

Program IV ŚSN 24-25.03.2017

Śląskie Spotkania Naukowe

Ustroń, 24-25 marca 2017 r.



CENTRUM ONKOLOGII – INSTYTUT
IM. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE
ODDZIAŁ W GLIWICACH

HOTEL DIAMENT USTRONŃ****

ul. Zdrojowa 3,
43-450 Ustroń
tel. +48 33 854 33 91

opracowanie: Magdalena Skonieczna

~~Piątek~~ Sobota, 25.03.2017
24.03.2017

Warsztaty Projektu BioTest

czas
(minuty)

Charakterystyka projektu i platformy BioTest 17:00-18:00

Nazwisko i imię	Jednostka	Tytuł prezentacji	
Fujarewicz Krzysztof	Politechnika Śląska	Wprowadzenie	17:00-17:15
Widłak Piotr	Instytut Onkologii	Platforma BioTest – z perspektywy użytkownika	
Aleksander Płaczek	WASKO S.A.	Ogólnie o systemie	17:15-18:00
Łukasz Shneider	WASKO S.A.	Aplikacja www	
Krzysztof Psiuk-Maksymowicz	Politechnika Śląska	Galaxy Serwer	
Piotr Malara	WASKO S.A.	Baza grafowa i hurtownia danych	

Demonstracja działania Platformy BioTest 18:00-20:00

Łukasz Shneider		Tworzenie projektu na platformie www	18:00-18:30
Roman Jaksik	Politechnika Śląska	Przetwarzanie danych proteomicznych na serwerze Galaxy	18:30-19:00
Tomasz Budzyński	WASKO S.A.	Analiza danych na grafach	19:00-19:20
Michał Jakubczak Sebastian Student	Politechnika Śląska	Przetwarzanie danych genomycznych na serwerze Galaxy	19:20-20:00

Kolacja **20:00 ...**

Rzeszowska Joanna	Politechnika Śląska	Otwarcie Konferencji	8:30-8:40	10
Prezentacja firmy Veracomp			8:40-9:00	20
SESJA A - Modelowanie i analiza obrazów			9:00-11:45	
Fujarewicz Krzysztof	Politechnika Śląska	O prawidłowym modelowaniu zmiennego w czasie opóźnienia	9:00-9:12	12
Bajger Piotr	Uniwersytet Warszawski	Optymalne sterowanie w modelu wzrostu heterogenicznego nowotworu (Optimal Control in a Model of Heterogeneous Tumour Growth)	9:12-9:24	12
Kurasz Karolina	Politechnika Śląska	Model metylacji cytozyny i demetylacji pochodnych form 5-metylocytozyny	9:24-9:28	4
Łakomicz Krzysztof	Politechnika Śląska	Sprzężona analiza wrażliwości układów przestrzennych	9:28-9:32	4
Krawczyk Anna	Politechnika Śląska	Analiza porównawcza algorytmów do anotacji interakcji microRNA – gen	9:32-9:50	12
Kurczyk Agata	Politechnika Śląska	Metody uczenia maszynowego jako narzędzia wspomagające badania nad nowym lekiem	9:50-10:02	12
Łabaj Wojciech	Politechnika Śląska	Obszerna analiza danych wysoce zrównoległych dla identyfikacji biomarkerów białaczki	10:02-10:14	12
Ochab Magdalena	Politechnika Śląska	Wpływ stochastycznej lokalizacji progów w modelu na los komórki w modelu z przełączeniami białka p53	10:14-10:26	12
Psiuk-Maksymowicz Krzysztof	Politechnika Śląska	Przetwarzanie danych obrazowych MRI	10:26-10:38	12
Borys Damian	Politechnika Śląska	Korekcja danych obrazowych MRI	10:38-10:50	12
Bednarczyk Katarzyna	Politechnika Śląska	Analiza korekcji linii bazowej w widmach z obrazowania molekularnego MSI	10:50-11:02	12
Marczyk Michał	Politechnika Śląska	Filtracja obrazów z dwuwymiarowej elektroforezy żelowej w celu efektywnego modelowania plamek	11:02-11:06	4
Bandola Dominika	Politechnika Śląska	Muscle work evaluation in Vojta method reflex crawl stimulation using skin temperature measurements	11:06-11:10	4
Gracka Maria	Politechnika Śląska	Wielofazowy model pulsacyjnego przepływu krwi w tętnicy	11:14-11:18	4
Melka Bartłomiej	Politechnika Śląska	Modelowanie przepływu krwi w wybranym odcinku aorty zstępującej z założeniem odkształcalności naczyń krwionośnych	11:18-11:22	4

Przerwa kawowa			11:30-12:00	
Prezentacja firmy Veracomp			12:00-12:20	20
SESJA B - Biomarkery			12:20-14:05	
Grzybowska Ewa	Instytut Onkologii	Farmakogenetyka procesów absorpcji, dystrybucji, metabolizmu i usuwania (ADME) związków chemicznych z organizmu	12:20-12:32	12
Pamuła-Pilat Jolanta	Instytut Onkologii	Znaczenie wariantów polimorficznych genów transportu i metabolizmu leków stosowanych w leczeniu raka piersi schematem FAC	12:32-12:44	12
Tęcza Karolina	Instytut Onkologii	Modele predykcyjne skutków ubocznych chemioterapii FAC w raku piersi	12:44-12:56	12
Lisowska Katarzyna	Instytut Onkologii	Nowe możliwości terapii raka płuca, żołądka i pęcherza za pomocą selektywnego inhibitora czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR) opracowanego przez polską firmę CelonPharma	12:56-13:08	12
Jelonek Karol	Instytut Onkologii	Sygnatury molekularne oparte o lipidy i metabolity surowicy krwi różnicują pacjentów z nowotworami płuc we wczesnym stadium od osób zdrowych	13:08-13:20	12
Cecotka Agnieszka	Politechnika Śląska	Zmiany poziomu metylacji DNA w różnych regionach genomu w ostrej białaczce szpikowej	13:20-13:32	12
Mika Justyna	Politechnika Śląska	Poszukiwanie biomarkerów ekspozycji na promieniowanie powiązanych z białkiem Tis11/TTP	13:32-13:44	12
Cieślicka Marta	Instytut Onkologii	Profil ekspresji genów w raku brodawkowatym tarczycy w zależności od występowania mutacji w genach BRAF oraz TERT	13:44-13:48	4
Sikora Bartosz	Śląski Uniwersytet Medyczny	Różnicowanie ADSC w kierunku nabłonka rogówki	13:48-13:52	4
Simka Kaludia	Śląski Uniwersytet Medyczny	Wpływ cukrzycy typu 2 na ekspresję genu CD90 w mezenchymalnych komórkach macierzystych z tkanki tłuszczowej różnicowanych w kierunku osteoblastów	13:52-13:56	4
Skubis Aleksandra	Śląski Uniwersytet Medyczny	Analiza genu kodującego osteopontynę w mezenchymalnych komórkach macierzystych pochodzących od pacjentów z cukrzycą typu 2 poddanych osteogenezie	13:56-14:00	4
Pacholczyk Marcin	Politechnika Śląska	Poszukiwanie molekularnej sygnatury nowotworowej z wykorzystaniem danych z wielu platform analitycznych	14:00-14:04	4

Przerwa obiadowa

14.05-15:00

SESJA C - Biologia Molekularna

15:00-17:08

Widłak Wiesława	Instytut Onkologii	Efekty selekcji klonalnej podczas modyfikacji genomów za pomocą CRISPR/CAS9	15:00-15:12	12
Vydra Natalia	Instytut Onkologii	Wpływ czynnika transkrypcyjnego HSF1 na fenotyp komórek piersi	15:12-15:24	12
Sojka Damian	Instytut Onkologii	Wpływ zahamowania ekspresji białek szoku cieplnego HSPA na chemioporność komórek niedrobnokomórkowego raka płuca	15:24-15:36	12
Pietrowska Monika	Instytut Onkologii	Profil molekularny egzosomów uwalnianych przez komórki nowotworowe	15:36-15:48	12
Gawin Marta	Instytut Onkologii	Badania heterogeniczności guzów złośliwych z wykorzystaniem techniki obrazowania MALDI MS	15:48-16:00	12
Rusin Marek	Instytut Onkologii	Stymulacja genów odporności nieswoistej (innate immunity) w trakcie synergistycznej aktywacji p53	16:00-16:12	12
Rolnik Bożena	Politechnika Śląska	Analiza trendów zmian strukturalnych w genomie w odpowiedzi na wybrane dawki promieniowania jonizującego	16:12-16:24	12
Chadalski Marek	Instytut Onkologii	Proapoptotyczne właściwości mysiego białka LOC66598 i jego wariantów delecyjnych	16:24-16:28	4
Jazowiecka-Rakus Joanna	Instytut Onkologii	Wirus myksomatozy w terapii onkolitycznej	16:28-16:32	4
Gendosz Daria	Śląski Uniwersytet Medyczny	Ocena wpływu wylewu podpajęczynówkowego u szczonego na jednostkę nerwowo-naczyniową bariery krew-mózg na poziomie ultrastrukturalnym	16:32-16:44	12
Hejmo Tomasz	Śląski Uniwersytet Medyczny	Rezweratrol w kombinacji z berberyną indukuje nekrozę ludzkich komórek raka języka linii SSC-25 in vitro zależną od ilości reaktywnych form tlenu	16:44-16:48	4
Hudy Dorota	Politechnika Śląska	Badanie kompleksu RISC w procesach regulacji ekspresji genów i syntezy białek	16:48-16:52	4
Poteręła-Hejmo Aleksandra	Politechnika Śląska	Analiza systemów antyoksydacyjnych w komórkach napromienionych	16:52-16:56	4
Bil Patryk	Politechnika Śląska	Zmiany poziomu reaktywnych form tlenu w dzielących się komórkach, na podstawie danych z mikroskopii fluorescencyjnej przyżyciowej	16:56-17:00	4
Kała Sylwia	Politechnika Śląska	Zmiany reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych zachodzące pod wpływem działania niskich dawek promieniowania UV	17:00-17:04	4
Krzywoń Aleksandra	Politechnika Śląska	Efekt sąsiedztwa indukowany promieniowaniem jonizującym	17:04-17:16	12

Przerwa kawowa			17:15-17:30	
SESJA D - Biotechnologia			17:30-19:25	
Klymenko Olesya	Śląski Uniwersytet Medyczny	Analiza morfologiczna osierdzia stabilizowanego chemicznie z wykorzystaniem Mikroskopu Sił Atomowych	17:30-17:42	12
Nowak Agnieszka	Śląski Uniwersytet Medyczny	Reakcja Maillarda w dżemach owocowych – potencjalne korzyści i zagrożenia dla organizmu	17:42-17:46	4
Lipowska Daria	Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN	Stabilizacja termoczułych nanonośników leków	17:46-17:58	12
Otulakowski Łukasz	Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN	Nanonośnik met-enkefalinowy zaopatrzone w peptyd znacznikowy RGD	17:58-18:10	12
Kosowski Dominik	Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN	Biokoniugaty termoczułych polimerów z peptydami	18:10-18:14	4
Sochanik Aleksander	Instytut Onkologii	Nośnik polimerowy WP760	18:14-18:18	4
Malarz Katarzyna	Uniwersytet Śląski	Chelatory metali w terapiach przeciwnowotworowych	18:18-18:30	12
Mrozek- Wilczkiewicz Anna	Uniwersytet Śląski	Synergia działania chelatorów żelaza i egzogennych fotouczulaczy	18:30-18:42	12
Nackiewicz Joanna	Uniwersytet Opolski	Oktakarboksyftalocyanina galu jako potencjalny fotosensibilizator w terapii PDT	18:42-18:46	4
Golec Marlena	Uniwersytet Śląski	Cytotoksyczne kompleksy złota(III) zawierające pochodne 2,2':6',2''-terpirydyny	18:46-18:50	4
Krzykała Klaudia	Uniwersytet Śląski	Wpływ chelatorów żelaza na syntezę protoporfiryny IX	18:50-18:54	4
Michalak Sandra	Uniwersytet Śląski	Związki koordynacyjne platyny(II) z 4'-podstawionymi pochodnymi 2,2':6',2''-terpirydyny w aspekcie badań fizykochemicznych i biologicznych	18:54-18:58	4
Rejmund Marta	Uniwersytet Śląski	Tiosemikarbazony - synteza nowych związków o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej	18:58-19:02	4
Skowronek Bartłomiej	Śląski Uniwersytet Medyczny	Skuteczność acelularyzacji tkanek świńskich w eliminacji zagrożenia transmisji wirusów	19:02-19:06	4
Dyskusja i zamknięcie konferencji			19:10-19:30	
Kolacja			19:30-21:00	

Optymalne sterowanie w modelu wzrostu heterogenicznego nowotworu

Piotr Bajger

Uniwersytet Warszawski

Przedmiotem analizy będzie model wzrostu nowotworu heterogenicznego ze względu na odporność komórek na chemioterapię bazujący na znanym z literatury modelu Hahnfeldta i in. z 1999 roku. Dwa typy komórek nowotworowych (wrażliwe oraz odporne) będą rozważane jako konkurujące gatunki. Pokróćce przedstawione zostaną wnioski płynące z analizy dynamiki modelu w zależności od współczynników konkurencji. Problem znalezienia optymalnej terapii rozpatrywany będzie z punktu widzenia teorii sterowania optymalnego. Głównym problemem będzie wybór odpowiedniego funkcjonału celu tak, aby jednocześnie ograniczyć objętość nowotworu oraz uniknąć przełączenia nowotworu do fenotypu odpornego na chemioterapię. Ze względu na nieliniowość modelu optymalne sterowanie będzie poszukiwane przy pomocy metod numerycznych.

