

Význam změn buněčných lipidů v diferenciační a apoptické odpovědi buněčných linií odvozených z normální a nádorové tkáně kolonu.

Hofmanová J., Koubková Z., Vaculová A., Hýžd'alová M., Netíková J., Kozubík A.

Oddělení cytokinetiky, Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Brno

Rovnováha mezi přírůstkem a úbytkem buněk je základní podmínkou zdravého epitelu tlustého střeva (kolonu). Kromě proliferace je počet buněk řízen apoptózou, jejíž deregulace spolu s poruchami diferenciace podstatně přispívá k **rozvoji nádorového onemocnění** [1]. Tyto procesy jsou regulovány jak genetickým programem tak endogenními faktory a mohou být významně modulovány rovněž exogenními látkami přicházejícími do těla s potravou. K těmto faktorům patří i **tuky a vláknina**, jež jsou zdrojem **vysoce nenasycených mastných kyselin (VNMK)** a **MK s krátkým řetězcem jako je butyrát**. Dnes je již zřejmé, že kromě nutriční hodnoty jsou lipidy důležité pro správné fungování řady fyziologických funkcí v organismu a hrají klíčovou úlohu v membránové biologii [2]. VNMK typu ω -6 a ω -3 i jejich metabolity (např. eikosanoidy) působí spolu s cytokiny a hormony jako mediátory a modulátory mezi- i vnitrobuněčné signální sítě a proto je zřejmá její významná úloha i při vzniku patologických stavů jako jsou zánět a nádorová onemocnění [3].

Z výsledků experimentálních studií *in vitro* a *in vivo* i z některých klinických a epidemiologických údajů vyplývá, že ω -3 VNMK mohou ovlivnit buněčné funkce účinněji a mnohdy opačným způsobem než ω -6 VNMK. Řada experimentálních výsled-

ků podporuje předpoklad protizánětlivého a protinádorového působení ω -3 VNMK, zejména kyseliny dokosaheptaenové (DHA, 22:6) a eikosapentaenové (EPA, 20:5) obsažených v rybím tuku [4].

Protektivní úloha vlákniny je kromě jiného spojována s působením butyrátu, který vzniká ve střevě její mikrobiální anaerobní fermentací. Obecně se předpokládá, že butyrát slouží jako zdroj energie pro normální kolonocyty, podporuje jejich proliferaci a při jeho nedostatku dochází k apoptóze. Na druhé straně však bylo prokázáno, že butyrát zastavuje proliferaci a indukuje diferenciaci a apoptózu neoplastických buněk *in vitro* a *in vivo* [5].

Základní hypotézou našeho výzkumu je **předpoklad společného působení VNMK a butyrátu v lumen střeva a jejich interakce**, která může významným způsobem modulovat chování epiteliálních buněk. Naše předchozí výsledky a výsledky jiných pracovišť již prokázaly, že butyrát a VNMK (nebo rybí olej a pektin) mohou interagovat navzájem i modulovat působení endogenních regulátorů apoptózy [6, 7, 8, 9]. Méně informací je k dispozici o změnách buněčné diferenciaci v průběhu neoplastické transformace. Navíc bylo ukázáno, že vlastnosti buněčných membrán i obsah a složení fosfolipidů a MK v nádorových a normálních buňkách jsou odlišné [10]. To spolu s poznatky deregulace různých signálních drah udržujících rovnováhu mezi proliferací, diferenciací a apoptózou v průběhu buněčné transformace vytváří předpoklad rozdílného působení lipidických faktorů na normální a nádorovou tkáň střeva.

Materiál a metody

Náš výzkum je proto zaměřen na působení butyrátu sodného (NaBt, 3mM) a VNMK (50 M) typu ω -6 (kyselina arachidonová, AA, 20:4) nebo ω -3 (DHA) **na modelové buněčné linii *in vitro* odvozené z normálního fetálního kolonu (FHC) a adenokarcinomů různého stupně malignity (HT-29, HCT-116)** Tyto linie byly srovnávány s ohledem na proliferaci, diferenciaci a apoptickou odpověď na působení NaBt a VNMK samotných nebo v kombinaci.

V průběhu kultivace (24–72 h) byly s využitím **průtokové cytometrie (FCM)** a dalších metod (fluorimetrie, fluorescenční mikroskopie, spektrometrie, gelová elektroforéza) sledovány počty buněk přisedlých a plovoucích (%), buněčný cyklus, apoptóza (štěpení poly(ADP-ribose) polymerázy – PARP, kondenzace a fragmentace chromatinu po barvení DAPI), diferenciaci (aktivita alkalické fosfatázy – ALP a exprese karcinoembryonálního antigenu – CEA). S cytometrickými parametry byly korelovány změny struktury membránových lipidů (tzv. „lipid packing“, merocyanin – MC540), akumulace triglyceridů v cytoplasmě (Nile red), mitochondriální transmembránový potenciál (TMRE), produkce reaktivních kyslíkových metabolitů (ROS, dihydrorodamin-123), aktivita kaspáz a exprese antiapoptického proteinu Mcl-1.

Výsledky a diskuse

NaBt snižoval počty buněk a viabilitu fetální linie FHC i nádorových linií HT-29 a HCT-116. Avšak zatímco buňky FHC a HT-29 byly blokovány v G0/G1 fázi buněčného cyklu a indukovány do diferenciaci s nízkým procentem apoptózy (asi 10%), u buněk HCT-116 blokováných v G2/M fázi indukoval NaBt pouze vysokou hladinu apoptózy (30%). Citlivost k relativně nízké dávce AA a DHA se projevila pouze u buněk FHC snížením počtu buněk a **indukcí apoptózy** (6–18%). Navíc došlo u těchto buněk k masivnímu nárůstu apoptózy po kombinovaném působení NaBt s AA (34%) a zejména s DHA (62%). Pozorovaná apoptóza dále potvrzená detekcí štěpení PARP byla spojená s nárůstem % plovoucích buněk a napodobuje tak tzv. anoikis, ke které dochází na vrcholu kolonových krypt.

