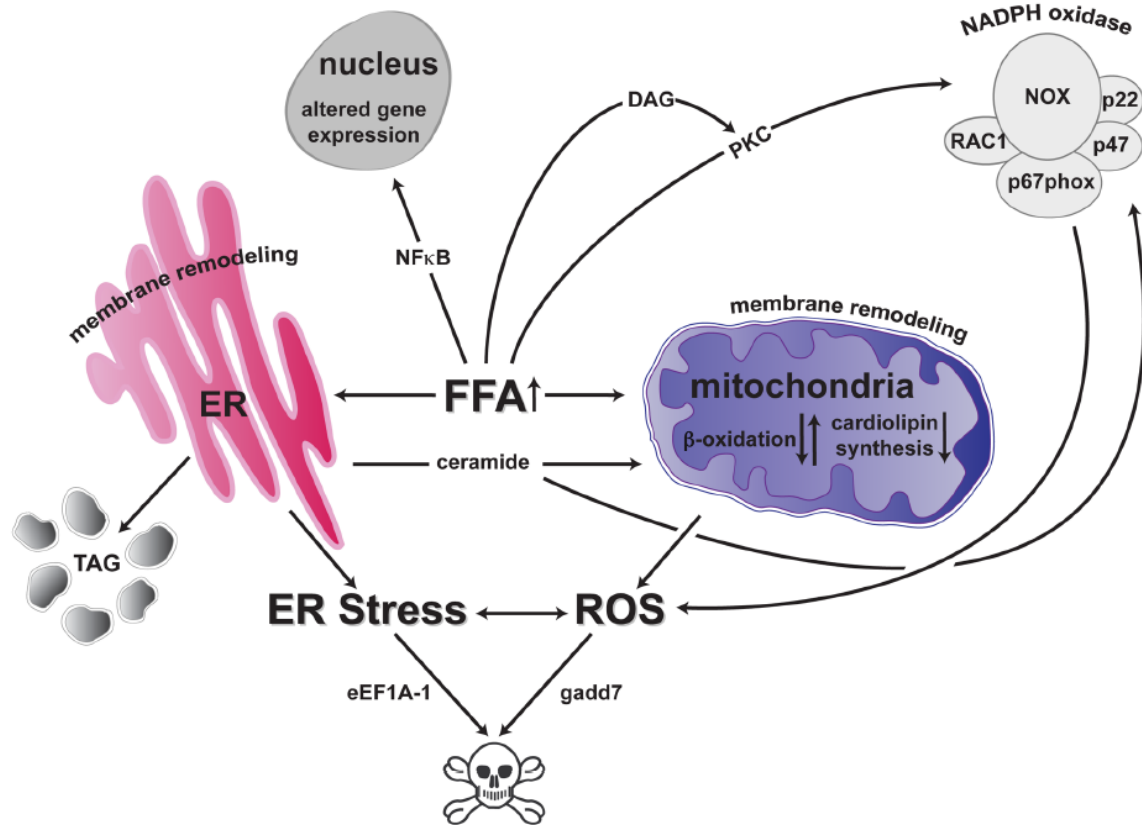


Zvýšená tvorba LD u FHC buněk posílená v kombinaci AA (DHA)/NaBt korelovala s % buněk se sníženým mit. membránovým potenciálem (MMP) a zvýšenou produkcí reakt. kyslíkových metabolitů (ROS)

Kolokalizace lipid bodies (droplets) s cPLA₂ a uvolňování AA u kolonových buněk po působení kyseliny olejové



Lipotoxicita



V netukových buňkách způsobuje nadbytek SFA oxidativní a ER stres způsobený lipidovými metabolity a aktivovanými signálními drahami.

Dysfunkce mitochondrií a ER stres jsou klíčové děje, jimiž je při nadbytku lipidů indukována buněčná smrt.

Nasměrování nadbytečných mastných kyselin do lipidových dropletů má ochranné účinky.

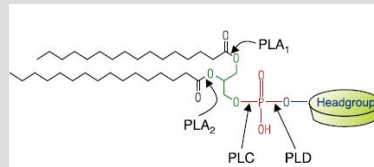
Figure 1. The lipotoxic-response

In non-adipose cells, excess saturated FFAs induce oxidative and ER stress through lipid metabolites and signaling pathways. Dysfunction of mitochondria and the ER are key steps through which excess lipid induces cell death, whereas channeling of excess FFAs to lipid droplets is cytoprotective.

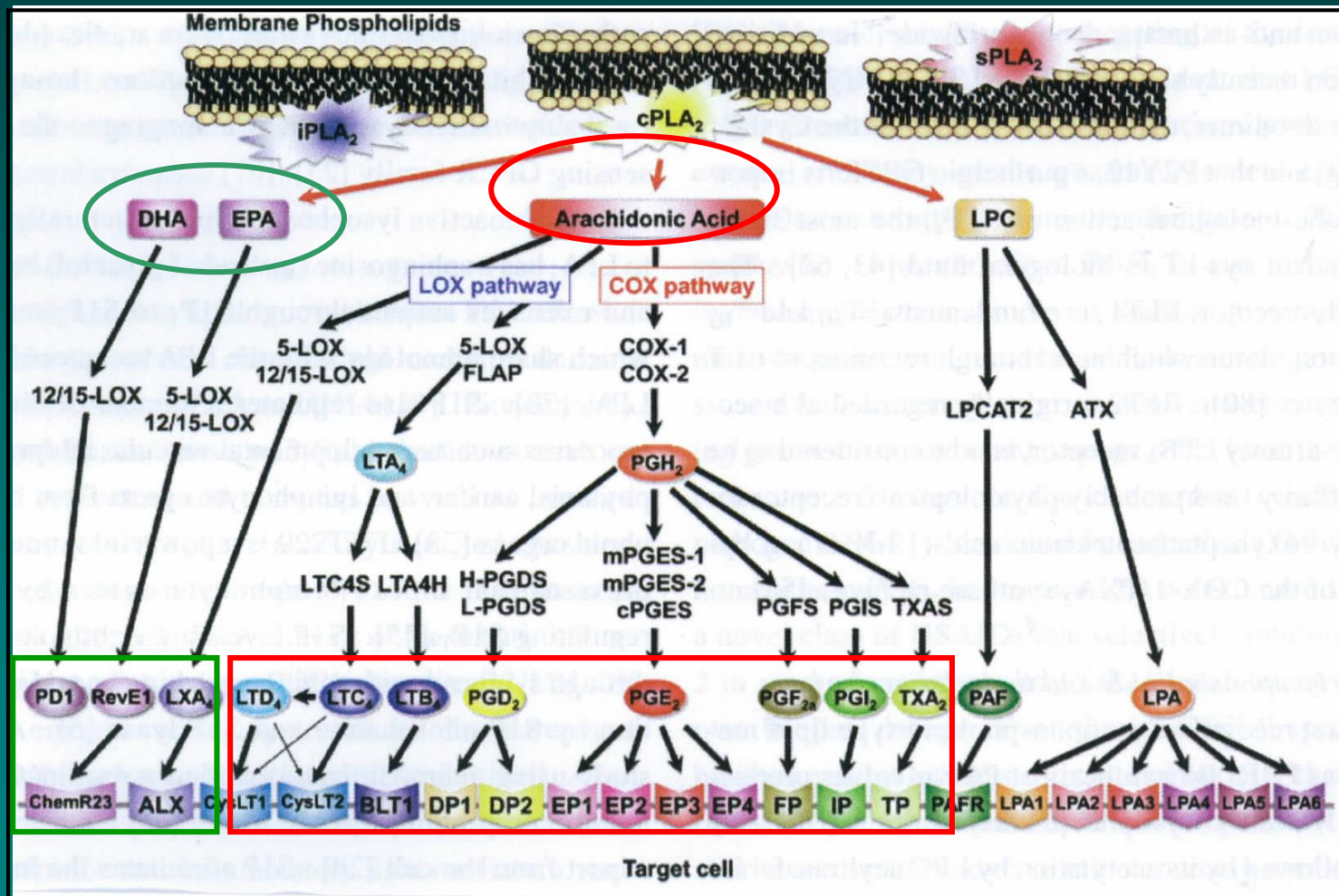
Metabolismus mastných kyselin

INKORPORACE A UVOLŇOVÁNÍ VNMK Z MEMBRÁNOVÝCH FOSFOLIPIDŮ

- ▶ odráží složení a obsah VNMK v dietě
- ▶ n-6 a n-3 VNMK soutěží o stejné pozice ve fosfolipidech
- ▶ soutěží o stejné metabolizující enzymy



Headgroup	Phospholipid
OH	PA
choline	PC
ethanolamine	PE
serine	PS
glycerol	PG
inositol	PI
inositolmonophosphate	PIP
inositlbisphosphate	PIP ₂
inositoltrisphosphate	PIP ₃



PŘEHLED LIPIDOVÝCH MEDIÁTORŮ

Obecné schéma fosfolipidu

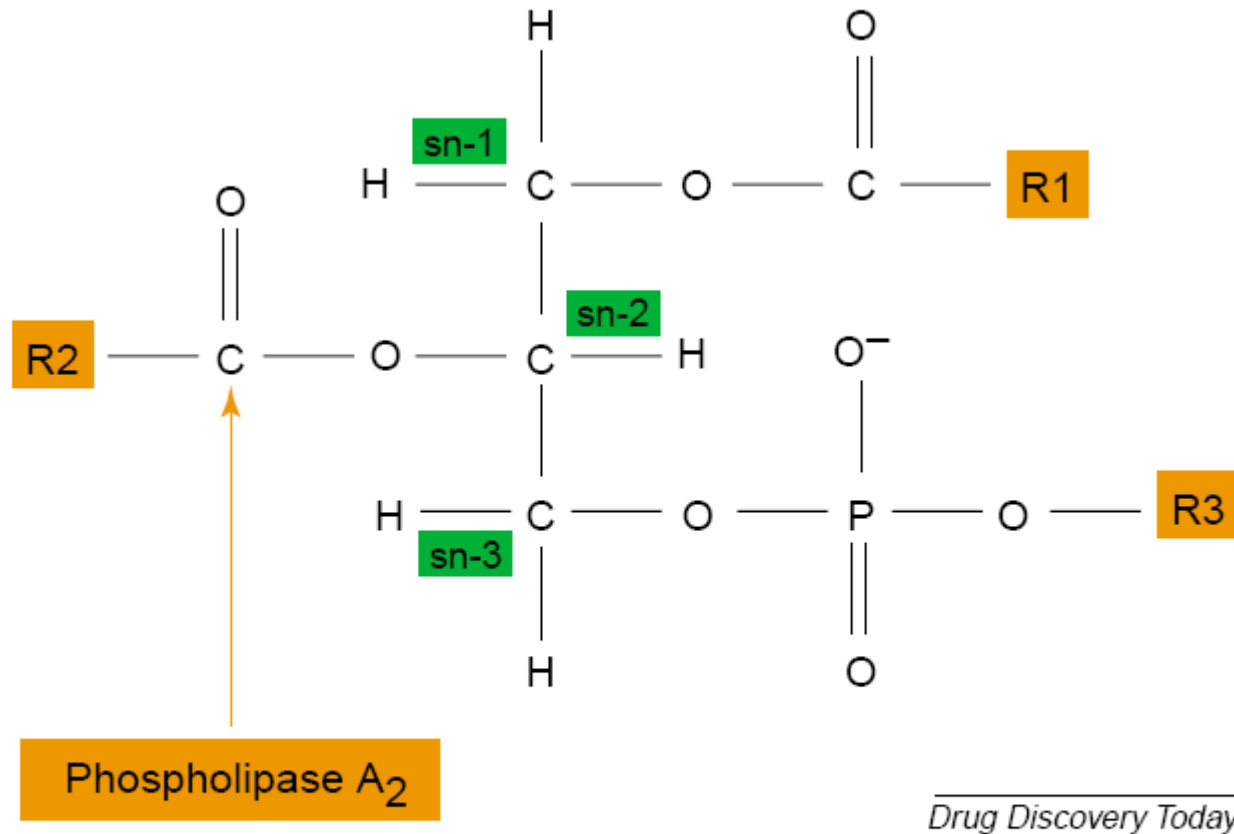
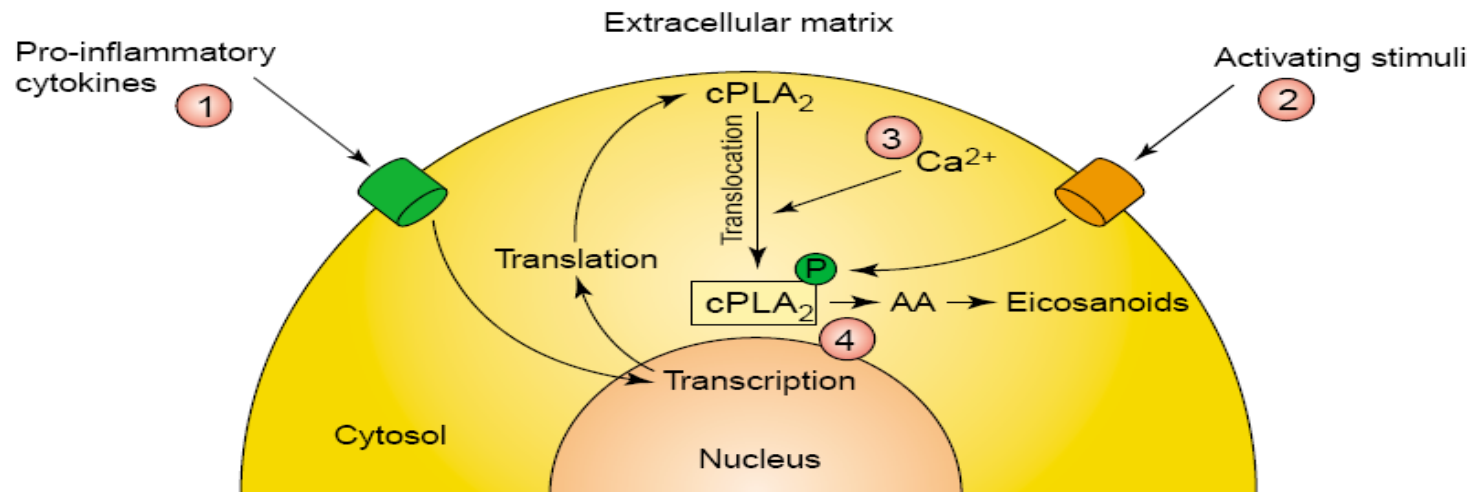


Figure 1. Phospholipid structure with phospholipase A₂ cleavage site.



Drug Discovery Today

Figure 3. Activation of $cPLA_2\text{-}\alpha$. (1) Pro-inflammatory cytokines including tumour necrosis factor α induce expression of $cPLA_2\text{-}\alpha$. (2) Activation leads to mitogen-activated protein kinase-pathway-directed phosphorylation of $cPLA_2\text{-}\alpha$. (3) Extracellular influx or mobilization of intracellular stores of Ca^{2+} bring about $cPLA_2\text{-}\alpha$ translocation from the cytosol to perinuclear membranes. This brings $cPLA_2\text{-}\alpha$ in close proximity to both its substrate and enzymes involved with eicosanoid synthesis. (4) Activated $cPLA_2\text{-}\alpha$ lyses membrane phospholipids providing arachidonic acid (AA) to a range of enzymes involved with eicosanoid synthesis, specifically COX and LOX.

Aktivace cPLA2

Prozánětlivé cytokiny indukují expresi cPLA2. Následuje fosforylace zprostředkovaná MAP kinázami. Ca^{2+} způsobuje translokaci cPLA2 z cytosolu do perinukleární membrány, kde je také její substrát a enzymy nutné k tvorbě eikosanoidů. Aktivovaná cPLA2 lyzuje membránové fosfolipidy a uvolňuje AA, která je metabolizovaná COX a LOX.