MUSCLE WORK EVALUATION IN VOJTA METHOD REFLEX CRAWL STIMULATION USING SKIN TEMPERATURE MEASUREMENTS

Dominika Bandała

Biomedical Engineering Laboratory, Institute of Thermal Technology, Faculty of Energy and Environmental Engineering, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland

The aim of this preliminary study is to identify possibilities of muscle work evaluation during Vojta method rehabilitation procedure. This stimulation method, introduced in 1950s by Václav Vojta [1], involves induction of two global movement patterns: reflex rotation and crawl movement, being result of stimulation of reflex points. Vojta method can be used in neurorehabilitation of children and adults.

Preliminary studies were performed in Department of Neurological Rehabilitation of John Paul II Upper Silesian Child Health Centre in Katowice. Experimental data were collected from the group of four volunteers/subjects: two healthy women, one healthy man and one hemiparetic man with the brain damage.

The idea behind the study relay on the fact that the muscles work can be revealed by a rise of tissue temperatures. The method allows to monitor, continuously and non-invasively, the muscles reaction and activity.

Two methods of recording the temperature distribution over the body's surface were tested: IR camera (FLIR SC620, FLIR® Systems, Inc., USA) and contact wireless temperature data loggers attached to the skin surface using adhesive tape (iButton DS1922L, Maxim Integrated, USA). Due to the artefacts in IR images and according to recommendations [2], the latter method was selected as favorable one.

Measurements were done for various skin locations in vicinity of central part of muscles, namely: right and left latissimus dorsi muscles, right tensor fasciae latae, left biceps femoris, biceps and triceps brachii, quadriceps femoris.

Collected temperature data were compared to the mean skin temperature (ISO9886), showing increase of muscle related temperature during stimulation process. Further investigation is anticipated.

Literature:

- [1] Vojta V., Peters A. Metoda Vojty. Gry mięśniowe w odruchowej lokomocji i w ontogenezie ruchu, Wyd. 1, Kraków 2006.
- [2] Bach A.J.E., Stewart I.B., Disher A.E., Costello J.T., A Comparison between Conductive and Infrared Devices for Measuring Mean Skin Temperature at Rest, during Exercise in the Heat, and Recovery. PLoS ONE 10(2): e0117907 (doi:10.1371/journal.pone.0117907), 2015.

Acknowledgements: The research was supported by Faculty of Energy and Environmental Engineering within Ministry of Science and Higher Education (Poland) statutory research funding scheme. This help is gratefully acknowledged herewith.

Analiza korekcji linii bazowej w widmach z obrazowania molekularnego MSI

Katarzyna Bednarczyk, Joanna Polańska

Zakład Analizy Eksploracyjnej Danych, Instytut Automatyki, Politechnika Śląska, Gliwice, Polska

Wstęp. Spektrometria mas stanowi obecnie podstawowe narzędzie analityczne w projektach dotyczących diagnostyki nowotworowej. Przetwarzanie wstępne danych z widm masowych jest niezbędnym krokiem poprzedzającym analizę, który wpływa na poprawność uzyskanych wyników. Wyróżnia się kilka etapów przetwarzania wstępnego widm masowych, między innymi redukcję szumu, usunięcie linii bazowej, detekcję wartości odstających, uliniawianie czy normalizację, przy czym w zależności od potrzeb nie wszystkie są konieczne do implementacji. Niezbędnym jednak etapem warunkującym dalszą analizę widma jest proces usunięcia linii bazowej, którą zalicza się do szumu eksperymentalnego.

Cel. Celem pracy było stworzenie efektywnego, adaptacyjnego algorytmu wyznaczania wartości linii bazowej poprawiającego jakość przetwarzania wstępnego widm MSI.

Dane i metodyka. W niniejszej pracy analizowane były widma peptydowe pochodzące z obrazowania tkanki raka głowy i szyi. Dla każdego preparatu otrzymano kilkadziesiąt tysięcy widm w zakresie 800-4000 m/z. Często używane najprostsze algorytmy redukcji linii bazowej nie dopasowują się indywidualnie do kształtu widma i wykorzystują stałą szerokość ramki przy wyliczaniu wartości linii bazowej. Najczęściej wartość linii bazowej w obrębie ramki wyliczana jest jako kwantyl rzędu 1/10, a następnie wszystkie punkty łączone są za pomocą interpolacji. Ze względu jednak na obecność szumu powstałego na detektorze szczególnie na początku eksperymentu, linia bazowa wykazuje dużą zmienność wzdłuż osi m/z. Implementowana metoda stanowi rozwinięcie przedstawionej metody podstawowej i pozwala adaptacyjnie dopasować szerokość ramki okna. Zakłada się bowiem, iż odpowiednia szerokość ramki, to taka dla której wewnątrz ramki trend jest stały i nie zmienia się wraz ze wzrostem m/z. Na tej podstawie adekwatne wydaje się zastosowanie wartości korelacji Pearsona, która może posłużyć do adaptacyjnego dopasowania wielkości ramki. Dzięki temu lokalne spadki czy też wzrosty wartości zostają zniwelowane, a także w mniejszym stopniu obserwowane jest usunięcie istotnych pików.

Wnioski. Wyniki analiz pokazały, iż metoda adaptacyjna jest efektywna, a także pozwala dobrze dopasować się do wielu typów widm masowych, co ma ogromne znaczenie przy analizie widm z obrazowania molekularnego.

Finansowanie. Praca naukowa finansowana ze środków z dotacji statutowej Politechniki Śląskiej BK/213/RAU1/2016/10 (JP) oraz ze środków Narodowego Centrum Nauki UMO-2015/19/B/ST6/01736 (KB).

Zmiany poziomu reaktywnych form tlenu w dzielących się komórkach, na podstawie danych z mikroskopii fluorescencyjnej przyżyciowej

Patryk Bil, Joanna Rzeszowska-Wolny

Zakład Inżynierii Systemów, Instytut Automatyki Politechniki Śląskiej, Gliwice, Polska

Reaktywne formy tlenu występują w komórkach zdrowych i nowotworowych, są nieustannie generowane przez komórkę i redukowane. Biorą udział w regulacji wielu ważnych procesów zachodzących w komórkach, m.in. sygnalizacji, różnicowaniu komórek i apoptozie. Na rynku dostępne są barwniki fluorescencyjne niespecyficzne dla konkretnych rodzajów ROS, jak np. barwnik CellROX Green, a także barwniki specyficzne dla określonych cząsteczek, np. MitoSOX do oznaczania anionorodnika ponadtlenkowego. Użycie mikroskopii fluorescencyjnej przyżyciowej i barwników fluorescencyjnych dających świecenie w połączeniu z cząsteczkami ROS, pozwala na podstawie zmiany intensywności świecenia obserwowanych komórek, określić względny poziom znajdujących się w nich reaktywnych form tlenu.

Do śledzenia komórek i odczytu ich intensywności świecenia fluorescencyjnego na otrzymanych seriach zdjęć, wykonywanych w półgodzinnych odstępach czasu, użyto programu LineageTracker. Uzyskane dane o pozycji komórki i jej poziomie fluorescencji w danym punkcie czasowym, użyto do badania relacji między ruchliwością komórki (przemieszczenia względem punktu początkowego) i stężeniem znajdujących się na obszarze jej jądra reaktywnych form tlenu. Badanie dodatkowo pozwala na ocenę wpływu aktywności proliferacyjnej oraz sąsiedztwa komórek na zmiany poziomu ROS.

Korekcja danych obrazowych MRI

Damian Borys

Zakład Inżynierii Systemów
Instytut Automatyki
Politechnika Śląska w Gliwicach

Obrazowanie MRI, podobnie jak CT, wykorzystywane jest w obrazowaniu zmian w strukturze anatomicznej. Obrazy MRI najlepiej sprawdzają się dla tkanek miękkich, pozwalając również na uzyskanie informacji funkcjonalnych o danej tkance. Niestety pomimo szeregu zalet wykazują również pewne wady wynikające z samej techniki pomiarowej. Dwa szczególnie istotne z punktu widzenia prowadzonych przez nas badań to dystorsje geometryczne w obrazach MRI oraz niejednorodność intensywności sygnału. Przyczyna powstawania jednego czy też obu problemów wynikać może z np. wysokiego pola magnetycznego stosowanego w obrazowaniu, niejednorodności pola magnetycznego, niedoskonałości cewki nadawczo-odbiorczej, indukowanych w obiekcie prądów wirowych oraz budowy anatomicznej badanego obiektu (zarówno wewnątrz jak i poza cewką), w tym występowaniu elementów o wysoce zróżnicowanych właściwościach magnetycznych (np. implanty itp.). W przypadku stosowania cewek ogólnych zjawisko ma charakter bardziej globalny. Niejednorodność intensywności przejawia się najczęściej w postaci łagodnej zmiany intensywności sygnału występującej w obrazie. Sytuacja pogarsza się w przypadku stosowania cewek dedykowanych, jak to ma miejsce w przypadku obrazowania gruczołu piersiowego. Cewki te poprawiają lokalny SNR sygnału jednak wprowadzają przy tym dość znaczne niejednorodności widoczne w okolicach cewek (silne wzmocnienie sygnału) oraz poza całym układem (duże osłabienie sygnału). Większość z tych zmian uznaje się, iż dla jakościowej oceny wykonywanej przez specjalistę radiologa, nie powinny znacząco wpływać na proces diagnostyczny. Jednakże w przypadku analizy ilościowej i automatycznej, w tym segmentacji, tego typu zmiany sygnału mają bardzo duży niekorzystny wpływ na skuteczność algorytmów segmentacji, które wykorzystują informacje o intensywności sygnału w danych strukturach. Informacja ta jest również kluczowa w algorytmach dopasowania obrazów.

W literaturze zaproponowano wiele metod korekcji niejednorodności sygnału w obrazach MRI. W badaniach porównujemy istniejące algorytmy retrospektywne (N3, N3+FCM, nieparametryczny, itp.) i próbujemy dobrać najlepszy do korekcji intensywności w obrazach gruczołu piersiowego. W celu oceny i korekcji dystorsji wykorzystujemy metody elastycznej fuzji obrazów opartej na modelu przepływu. Badania prowadzone są na fantomach (LTO, LEGO, itp.) w celu oszacowania efektywności działania algorytmu.

Zmiany poziomu metylacji DNA w różnych regionach genomu w ostrej białaczce szpikowej

Agnieszka Cecotka, Joanna Polańska

Zakład Analizy Eksploracyjnej Danych, Instytut Automatyki, Politechnika Śląska, Gliwice, Polska

Metylacja DNA jest epigenetycznym procesem kontroli ekspresji genów. Polega na przekształceniu cytozyny w 5-metylocytozynę w miejscach CpG w genomie. Miejsca te nie są równomiernie rozłożone wzdłuż całego genomu. Ich skupiska nazywane są wyspami CpG (ang. CpG islands) i występują przede wszystkim w regionach promotorowych genów. Następne obszary w odniesieniu do zagęszczenia miejsc CpG to kolejno: wybrzeże (ang. shore), szelf i otwarte morze.