Diferenciaci detekovaná nárůstem aktivity ALP a exprese CEA byla mnohem výraznější u buněk FHC (asi 3x) ve srovnání s buňkami HT-29 a byla významně snížena po kombinaci NaBt s VNMK.

NaBt aktivoval kaspázu-3 a -9 u všech studovaných linií. Tato aktivita však byla snížena po kombinaci s VNMK. Výsledky svědčí o významu aktivace kaspáz nejen pro apoptózu, ale rovněž pro diferenciaci kolonových buněk.

Vazba fluorescenčního barviva MC540 na membránové lipidy odráží velmi jemné změny v jejich struktuře, které mohou souviset s indukcí diferenciaci, apoptózy nebo aktivací buněk. U všech tří linií docházelo působením NaBt k nárůstu fluorescence MC540 (lipid unpacking), která byla dále zvýšena u buněk FHC po kombinaci NaBt s VNMK, což naznačuje souvislost tohoto procesu s indukcí apoptózy.

Akumulace triglyceridů (TG) ve formě lipidových kapének v cytoplasmě (odpovídající fluorescenci Nile red) je odrazem příjmu VNMK do buněk. Tyto metabolicky aktivní orgány slouží jako zásobárna lipidů a jejich tvorba je rovněž spojována s indukcí diferenciaci a apoptózy. K nejvyšší akumulaci TG docházelo u buněk FHC jak po působení NaBt tak VNMK a zvláště pak po jejich kombinovaném působení spojeném se silnou indukcí apoptózy. U nádorových linií byla akumulace TG nižší.

Úloha produkce ROS a její spojitost s poklesem MMP není zcela jasná. K indukci produkce ROS došlo jak po působení NaBt tak po působení AA a DHA v průběhu diferenciaci i apoptózy. Zdá se však, že posun rovnováhy k silně prooxidativnímu prostředí může být zodpovědný za přechod diferenciaci v apoptózu po kombinaci NaBt a VNMK u buněk FHC. Snížení apoptózy a zvýšení diferenciaci u těchto buněk při spolupůsobení antioxidantu Troloxu podporuje tyto závěry. Již dříve jsme prokázali, že zvýšený oxidativní metabolismus indukovaný NaBt nebo VNMK přispívá ke zcitlivění buněk HT-29 na působení endogenních induktorů apoptózy z rodiny TNF [7, 11].

Dynamika exprese proteinu Mcl-1 v průběhu kultivace buněk ukazuje na jeho dvojitou úlohu jak v diferenciaci tak v apoptóze buněk kolonu. Jeho zvýšená exprese po působení NaBt u diferencujících buněk FHC je v souladu s publikovanými účinky diferenciacních činidel u jiných typů buněk [12]. Zvýšená exprese Mcl-1 chrání diferencující se buňky před apoptózou, kdy dochá-

zí ke snížení této exprese. Významně snížená exprese Mcl-1 byla v našich pokusech detekována u buněk FHC po kombinaci NaBt a VNМК, kdy byla indukována silná apoptóza. Tyto změny nebyly pozorovány u nediferencujících buněk HCT-116.

Závěry

Naše výsledky prokázaly **možnost interakce mezi dietetickými lipidovými složkami butyrátem a VNМК ovlivňující diferenciální a apoptickou odpověď epiteliálních buněk kolonu**. Ve srovnání s nádorovými liniemi reagovaly fetální buňky výrazně citlivěji na kombinaci NaBt s VNМК (zejména s DHA) zvýšením apoptózy provázeném snížením diferenciace. Změny cytokinetických parametrů byly doprovázeny rozvolňováním struktury membránových lipidů (lipid unpacking), snížením MMP a zvýšenou produkcí ROS. Změny v aktivitě kaspázy-3 a -9 a dynamická modulace exprese proteinu Mcl-1 naznačují úlohu těchto molekul jak v diferenciaci tak v apoptóze. V souhrnu tyto výsledky podporují myšlenku, že **účinky fermentovatelné vlákniny ve střevě závisejí na přítomnosti určitého typu a množství VNМК**, a že působení těchto složek potravy může mít rozdílný dopad na normální a neoplastickou tkáň střeva. Tyto poznatky by měly přispět k **poznání úlohy dietetických faktorů v karcinogenezi kolonu a k optimalizaci jejich využití v protinádorové terapii**.

Literatura

1. Koornstra J. J. et al. (2003), Crit Rev in Oncol Hematol 45:37-53
2. Lunn J. and Theobald H. E. (2006), British Nutrition Foundation, Nutr Bulletin 31:178-224
3. Jho D. H. et al. (2004), Integr Cancer Ther 3:98-111
4. Moyad M. A. (2005), Urol Oncol 23:36-48
5. Sengupta S. et al. (2006), J Gastroenterol Hepatol 21:209-218
6. Chapkin R. S. et al. (2007) Curr Opin Gastroenterol 23:48-54
7. Hofmanová J., et al. (2005), Eur J Nutr 44:40-51
8. Hofmanová J., et al. (2005), Cancer Lett 218:33-41
9. Vaculová A., et al. (2005), Cancer Lett 229:43-48
10. Das U. N. (2002), Med Sci Monit 8:RA79-92
11. Kovaříková M., et al., (2000), Eur J Cancer 36:1844-1852
12. Sano M et al. (2001), Exp Cell Res 266:114-125

Práce byla podpořena granty GAČR č. 524/07/1178, 301/07/1557 a IGA AVČR č. 1QS500040507