TVORBA A VÝZNAM EIKOSANOIDŮ

Metabolismus kyseliny arachidonové

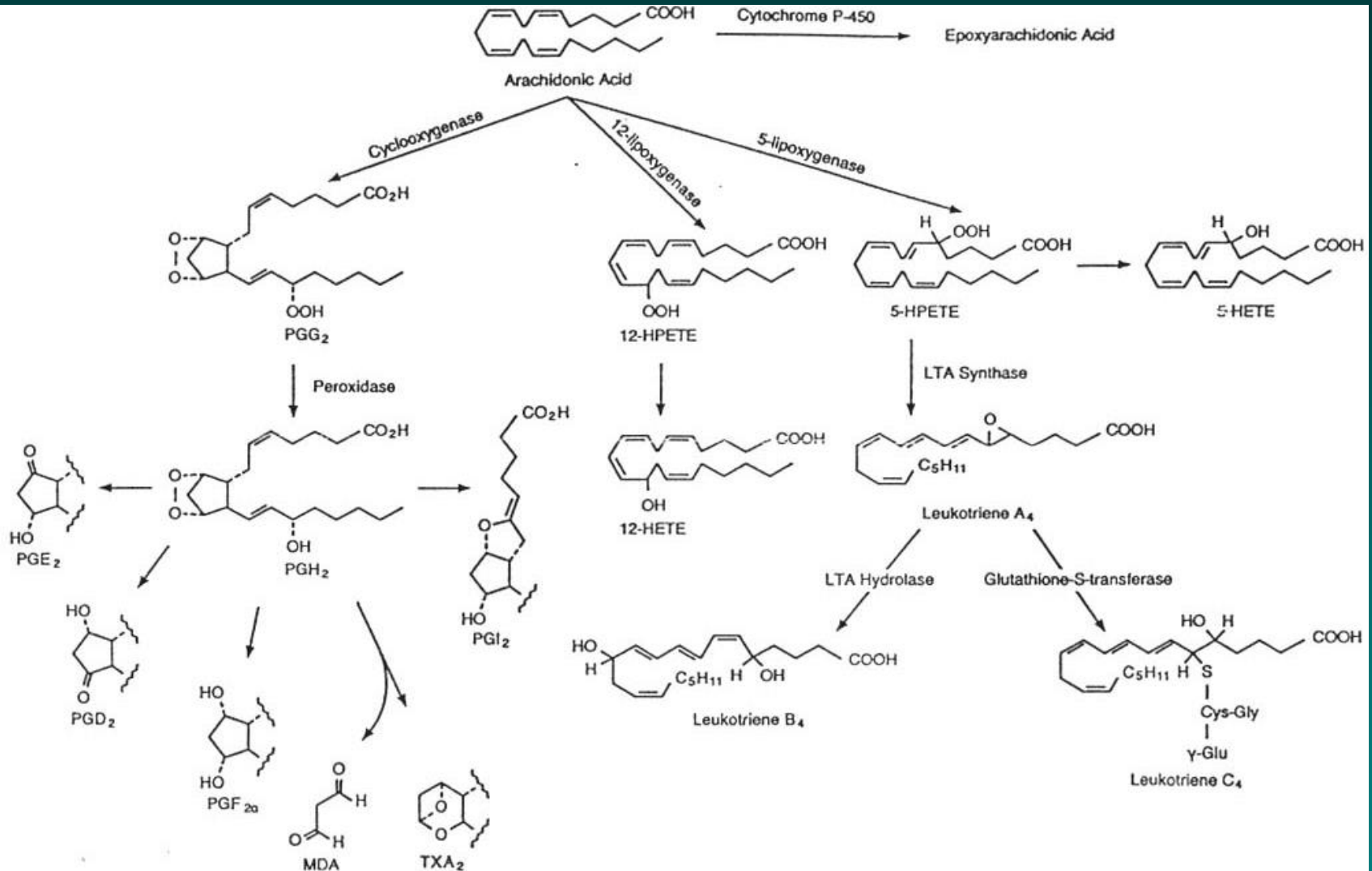
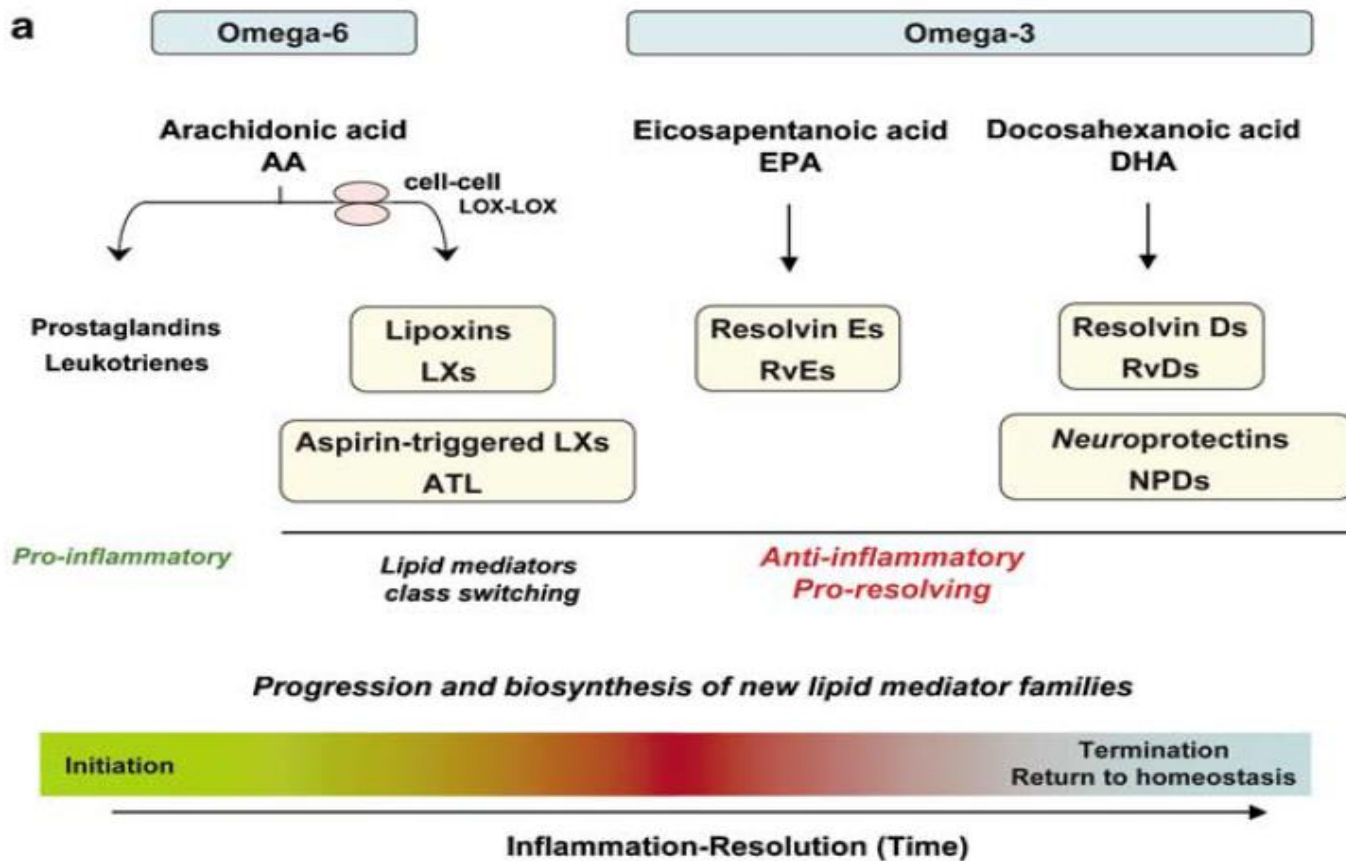


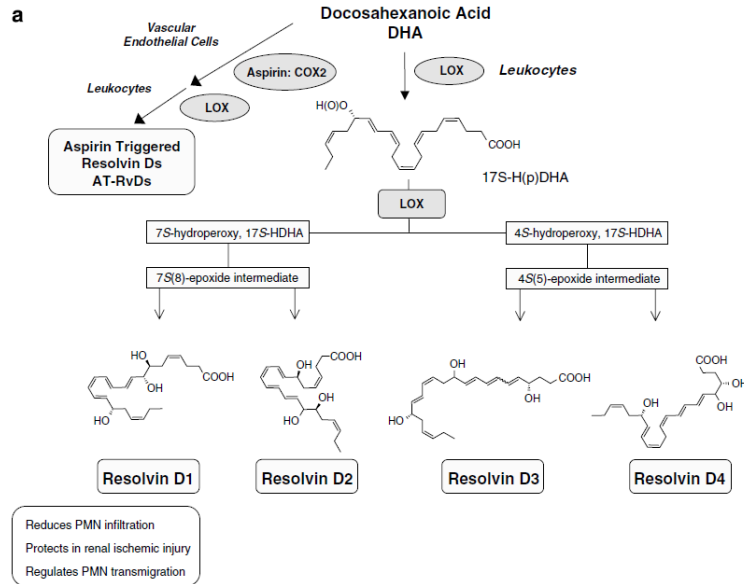
Fig. 1 Cyclooxygenase and lipoxygenase pathways of AA metabolism. Metabolites of cyclooxygenase pathway are called prostaglandins G₂ (PGG₂), E₂ (PGE₂), H₂ (PGH₂), D₂ (PGD₂), F_{2α} (PGF_{2α}), thromboxane A₂ (TXA₂), malondialdehyde (MDA), and prostacyclin (PGI₂). Metabolites of the lipoxygenase pathway are called 12- and 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acids (HPETEs), and their corresponding fatty acids (HETEs). Leukotriene A synthase (LTA synthase) generates the leukotrienes.

Nové lipidové mediátory odvozené od omega-3 PUFAs

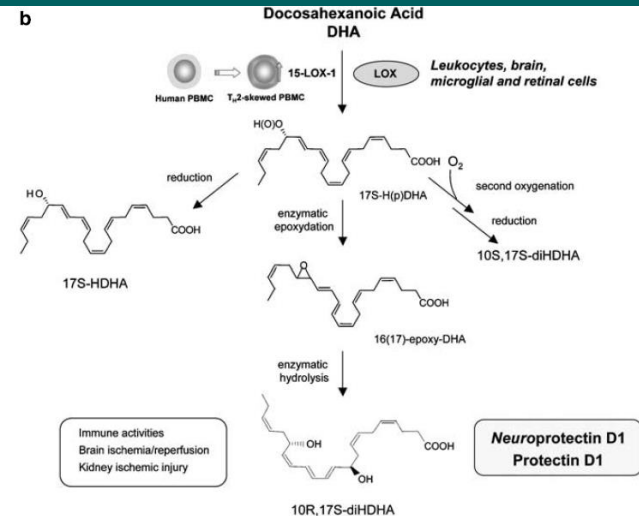
Resolviny a neuroprotektiny



Produkce a struktura mediátorů odvozených od DHA



D resolvin



D Neuroprotektiny

Figure 3 D-series resolvins and protectins. (a) Resolvin Ds: formed from docosahexaenoic acid (DHA), the proposed biosynthetic pathways reconstructed *in vitro* involve the lipoxygenase (LOX) product 17S-H(p)DHA, which is rapidly transformed by the LOX activity in human polymorphonuclear leukocyte (PMN) into two epoxide intermediates. These two novel epoxide intermediates open to form bioactive products denoted 17S-resolvin D series (RvD1-4). Aspirin also impacts the formation of resolvin D series by catalytically switching COX-2 to a 17R-lipoxygenase-like mechanism that generates 17R-H(p)DHA, and subsequently 17R-resolvin D series (AT-RvDs). (b) Protectins: the initial enzymatic product 17S-H(p)DHA is converted to neuroprotectin D1/PD1. The complete stereochemistries of the bioactive mediators and related natural isomers are established (see text for further details).

Produkce a struktura mediátorů odvozených od EPA

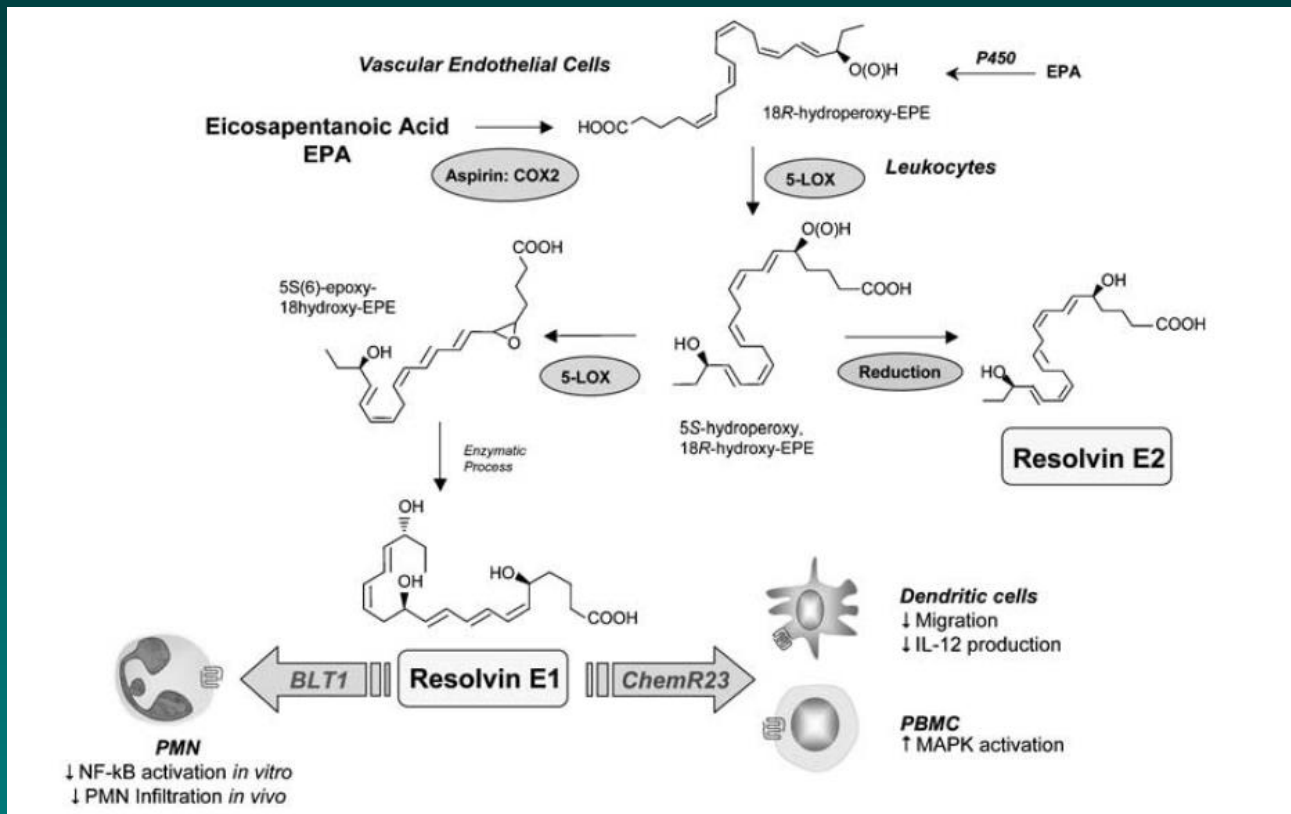


Figure 2 E-series resolvins. Aspirin impacts the formation of resolvin E1 (RvE1) by acetylating COX-2 in vascular endothelial cells that stereoselectively generate 18R-hydroperoxy-EPE (18R-H(p)EPE). 18R-HEPE is further converted via sequential actions of leukocyte 5-LOX, leading to formation of RvE1. The complete stereochemistry of RvE1 was recently established. Microbial P-450s can also contribute to RvE biosynthesis via converting eicosapentaenoic acid (EPA) to 18-HEPE (Arita *et al.*, 2005b). Human recombinant 5-LOX also generates resolvin E2 (RvE2) from 18-HEPE. At least two separate GPCRs can specifically interact with RvE1: (1) ChemR23, on mononuclear cells and DCs, and (2) BLT1, on human PMN. Also, when expressed on epithelial cells ChemR23 and RvE1 stimulated CD-55-dependent clearance of PMN from the mucosal surface (Campbell *et al.*, 2007).

Dráhy metabolismu n-6 a n-3 VNMK a jejich účinky v nádorové biologii

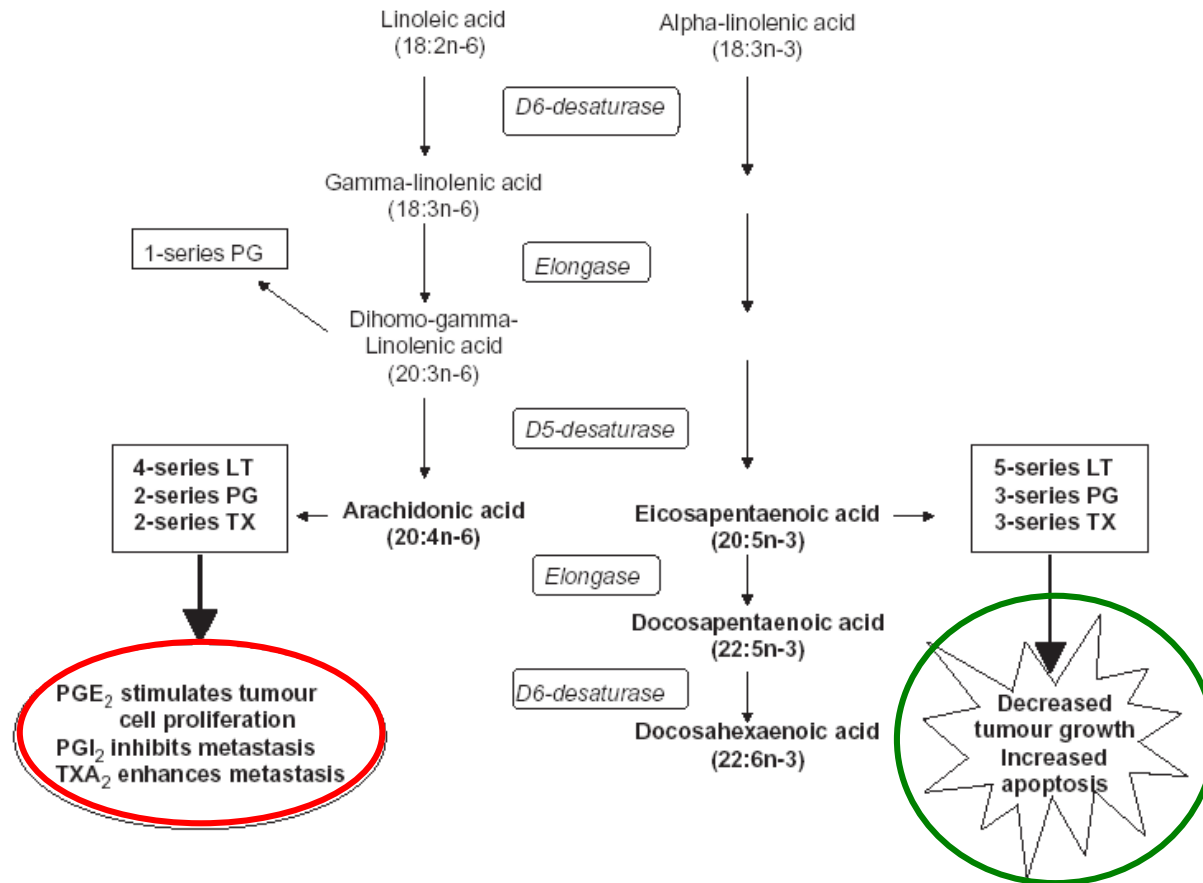
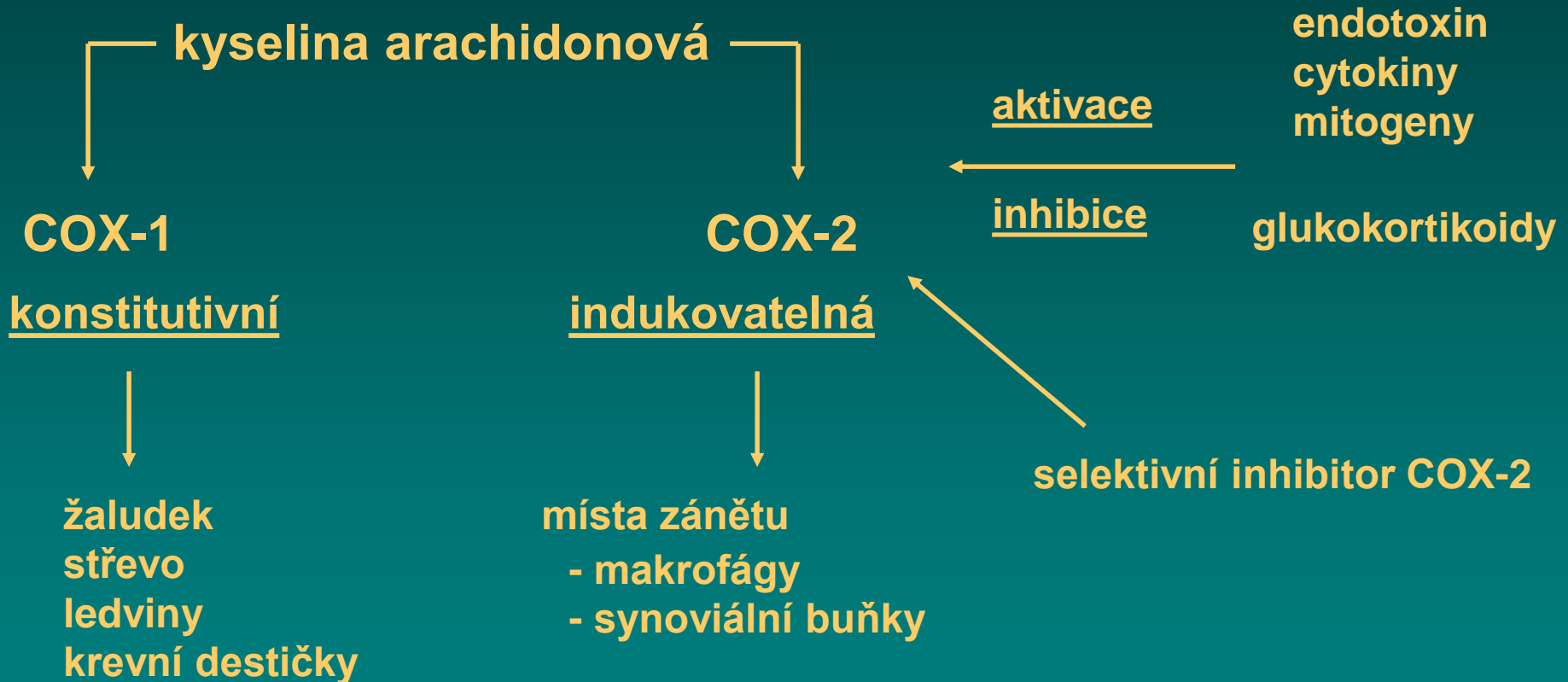


Figure 2 Pathway of n-6 and n-3 PUFA metabolism and suggested effects on tumour biology. n-6 and n-3 Fatty acids compete for metabolism by a series of common enzymes (desaturases and elongases). Twenty-carbon fatty acids of either family (dihomo-gamma-linolenic acid, arachidonic acid, eicosapentaenoic acid) can act as precursors for different series of eicosanoids which include leukotrienes (LT), prostaglandins (PG) and thromboxanes (TX).