Pomiar poziomu metylacji umożliwia platforma Illumina Infinium HumanMethylation 450. Mikromacierz ta zawiera ponad 485 tys. sond, dzięki którym uzyskuje się informację na temat poziomu metylacji na przestrzeni całego genomu. Do każdej sondy jest przypisana informacja na temat jej sekwencji, dokładnego położenia w genomie, przynależności do opisywanych wcześniej obszarów zagęszczenia miejsc CpG (wyspa, wybrzeże, szelf lub otwarte morze) oraz regionów genu: TSS (transcription start site – region promotorowy genu), końca 5'UTR, pierwszego eksonu, body oraz końca 3'UTR. Ponadto sondom należącym do obszarów kodujących geny przypisano symbol genu.

Metylacja każdego z opisywanych regionów pełni odmienną rolę w kontroli ekspresji genów. Największe znaczenie ma wzrost poziomu metylacji na wyspach CpG położonych w regionach promotorowych genów. Proces ten powoduje zablokowanie inicjacji transkrypcji. Zwiększona metylacja w regionie promotorowym genu zmniejsza więc jego ekspresję. Odwrotnie jest w przypadku zwiększonej metylacji w regionie gene body. Nie powoduje ona zahamowania transkrypcji, a wręcz uważa się, że skutkuje jej wzmocnieniem. Wynika z tego, że proces elongacji nie jest tak wrażliwy na zmiany transkrypcji, jak proces inicjacji.

Dane analizowane w tym badaniu dotyczyły 14 osób z ostrą białaczką szpikową. Uzyskane dla nich pomiary porównano z kontrolą liczącą 5 osób. Wykonując podstawową analizę statystyczną opisywanych danych, znaleziono miejsca CpG, w których występują istotne różnice w poziomie metylacji między osobami chorymi a zdrowymi. Bardzo duża część z nich jest położona w regionach TSS. Duże różnice występują także w regionach body. Znalezienie konkretnych genów, których poziom metylacji różnicuje osoby chore i zdrowe może pomóc w zrozumieniu mechanizmów procesów zachodzących w ostrej białaczce szpikowej.

Praca naukowa finansowana ze środków Politechniki Śląskiej na działalność statutową: BKM/506/RAU1/2016/29 (AC) oraz BK/213/RAU1/2016/10 (JP).

Proapoptotyczne właściwości mysiego białka LOC66598 i jego wariantów delecyjnych

Marek Chadalski¹, Anna Naumowicz^{1,2}, Joanna Korfanty¹, Wiesława Widlak¹

¹Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Wybrzeże Armii Krajowej 15,
44-101 Gliwice;

²Politechnika Śląska, Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki, ul. Akademicka 16,
44-100 Gliwice

Mysi gen 3110001I22Rik kodujący białko LOC66598 został zidentyfikowany w ramach projektu The RIKEN integrated database of mammals. Gen zlokalizowany jest na 16 chromosomie w pierwszym intronie genu Bfar. Myszy z nokautem genu 3110001I22Rik nie wykazywały żadnych istotnych zmian fenotypowych, a funkcja tego genu pozostaje nieznana.

Gen 3110001I22Rik został wybrany przez nas jako obiekt badań w wyniku eksperymentów mikromacierzowych, które wykazały dwukrotny wzrost jego ekspresji w wątrobie po szoku termicznym. Wśród pozostałych narządów myszy aktywacja genu po szoku termicznym zachodzi również w grasicy. Wstępne eksperymenty przeprowadzone z użyciem mikroskopu przyżyciowego sugerują, iż białko LOC66598 może posiadać właściwości proapoptotyczne. Badania *in silico* wskazały obecność dwóch potencjalnie funkcjonalnych domen: LGE oraz bogatą w seryny (Ser rich). Sklonowaliśmy więc cDNA badanego genu i wykonaliśmy klony z delecjami powyższych domen, celem ustalenia ich istotności w funkcjonowaniu białka LOC66598. Zastosowaliśmy lentiwirusowy system ekspresji indukowanej doksycykliną w mysich fibroblastach zarodkowych linii NIH-3T3 oraz transfekcje przejściowe wektorów kodujących pełne białko LOC66598-EGFP lub jego klony delecyjne. Po transfekcji przejściowej wszystkie konstrukty indukują apoptozę, nie jest ona jednak obserwowana po indukcji ekspresji wektorów za pomocą doksycykliny.

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, nr grantu 2014/13/B/NZ3/04650.

Cytotoksyczne kompleksy złota(III) zawierające pochodne 2,2':6',2''-terpirydyny

K. Czerwińska^a, M. Golec^{b,c}, M. Skonieczna^{d,e}, J. Palion-Gazda^a, D. Zygałło^{b,c}, A. Ratuszna^{b,c}, A. Szlapa-Kula^f, S. Krompiec^f, B. Machura^{*a} i A. Szurko^{*b,c}

^aUniwersytet Śląski, Instytut Chemii, Zakład Krystalografii, ul. Szkolna 9, 40-006 Katowice

^bUniwersytet Śląski, Instytut Fizyki im. Augusta Chelkowskiego, ul. Uniwersytecka 4, 40-007 Katowice

^cŚląskie Międzyuczelniane Centrum Edukacji i Badań Interdyscyplinarnych, ul. 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów

^dPolitechnika Śląska, Centrum Biotechnologii, 44-100 Gliwice

^ePolitechnika Śląska, Instytut Automatyki, 44-100 Gliwice

^fUniwersytet Śląski, Instytut Chemii, Zakład Chemii Nieorganicznej, Metaloorganicznej i Katalizy, ul. Bankowa 14, 40-007 Katowice

Chemioterapia jest jedną z najskuteczniejszych metod walki z chorobami nowotworowymi. Od wielu lat głównymi chemioterapeutykami są związki zawierające platynę, jednak dokuczliwe skutki uboczne, a także oporność komórek nowotworowych na te leki kieruje poszukiwania na nowe tory. W ostatnich latach testowane są kompleksy różnych metali, w tym złota. Opublikowane badania wykazują, że biologiczna aktywność związków złota jest lepsza niż najpowszechniej stosowanej cisplatyny. Pewnym ograniczeniem związków złota(III) jeżeli chodzi o ich wykorzystanie w terapii nowotworowej jest ich mała stabilność w środowisku fizjologicznym. Multidentne ligandy N-donorowe, takie jak 2,2':6',2''-terpirydyna stwarzają możliwość otrzymania związków o odpowiedniej trwałości.

Otrzymano i zbadano dwa kompleksy złota(III) zawierające pochodne 2,2':6',2''-terpirydyny (*terpy*): $[\text{AuCl}(4'\text{-R}^1\text{-terpy})](\text{PF}_6)_2$ i $[\text{AuCl}(4'\text{-R}^2\text{-terpy})](\text{PF}_6)_2$ gdzie R^1 to 2-pirydył zaś R^2 to 3-pirydył. Stabilność związków Au(III) w roztworze buforu fizjologicznego potwierdzono wykonując pomiary czasowe elektronowych widm absorpcyjnych. Badania rentgenostrukturalne wykazały, że struktury otrzymanych związków składają się z kationów $[\text{AuCl}(4'\text{-R-terpy})]^{2+}$ oraz anionów heksafluorofosforanowych w stosunku stechiometrycznym 1 : 2. Kationy $[\text{AuCl}(4'\text{-R}^2\text{-terpy})]^{2+}$ wykazują zaburzoną geometrię płaskokwadratową, analogiczną do geometrii cisplatyny.

Oba kompleksy wykazują właściwości antyproliferacyjne wobec linii komórkowej HCT116 (Human Colon Carcinoma) w stosunku do wolnych ligandów oraz cisplatyny. Własności cytotoksyczne związków dla linii komórkowych nowotworowych i prawidłowych określono za pomocą testu MTS. Badanie linie nowotworowe to: HCT116, HTC116 (p53^{-/-}) (Human Colon Carcinoma z delecją genu p53), MCF7 (Human Breast Adenocarcinoma) i A549 (Adenocarcinoma Human Alveolar Basal Epithelial). Kontrolne, prawidłowe linie komórkowe to: NHDF (Normal Human Dermal Fibroblasts) i BEAS 2B (Human Bronchial Epithelial). Wartości IC₅₀ kompleksów złota dla wszystkich linii komórkowych są niższe w porównaniu do działania wolnego ligandu, a także cisplatyny, co wskazuje na ich większą

cytotoksyczność. Co więcej cytotoksyczność związków złota(III) wobec komórek linii prawidłowej NHDF wskazuje na selektywność ich działania.

Ponadto badaliśmy również wpływ kompleksów na cykl komórkowy, apoptozę/nekrozę oraz wewnątrzkomórkowy poziom reaktywnych form tlenu (ROS). Uzyskane wyniki wskazują na obiecujące właściwości kompleksów złota zawierających pochodną 2,2':6',2''-terpirydyny do zastosowania w terapiach przeciwnowotworowych.

Literatura

1. Ch. Nardon, G. Boscutti, D. Fregona, *Anticancer research* 34: 487-492 (2014)
2. I. Ott, R. Gust, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2007, 340, 117-126
3. F Trudu, F Amato, P Vaňhara, T Pivetta, EM Peña-Méndez, J Havel, *Journal of applied biomedicine* 13 (2), 79-103
4. N. Cutillas, G. S. Yellol, C. de Haro, C. Vicente, V. Rodriguez, J. Ruiz, *Coord. Chem. Rev.*, 2013, 257, 2784
5. L. Messori, G. Marcon, P. Orioli, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2003, 1, 177
6. V. Milacic, Q. P. Dou, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, 253, 1649

O prawidłowym modelowaniu zmiennego w czasie opóźnienia

Krzysztof Fajarewicz

Politechnika Śląska, Instytut Automatyki, Zakład Inżynierii Systemów

W prezentacji przedstawiono klasyfikację modeli matematycznych zmiennego w czasie opóźnienia uwzględniającą typ opóźnienia oraz pierwotną przyczynę zmian wartości opóźnienia. Wprowadzono rozróżnienie na dwa różne typy opóźnienia: opóźnienie wywołane propagacją informacji i opóźnienie wywołane transferem masy/energii. Te dwa typy opóźnienia są identyczne w przypadku stałego czasu opóźnienia. Jednak w przypadku zmiennego w czasie opóźnienia ich modele matematyczne różnią się. Prawidłowy model matematyczny zmiennego opóźnienia wywołanego transferem masy/energii oprócz zmian w samym czasie opóźnienia charakteryzuje również zmiana amplitudy sygnału wyjściowego modelu w porównaniu z amplitudą opóźnionego sygnału wejściowego. Fakt ten nie jest uwzględniany przez znane z literatury modele zmiennego w czasie opóźnienia oraz narzędzia do symulacji takich układów. Pokazano, że prawidłowy model zmiennego opóźnienia wywołanego transferem zachowuje bilans masy/energii.

WIELOFAZOWY MODEL PULSACYJNEGO PRZEPLYWU KRWI W TĘTNICY

Maria Gracka

Politechnika Śląska, Instytut Techniki Ciepłej, maria.gracka@polsl.pl

Choroby oraz zaburzenia układu sercowo-naczyniowego, takie jak miażdżycy tętnic, udary mózgu i ataki serca są głównymi przyczynami przedwczesnej śmierci na świecie, szczególnie w społeczeństwach uprzemysłowionych i rozwiniętych. Głównym powodem problemów z przepływem krwi w tętnicach wieńcowych jest miażdżycy, będąca wynikiem wysokiego poziomu cholesterolu oraz osadzania się tłuszczu. Lokalizacja płytki na wewnętrznej ścianie tętnic wieńcowych może być przyczyną zwężenia, a nawet całkowitego zamknięcia się ich światła, co prowadzi do niedokrwienia, a w ostateczności do zawału mięśnia sercowego [1].

Zrozumienie podstawowych mechanizmów i zjawisk zachodzących w układzie sercowo-naczyniowym może być przydatne przy wczesnym wykrywaniu uszkodzeń naczyń, gdzie możliwe jest zastosowanie leczenia farmakologicznego zamiast niebezpiecznych, skomplikowanych i drogich zabiegów chirurgicznych.

Modele komputerowe oferują wiele korzyści w porównaniu do badań eksperymentalnych, dlatego w ostatnich latach symulacje wykonane przy pomocy techniki numerycznego modelowania mechaniki płynów (CFD - Computational Fluid Dynamics) znalazły szerokie zastosowanie w bioinżynierii.

W prezentowanej pracy przeprowadzono analizę numeryczną przepływu krwi w tętnicy wieńcowej wykorzystując uproszczoną geometrię naczynia. Przedstawiono model dwufazowy wykorzystujący technikę Euler-Euler. Przyjęto nienewtonowski model krwi oraz założono, że krew jest mieszaniną osocza (fazy ciągłej) i zawieszonych w niej cząsteczek stałych – erytrocytów. Traktowanie krwi jako mieszaniny osocza i czerwonych krwinek, jako dwa przenikające się wzajemnie kontinua, pozwala na modelowanie przepływu bardziej realistycznie, gdyż erytrocyty kontrolują reologię krwi [2]. W modelu zaimplementowano pulsacyjny warunek brzegowy w celu symulacji cyklu pracy serca wykorzystując tzw. procedury własne (UDF – User Defined Functions). Jako warunek brzegowy na wlocie zadano profil prędkości w funkcji czasu, natomiast na wylocie przyjęto warunek brzegowy typu outflow. Ponadto opracowano dodatkowy UDF w celu modelowania lepkości czerwonych krwinek. Symulacje opracowanego modelu numerycznego przepływu krwi w tętnicy wieńcowej przeprowadzono wykorzystując komercyjne oprogramowanie ANSYS Fluent (ANSYS Inc., USA) [3].

Bibliografia

- [1] Zhou H., Sun Peng, Ha S., Lundine D., Xiong G., (2016) Watertight modeling and segmentation of bifurcated Coronary arteries for blood flow simulation using CT imaging, *Computerized Medical Imaging and Graphic* **53**, 43-53
- [2] Jung J., Lyczkowski R.W., Panchal C. B., Hassanein A., (2006) Multiphase Hemodynamic Simulation of Pulsatile Flow in a Coronary Artery, *Journal of Biomechanics* **39**, 2064-2073
- [3] ANSYS Fluent UDF Manual, Rel. 15, ANSYS, Inc, 2013.

Podziękowania: Badania finansowane są przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu nr 2014/13/B/ST8/04225.

Ocena wpływu wylewu podpajęczynówkowego u szczura na jednostkę nerwowo-naczyniową bariery krew-mózg na poziomie ultrastrukturalnym

Gendosz D.¹, Mielańczyk Ł.², Matysiak N.²

¹ Katedra i Zakład Fizjologii, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

² Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski z Oddziałek Lekarsko-Dentystycznym, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Celem pracy była ocena zmian ultrastrukturalnych jednostki-nerwowo naczyniowej bariery krew-mózg, powstałych w wyniku wylewu podpajęczynówkowego u szczurów szczepu Wistar C.

Badane zwierzęta utrwalano techniką perfuzji naczyniowej za pomocą 4% formaldehydu. Po wyciągnięciu mózgu, wycięto odpowiednie regiony mózgu, które utrwalano w 3% aldehydzie glutarowym oraz wtórnie w 2% czterotlenku osmu. Utrwaloną tkankę odwodniono w szeregu alkoholowym oraz tlenku propylenu, następnie przesycono i zatopiono w żywicy epoksydowej Epon. Materiał skrojono na ultracienkie skrawki, które wykontrastowano solami ołowiu oraz uranylu. Tak przygotowane preparaty fotografowano i analizowano pod transmisyjnym mikroskopem elektronowym FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin przy napięciu 120 kV.

Analiza ultrastrukturalna tkanki nerwowej pobranej ze zwierząt doświadczalnych (grupa SAH, n=4), wykazała obecność zmian patologicznych zarówno na poziomie jednostki nerwowo-naczyniowej (ang. *neuro-vascular unit*, NVU), jak również otaczającego ją neuropilu w porównaniu do szczurów z grupy kontrolnej (grupa SHAM, n=4). Morfologiczne cechy uszkodzenia komórek śródbłonna NVU polegały na hipertofii komórki, przejawiającej się: (i) powiększeniem i nieregularnym obrysem jądra komórkowego, (ii) rozděciem sieci retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego, (iii) nasileniem procesów transcytozy, w postaci zwiększonej liczby pęcherzyków w obrębie powierzchni błony luminalnej, abluminalnej oraz cytoplazmy komórki. Zmiany obejmowały również błonę podstawną mikrokapilar: (i) pogrubienie i pofałdowanie błony podstawnej, (ii) rozwarstwienie błony podstawnej, (iii) obecność fragmentów/resztek komórkowych w przestrzeni między śródbłonkiem a błoną podstawną oraz w samej błonie podstawnej. Połączenia ściśle widoczne na granicy dwóch komórek endotelium nie wykazują zmian patologicznych, przeciwnie zaobserwowano zmiany w ich morfologii przejawiające się ich znacznym wydłużeniem jak również zagęszczeniem.

Ponadto, zaobserwowano również istotne zmiany w budowie przestrzeni okołonaczyniowej, która charakteryzowała się: (i) obecnością różnej wielkości wolnych przestrzeni pomiędzy wypustkami komórkowymi, (ii) zapadanie się mikrokapilar, (iii) zmiany degeneracyjne neurocytów i astrocytów, (iv) obecność fagocyto-podobnych komórek w okolicy naczyń, (v) obecność komórek „*dark cells*”, tj. degenerujących komórek mózgowia o nieznanym pochodzeniu. Dodatkowo analizowane komórki, które wchodzą w skład NVU oraz strefy przy naczyniowej, cechują się obecnością mitochondriów wykazujących uszkodzenie widoczne jako obrzęk, skrócenie lub braku grzebieni mitochondrialnych.

Resweratrol w kombinacji z berberyną indukuje nekrozę ludzkich komórek raka języka linii SCC-25 in vitro zależną od ilości reaktywnych form tlenuHejmo Tomasz¹, Skonieczna Magdalena², Bułdak Magdalena³, Bułdak Rafał¹¹Wydział Lekarski z oddziałem Lekarsko Dentystycznym w Zabrze, Katedra i Zakład Biochemii, Zabrze²Politechnika Śląska, Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Zakład Inżynierii Systemów, Gliwice³ Śląski Uniwersytet Medyczny, Wydział nauk o zdrowiu w Bytomiu, Katedra Dietetyki, Zakład żywienia człowieka, Bytom

Wstęp: Resweratrol to polifenolowa pochodna stilbenu, znajdująca się m. in. w winogronach, orzechach ziemnych czy owocach czarnej porzeczki. Berberyna to izochinolinowy alkaloid pochodzenia roślinnego. Oba związki chemiczne charakteryzują się prozdrowotnymi właściwościami, m. in. przeciwbakteryjnymi, przeciwwirusowymi, przeciwzapalnymi, a berberyna powoduje spadek poziomu cukru we krwi oraz zmianę poziomu cholesterolu HDL i LDL. Z tego względu są one intensywnie badane pod względem przydatności do leczenia chorób człowieka. Udowodnione właściwości przeciwnowotworowe pozwalają na wykorzystanie ich jako potencjalnych substancji pomocniczych przy leczeniu nowotworów, ponieważ istnieje ciągła konieczność poszukiwania nowych alternatywnych substancji chemicznych mogących zwiększać skuteczność tradycyjnych leków chemioterapeutycznych bez negatywnego wpływu na komórki prawidłowe.

Materiał i metody: Komórki ludzkiego raka języka linii SCC-25 były hodowane z użyciem medium DMEM/F12 z dodatkiem 10%FBS i hydrokortyzolu w stężeniu 400ng/l w warunkach standardowych (37 st. C, 5% CO₂). Oznaczenie żywotności wykonano z użyciem testu MTS CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay firmy Promega. Oznaczenie ilości reaktywnych form tlenu wykonano korzystając z cytometru przepływowego z użyciem barwników CellROX Green Life Technologies i DCFH-DA Sigma.

Wyniki: Obserwowano zmniejszenie żywotności komórek SCC-25 in vitro o 54 % w grupie stymulowanej berberyną (B) w stężeniu 1,25 µg/ml względem komórek nietraktowanych (kontrolnych). Monoterapia z użyciem wyłącznie resweratrolu (R) w stężeniu 10 µg/ml skutkowała obniżeniem żywotności analizowanych komórek o 25% względem kontroli. Terapia kombinowana z wykorzystaniem obydwu związków chemicznych (R+B) powodowała maksymalne obniżenie żywotności testowanych komórek o 58 % w porównaniu do komórek z grupy kontrolnej. Obserwowano wzrost o 19 % ilości komórek nekrotycznych w hodowli po stymulacji R + B w stężeniu 10 µg/ml, który był spowodowany wzrostem stężenia reaktywnych form tlenu (RFT) w hodowli analizowanych komórek mierzonych z użyciem pochodnej dichlorofluoresceiny (DCF). Najwyższe stężenie RFT w hodowli obserwowano w grupie traktowanej (R+B) względem komórek stymulowanych wyłącznie (R) lub (B), odpowiednio; (2140 ±16 vs 1880 ± 46 vs 900 ± 45 RFU; p<0.05). Nie obserwowano liniowej zależności między poziomem RFT a ilością komórek nekrotycznych w grupach komórek stymulowanych wyłącznie z użyciem monoterapii (R lub B).

Wnioski: Obydwie substancje chemiczne nie wykazują liniowej synergii w obniżaniu żywotności testowanych komórek raka języka linii SCC-25, niemniej w terapii kombinowanej z użyciem R+B obserwowano większy odsetek nekrotycznych komórek spowodowany indukowanym stresem oksydacyjnym.

Badanie kompleksu RISC w procesach regulacji ekspresji genów i syntezy białek.

Dorota Hudy, Joanna Rzeszowska-Wolny

Politechnika Śląska, Instytut Automatyki, Zakład Inżynierii Systemów

RISC (RNA-induced silencing complex) może oddziaływać na kilka różnych sposobów z mRNA, regulując w ten sposób procesy zachodzące w komórce. Składa się z szeregu białek m. in. Argonaute, oraz microRNA. Niektóre metody jego działania obejmują destabilizację bądź cięcie przyłączonego mRNA, inne inhibicję procesu syntezy białka. Część z tych mechanizmów można uzasadnić występowaniem konkretnego białka Ago w kompleksie np. przyjmuje się, że Ago2 odpowiada za cięcie mRNA.

Głównym celem projektu jest charakterystyka różnic w oddziaływaniu RISCa na poziomy mRNA i białka w różnych liniach komórkowych. Badania oparto na modelu z plazmidem psiCHECK-2 zawierającym dwa geny reporterowe, lucyferaza renilla i firefly, z których lucyferaza renilla zawierała w końcu 3' miejsca docelowe dla miRNA (m.in. miR-21, miR-24). W eksperymentach zbadano oddziaływanie miRNA na poziom transkryptu oraz powstającego z niego produktu. Zbadano również występowanie transkryptów reporterowych w kolejnych frakcjach polisomalnych.

Badania finansowano z projektu nr BKM/506/RAU1/2016/t. 20

Zmiany reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych zachodzące pod wpływem działania niskich dawek promieniowania UV

Sylwia Kała, Karolina Gajda, Joanna Rzeszowska – Wolny

Politechnika Śląska, Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Zakład Inżynierii Systemów

Stymulacja komórek przez niskie dawki promieniowania nie jest zagadnieniem nowym.

W latach 90 nastąpiły kluczowe badania w tym temacie, jednak skupiały się one głównie na adaptacji komórek przez kondycjonowanie ich małymi dawkami promieniowania do wyższych dawek, szkodliwych dla komórek dawek. Zagadnienie to obejmowało wiele teorii, zaczynając od teorii uszkodzeń DNA oraz aktywacji enzymów naprawczych, po regulację metabolizmu komórki przez zmiany poziomu wapnia.

W prezentowanych badaniach została przedstawiona rola reaktywnych form tlenu i azotu, które zwyczajowo uważane były za szkodliwe dla komórek. Obecnie podtrzymywana jest hipoteza, która określa małe stężenia reaktywnych form tlenu jako stymulujące dla komórek, a wysokie za szkodliwe, prowadzące do senescencji lub apoptozy. Badania obejmują trzy dawki promieniowania UVA, które wykazują różnice w teście klonogenności. Jedna, która nie uwidacznia żadnego wpływu na komórki, druga stymulująca, trzecia prezentująca inhibicję proliferacji. Taki układ eksperymentalny pozwala na sprawdzenie różnic w możliwych ścieżkach aktywowanych w komórkach oraz sprawdzenie jakie reaktywne formy tlenu i azotu dominują w przypadku danej dawki i godziny (sprawdzone godziny 1,6,12,24). Z obserwacji wynika, że w zależności od bodźca w postaci dawki promieniowania UVA, komórki zachowują się różnorodnie. Widoczny jest wzajemny wpływ reaktywnych form tlenu i azotu na siebie. Wzajemne fluktuacje oraz pojawienie się wyższych stężeń reaktywnych form tlenu i azotu prezentuje inne reakcje komórek na bodziec. Oznacza to, że mogą mieć one znaczący wpływ na wyjaśnienie zjawiska stymulacji proliferacji przez niskie dawki promieniowania.