N-6 a n-3 VNMK soutěží o stejné enzymy (desaturázy a elongázy). 20C VNMK (DGLA, AA, EPA) jsou prekursory pro tvorbu různých typů eikosanoidů (prostaglandiny, leukotrieny, tromboxany) – soutěž o stejné enzymy (cyklooxygenázy, lipoxygenázy)

Cyklooxygenázové dráhy



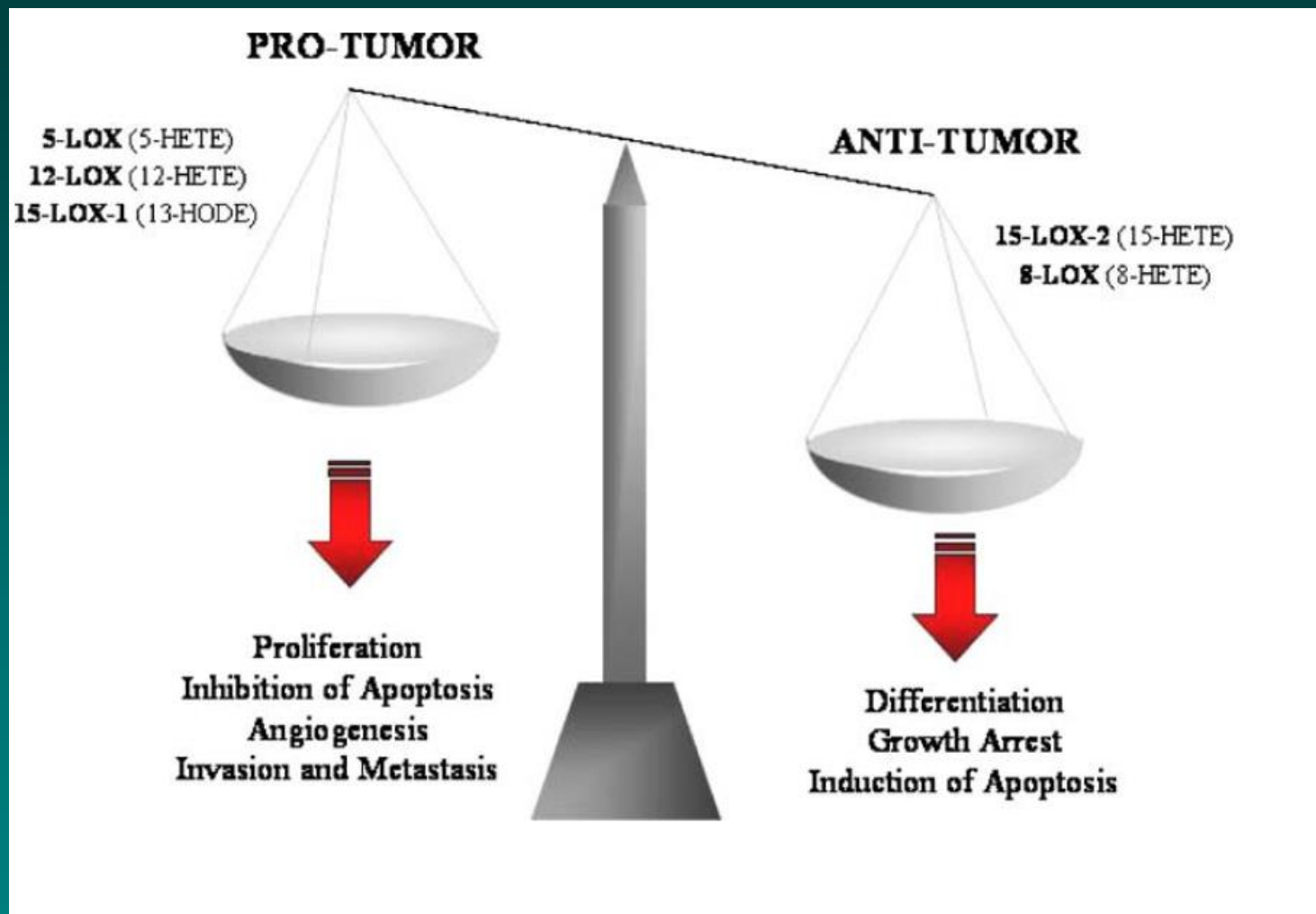
Zvýšená exprese COX-2 v maligních a premaligních lidských nádorech

Table 1. COX2 expression in malignant or premalignant human tumours

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

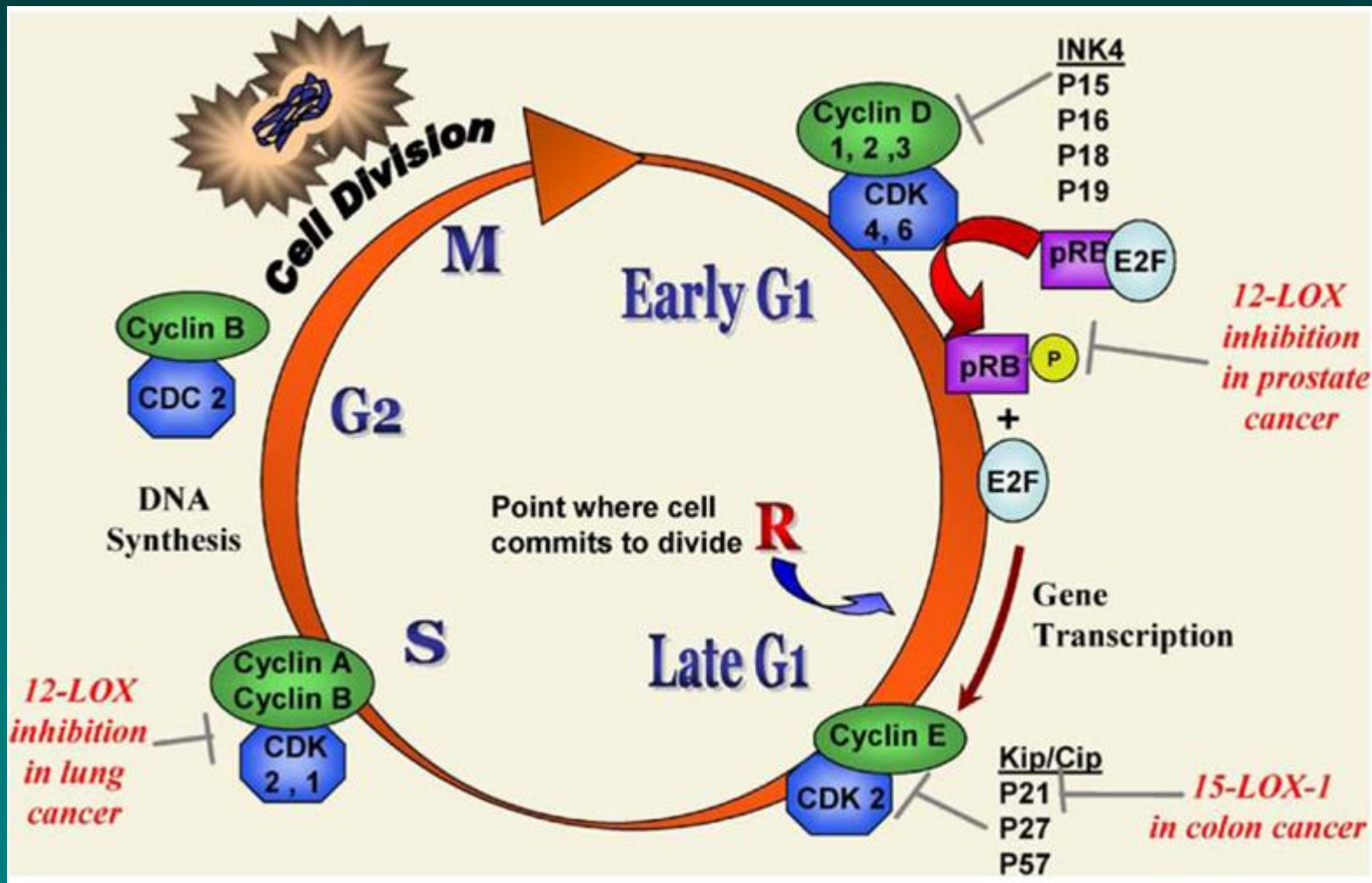
References available at <http://image.thelancet.com/extras/03oncl205webfr.pdf>

Úloha lipoxygenáz (LOX) v rozvoji nádoru



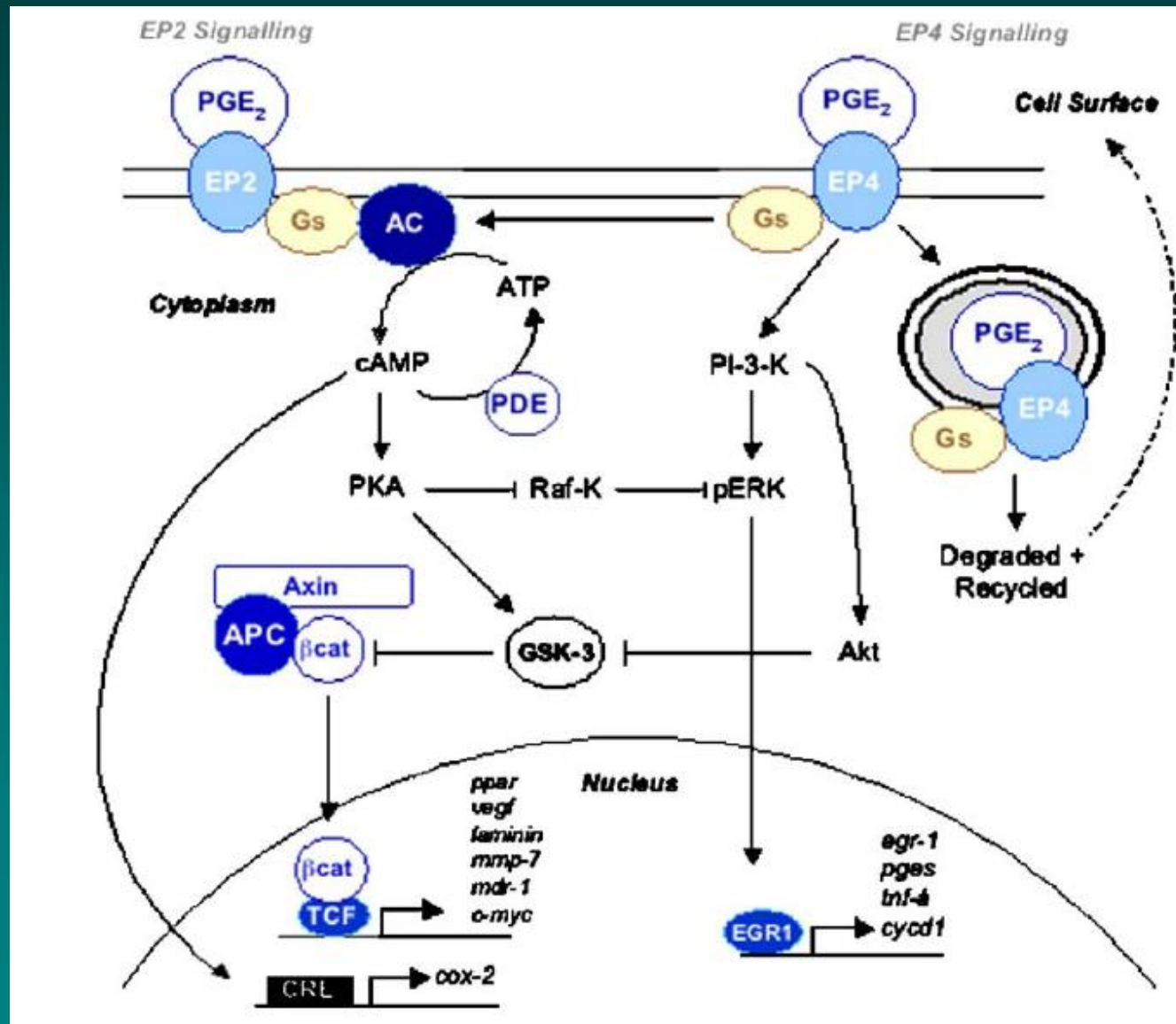
Rovnováha v produkci různých isoform LOX (pro- i protinádorově působících) a jejich biologická aktivita rozhoduje o vývoji nádorů.

Metabolismus LOX podporuje průchod buněk buněčným cyklem

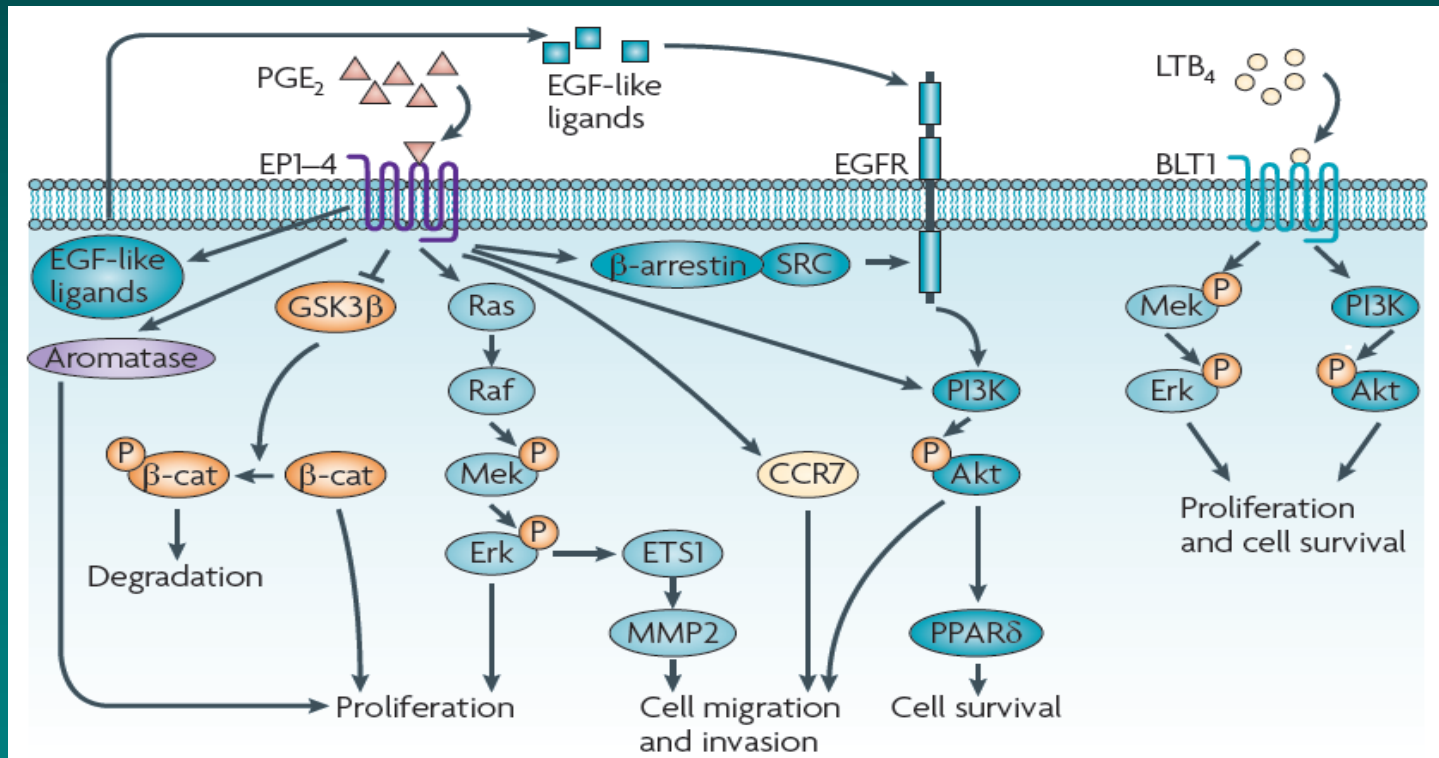


12- a 15-LOX a jejich metabolity podporují průchod nádorových buněk buněčným cyklem. Jejich inhibice způsobuje zástavu buněčného cyklu následovanou obvykle apoptózou.