Praca finansowana ze środków: BKM/506/Rau1/2016/ (S.K,K.G), UMO-2015/19/B/ST7/02984 (J.RW).

**Analiza morfologiczna osierdzia stabilizowanego chemicznie
z wykorzystaniem Mikroskopu Sił Atomowych**

Olesya Klymenko¹, Aleksandra Niemiec-Cyganek², Aneta Samotus², Katarzyna Jesse²,
Małgorzata Morenc², Barbara Kubin², Piotr Wilczek², Romuald Wojnicz¹

¹Katedra i Zakład Histologii i Embriologii w Zabrze, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko Dentystycznym,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²FRK „INTRA-CORDIS” Sp. z o.o.

Jednym z najczęściej przeprowadzonych zabiegów kardiochirurgicznych jest wymiana zastawek serca. W chwili obecnej do tego celu wykorzystywane są protezy mechaniczne oraz biologiczne, które jednak posiadają szereg ograniczeń i wad w tym m.in. wywołują stan zapalny oraz indukują odpowiedź immunologiczną. Alternatywnym rozwiązaniem jest opracowanie modelu zastawki autologicznej, która powstaje w wyniku nahodowania komórek pochodzących ze szpiku kostnego pacjenta na ksenograficznej bezkomórkowej matrycy kolagenowej.

Badaniami objęto chirurgicznie pobierane wycinki blaszki trzewnej worka osierdziowego poddane obróbce chemicznej. Oceniono morfologię tkanek na poszczególnych etapach procesu przygotowanie materiału w skład których wchodziło: (1) mechaniczne usunięcie tłuszczu i błon zewnętrznych, (2) pięciodniową kąpiel antybiotykową, (3) acelularyzacja z zastosowanie detergentów. W celu kontroli skuteczności acelularyzacji badanych próbek wykorzystano Mikroskop Sił Atomowych. Mikroskop ten składa się z trzech głównych elementów: (1) miękkiej sprężynki z cienką igłą na końcu, która skanuje powierzchnię, (2) piezoskanera który zapewnia trójwymiarowe ustawienie próbki, oraz (3) układu detekcyjnego obejmującego laser zogniskowany na końcu sprężynki wraz z fotodetektozem rejestrującym zmianę pozycji odbitego światła lasera. W efekcie otrzymuje się rzeczywisty, trójwymiarowy obraz topografii powierzchni.

W oparciu o wykonane badania nie stwierdzono zmian w strukturze włókien kolagenowych w zakresie charakterystyki prążkowania a także pomiarów liniowych (szerokość). Wobec powyższego można przyjąć iż zaproponowana metoda uzyskiwania szkieletu łącznotkankowego wydaje się gwarantować stabilność podporową dla potencjalnej celularyzacji.

Wpływ chelatorów żelaza na syntezę protoporfiryny IX

Klaudia Krzykała^{1,2}, Anna Mrozek-Wilczkiewicz², Katarzyna Malarz^{1,2}, Marta Rejmund¹,
Alicja Ratuszna², Robert Musioł¹

¹ Uniwersytet Śląski, Zakład Chemii Organicznej, Szkolna 9, 40-007 Katowice

² Uniwersytet Śląski, Zakład Fizyki Ciała Stałego, 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów

Terapia fotodynamiczna (PDT ang PhotoDynamic Therapy) polega na wykorzystaniu kombinacji nietoksycznych w ciemności barwników, znanych jako fotouczulacze oraz światła z zakresu czerwonego. Absorbacja przez fotouczulacz światła o określonej długości fali prowadzi do generacji reaktywnych form tlenu (RFT), które uszkadzając komórkę prowadzą do jej śmierci [1].

W leczeniu nowotworów wykorzystuje się pochodne porfiryn i ftalocyjanin. W terapii ALA-PDT wykorzystuje się prekursor protoporfiryny IX (PpIX) – kwas 5-aminolewulinowy. Aplikacja leku powoduje akumulację PpIX w komórkach nowotworowych i generację RFT po naświetleniu światłem czerwonym. Terapia taka ma szereg zalet, m.in. protoporfiryna IX występuje endogennie w organizmie ludzkim, przez co jest szybko metabolizowana i nietoksyczna, czas fotowrażliwości skóry nie przekracza 48 h, a skutki uboczne stosowania terapii są rzadkie [2].

W niniejszej pracy sprawdzono zdolność komórek kilku linii nowotworowych i prawidłowych do syntezy protoporfiryny IX oraz wpływ chelatorów żelaza na efektywność tego procesu. Sprawdzono również ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę PpIX.

[1] Kim i in. Synergistic anti-tumor effects of combination of photodynamic therapy and arsenic compound in cervical cancer cells: in vivo and in vitro studies, PLoS One, 7, 2012

[2] Tetard I in., Experimental use of photodynamic therapy in high grade gliomas: a review focused on 5-aminolevulinic acid. Photodiagnosis Photodyn Ther, 11 (319-330), 2014

Efekt sąsiedztwa indukowany promieniowaniem jonizującym

Aleksandra Krzywoń, Magdalena Skonieczna, Maria Wideł, Joanna Rzeszowska-Wolny

Politechnika Śląska, Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Zakład Inżynierii Systemów

Indukowany promieniowaniem efekt sąsiedztwa (ang. radiation induced bystander effect, RIBE) jest zjawiskiem obserwowanym w komórkach, które nie były bezpośrednio napromieniowane lecz otrzymały sygnały (głównie uszkodzające) wysyłane przez komórki bezpośrednio napromieniowane. Zmiany w komórkach nie znajdujących się w obszarze napromieniowania przejawiają się jako obniżenie przeżywalności komórek klonogennych, wzrost odsetka apoptozy, zmiany ekspresji genów, uszkodzenia cytogenetyczne, zmiany biochemiczne i epigenetyczne. Oprócz negatywnego działania efektu sąsiedztwa czasami występuje efekt ochronny w komórkach bezpośrednio napromieniowanych, który ujawnia się w postaci obniżenia indukcji apoptozy i mikrojaderek, zwiększenia przeżywalności komórek oraz wzrostu radiooporności. Celem badań jest sprawdzenie czy promieniowanie jonizujące indukuje radiooporność w komórkach nienapromieniowanych („komórkach bystander”) poddanych kolejnemu napromieniowaniu.

Analiza porównawcza algorytmów do anotacji interakcji microRNA–gen

Anna Krawczyk, Joanna Polańska

Politechnika Śląska, Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Instytut Automatyki, Zakład Analizy Eksploracyjnej Danych

MicroRNA to jednoniciowe, niekodujące cząsteczki, składające się z 21 – 25 nukleotydów. Regulują ekspresję genów poprzez supresję translacji, destabilizację mRNA czy też represję genu docelowego lub zmniejszenie ekspresji. Odgrywają one kluczową rolę w rozwoju raka, ponieważ mogą działać zarówno jako supresory, jak i onkogeny.

Obecnie zaobserwować można ciągły rozwój algorytmów predykcyjnych, służących do predykowania docelowych miejsc wiązania microRNA do danego genu. Badania wykazały, iż cząsteczki microRNA wiążą się do genu w ściśle określonych miejscach: w obszarze 3'-UTR, 5'-UTR, CDS (sekwencja kodująca) oraz w obszarze promotorowym. Dokonany przez autorów przegląd dostępnych algorytmów pokazuje, iż większość z nich umożliwia jedynie wyznaczenie miejsc wiązania microRNA do genu w obszarze 3'-UTR, a jedynie algorytm miRWalk bierze pod uwagę również obszar promotorowy genu, 5'-UTR oraz CDS.

Do szczegółowej i gruntownej analizy sposobu działania oraz funkcjonalności algorytmów predykcyjnych wybrano trzy miRWalk, DIANA-microT-CDS oraz TargetScan. Każdy z nich działa w oparciu o inną podstawę wyznaczania miejsc wiązania microRNA do genu, a mianowicie: komplementarność ziarna względem sekwencji genu czy termodynamikę, gdzie wyznacza się swobodną energię wiązań pomiędzy microRNA a docelowym genem. Ponadto każda z wybranych metod pozwala na dokonanie oceny otrzymanych wyników, jednak miara służąca do tejże oceny jest różna w każdej z nich: miRWalk – p-value, DIANA-microT-CDS – MRE score, TargetScan – P_{CT} . Implikuje to problem z wyborem algorytmu, który docelowo dostarczałby rzeczywistych, statystycznie istotnych rezultatów.

Niniejsza praca zawiera propozycję próby ujednoczenia wyników otrzymanych za pomocą trzech wspomnianych wyżej algorytmów poprzez obliczenie p-wartości dla rezultatów każdej z metod, a następnie ujednoczenie przestrzeni probabilistycznej poprzez integrację p-wartości za pomocą Testu Fisher'a. Wynikiem pracy jest umożliwienie porównywania wyników otrzymanych za pomocą algorytmów miRWalk, DIANA-microT-CDS oraz TargetScan.

MODEL METYLACJI CYTOZYNY I DEMETYLACJI POCHODNYCH FORM 5-METYLOCYTOZYNY

Karolina Kurasz, Krzysztof Fujarewicz

¹Politechnika Śląska, Gliwice, Poland

Metylacja cytozyny jest ważnym czynnikiem regulatorowym genomu, zmiany epigenetyczne wpływają na strukturę chromatyny, ekspresję genów oraz stabilność genomu. Wzrost metylacji części regulatorowej genu może wywołać zahamowanie jego ekspresji. Zakłada się, że wysoka metylacja pewnych fragmentów chromatyny związana jest z jej częściową lub całkowitą inaktywacją transkrypcyjną. Aktywna demetylacja nie jest zjawiskiem pełni wyjaśnionym, przyjmuje się, że przy udziale niedawno odkrytych białek z rodziny TET 5-metylocytozyna może być utleniana do 5-hydroksymetylocytozyny, która może być dalej utleniana do 5-formylocytozyny i 5-karboksylocytozyny. 5-hydroksycytozyna może również ulec glikozylacji przy udziale TDG lub deaminacji przez AID do 5-hydroksymetylouracylu.

Zaproponowany został model w oparciu o dane eksperymentalne dla pięciu linii komórkowych. Estymacja parametrów oparta została o metodę najmniejszych kwadratów (MNK), a zdolności predykcyjne modelu do przewidywania poszczególnych form cytozyny oparte zostały o krosvalidację typu leave-one-out.

Metody uczenia maszynowego jako narzędzia wspomagające badania nad nowym lekiem

Agata Kurczyk

Instytut Automatyki Politechniki Śląskiej w Gliwicach, ul. Akademicka 16, 44-100 Gliwice

Poszukiwanie nowych leków to proces złożony, wieloletni i bardzo kosztowny. Zastosowanie różnorodnych metod informatycznych w połączeniu z danymi eksperymentalnymi umożliwia konstrukcję zaawansowanych algorytmów służących jako narzędzia wspomagające badania nad nowym lekiem. Skrining wirtualny (ang. virtual screening, VS) jest integralną częścią procesu projektowania leków. VS to metoda analizy wirtualnych bibliotek związków chemicznych, mająca na celu wskazanie molekuł o potencjalnej aktywności biologicznej. W kolejnym etapie związki te zostają przebadane w rzeczywistym eksperymencie laboratoryjnym w celu weryfikacji uzyskanych drogą obliczeń wyników.

Metody uczenia maszynowego (ang. machine learning, ML) zaliczane są do dziedziny nauk zajmujących się problematyką sztucznej inteligencji. Techniki ML znajdują szereg praktycznych zastosowań w różnorodnych dziedzinach nauki i gałęziach przemysłu. W zastosowaniach chemoinformatycznych najczęściej stosowanym kryterium klasyfikacyjnym jest aktywność biologiczna. Modele regresyjne wykorzystywane są do predykcji wartości wybranych właściwości fizykochemicznych lub wartości związanej z aktywnością biologiczną (np. wartość parametru IC_{50}). Z kolei zadaniem klasyfikatorów binarnych jest dychotomiczny podział badanej grupy związków na aktywne lub nieaktywne w wybranym kierunku stymulacji farmakologicznej.

Kluczowym etapem badań było skonstruowanie protokołu wirtualnego skriningu, który został wykorzystany do przeszukiwania baz komercyjnie dostępnych związków w celu poszukiwania nowych, potencjalnych inhibitorów enzymu integrazy (IN) wirusa HIV. Protokół obejmuje dwa moduły: (i) moduł PS wykorzystujący informacje na temat uprzywilejowania wybranych fragmentów molekularnych oraz (ii) moduł ML, w którym następuje klasyfikacja związków. Potencjalne inhibitory IN wyłonione na drodze VS, zostały zakupione i skierowane do wykonania testów biologicznych *in vitro*. Dwa preparaty wykazały istotną aktywność antywirusową.¹

Skuteczność skonstruowanego protokołu VS uzyskana dla inhibitorów IN skłania do zbadania efektywności opracowanej procedury w przypadku innych niż zakażenie wirusem HIV obszarów terapeutycznych. Badanie takie pozwoli oszacować możliwości stosowania metod uczenia maszynowego jako narzędzi wspomagających badania nad nowym lekiem. W przypadku uzyskania pozytywnych wyników zaowocuje wskazaniem nowych struktur aktywnych badanej podprzestrzeni chemicznej. Obecnie prowadzone są badania skriningu wirtualnego pochodnych chinazoliny, w celu poszukiwania nowych związków o aktywności przeciwnowotworowej.

1. Kurczyk A., Warszycki D., Musiol R., Kafel R., Bojarski A. J., Polanski J.; Ligand-Based Virtual Screening in a Search for Novel Anti-HIV-1 Chemotypes., *J. Chem. Inf. Model.* 2015, 55 (10), 2168–2177

Obszerna analiza danych wysoce zrównoleglonych dla identyfikacji biomarkerów białaczki

Wojciech Łabaj¹, Anna Papież², Joanna Polańska², Andrzej Polański¹

¹ Instytut Informatyki, Politechnika Śląska, ul. Akademicka 16, Gliwice, Polska

² Instytut Automatyki, Politechnika Śląska, ul. Akademicka 16, Gliwice, Polska

Duże zbiory danych biomedycznych w badaniach nad nowotworami, takimi jak białaczka, powodują konieczność zastosowania dopasowanego schematu analizy, biorącego pod uwagę charakter analizowanych danych w celu zapewnienia możliwie najwyższej jakości wyciąganych informacji. W niniejszej pracy analizie został poddany duży zbiór danych mikromacierzowych (2096 pacjentów) pochodzący ze studium MILE (ang. Microarray Innovations in LeukEmia).

W tej pracy wykazano, że zastosowanie podczas analizy dopasowanego zbioru metod do charakteru danych, pozwala na lepszą ekstrakcję informacji, cech. Dokonano trzech analiz, każda dla uzyskania głębszego zrozumienia procesów leżących u podstaw różnych typów i podtypów białaczki. Podczas pierwszego kroku główne grupy chorych badane są pod kątem różnicowej ekspresji w stosunku do zdrowej kontroli, jak to się wykonuje w standardowym badaniu kliniczno-kontrolnym. Pod koniec tej analizy wydobyta jest podstawowa wiedza na temat mechanizmów molekularnych, co potwierdzono liczbowo oraz znajduje potwierdzenie w literaturze. W drugiej części przeprowadzono analizę porównawczą par, zestawiając ze sobą wszystkie główne typy białaczek. W tym przypadku za pomocą indeksu Dice-a wskazano ogólne zależności pomiędzy każdą z głównych grup. Ponadto zaproponowano listę możliwych biomarkerów dla głównych grup białaczek. Ostatni krok analizy dostarcza informacji na temat wszystkich badanych podtypów białaczki, doprowadzając do odkrycia czterech możliwych biomarkerów białaczki dla czterech różnych podtypów, po jednym z 4 głównych grup białaczki. Ponadto wzbogacona sygnatura genowa otrzymana za pomocą nowatorskiego schematu przetwarzania danych prowadzi do znacznie lepszej jakości klasyfikacji danych wieloklasowych.

Opracowana metodologia składająca się z korekty efektu paczki, dwóch etapów adaptacyjnej filtracji - usunięcie szumu i cech nieinformatywnych, zbioru odpowiednich testów statystycznych i zastosowaniu definicji biomarkera okazała się skutecznym podejściem do odkrywania wiedzy z dużych zbiorów danych otrzymanych technikami wysoce zrównoleglonymi biologii molekularnej [1].

Słowa klucze: identyfikacja biomarkerów, białaczka, selekcja cech, korekta efektu paczki, ekspresja genów

[1] Łabaj Wojciech, Papież Anna, Polańska Joanna and Polański Andrzej. Comprehensive analysis of MILE gene expression data set advances discovery of leukaemia type and subtype biomarkers, 2017. INTERDISCIPLINARY SCIENCES: COMPUTATIONAL LIFE SCIENCES, vol. 2017, pp. 1-12

Chelatory metali w terapiach przeciwnowotworowych

Katarzyna Malarz^{a,b}, Anna Mrozek-Wilczkiewicz^{b,c}, Marta Rejmund^a, Maciej Serda^a,
Alicja Ratuszna^{b,c}, Jarosław Polański^a, Robert Musioł^a

^aUniwersytet Śląski, Instytut Chemii, ul. Szkolna 9, Katowice 40-006, Polska

^bUniwersytet Śląski, Śląskie Międzyuczelniane Centrum Edukacji i Badań, ul.75 Pułku Piechoty 1A, Chorzów
41-500, Polska

^cUniwersytet Śląski, Instytut Fizyki im. Augusta Chełkowskiego, ul. Uniwersytecka 4, Katowice 40-007, Polska

Poprawa aktywności terapeutycznej i selektywności jest głównym celem rozwoju strategii przeciwnowotworowych. Wykorzystanie i zastosowanie terapii opartych na wywołaniu stresu oksydacyjnego, jest obiecującym podejściem ze względu na różnice genetyczne między komórkami prawidłowymi, a nowotworowymi. Komórki nowotworowe charakteryzują się wysokim poziomem reaktywnych form tlenu (ROS) ze względu na zmiany aktywności metabolicznej. Tym samym, czyni je to wrażliwymi na szkodliwe działanie w następstwie zwiększonego stresu oksydacyjnego indukowanego lekami, które generują wytwarzanie ROS i/lub osłabiają system obrony antyoksydacyjnej w komórce¹. Takie podejście może stanowić skuteczną strategię eliminacji komórek raka jelita grubego, trzustki i piersi, które cechuje podwyższony poziom ROS².

Pochodne tiosemikarbazonu (TSC) ze względu na zdolności do chelatowania jonów metali, takich jak żelazo i miedź mogą być niezwykle skutecznymi chemioterapeutykami w leczeniu chorób nowotworowych. Związki te poprzez wiązanie i wychwytywanie jonów metali z komórki zaburzają jej metabolizm, co prowadzi do zatrzymania procesów proliferacji i wzrostu guza³. Z drugiej strony, TSC mogą tworzyć redoks aktywne kompleksy, które tym samym warunkują właściwości cytotoksyczne⁴. Ponadto ostatnie doniesienia sugerują alternatywne wykorzystanie pochodnych tiosemikarbazonu jako jonoforów⁵. Biorąc to pod uwagę, postanowiliśmy zbadać wpływ jonów żelaza i miedzi wraz TSC na cytotoksyczność komórek raka jelita grubego oraz piersi. Co więcej, skupiliśmy się na głębszym spojrzeniu na mechanizmy indukcji stresu oksydacyjnego i ścieżek apoptotycznych po traktowaniu wysoce aktywnymi TSC. Uzyskane wyniki, sugerują, że kompleksowanie jonów żelaza lub miedzi prowadzi do zwiększenia poziomu ROS, co ma wpływ na regulację wielu genów i białek tiolowych systemu obrony antyoksydacyjnej. Dodatkowo, nadekspresja Ndrgl w powiązaniu z aktywacją białka p21 może odgrywać zasadniczą rolę w szlaku indukcji śmierci komórkowej.

Literatura

¹ Nogueira V, Hay N. *Clin Cancer Res.* 2013;19(16):4309-4314

² Sreevalsan S, Safe S. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2013;9(4):350-357

³ Kalinowski DS, Yu Y, Sharpe PC, et al. *J Med Chem.* 2007;50(15):3716-3729

⁴ Serda M, Kalinowski DS, Rasko N, et al. *PLoS One.* 2014;9(10):e110291

⁵ Akladios FN, Andrew SD, Parkinson CJ. *BioMetals.* 2016;29(1):157-170

Badania są objęte finansowaniem z Narodowego Centrum Nauki (NCN, grant 2014/13/D/NZ7/00322).

Filtracja obrazów z dwuwymiarowej elektroforezy żelowej w celu efektywnego modelowania plamek

Michał Marczyk

Zakład Analizy Eksploracyjnej Danych, Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki Politechniki Śląskiej

Elektroforeza to zjawisko elektrokinetyczne, w którym pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego przemieszczają się makrocząsteczki obdarzone niezerównoważonym ładunkiem elektrycznym. W dwuwymiarowej elektroforezie żelowej białka rozdzielone techniką ogniskowania izoelektrycznego (pierwszy kierunek) przenoszone są na elektroforezę płytową gdzie realizuje się drugi kierunek elektroforezy separujący białka według ich mas cząsteczkowych. Technika ta najczęściej używana do rozdzielania mieszanin białek i peptydów i pozwala na osiągnięcie wysokiej rozdzielczości, a w połączeniu z technikami immunobarwienia, również wysokiej selektywności.

Pozyskiwane obrazy mogą być modelowane z wykorzystaniem mieszaniny dwuwymiarowych rozkładów normalnych. Niestety, występowanie szumów pomiarowych i wartości odstających na obrazie powoduje błędy w estymacji parametrów modelu. Jednym z możliwych rozwiązań jest wstępne przetwarzanie obrazu poprzez usunięcie tła i szumów pomiarowych. W ramach pracy przebadano 3 metody usuwania tła i 4 metody filtracji z użyciem 2 fragmentów obrazu rzeczywistego i 100 obrazów syntetycznych. W celu zbadania jakości wykrywania plamek na obrazie po zastosowanie wstępnego przetwarzania, obliczono czułość i FDR dla każdej metody.

W wyniki przeprowadzanych analiz udowodniono, że usuwanie tła i filtracja obrazu jest niezbędna w celu poprawy jakości wykrywania plamek z użyciem modelu mieszanin gaussowskich. Dwustopniowa metoda Otsu dała najlepsze wyniki wykrywania plamek dla różnych zbiorów danych. Nie można wyróżnić najlepszej metody filtracji obrazu, ale metoda wykorzystująca filtr dopasowany dała dobre wyniki bez względu na zastosowaną metodę usuwania tła i zbiór danych.

Praca została sfinansowana z grantu Politechniki Śląskiej dla młodych naukowców, numer 02/010/BKM16/0047/33. Wszystkie obliczenia zostały przeprowadzone z użyciem platformy GeCONiI finansowanej z projektu POIG.02.03.01-24-099/13.

„Związki koordynacyjne platyny(II) z 4'-podstawionymi pochodnymi**2,2':6',2''-terpirydyny w aspekcie badań fizykochemicznych i biologicznych**

Anna Maroń¹, Sandra Michalak^{2,3}, Katarzyna Czerwińska¹, Dorota Zygadło^{2,3}, Agata Szlapa-Kula⁴, Stanisław Krompiec⁴, Alicja Ratuszna^{2,3} & Agnieszka Szurko^{2,3}

¹ Uniwersytet Śląski, Instytut Chemii, Zakład Krystalografii, ul. Szkolna 9, 40-006 Katowice

² Uniwersytet Śląski, Instytut Fizyki im. Augusta Chelkowskiego, ul. Uniwersytecka 4, 40-007 Katowice

³ Śląskie Międzyuczelniane Centrum Edukacji i Badań Interdyscyplinarnych, Zakład Fizyki Ciała Stałego, ul. 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów

⁴ Uniwersytet Śląski, Instytut Chemii, Zakład Chemii Nieorganicznej, Metaloorganicznej i Katalizy, ul. Szkolna 9, 40-006 Katowice

Współczynnik zachorowań na nowotwory nieustannie wzrasta, dlatego trwają poszukiwania nowych leków, które można zastosować w chemioterapii. Pochodne platyny(II) są już szeroko wykorzystywane w leczeniu klinicznym, chociaż posiadają liczne wady. Z tego powodu próbuje się modyfikować aktywnie biologicznie związki, aby ograniczyć niepożądane efekty, jednocześnie zachowując ich skuteczność.