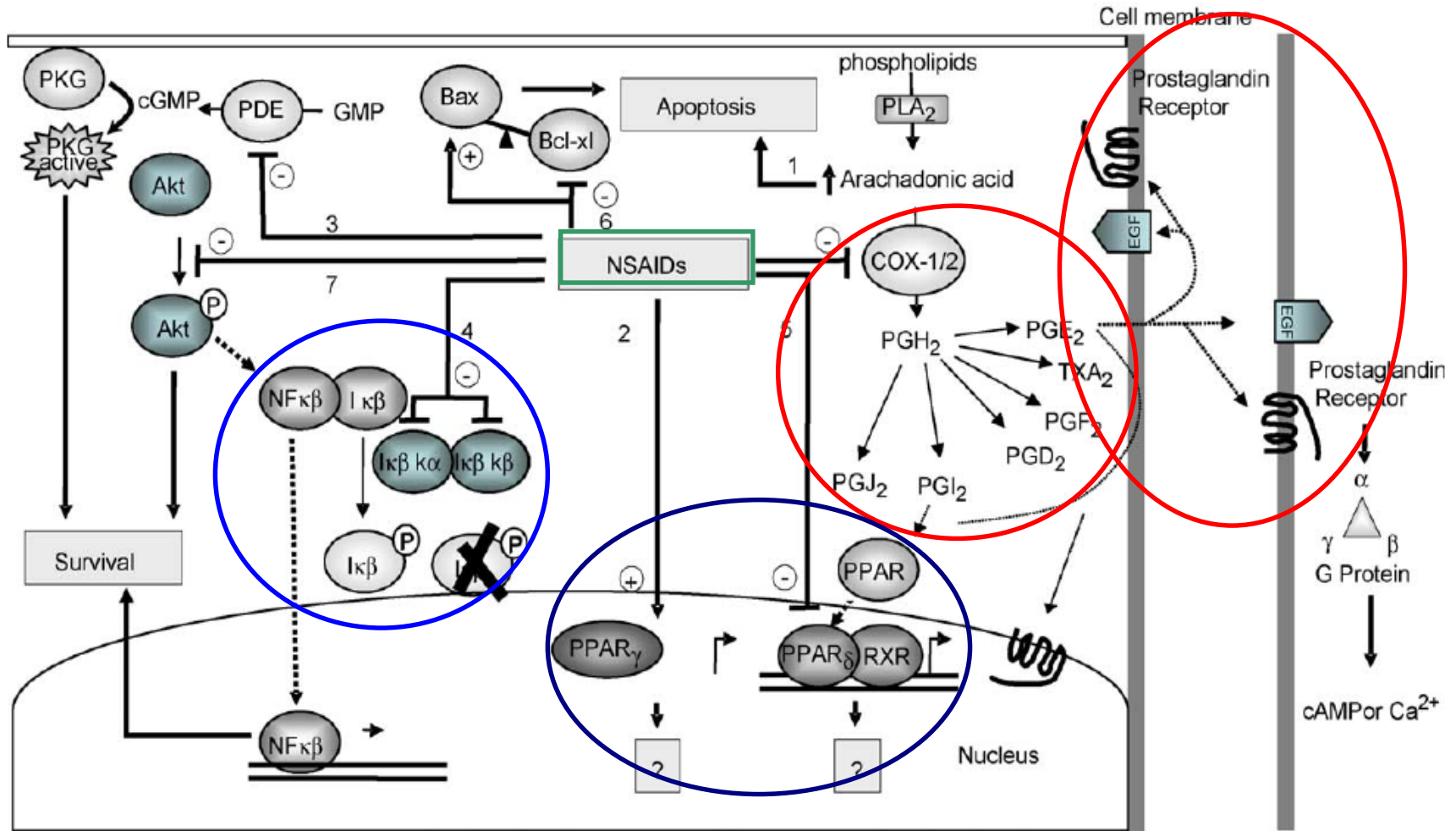
Přenos signálů PGE₂ prostřednictvím receptorů EP1 – 4 spřažených s G-proteiny



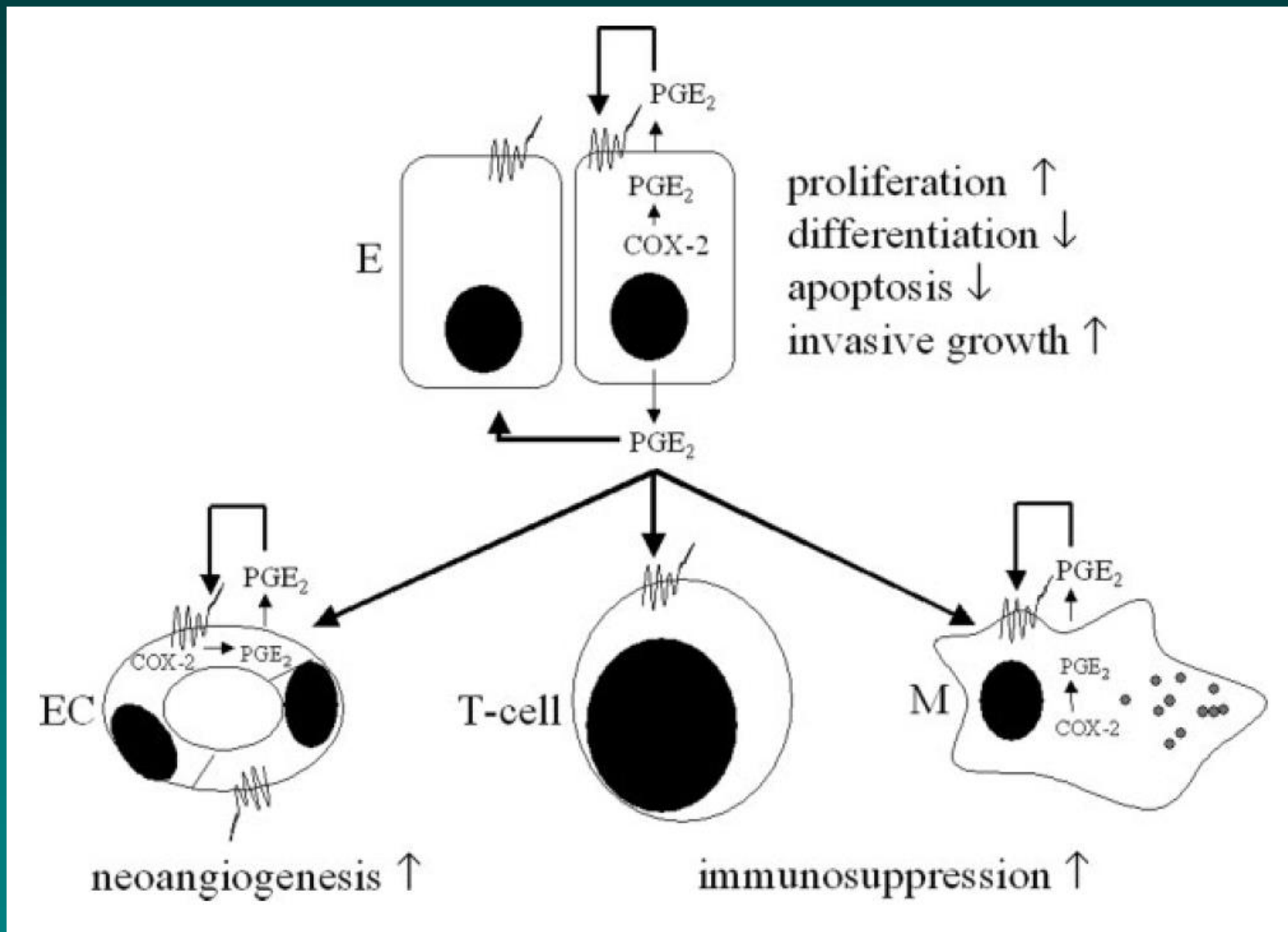
PGE₂ a LTB₄ podporují progresi nádoru indukcí proliferace, přežívání, migrace a invaze nádorových epiteliálních buněk



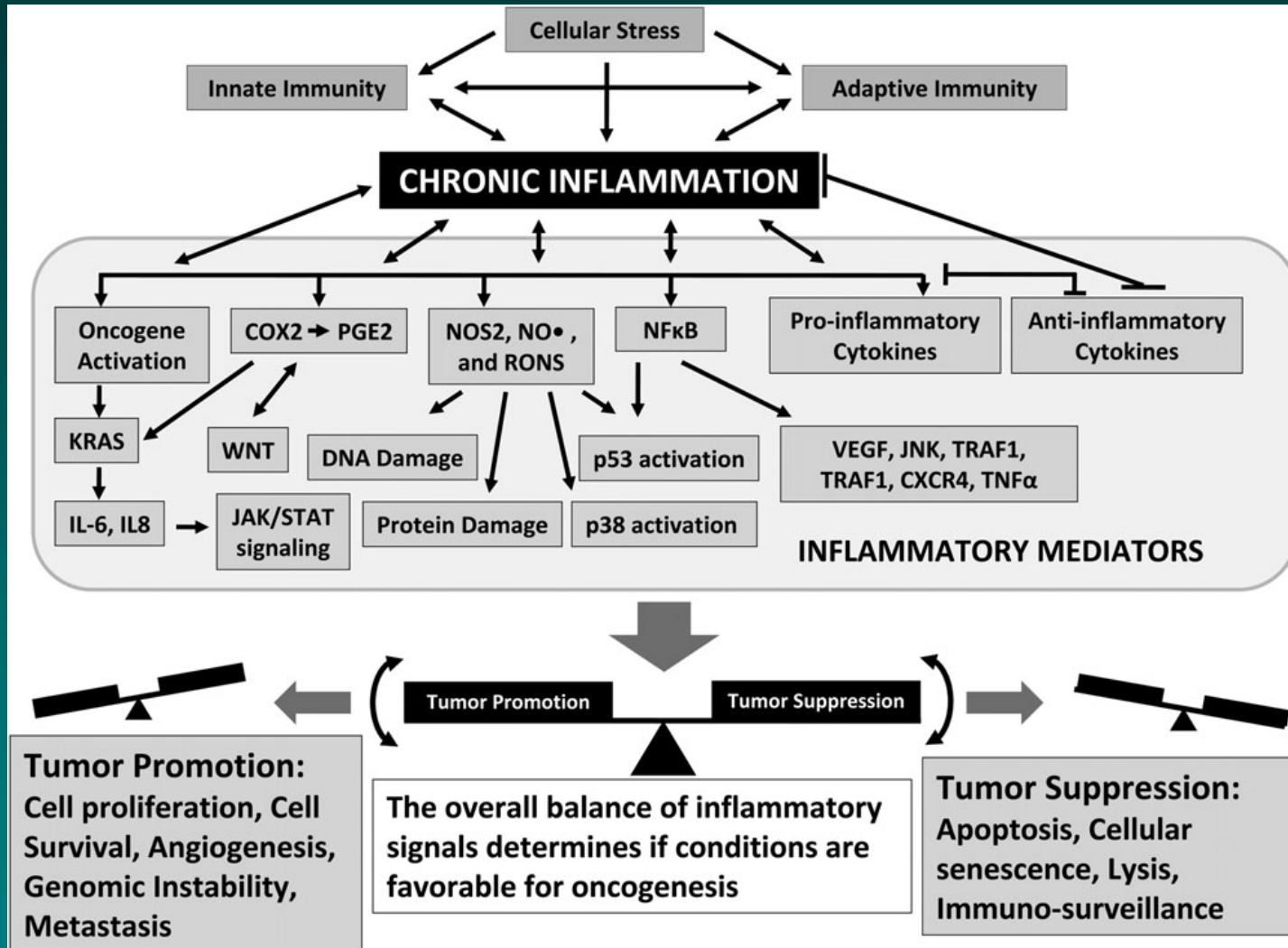
Hlavní molekulární cíle COX-2 a NSAIDs



Prozánětlivé, pronádorové a imunosupresivní působení COX-2 a PGE₂

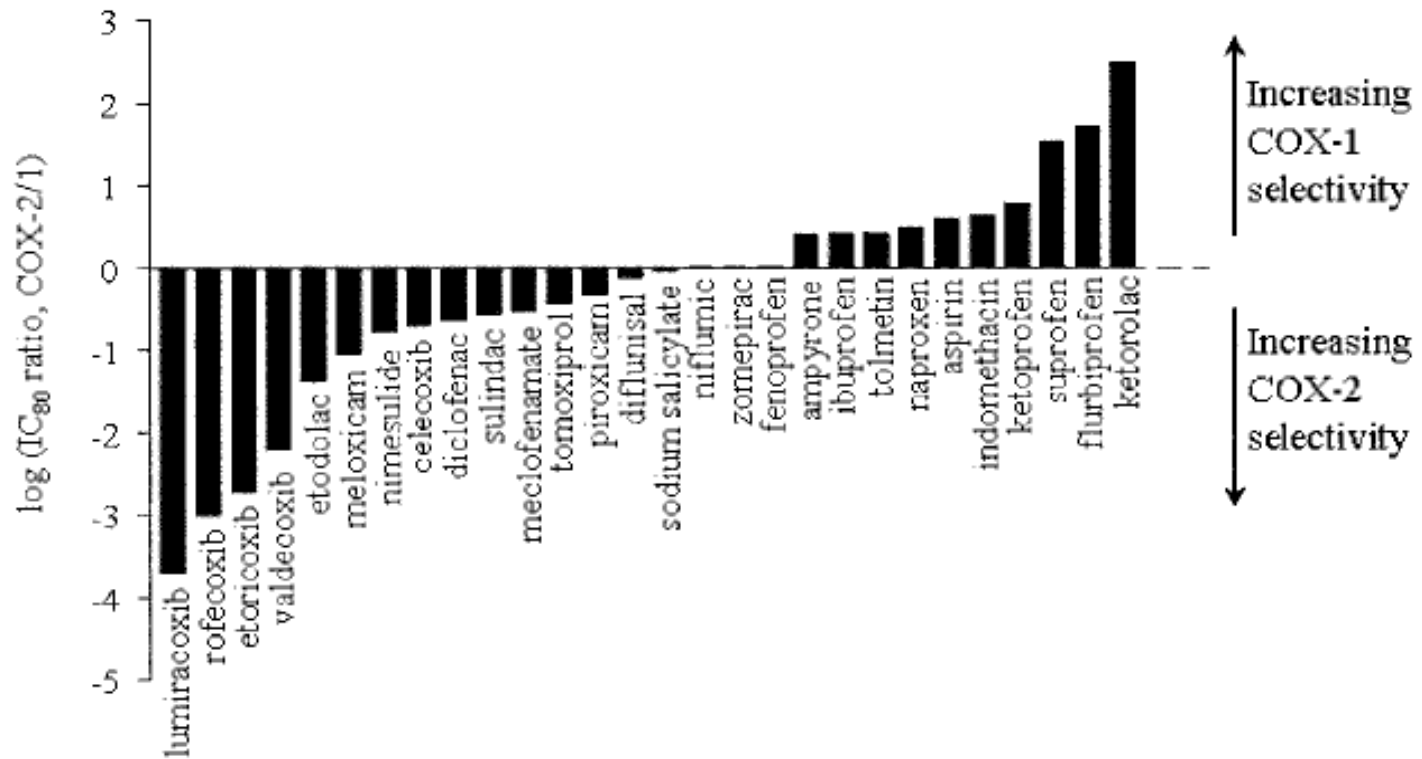


Úloha zánětu v karcinogenezi



Chronický zánět mění hladiny zánětlivých mediátorů včetně COX-2, RONS a zánětlivých cytokinů a aktivuje protoonkogeny. V závislosti na společných funkcích a rovnováze zánětlivých mediátorů může zánětlivá odpověď nádor buď podporovat nebo působit protinádorově.

INHIBITORY COX-1 a COX-2



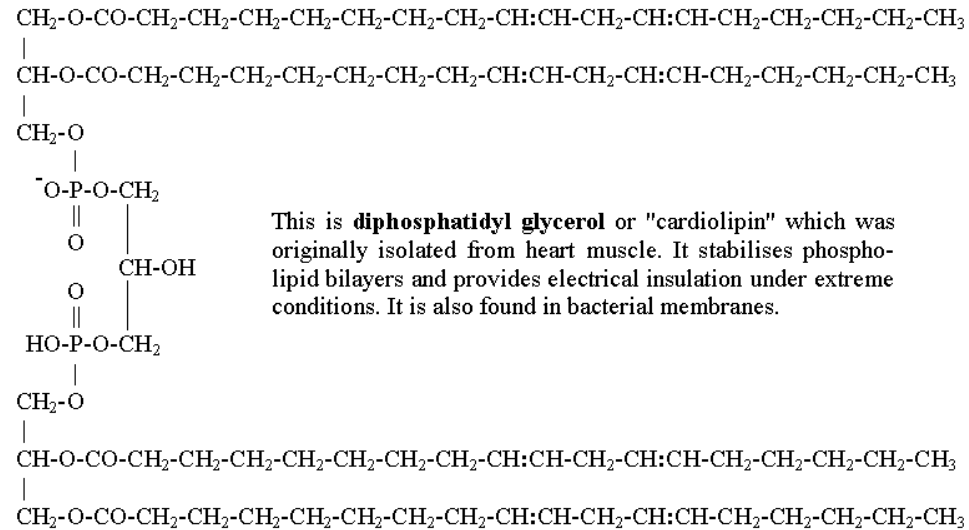
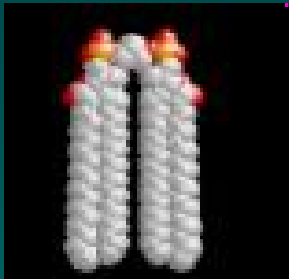
Coxibs – selektivní inhibitory COX-2, klinicky důležité

Děje na mitochondriích a oxidativní metabolismus

- VNMK fyzicky interagují s mitochondriální membránou, mění její permeabilitu otevíráním MTP (membrane permeability pores) a snižují tak membránový potenciál.
- DHA je přednostně inkorporována do kardiolipinu, fosfolipidu vnitřní mitochondriální membrány. To souvisí se stupněm nenasycenosti, indukci oxidativního stresu, uvolněním cytochromu c a apoptózou.
- VNMK modulují hladinu proteinů rodiny Bcl-2 (Bid, Bcl-2), které interagují s lipidy mit. membrány.
- Zvýšené množství VNМК vyvolává oxidativní stres (produkce ROS, NOS a lipidová peroxidace)

Kardiolipin (Difosfatidyl glycerol, glycerolfosfolipid)

Hlavní součást membrán mitochondrií



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

- sn-1 – SFAs – LA, OA
- sn-2 – PUFAs – DHA – přednostně se vestavuje do kardiolipinu – mění nenasycenost mit. membrány a oxidativní metabolismus.
- Souvislost s aktivitou cytochrom c oxidázy a uvolňováním cytochromu c
- Význam pro apoptózu

Kardiolipin na kontaktních místech vnější a vnitřní mit. membrány váže kaspázu 8 a produkuje aktivní BID. To způsobuje oligomerizaci BAK/BAX a uvolnění cyt c