Dla czterech związków koordynacyjnych platyny(II) z 4'-podstawionymi pochodnymi 2,2':6',2''-terpirydyny zostały opisane właściwości fizykochemiczne oraz aktywność biologiczna, w odniesieniu do ich potencjału w leczeniu nowotworów. Przedstawiamy wstępne wyniki, które wykazały, że związki z tej grupy wydają się być interesującymi kandydatami do dalszych badań.

Przedmiotem badań były związki o wzorze ogólnym $[PtCl(4'-R\text{-terpy-}\kappa^3N)]X$, które uzyskano znanymi z literatury metodami syntezy, wykorzystując dwa różne prekursory platyny(II) - $K_2[PtCl_4]$ oraz $[PtCl_2(PhCN)_2]$. Struktury $[PtCl(4'-R\text{-terpy-}\kappa^3N)]X$ potwierdzono technikami rentgenowskiej analizy strukturalnej, analizy elementarnej, spektroskopii NMR oraz FT-IR.

Natomiast w ramach początkowych badań biologicznych in vitro wykonano badanie cytotoksyczności względem szerokiego panelu linii komórkowych za pomocą testu MTS. Nasze badania potwierdziły silne właściwości cytotoksyczne dla jednego z czterech przedstawionych związków. Stwierdzono, że nadaje się on do dalszych badań takich jak analiza cyklu komórkowego oraz badania mechanizmu działania. Podsumowując, silna cytotoksyczność względem komórek glejaka A-172 (IC₅₀ na poziomie 0,49 μM) stawia $[PtCl(4'-(2,5-F_2C_6H_3)\text{-terpy-}\kappa^3N)]X$ w grupie potencjalnie aktywnych związków w terapii przeciwnowotworowej.

MODELOWANIE PRZEPŁYWU KRWI W WYBRANYM ODCINKU AORTY ZSTĘPUJĄCEJ Z ZAŁOŻENIEM ODKSZTAŁCALNOŚCI NACZYŃ KRWIONOŚNYCH

Bartłomiej Melka

Instytut Techniki Ciepłej, ul. Konarskiego 22, Gliwice 44-203, Politechnika Śląska

Celem prezentowanych badań było stworzenie modelu numerycznego przepływu krwi w elastycznych naczyniach krwionośnych. Metody numeryczne stosowane w inżynierii biomedycznej skupiające się na odtworzeniu przepływu krwi mogą pomóc we wczesnej diagnostyce chorób związanych z układem krążenia. Ponadto, mogłyby zostać zastosowane do wizualizacji skutków planowanych zabiegów medycznych jeszcze przed ich przeprowadzeniem.

W badaniach modelowych, z wykorzystaniem metody objętości skończonych użytych w programie ANSYS Fluent, zasymulowany został przepływ krwi w odcinku aorty zstępującej u 8-letniej pacjentki. Geometria została przygotowana przy użyciu angiografii z rezonansu magnetycznego (MRA) [1]. Geometria obejmująca objętość krwi w naczyniu została następnie zdyskretyzowana do siatki numerycznej, na podstawie której zostały przeprowadzone obliczenia. Dodatkowo w modelu założono grubość ściany naczynia na poziomie 10% średniego przekroju badanego naczynia [2].

Wiele badań modelowych dostępnych w literaturze obejmuje przepływ krwi z założeniem sztywnych naczyń krwionośnych, co może prowadzić do niezgodności pomiędzy wynikami obliczeń i rzeczywistym przepływem krwi [3]. W prezentowanych badaniach zaproponowano, że odkształcenia naczyń krwionośnych będą ujęte w analizie za pomocą obliczeń w zakresie mechaniki ściany naczynia, uwzględniających dynamikę tego zjawiska. W tym celu sprzęgnięte zostały programy do obliczeń polowych dynamiki ciała stałego oraz przepływu płynu nie-Newtonowskiego. Zastosowane podejście, znane pod nazwą Fluid Structure Interaction (FSI) pozwala uzyskać prawdopodobne wyniki symulacji zbieżne z rzeczywistym przepływem. Rozwiązane jest otrzymywane iteracyjnie, tak, aby uzyskać zbieżność rozwiązania pomiędzy modułami obliczeniowymi dla danego kroku czasu, co opisano w [4]. Pulsacyjny charakter przepływu krwi wynikający z cyklu pracy serca ujęty został w modelu za pomocą funkcji zdefiniowanych przez użytkownika. Zmienny przepływ w czasie był zgodny z danymi zamieszczonymi razem z wykorzystywaną geometrią [1].

Wyniki badań wskazują na prawdopodobne odkształcenia ściany naczynia wywołane pulsacyjnym przepływem krwi. Pole ciśnienia uzyskane podczas prowadzonych badań modelowych również wydaje się wiarygodne. Maksymalna lokalna prędkość występująca w domenie obliczeniowej wystąpiła w najwęższym przekroju poprzecznym naczynia.

Literatura:

- [1] Source of medical data: <http://www.vascularmodel.org/> (accessed October 25th 2016)
- [2] Bazilevs Y., Takizawa K. and Tezduyar T. E. Computational fluid-structure interaction methods and applications. Wiley-Blackwell, 2013.

- [3] Crosetto P. et al., Fluid–structure interaction simulation of aortic blood flow, *Computers & Fluids* **43** (2011) 46–57
- [4] Neidlin M. et al., Investigation of hemodynamics during cardiopulmonary bypass: A multiscale Multiphysics fluid–structure–interaction study, *Medical Engineering and Physics* (2016) **38**(4):380–390

Podziękowania: Badania finansowane są przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu nr 2014/13/B/ST8/04225.

Poszukiwanie biomarkerów ekspozycji na promieniowanie powiązanych z białkiem Tis11/TTP

Justyna Mika, Joanna Polańska

Zakład Analizy Eksploracyjnej Danych, Instytut Automatyki, Politechnika Śląska, Gliwice, Polska

Tis11/TTP jest białkiem regulatorowym, które łączy się z miejscami ARE niektórych mRNA, kierując je na drogę degradacji lub blokując ich translację. Taki proces regulacji kontroluje ekspresję wielu genów powiązanych z odpowiedzią stresową i zapalną. Co ciekawe, w ludzkich limfocytach T napromieniowanych *ex vivo* zaobserwowano zależną od dawki nadekspresję genu kodującego Tis11/TTP. Uważa się, że geny powiązane z białkiem Tis11/TTP mogą służyć za biomarkery ekspozycji na promieniowanie, które dodatkowo rozróżniałyby odpowiedź zapalną od popromiennej.

W celu znalezienia opublikowanych targetów białka Tis11/TTP wykorzystano zarówno komercyjne narzędzie Ingenuity Pathway Analysis (IPA), jak i zaawansowany przegląd literaturowy. Studium to oparto na czterech popularnych bazach publikacji naukowych: Web of Science, Scopus, PubMed oraz ScienceDirect. Ze względu na brak numerów DOI dla wszystkich artykułów oraz odmienny dla każdej bazy sposób cytowania publikacji, zaproponowano algorytm przeszukiwania tekstu w celu detekcji wspólnych tytułów. Zaimplementowano metodę Levenstheina z odległością edycyjną, co pozwoliło na znalezienie 1138 unikatowych artykułów dotyczących interesującego zagadnienia. Spośród targetów wyodrębnionych z abstraktów oraz tytułów publikacji można wyróżnić geny kodujące kinazy, miRNA, czy czynniki transkrypcyjne. Najczęściej cytowanym powiązaniem z białkiem Tis11/TTP była cytokina TNF α . Łącznie znaleziono 375 targetów białka Tis11/TTP, które następnie zostały poddane wstępnej walidacji przy wykorzystaniu bazy ARE Database, zawierającej informacje na temat mRNA z regionami ARE. Na tej podstawie wybrano 86 genów będących kandydatkami biomarkerami ekspozycji na promieniowanie.

Za pomocą metody RT-qPCR przebadano ekspresję wybranych genów pod wpływem działania niskich oraz wysokich dawek promieniowania oraz różnych dawek czynnika zapalnego (LPS lub flagellina). Próbkę krwi pochodziły od 14 pacjentów. Sprawdzono odpowiedź genów po czasie 6 i 24 godzin od napromieniowania. Wartości ekspresji genów zostały znormalizowane z wykorzystaniem metody $\Delta\Delta C_t$, co pozwoliło na ich analizę porównawczą z uwzględnieniem czynnika zapalnego oraz promieniowania.

Przedstawiony algorytm wspomógł oraz przyspieszył proces przeglądu literatury. Pozwolił na znalezienie dużej liczby opublikowanych powiązań z białkiem Tis11/TTP oraz dostarczył listę genów kandydatkich pod względem zastosowań w bioindykacji. Analiza ekspresji wybranych genów pozwoliła na ich podział pod względem możliwości wykorzystania w celach detekcji zapalenia lub promieniowania. Wykazała także różnice pomiędzy zastosowaniem LPS lub flagelliny w celu wywołania reakcji zapalnej oraz zmienną odpowiedź w czasie dla wybranych genów.

Praca naukowa finansowana ze środków Komisji Europejskiej [EU; OPERRA, 604984, VIBRATO] oraz ze środków finansowych na naukę w latach 2016 - 2017 przyznanych na realizację projektu międzynarodowego współfinansowanego nr 3562/7.PR-EURATOM/2016/2 (JP), oraz z projektu Politechniki Śląskiej BKM/506/RAU1/2016/27 (JM)

Synergia działania chelatorów żelaza i egzogennych fotouczulaczy.

Anna Mrozek-Wilczkiewicz^{a,b}, Katarzyna Malarz^c, Marzena Rams-Baron^{a,b}, Maciej Serda^c,
Franz-Peter Montforts^d, Alicja Ratuszna^{a,b}, Jarosław Polański^c, Robert Musioł^c

^aUniwersytet Śląski, Instytut Fizyki im. Augusta Chełkowskiego, ul. Uniwersytecka 4, Katowice 40-007, Polska

^bUniwersytet Śląski, Śląskie Międzyuczelniane Centrum Edukacji i Badań, ul. 75 Pułku Piechoty 1A, Chorzów 41-500, Polska

^cUniwersytet Śląski, Instytut Chemii, ul. Szkolna 9, Katowice 40-006, Polska

^dUniwersytet w Bremen, Instytut Chemii Organicznej, Leobener Strasse NW2C, D-28359 Bremen, Niemcy

U podstaw terapii fotodynamicznej leży zjawisko aktywacji światłem fotouczulacza selektywnie działającego na komórki nowotworowe. Ta atrakcyjna metoda leczenia może być wzbogacona o małowiązujące związki o własnościach chelatujących jony metali. Pochodne tiosemikarbazonu cieszą się obecnie dużym zainteresowaniem ze względu na ich wysoką aktywność antyproliferacyjną^{1,2}. Własności te mogą zostać wykorzystane w terapii kombinowanej z zastosowaniem leków z grupy porfiryn. Rezultatem kontynuacji naszych badań nad terapią łączoną jest znalezienie kilku atrakcyjnych, pod względem terapeutycznym, połączeń pochodnych tiosemikarbazonu zarówno z wewnątrzkomórkowymi (protoporfiryna IX), jak i zewnątrzkomórkowymi (chloryny) fotouczulaczami³. Mechanizm działania obu składowych opiera się na generowaniu reaktywnych form tlenu, co tłumaczy ich synergistyczne działanie. W celu potwierdzenia naszej hipotezy przeprowadziliśmy testy z użyciem związku referencyjnego DFO, będącego efektywnym chelatorem, jednakże nie generującym reaktywnych form tlenu. W tym przypadku zaobserwowano działanie addytywne, bądź słabo antagonistyczne. Rezultat sugeruje, że udział chelatora w reakcjach rodnikowych determinuje jego aktywność biologiczną. Nasza teoria została również potwierdzona szeregiem badań z zakresu metod determinujących występowanie stresu oksydacyjnego.