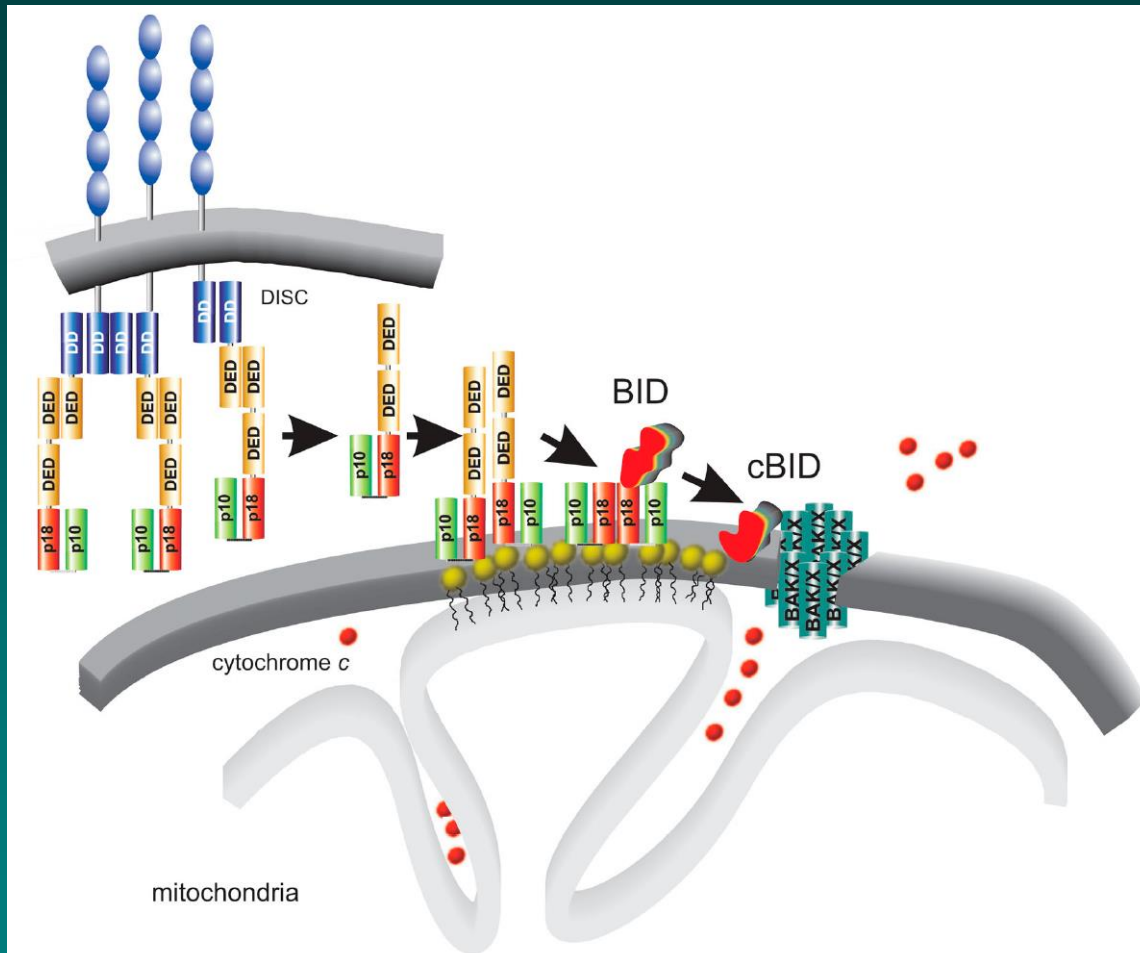
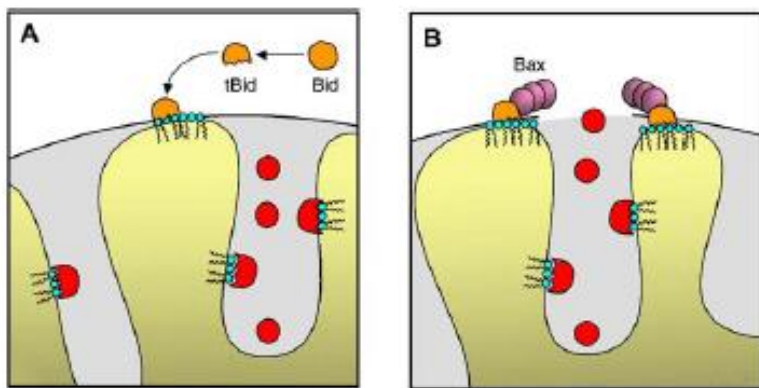
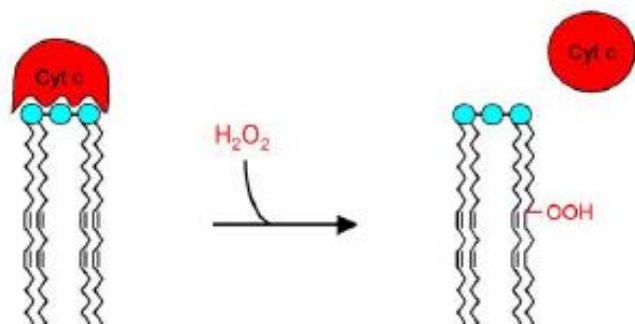
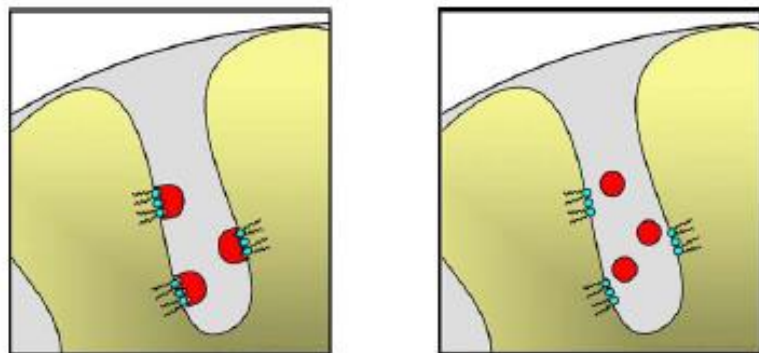


Figure 1. **Localized production of active, cleaved BID on cardiolipin platforms that are used for the assembly of active caspase 8.** The diagram depicts the sequence of events that occur in type II cells according to Gonzalvez et al. (2008). DD, death domain; DED, death effector domain; p10 and p18 are the catalytic core of the caspase. The p43/p10 caspase 8 isoform comprises two DEDs, one p10, and one p18 domain. The cardiolipin (yellow heads) platform at the contact sites between inner and outer mitochondrial membranes is used to produce active BID where it is needed. This in turn causes BAK/BAX oligomerization and cytochrome c release.

Interakce cyt c a kardiolipinu, funkce kardiolipinu v apoptóze



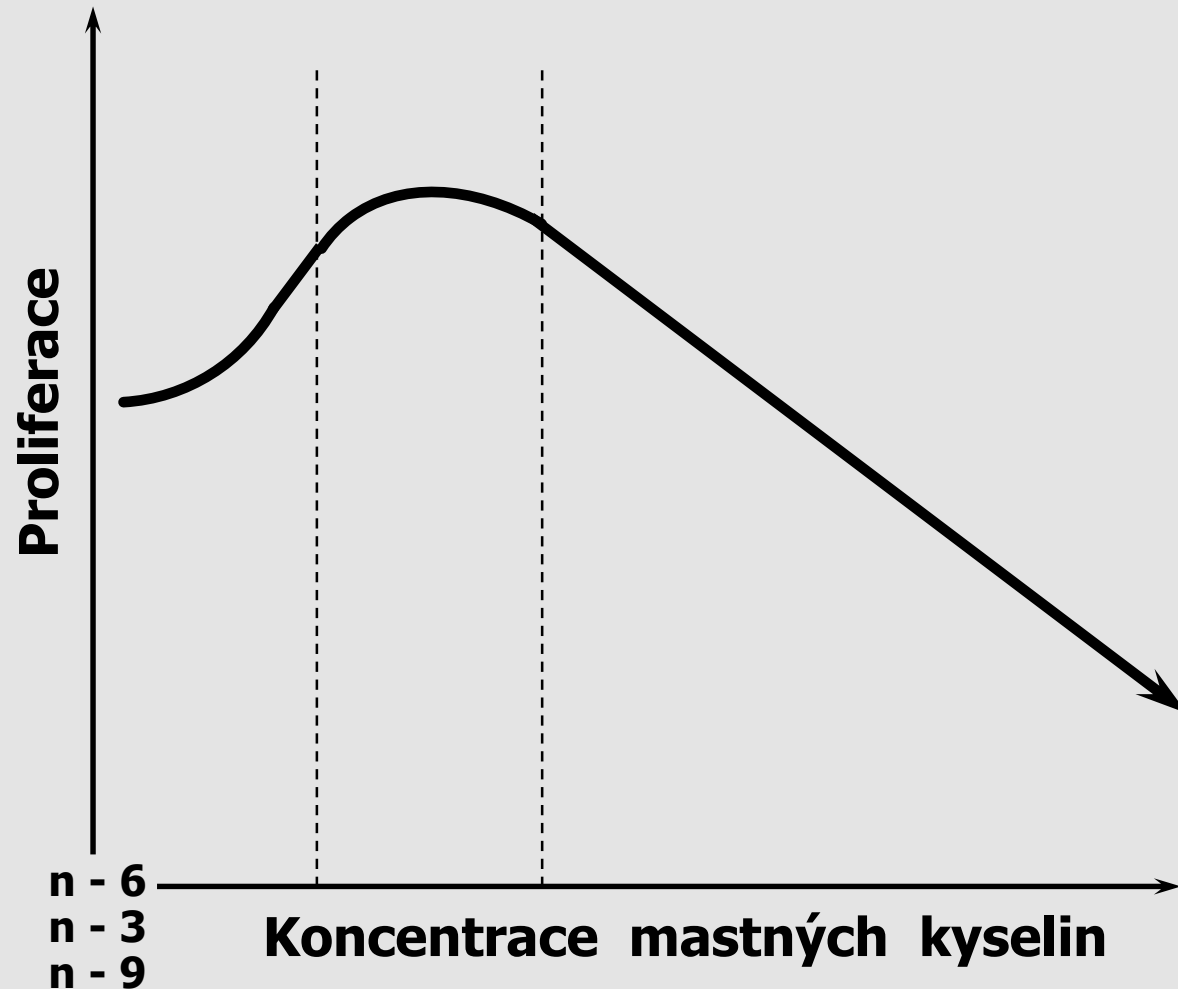
Cyt c katalyzovaná peroxidace CL vede k permeabilizaci vnější membrány a uvolnění cyt c

Kardiolipin slouží jako platforma pro uchycení proapoptického proteinu tBid na místech kontaktu vnější a vnitřní membrány. CL se účastní perforace vnější membrány tBid a Bax proteiny.

Fig. 3 Cytochrome *c* (red) is attached to cardiolipin on the outer surface of the mitochondrial inner membrane and therefore, permeabilization of the mitochondrial outer membrane is not sufficient for cytochrome *c* release. The dissociation of cytochrome *c* from cardiolipin is a required step prior to outer membrane permeabilization and is triggered by cardiolipin peroxidation. Recently it was shown that cardiolipin peroxidation is catalyzed by the bound cytochrome *c* itself [58]

Fig. 4 Cardiolipin executes apoptosis-supporting roles at the mitochondrial outer membrane. (A) Cardiolipin serves as a docking platform for the pro-apoptotic Bcl-2 protein tBid, particularly at contact sites of the inner and outer membranes. (B) Cardiolipin assists the perforation of the mitochondrial outer membrane by tBid and Bax. The mechanism is still elusive

Mastné kyseliny a oxidativní metabolismus



Ovlivnění přenosu signálů a účinky ROS na buněčný cyklus a buněčnou smrt

Účinky jsou závislé na dávce a délce expozice

Nekróza
Apoptóza
Zástava bun. cyklu
Diferenciace
Proliferace

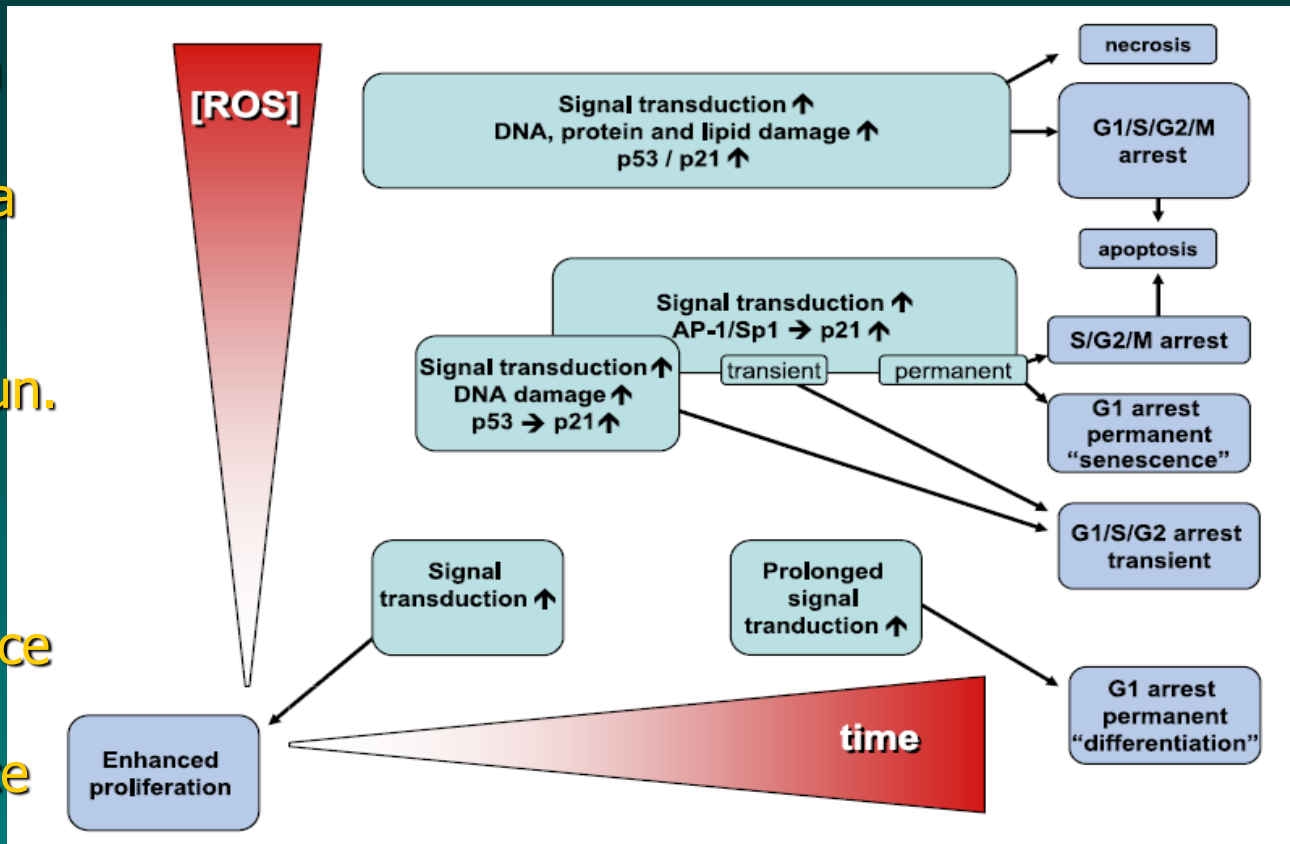


Fig. 3. Scheme, representing the multitude of effects that ROS can have on signal transduction and cell cycle progression. For a given cell and ROS type the effects depend on the amount of ROS and the duration of exposure of the cells to ROS. A short exposure to relatively low doses results in an activation or enhancement of signal transduction pathways leading to (enhanced) cell proliferation. Prolonged exposure to these ROS concentrations will result in prolonged activation of these signal transduction pathways, comparable to the effects of differentiation factors, which will result in a G1 arrest. At higher concentrations and possibly depending on the cellular localization of the ROS, damage to DNA might occur, resulting in an induction of p53 activity and consequently in expression of p21. During the subsequent cell cycle arrest DNA repair will occur after which cell proliferation will resume. Alternatively p21 may become expressed due to the AP-1 or Sp1 sites, which are redox sensitive, resulting in a transient or permanent G1 arrest. If the amounts of ROS are again higher, either due to increase concentrations or prolonged exposure, all changes described above will take place, together with structural damage to proteins and lipids. Under these conditions, cells will arrest in all phases of the cell cycle, especially in the G1 and G2 phases and the cells will undergo apoptosis. Upon sever damage the cells may directly undergo necrosis.

Ovlivnění přenosu signálů a regulačních molekul v buňkách

VNMK a jejich metabolismy jsou ligandy pro PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors)

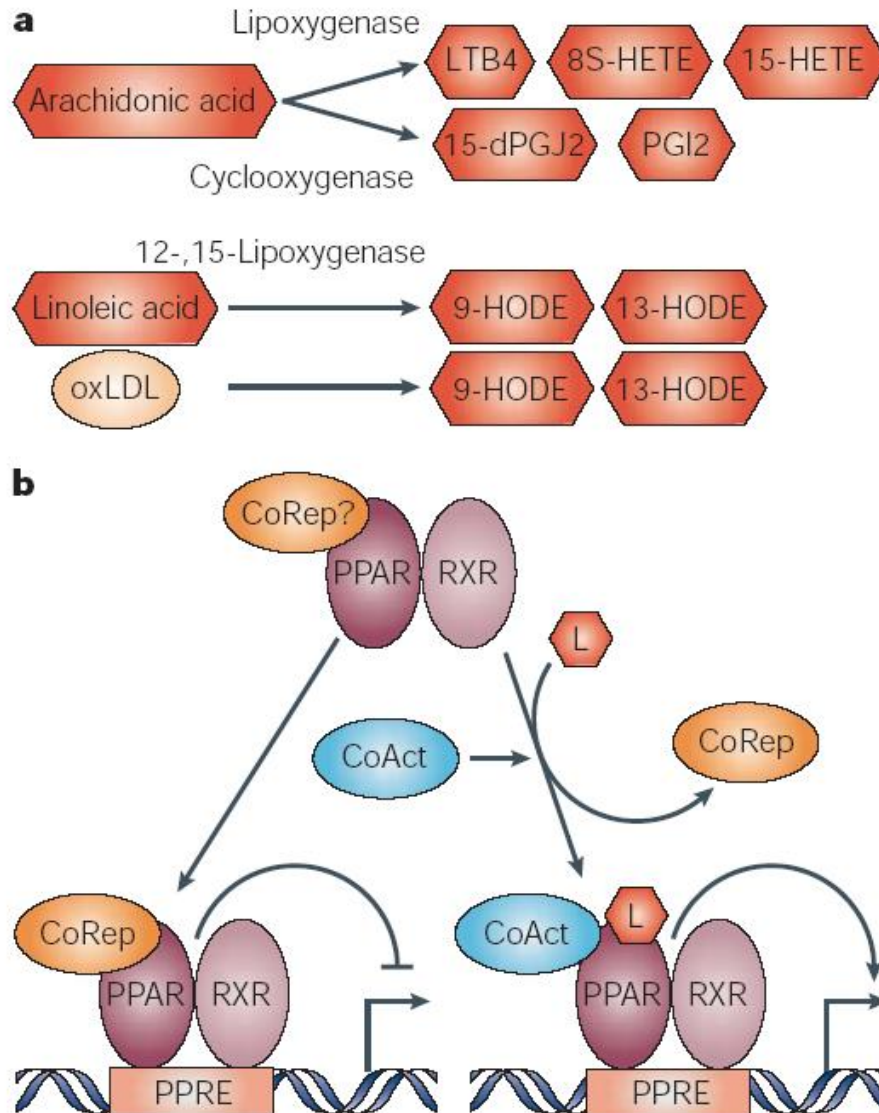
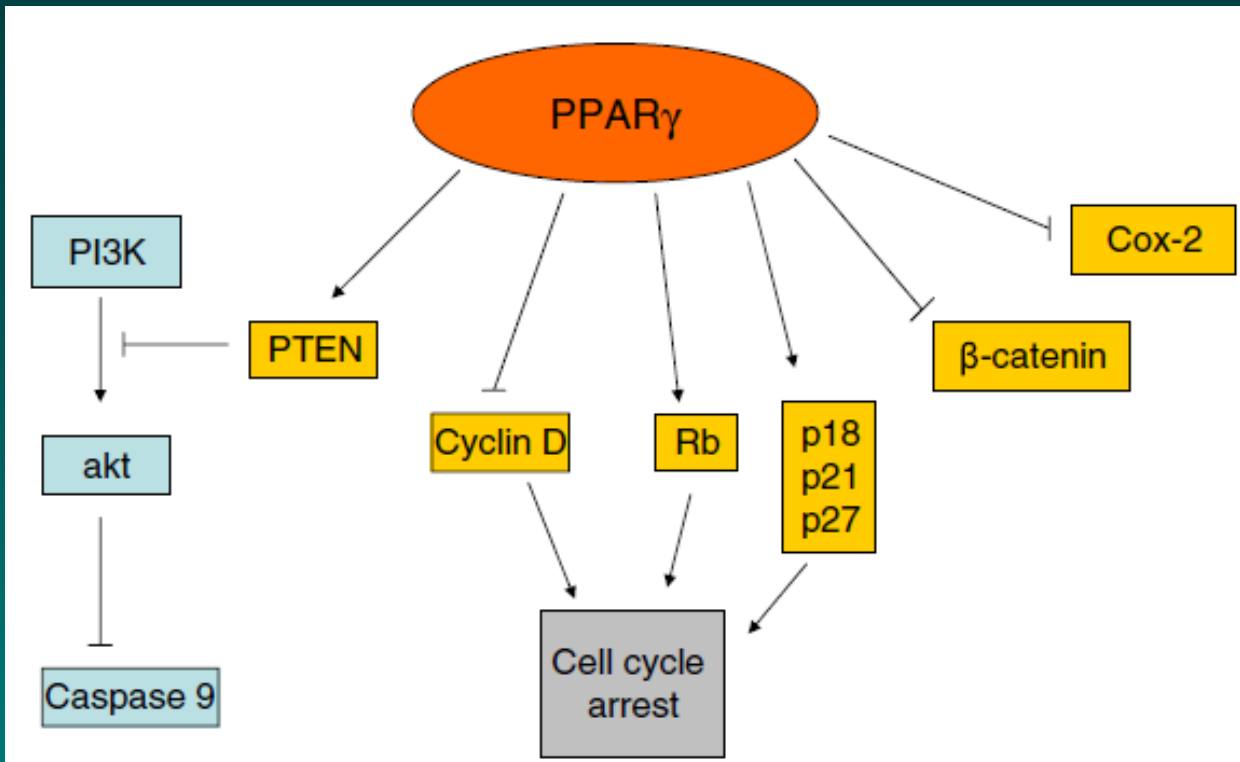


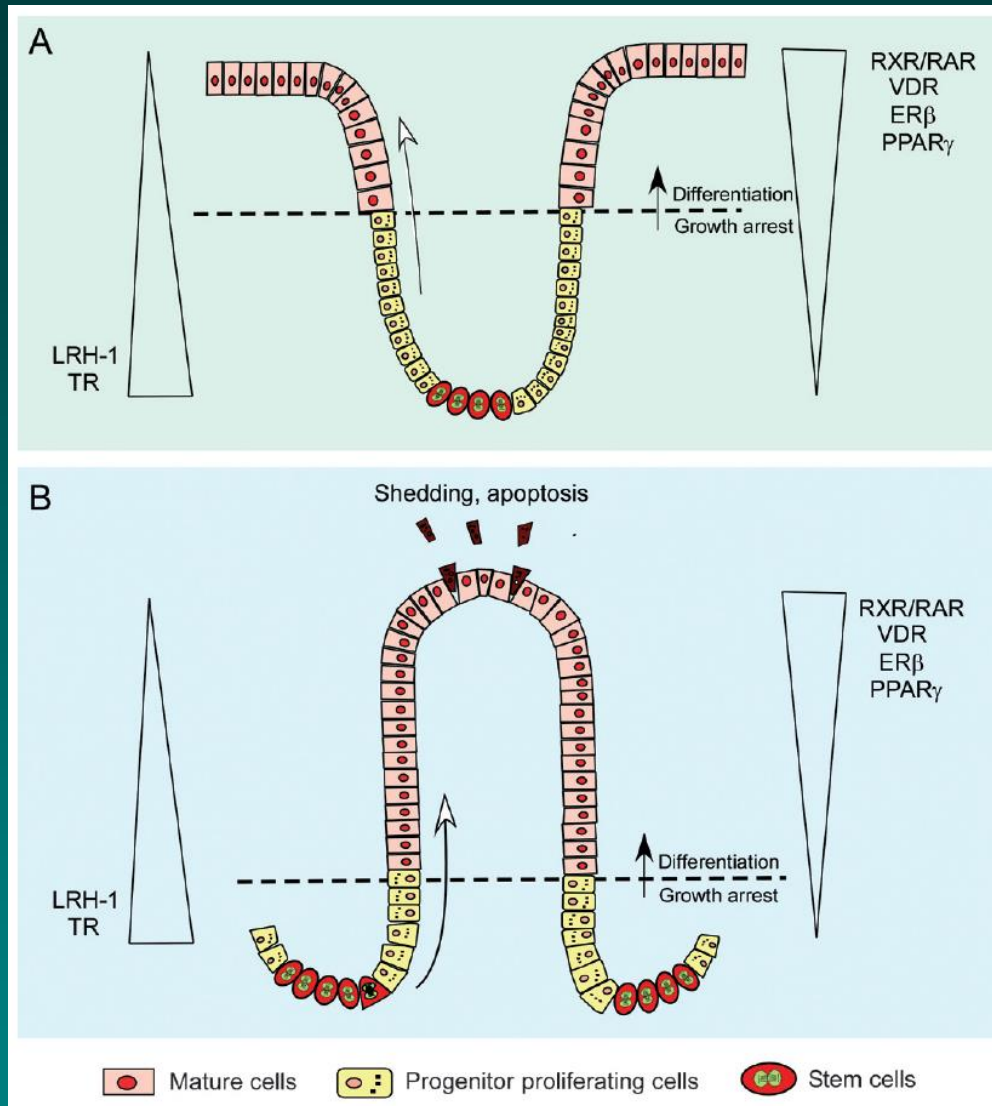
Figure 1 | Schematic representation of the PPAR signalling pathways. a | Endogenous agonists of peroxisome-proliferator-activated receptors (PPARs). PPARs are ligand-inducible receptors, which can be activated by fatty acids — such as arachidonic or linoleic acids — and their derivatives. The fatty-acid metabolites that activate PPARs are mainly derived from arachidonic or linoleic acids through the cyclooxygenase or the lipoxygenase pathways. The best characterized at the moment are leukotriene B4 (LTB4) and 8S-HETE (hydroxyeicosatetraenoic acid), which preferentially activate PPAR α ; 15-deoxy-prostaglandin J2 (15-dPGJ2) and 15-HETE, which are PPAR γ -selective ligands; and the prostaglandin I2 (PGI2, also called prostacyclin), which is probably a PPAR β/δ natural ligand. PPAR γ is also activated by 9-HODE (hydroxyoctadecadienoic acid) and 13-HODE, either derived from linoleic acid or as components of oxidized low-density lipoprotein (oxLDL). **b |** PPARs function as heterodimers with their obligate partner, retinoid receptor (RXR). The dimer probably interacts with co-regulators, either co-activators (CoAct) or co-repressors (CoRep). In the unliganded form, PPAR β/δ -RXR heterodimer, in contrast to PPAR α -RXR and PPAR γ -RXR heterodimers, recruits co-repressors and represses the activity of PPAR α and PPAR γ target genes by binding to the peroxisome proliferator response element (PPRE) that is present in their promoters^{6,7}. In their liganded form, the PPAR-RXR heterodimers interact with co-activators, bind to the PPRE that is present in the promoters of their target genes and activate their transcription.

Důležité signální dráhy a molekuly indukované či inhibované PPAR γ



PPAR γ indukuje fosfatázu PTEN vedoucí k inhibici kinázy Akt. Akt má antiapoptické účinky (inhibice kaspázy-9). PPAR γ způsobuje zástavu bun. cyklu represí cyklinu D, indukci p18, p21, p27 a interakcí s Rb. PPAR γ rovněž potlačuje beta-katenin a COX-2 podporující karcinogenezi kolonu.

Obnova střevního epitelu a jaderné receptory



Hladina jaderných receptorů v různých kompartmentech tlustého (A) a tenkého střeva (B).

LRH-1 – liver receptor homology

TR – thyroid hormone receptor

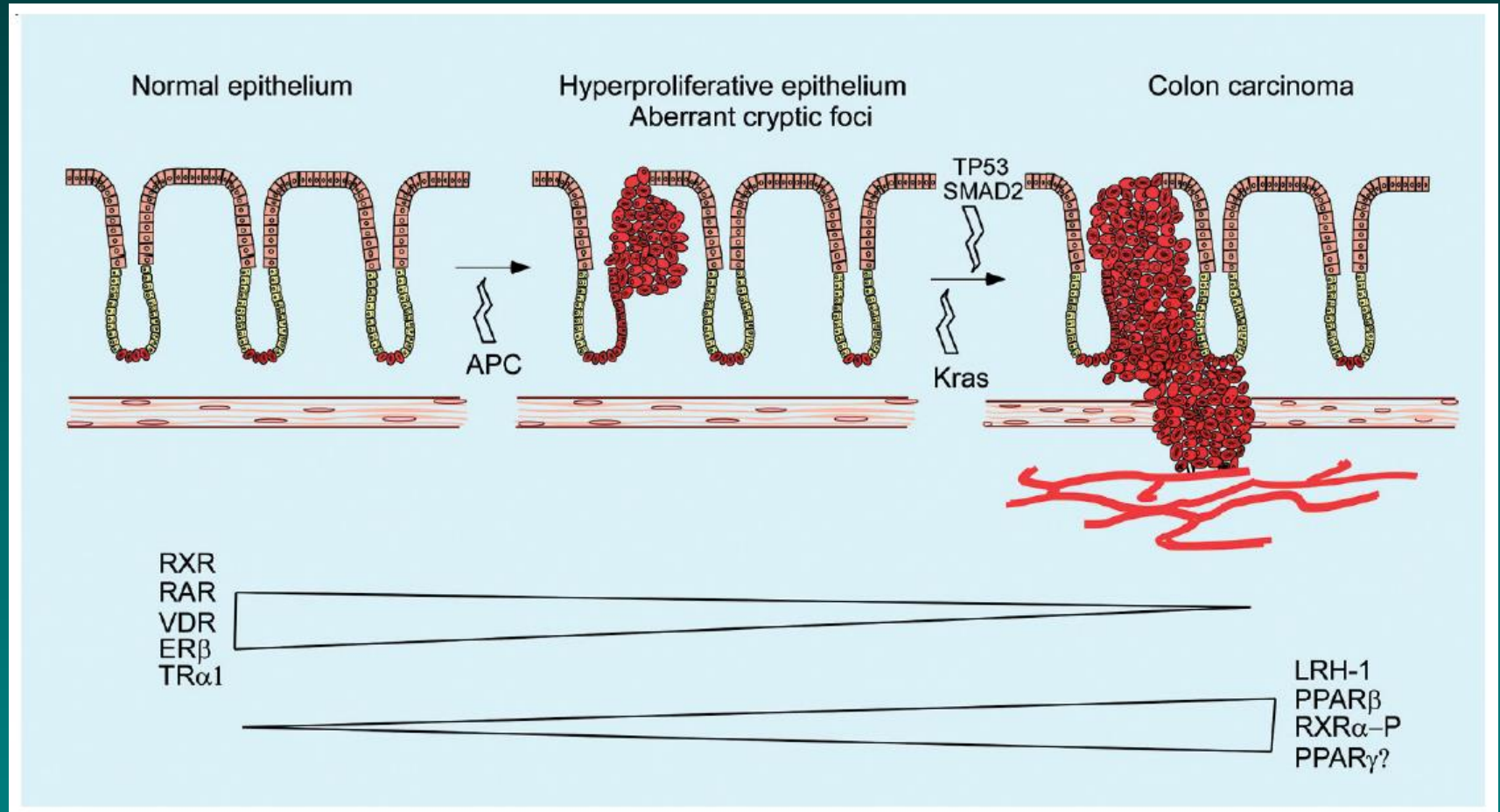
RXR/RAR – retinoid x receptor/retinoid acid receptor

VDR – vitamin D receptor

ER – estrogen receptor

PPAR – peroxisome proliferator-activated receptor

Vývoj nádorů kolonu a exprese jaderných receptorů



TP53 – tumor protein 53

SMAD2 – Small mothers against decapentaplegic homolog 2

Funkce receptorů pro peroxisomové proliferátory (PPARs) ve vztahu ke karcinogenezi

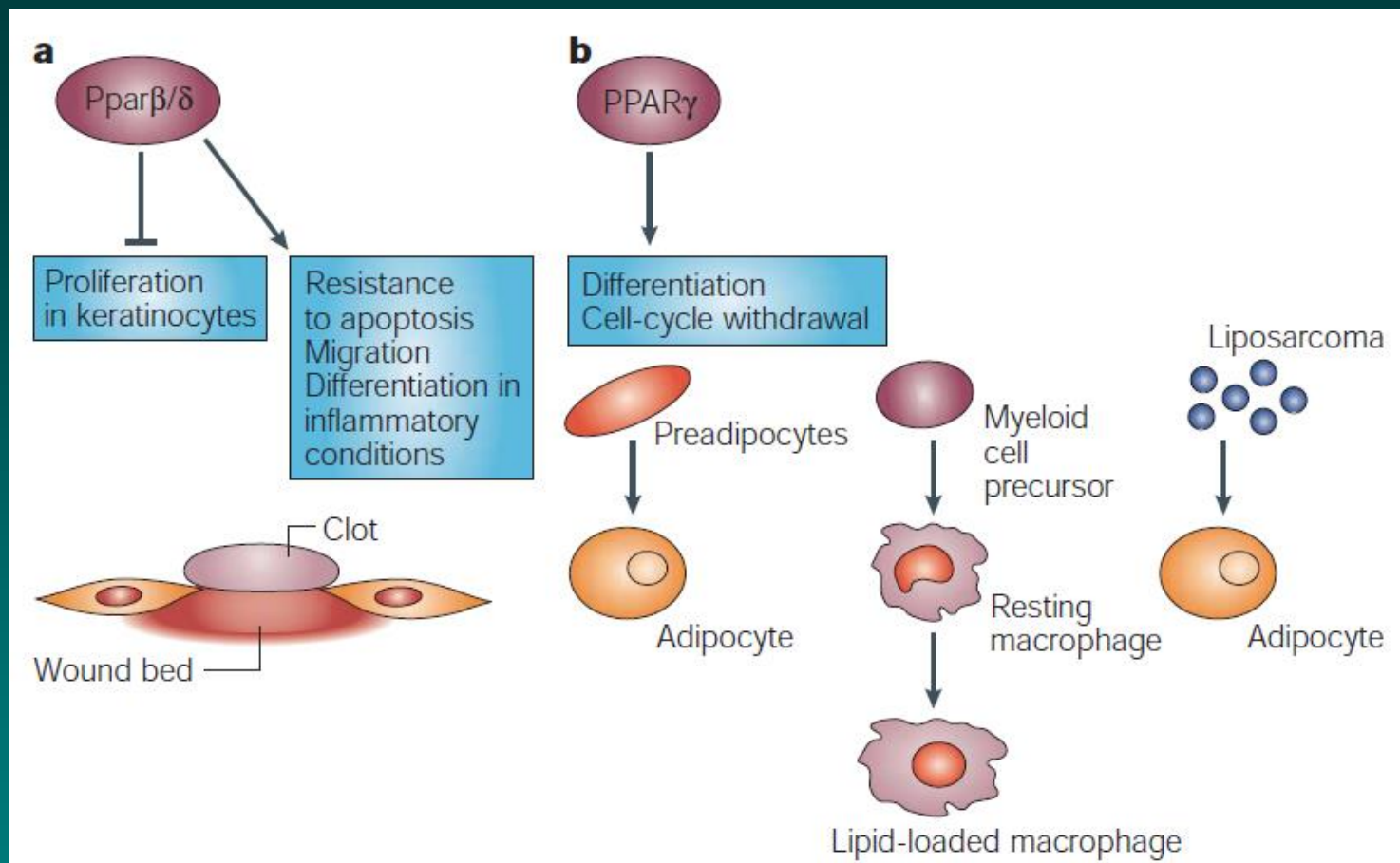


Figure 3 | **PPARβ/δ and PPARγ functions that relate to their carcinogenic properties.**
a | As demonstrated in a mouse-skin wound-healing model, Pparβ/δ inhibits keratinocyte proliferation and participates in inflammation-induced keratinocyte differentiation, which are anti-carcinogenic actions. However, it also increases both migration and keratinocyte resistance to Tnf-α-induced apoptosis. **b** | PPARγ is implicated in the differentiation of pre-adipocytes to adipocytes and of monocytes to macrophages. In the presence of PPARγ and retinoid receptor (RXR) ligands, myeloid-cell precursors become resting macrophages, which can be turned to lipid-loaded macrophages, when PPARγ and RXR ligands are maintained. PPARγ can also withdraw liposarcoma-derived cells from cell division to trigger their differentiation to adipocytes.

Mutace PPAR γ v lidských nádorech a účinky agonistů PPAR γ u různých buněčných typů

Table 1 | **Mutations found in PPAR γ in human tumours**

Tissue	Frequency	Mutation	References
Sporadic colon tumors	4/55	Loss of function	112
Follicular thyroid carcinomas	5/8	Chromosomal translocation; PAX8-PPAR γ fusion protein; dominant-negative inhibitor of PPAR γ	113
Follicular thyroid carcinomas	5/9	Chromosomal translocation; PAX8-PPAR γ fusion protein	114
Follicular thyroid adenomas	2/16	Dominant-negative inhibitor of PPAR γ	
Follicular thyroid carcinomas	13/33	Chromosomal translocation; PAX8-PPAR γ fusion protein	115
Follicular thyroid adenomas	1/23	Chromosomal translocation; PAX8-PPAR γ fusion protein	
Follicular thyroid carcinomas	6/17	Chromosomal translocation; PAX8-PPAR γ fusion protein	116
Follicular thyroid adenomas	6/11	Chromosomal translocation; PAX8-PPAR γ fusion protein	
Prostate tumours	8/38	Hemizygous deletion of PPAR γ	59
71 cancer cell lines; 326 clinical cancers (colon, prostate, breast, lung cancers, osteosarcomas, leukaemias)	0	No mutation found	117

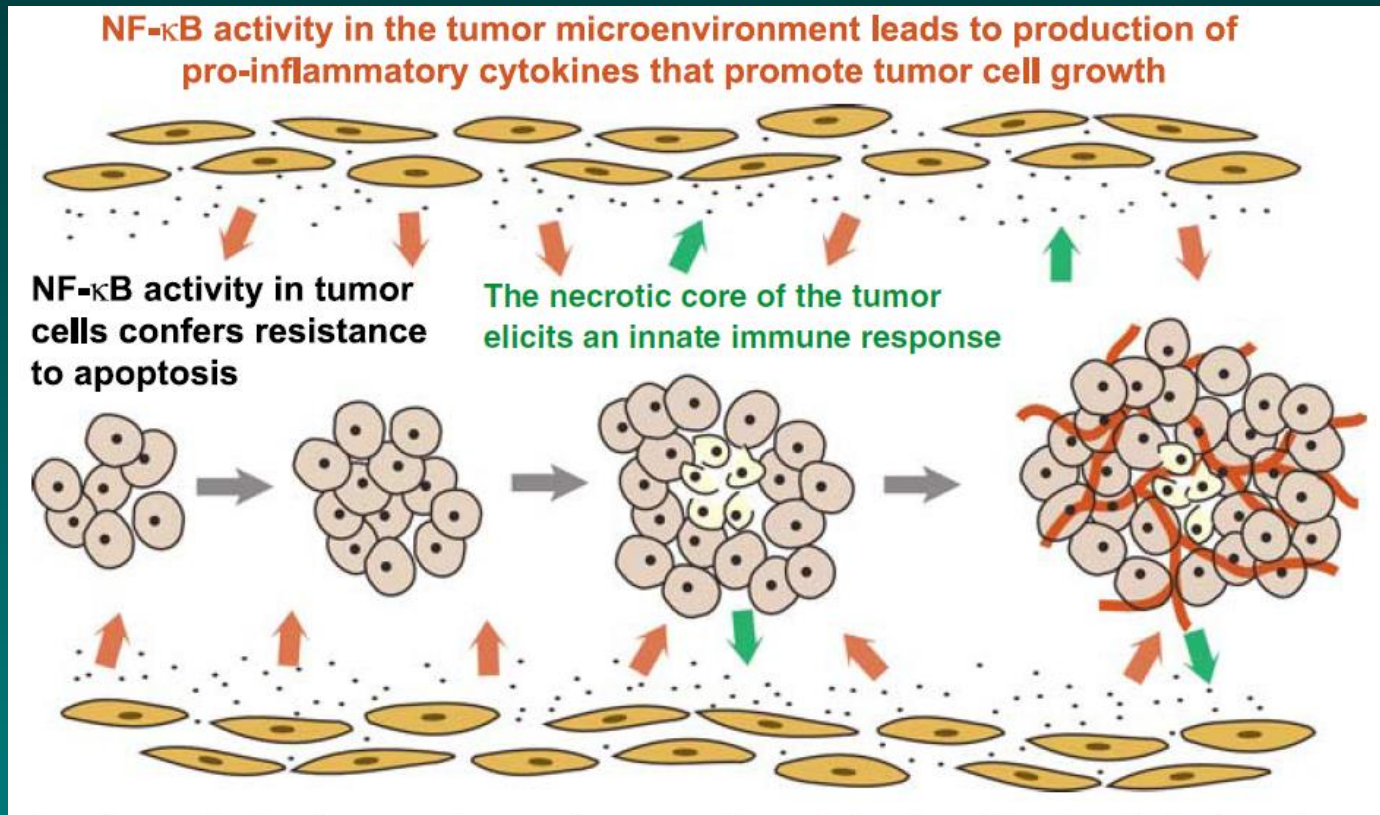
Mutations that decreased the activity of the receptor were described in the *PPAR γ* gene in some human tumours of various origins. Overall, these mutations are rather rare, indicating that decreased activity of PPAR γ might contribute to carcinogenesis, but is probably not causal to the pathology. For the sake of clarity (different approaches), each publication cited in the table is listed separately.

Table 2 | **Effects of PPAR γ agonists in various cell types**

Consequence of the treatment	Cell type	References
Growth arrest	Human colorectal cancer	118
	Breast cancer	53,54
	Prostate cancer	59
	Myeloid leukaemia	119
	Human neuroblastoma	120
	Human hepatoma	121
	Vascular smooth muscle	122
	Human gastric cancer	123
	Thyroid carcinoma cells	124
	Uterine leiomyoma smooth-muscle cells	125
	Oligodendrocyte-like cells	126
Pancreatic cell line	68	
Cell differentiation	Colon cancer cell lines	45
	Macrophages	127
	Prostate cancer cells	58
	Non-small-cell lung carcinoma	74,128
	Liposarcomas	78,79
	Oligodendrocyte-like cells; rat spinal-cord-derived oligodendrocytes	126
Apoptosis	Human colon cancer cell line	129
	Breast cancer cells	54
	Macrophages	130
	B-lineage cells	131
	Human liver cancer cells	132
	Choriocarcinoma cells	133
	Adipocytes	134
Decrease of spontaneous immortalization	Li-Fraumeni-syndrome-derived human mammary epithelial cells	135

This table summarizes the effects of treatment with PPAR γ agonists in various cell types, with regards to cell cycle. In most of the studies, treatment of the cells with a PPAR γ agonist has anti-carcinogenic consequences. Most of these results remain to be confirmed *in vivo* and their clinical relevance is not yet proven. Additionally, it is important to note that PPAR γ agonists might also have PPAR γ -independent effects (see Box 2) that were not separated from the PPAR γ -dependent effects in most of the studies.

Vnitřní a parakrinní účast NFκB v přežívání a proliferaci nádorů.



Aktivace NFκB vede k rezistenci k apoptóze. Buňky na okraji rychle rostoucího nádoru podléhají nekróze, když chybí ATP. Nekrotické nádorové buňky uvolňují prozánětlivé faktory. Tyto faktory aktivují imunitní odpověď nádorového mikroprostředí, která vede k syntéze prozánětlivých cytokinů závislé na NFκB, což podporuje růst nádoru.

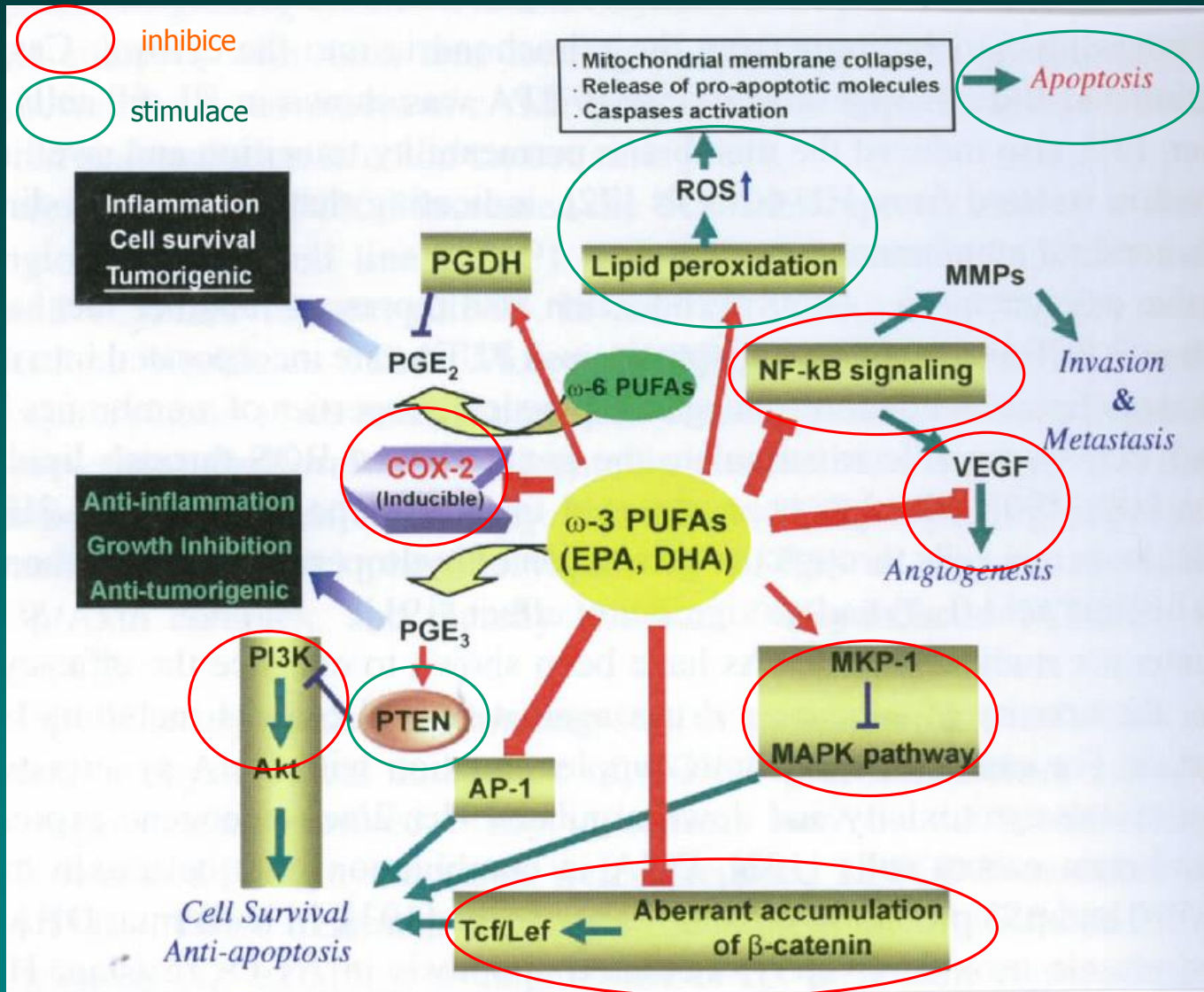
ÚČINKY omega-3 VNMK

Kyselina eikosapentaenová
(EPA, 22:5, n-3)

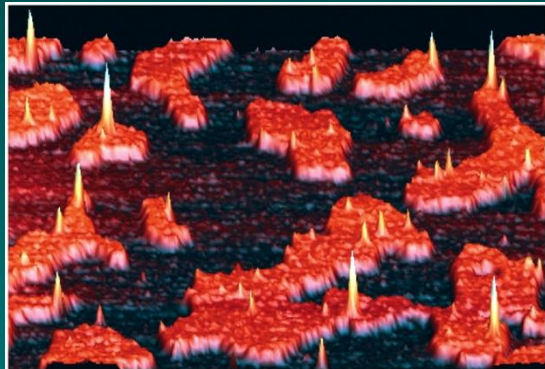
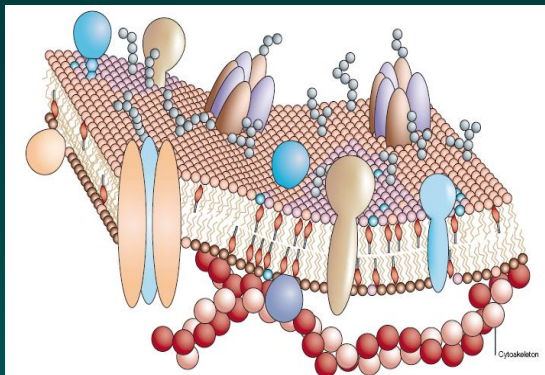
Kyselina dokosahexaenová
(DHA, 22:6, n-3)

- vznikají elongací a desaturací kys. linolenové (malá účinnost)
- jsou obsaženy v některých rostlinných olejích, olejích z řas a v rybím oleji

Účinky a mechanismy působení n-3 VNMK

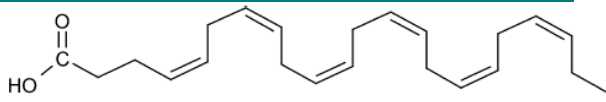
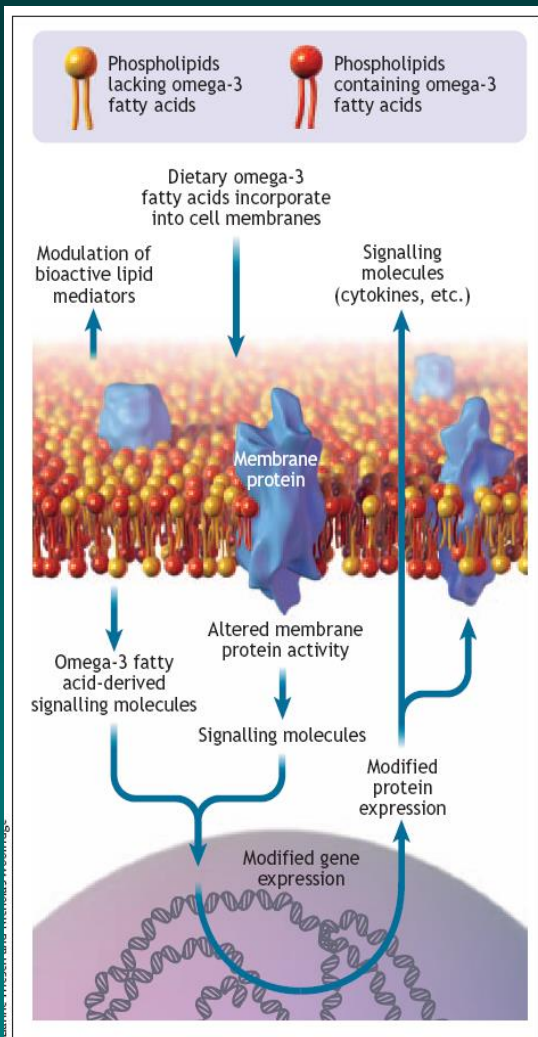


Inkorporace n-3 VNMK do buněčných membrán ovlivňuje strukturu i funkci

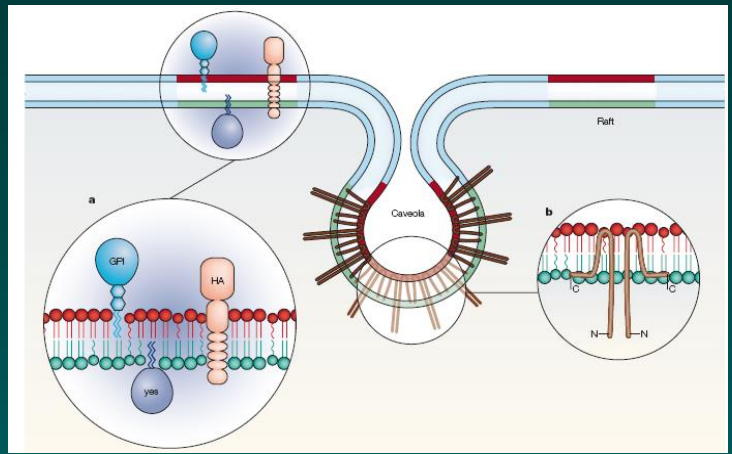


Atomic force microscopy

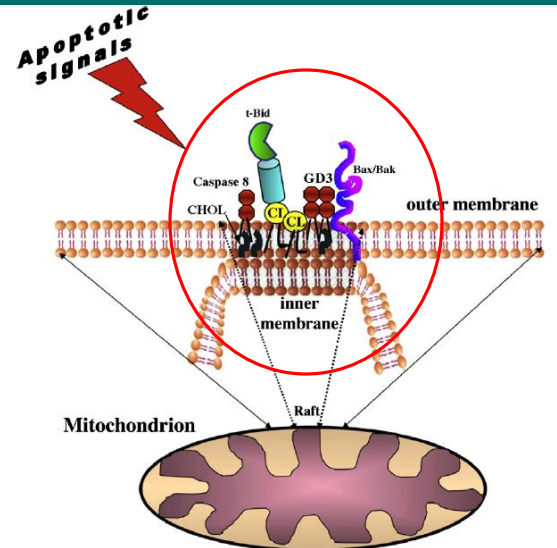
Změny lipidových mikrodomén (rafty a caveolae) po inkorporaci specifických VNMK ovlivňují aktivitu membránových přenašečů a receptorů i vazbu proteinů k buněčné membráně - **Vliv na přenos signálů**



Structure of DHA



DHA se inkorporuje specificky do kardiolipinu v mitochondriích, změny oxidace, propustnosti mit. membrány, uvolňování cyt c, indukce apoptózy (vazba kasp 8, tBid a oligomerizace Bak/Bax)



PREVENCE

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

Experimentální studie

- ω -3 VNMK inhibují karcinogeny-indukovanou karcinogenezi
- redukují růst transplantovaných nádorů u laboratorních zvířat
- snižují proliferaci a indukují apoptózu u nádorových buněk kolonu *in vitro*.

Klinické studie – EPA a DHA inhibují proliferaci epiteliálních buněk kolonu u pacientů s adenomy a vysokým rizikem nádorového onemocnění

TERAPIE

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

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

Kombinace se standartní terapií (chemoterapie, záření)

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

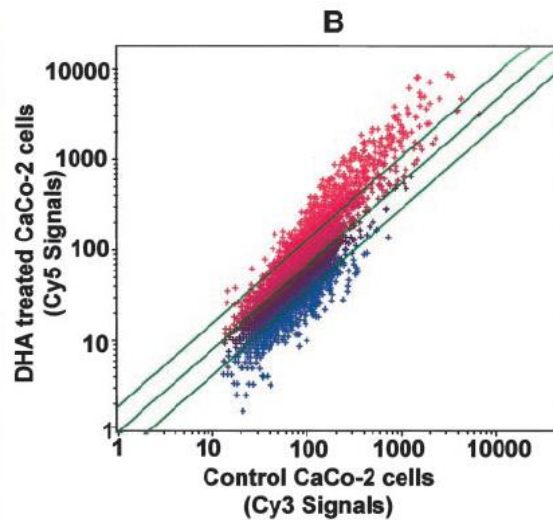
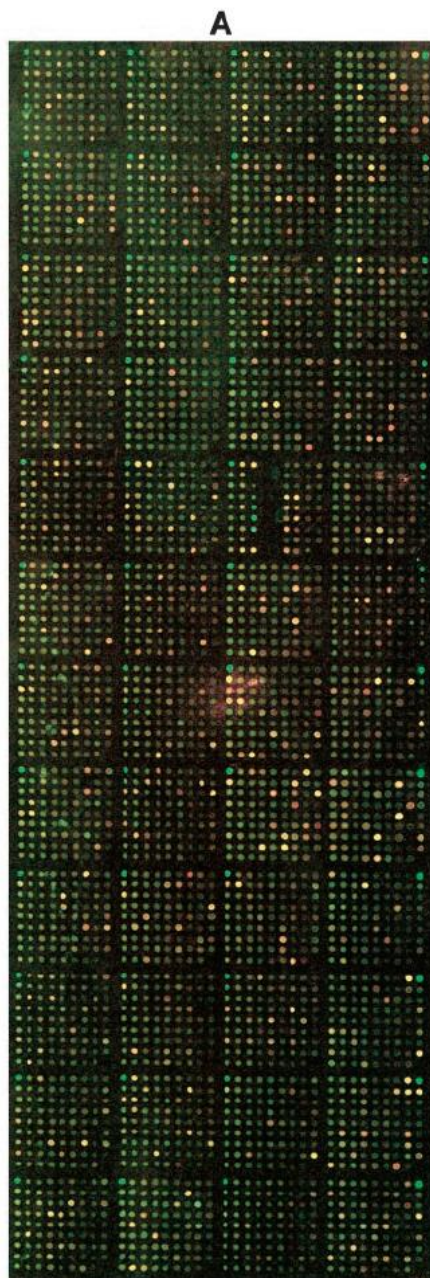


Fig. 2. *A*, scanned image of hybridized human oligoarrays containing 3.8 k genes. Total RNA from CaCo-2 cells, treated with DHA for 48 h, was used for microarray analysis as described in "Materials and Methods." A red color image of spots represents induced genes, green spots indicate repressed genes. *B*, scatter plot view of gene expression. Expression intensity Cy5: Cy3 ratios of untreated versus DHA-treated CaCo-2 cells. The ratios (Cy-5: Cy-3) of genes that have ≥ 2 -fold expression are considered induced, and those with ≤ 0.5 -fold expression are considered repressed. Approximately 504 of 3800 genes (13%) were expressed in DHA-treated cells.

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

Indukované geny
Reprimované geny

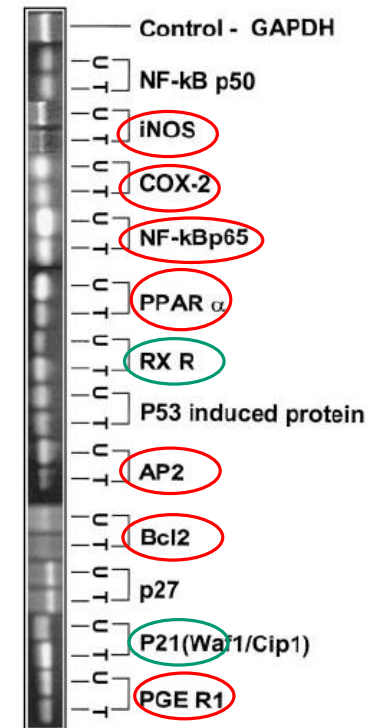
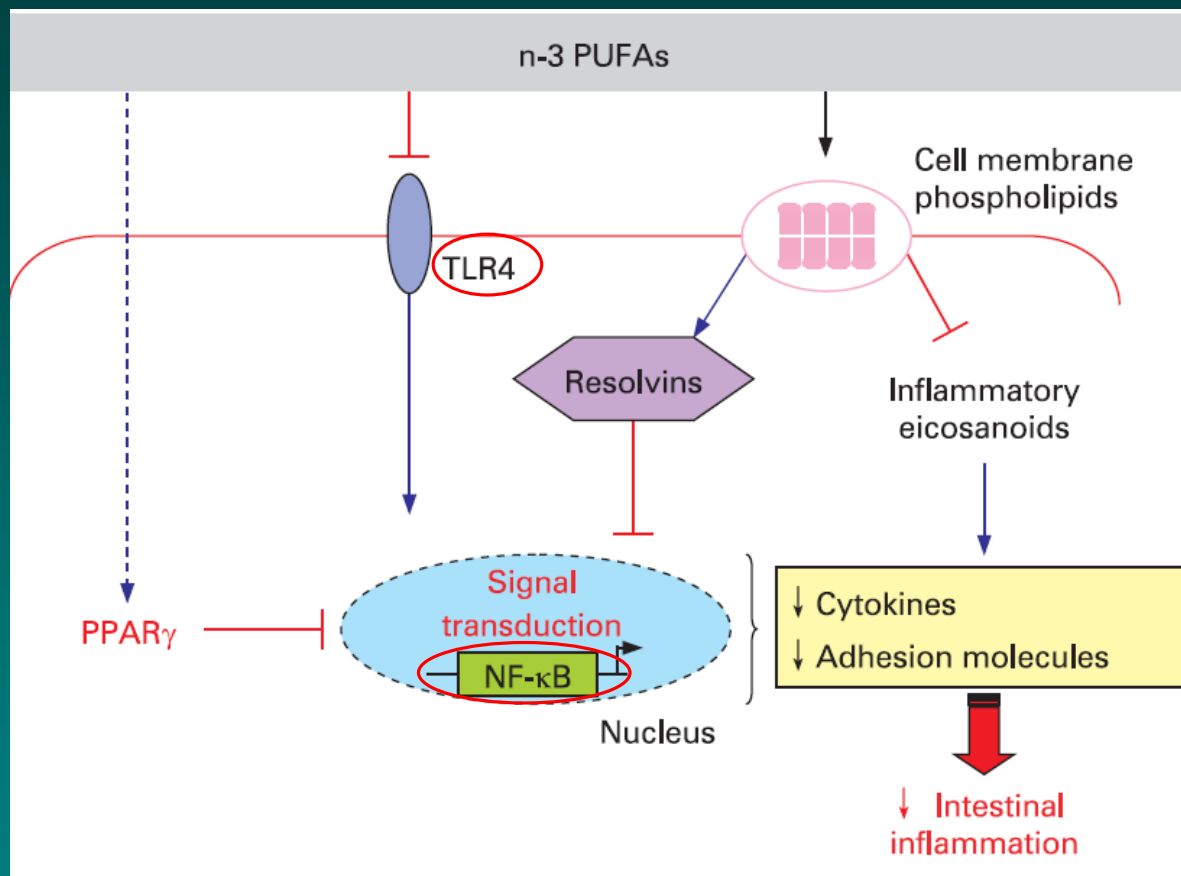


Fig. 3. RT-PCR validation of selected genes listed in Table 1. Differential expression of potential molecular targets modulated by DHA in CaCo-2 cells is shown on 2% agarose gel.

Mechanismy působení n-3 PUFAs v zánětu střeva



N-3 PUFAs aktivují PPAR_γ, který inhibuje signální dráhu NFκB a mohou inhibovat toll-like receptor 4 (TLR4). Mohou také modulovat složení membránových fosfolipidů vedoucí ke snížení produkce prozánětlivých eikosanoidů odvozených od AA a zvýšení produkce protizánětlivých resolinů. Tyto regulační dráhy snižují produkci prozánětlivých cytokinů a expresi adhezivních molekul. To vede ke snížení zánětu střeva.

VÝSTUPY

➤ Základní výzkum

➤ Klinika a výrobní praxe

- protinádorová prevence a terapie
- oblast nutriční farmakologie

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

Procesy ovlivňované lipidy

- Složení lipidových výživ ovlivňuje spektrum lipidů v plasmě i v buněčných membránách, přičemž metabolismus a obrat fosfolipidů v membránách transformovaných-nádorových buněk se zásadně liší od buněk netransformovaných-nenádorových.
- Změny ve složení fosfolipidů membrán mění její vlastnosti (fluiditu, produkci volných reaktivních radikálů a biologicky aktivních metabolitů - eikosanoidů), což se dále odráží ve schopnosti příjmu a přenosu signálů důležitých regulačních molekul s následnými účinky na důležité biologické procesy jako jsou buněčný růst, diferenciaci a apoptóza a dále funkce buněk imunitního systému
- VNMK a jejich metabolity mohou být důležitými regulátory genové exprese. Předpokládá se, že tyto látky jsou schopny ovlivňovat aktivitu transkripčních faktorů, které se pak váží na klíčové elementy spojené se specifickými geny.
- Změny membrán a růstových vlastností nádorových buněk po působení VNMK mohou modulovat jejich citlivost k různým terapeutickým zásahům (cytostatika, záření)
- Inhibitory metabolismu AA, tj. produkce eikosanoidů, k nimž patří i řada běžně v klinice využívaných NSAID, mohou významným způsobem modulovat zmíněné procesy.



Praktické aspekty poznatků o působení mastných kyselin



Nejedná se o farmaka, součást stravy, poměrně vysoké dávky (0,5-2g)

VYUŽITÍ :

DIETETICKÁ DOPORUČENÍ

Zdraví a prevence chorob

Středomořská dieta

Funkční potraviny

Potraviny pro zvláštní lékařské účely



TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ – nutriční farmakologie

Imunomodulace, antikachektické účinky, kombinovaná terapie, adjuvantní terapie, „disease specific nutrition“, nosiče léků



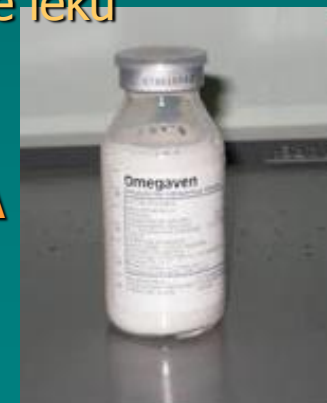
Physiol. Res. 54: 409-418, 2005

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

J. HOFMANOVÁ¹, Z. ZADÁK², R. HYŠPLER², J. MIKESKA³, P. ŽĎÁNSKÝ²,
A. VACULOVÁ¹, J. NETÍKOVÁ¹, A. KOZUBÍK¹

PARENTERÁLNÍ A ENTERÁLNÍ VÝŽIVA

optimalizace složení
lipidových emulzí



KLINIKA

Složení a využití lipidových emulzí

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

Tukové částice podobné chilomikronům

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

Funkce - zdroj energie a esenciálních MK

Enterální a orální výživa

Na základě nových poznatků o regulační úloze lipidů využití jako **farmaka**

Nutriční farmakologie

Výživa cílená na určité onemocnění – „Disease-specific nutrition“

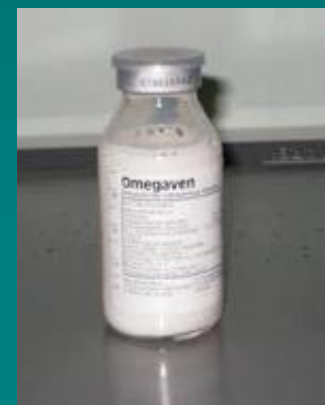
Složení klinicky využívaných lipidových emulzí v parenterální výživě

Components	Intralipid	Elolipid	Lipofundin MCT/LCT	Nutralipid MCT	Nutralipid P
<i>Soybean oil</i>	200	200	100	100	200
<i>Egg phospholipids</i>	12	12	12	12	12
<i>Glycerol</i>	22	25	25	22.5	22.5
<i>Coconut oil (MCT)</i>	–	–	100	100	–
<i>α-tocopherol</i>	–	–	0.2	–	–
<i>Sodium oleate</i>	–	–	0.3	–	–
<i>Oleic acid</i>	–	0.30 - 0.45	–	–	–
<i>Sodium hydroxide</i>	to pH 8	0.04 - 0.08	–	–	–
<i>Water for injection to</i>	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000

Omegaven – obsahuje rybí olej (omega-3 MK)

SMOFlipid – sójový, kokosový, olivový a rybí olej

Umělé strukturální triglyceridy



VÝZNAM SLOŽENÍ TUKŮ V ENTERÁLNÍ A PARENTERÁLNÍ VÝŽIVĚ PACIENTŮ

LCT - “long chain” triglyceridy

z rostlinných olejů s vysokým obsahem VNMK (důležitý poměr n-3 : n-6) - regulační funkce, mohou zvyšovat nebo snižovat např. produkci $TNF\alpha$ (kachektin) - prozánětlivý cytokin spojený s kachexií

MCT - “medium chain” triglyceridy - nasycené MK (6-12 uhlíků) - zdroj energie, působí proti supresi imunitních a fagocytárních funkcí u silně stresovaných pacientů.

Možnosti ovlivnění celkového metabolismu, podpora imunity, protizánětlivé účinky

Využití: pooperační stavy, nádorová anorexie a kachexie
Imunonutrice: Omega-3, L-glutamin, L-arginin, RNA



CYTOKINY

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

Lipidové mediátory ovlivňují produkci a funkci cytokinů.

To má důležitý dopad na řadu imunitních a buněčných funkcí včetně proliferace, diferenciaci a apoptózy

Důležité endogenní faktory ovlivňující kolorektální karcinogenezi

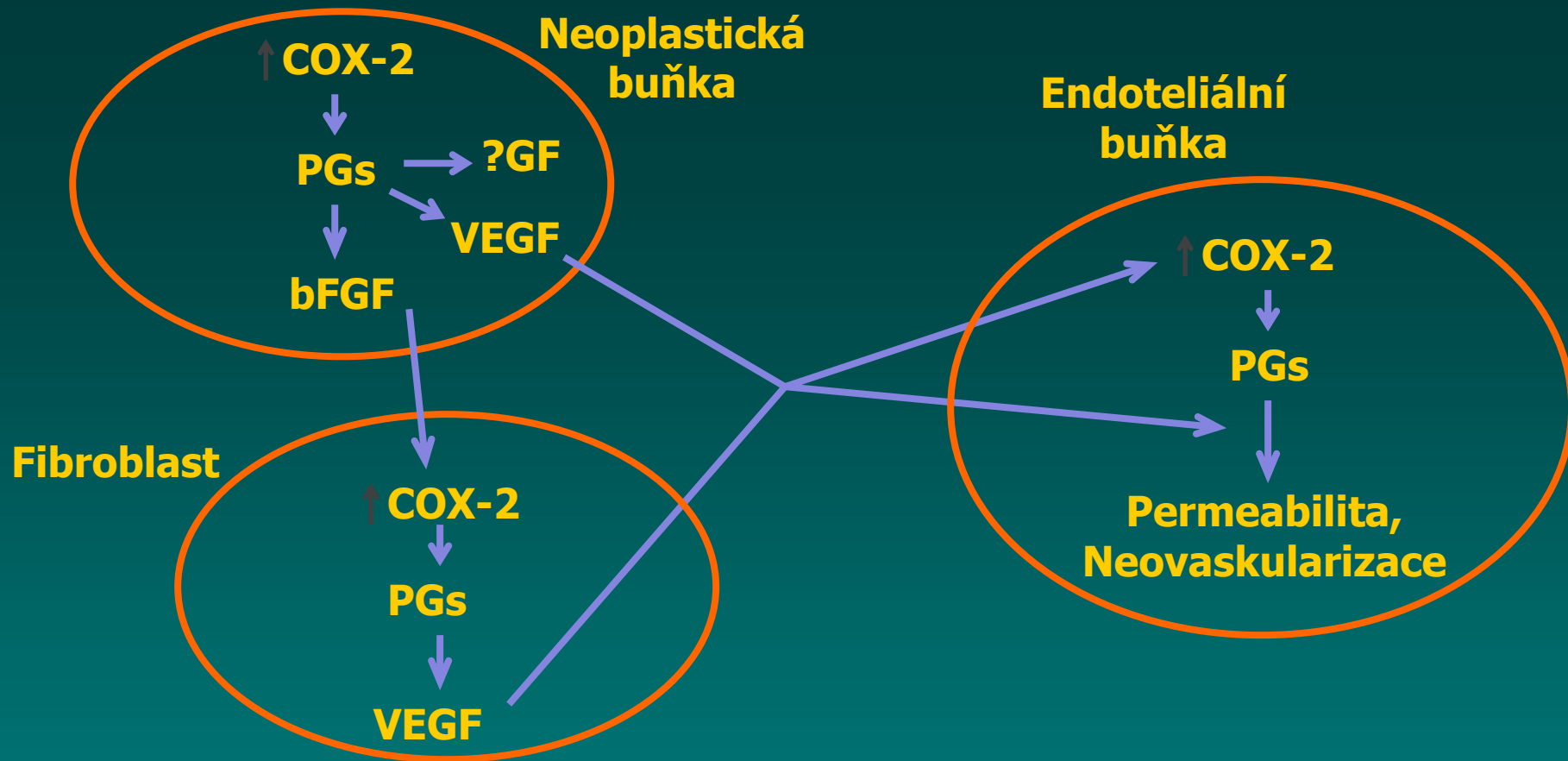
TNF-family (TNF- α , Fas ligand, TRAIL – TNF relating apoptosis inducing factor)

TGF-family (TGF- β)

EGF – epidermální růstový faktor

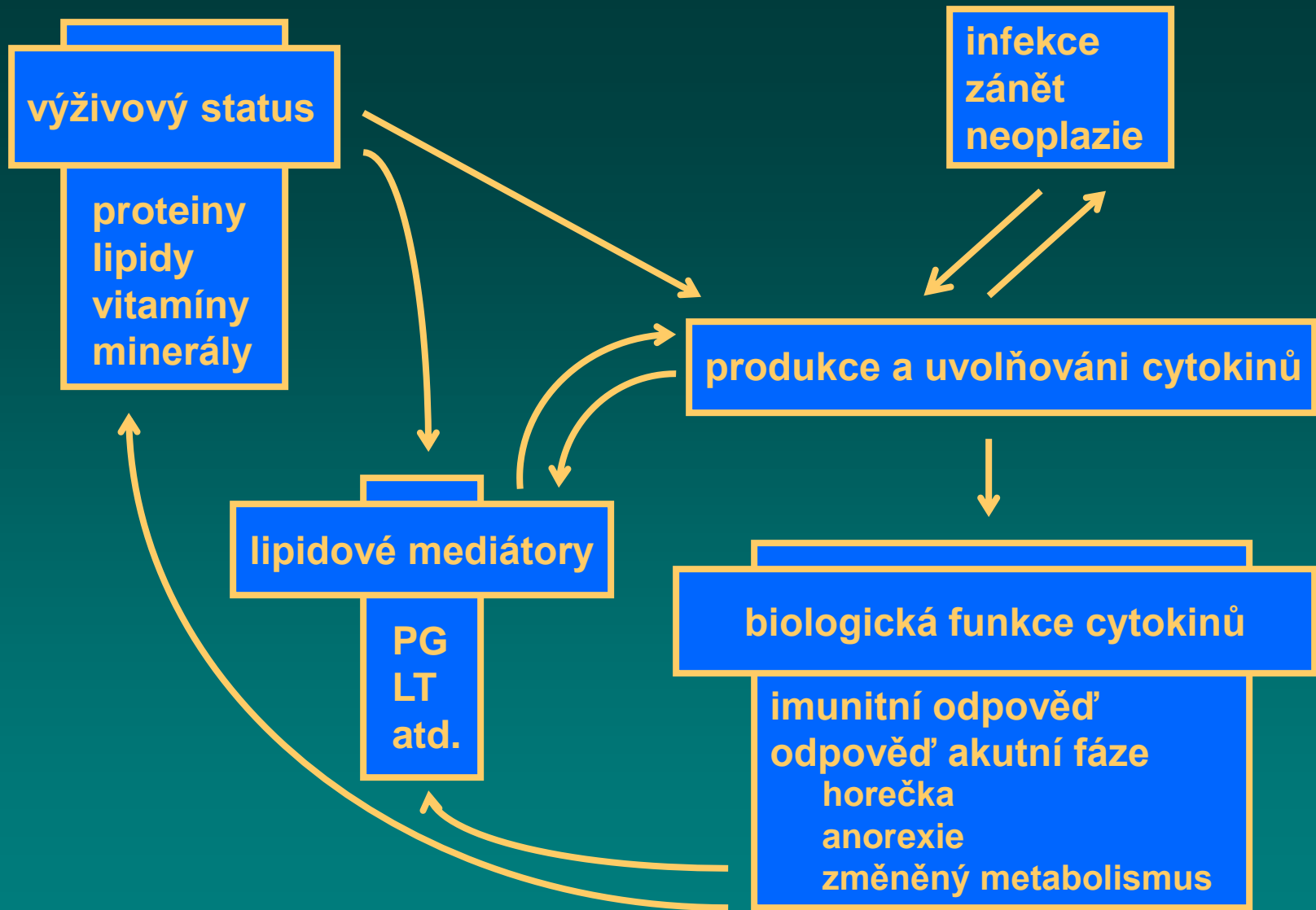
Tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukiny

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



Model angiogeneze - interakce buněčných typů

V nádorových buňkách prostaglandiny (PGs) tvořené přes cyklooxygenázu-2 (COX-2) zvyšují produkci růstových faktorů jako je VEGF, které působí přímo na endoteliální buňky a bFGF, který stimuluje produkci COX-2 u fibroblastů. PGs tvořené ve fibroblastech stimulují produkci VEGF, který působí parakrinním způsobem na endoteliální b. a opět zvyšuje aktivitu COX-2 a usnadňuje permeabilitu cév a angiogenezi. Inhibitory COX-2 blokuji produkci PGs a tak zabraňují angiogenezi indukované růstovými faktory.



Vzájemné vztahy mezi výživou a infekčními a zánětlivými chorobami zprostředkovanými cytokiny

The Traditional Healthy Asian Diet Pyramid