Bibliografia:

1. Serda M, Kalinowski DS, Rasko N, et al. Exploring the Anti-Cancer Activity of Novel Thiosemicarbazones Generated through the Combination of Retro-Fragments: Dissection of Critical Structure-Activity Relationships. *PLoS One*. 2014;9(10):e110291.
2. Bernhardt P V, Caldwell LM, Chaston TB, Chin P, Richardson DR. Cytotoxic iron chelators: characterization of the structure, solution chemistry and redox activity of ligands and iron complexes of the di-2-pyridyl ketone isonicotinoyl hydrazone (HPKIH) analogues. *J Biol Inorg Chem*. 2003;8(8):866-880.
3. Mrozek-Wilczkiewicz A, Serda M, Musioł R, et al. Iron chelators in photodynamic therapy revisited: synergistic effect by novel highly active thiosemicarbazones. *ACS Med Chem Lett*. 2014;5(4):336-339.

Oktakarboksyftalocyjanina galu jako potencjalny fotosensibilizator w terapii PDT

Joanna Nackiewicz¹, Marta Kliber-Jasik², Magdalena Skonieczna^{3,4}

¹Katedra Chemii Nieorganicznej, Wydział Chemii Uniwersytet Opolski w Opolu, e-mail:

Joanna.Nackiewicz@uni.opole.pl

²Zakład Chemii Fizycznej i Modelowania Molekularnego, Wydział Chemii Uniwersytet Opolski w Opolu,

³Zakład Inżynierii Systemów, Instytut Automatyki, Politechnika Śląska, Gliwice, Polska

⁴Centrum Biotechnologii, Politechnika Śląska, Gliwice, Polska

Ftalocyjaniny jako syntetyczne analogi porfiryn są od wielu lat intensywnie badane pod kątem ich potencjalnego wykorzystania w terapii PDT. Ftalocyjaniny należą do organicznych związków aromatycznych, które w swej strukturze posiadają makropierścień zawierający 18 zdelokalizowanych elektronów π [1]. Kompleksy ftalocyjanin z metalami, zawierające w centrum pierścienia metale takie jak: cynk, glin czy gal wykazują interesujące właściwości jako fotosensibilizatory. Do tych właściwości można zaliczyć m. in.: stabilność chemiczną, fluorescencję, niską toksyczność przed naświetlaniem [2]. Obecność ośmiu grup karboksylowych podstawionych odpowiednio do pierścieni benzenowych znacznie poprawia rozpuszczalność tych związków w rozpuszczalnikach polarnych, np. w wodzie. Kompleksy oktakarboksyftalocyjaniny można zatem wykorzystać jako fotosensibilizatory do badań w układach biologicznych.

Spośród przebadanych fotouczulaczy, najlepszą selektywność wobec komórek nowotworowych wykazały te zawierające w centrum aktywnym gal. Wszystkie związki (Zn-PDT, Al-PDT, Ga-PDT) wnikają do komórek w krótkim czasie, i osiągają maksymalne wewnątrzkomórkowe stężenie już po 4-6 h preinkubacji. W związku z tym terapię PDT w układzie *in vitro* podjęto już w pierwszej dobie, gdzie wpływ fotouczulaczy testowano wobec linii komórkowych czerniaka ludzkiego Me45 oraz prawidłowych fibroblastów NHDF i keratynocytów HaCaT. Cytotoksyczność wobec wszystkich linii badano testem MTS, gdzie po podaniu związków [30 μ M] oraz ekspozycji na promieniowanie IR [600-690 nm] oceniano żywotność komórek w przeciągu 24 h. Dodatkowo, zgodnie z założonym mechanizmem molekularnym terapii PDT, w komórkach oceniano cytometrycznie poziom wygenerowanych reaktywnych form tlenu (ROS) oraz indukcję apoptozy (Anexin-v assay). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że najlepszą selektywność wobec komórek nowotworowych Me45 wykazały związki zawierające Ga, działają one efektywnie również w niższych zakresach stężeniowych [6 μ M], ponieważ indukują one najskuteczniej w tej linii apoptozę oraz wpływają na podniesienie wewnątrzkomórkowego poziomu ROS.

Literatura:

[1]. Weber A., Ertel T. S., Reinohl U., Bertagnolli H., Leuze M., Hees M. i Hanack M.: Eur. J. Inorg. Chem., 2000, 2289–2294.

[2]. Allen C.M, Sharman W.M, Van Lier J.E. J. Porphyrins Phthalocyanines 2001, 5, 161-169.

Reakcja Maillarda w dżemach owocowych – potencjalne korzyści i zagrożenia dla organizmu

mgr Agnieszka Nowak, dr hab. n. med. Krystyna Tyrpień-Golder prof. nadzw. SUM

Katedra i Zakład Chemii Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Obróbka termiczna produktów spożywczych ma na celu poprawienie ich walorów organoleptycznych. Pociąga jednak za sobą wiele zmian o naturze fizykochemicznej. Jedną z takich przemian jest reakcja Maillarda, która zachodzi w obecności cukrów redukcyjnych i aminokwasów. Jej intensywność, przebieg oraz rodzaj produktów zależą między innymi od temperatury, ciśnienia i pH środowiska. Najbardziej zauważalnym efektem reakcji Maillarda jest brązowienie pieczywa i mięsa podczas pieczenia.

Reakcja ta zachodzi również podczas produkcji dżemów, popularnych przetworów owocowych. Dżemy zastępują owoce sezonowe w czasie, gdy nie są one dostępne w nieprzetworzonej formie, zawierają również wiele cennych substancji obecnych w roślinach i witamin. Owoce i ich przetwory są kojarzone ze zdrową dietą zawierającą odpowiednią ilość materiału pochodzenia roślinnego. Istotna jest zatem analiza wpływu obróbki termicznej na jakość dżemów, także w kontekście różnorodnych produktów reakcji Maillarda (MRPs).

Produkcja dżemu owocowego opiera się na długotrwałym ogrzewaniu go (często trwającym wiele godzin, jak w przypadku tradycyjnych powideł śliwkowych), dodawaniu cukru, witamin, substancji modyfikujących konsystencję czy też wpływających na kwasowość produktu. W warunkach przemysłowych można osiągnąć niższe temperatury gotowania dzięki zastosowaniu obniżonego ciśnienia. Zarówno czynniki fizyczne, jak i substancje dodatkowe mogą wpływać na przebieg reakcji Maillarda. Pomimo małej zawartości białka w porównaniu z innymi pokarmami, dżemy wykazują relatywnie duże ilości pewnych produktów tej reakcji. Produkty te to pochodne kancerogennego furfuralu, np. hydroksymetylofurfural. W dżemach owocowych wykryto również niebezpieczne aminy heterocykliczne, glioksal, metyloglioksal, diacetyl oraz prooksydanty.

Podczas reakcji Maillarda powstają brązowe barwniki, tzw. melanoidyny. Substancje te mają charakter antyoksydacyjny i powstają w większych ilościach, gdy obróbka cieplna jest intensywniejsza. Jednakże w trakcie produkcji oraz przechowania spada ilość przeciwutleniaczy pochodzenia roślinnego, np. antocyjanów (nie tylko w wyniku działania temperatury, ale również z powodu rozcieńczania materiału roślinnego dodawanymi substancjami słodzącymi).

Produkty reakcji Maillarda mogą być niebezpieczne, ale z drugiej strony mogą korzystnie wpływać na organizm – przez powstające w jej trakcie przeciwutleniacze. Efektem reakcji jest zmniejszenie wartości odżywczej produktu ze względu na zużycie i zniszczenie aminokwasów. Analiza wpływu omawianej reakcji na jakość dżemu owocowego może przynieść wiele korzyści dla produkcji dżemów. Pozwoli na takie dostosowanie parametrów produkcji, aby zminimalizować straty aminokwasów, ograniczyć powstawanie związków niebezpiecznych i promować syntezę antyoksydantów.

Wpływ stochastycznej lokalizacji progów na los komórki w modelu z przełączeniami białka p53

Magdalena Ochab, Krzysztof Puszyński

Zakład Inżynierii Systemów, Instytut Automatyki, Politechnika Śląska, Gliwice, Polska

Modele z przełączeniami w teorii automatyki należą do klasy systemów hybrydowych, w których w określonym czasie lub przy określonym stanie układu następuje skokowa zmiana parametrów lub struktury modelu. Zastosowanie modeli z przełączeniami pozwala na przedstawienie skomplikowanej, nieliniowej dynamiki procesów biologicznych poprzez zbiór liniowych modeli oraz zasad definiujących przełączanie między nimi. Uproszczony model modułu regulatorowego białka p53 można przedstawić poprzez układ złożony z 4 zmiennych stanu dla następujących białek: p53, cytoplazmatycznego MDM2, jądrowego MDM2 oraz PTEN wraz z wartościami progowymi, określającymi poziomy zmiennych przy których następuje przełączenie. Wpływ zewnętrznego stresu jest modelowany poprzez zwiększenie wartości parametru regulującego tempo degradacji białka MDM2.

W celu zbadania odpowiedzi heterogenicznej populacji komórkowej na wymuszenie zewnętrzne w postaci promieniowania IR wprowadzono randomizację lokalizacji progów. W efekcie każda symulacja odpowiada pojedynczej komórce, która ma charakterystyczną wrażliwość aktywacji różnych procesów. Zbadano zróżnicowanie populacji komórkowej pod względem aktywacji odpowiedzi na zewnętrzny stres oraz aktywacji ekspresji genów pod wpływem białka p53. Ponadto zbadano wpływ losowego ułożenia wszystkich progów w modelu. Wyniki pokazują zróżnicowanie populacji ze względu na odpowiedź komórkową: powrót do stanu normalnego, blokada cyklu komórkowego oraz apoptoza. Ponadto zaobserwowano zróżnicowanie w czasie odpowiedzi na stres oraz pojawienie się nowego typu oscylacji w poziomach białek, które można odnieść do zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu modułu regulatorowego białka p53.

Praca była finansowana w ramach projektu BKM/506/RAU1/2016/15 (MO) oraz DEC-2013/11/B/ST7/01713 (KP).

Analiza systemów antyoksydacyjnych w komórkach napromienionych

Aleksandra Poterała-Hejmo, Karolina Gajda, Magdalena Skonieczna, Joanna Rzeszowska

Politechnika Śląska, Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Zakład Inżynierii Systemów, Gliwice

Stres oksydacyjny to stan zaburzonej równowagi pomiędzy poziomem reaktywnych form tlenu, a zdolnością komórki do ich neutralizacji – w tym poziomie antyoksydantów. Indukowana promieniowaniem jonizującym nadprodukcja reaktywnych form tlenu może prowadzić do uszkodzeń w obrębie białek, lipidów i kwasów nukleinowych a w konsekwencji do mutacji lub apoptozy.

W ramach projektu analizowane są zmiany poziomu enzymów antyoksydacyjnych w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące.

W komórkach nowotworu jelita grubego HCT116 ekspozowanych na promieniowanie jonizujące o dawce 4Gy zaobserwowano wtórną produkcję reaktywnych form tlenu, w tym anionorodnika ponadtlenkowego oraz wzrost ekspresji genów kodujących tioredoksynę (TXN) oraz reduktazę tioredoksyny (TXNRD1). Uzyskane wyniki wskazują, że poziom ROS oraz ekspresja tioredoksyny i reduktazy tioredoksyny w komórkach napromienionych zależą od obecności funkcjonalnego białka p53.

Praca finansowana ze środków BKM -506/RAU1/2016 t. 23 (A.P.H), UMO-2015/19/ST7/02984 (J.R.)

Przetwarzanie danych obrazowych MRI

Krzysztof Psiuk-Maksymowicz

Politechnika Śląska, Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Zakład Inżynierii Systemów, Gliwice

Celem pracy jest opracowanie subpopulacyjnego polskiego atlasu MRI mózgu jako narzędzia do normalizacji, przetwarzania i analizy obrazu. Atlasy MRI mózgu, oraz mapy prawdopodobieństw występowania poszczególnych struktur mózgu (np. istoty szarej, istoty białej, płynu mózgowo-rdzeniowego) mają szerokie zastosowanie w diagnostyce obrazowej. Mogą być wykorzystywane m.in. w badaniach rozwoju mózgu dzieci, czy też w badaniach diagnostycznych chorób neurodegeneracyjnych. Na podstawie zbioru obrazów MRI sekwencji T1 zebranych od 99 osób udało się utworzyć mapy prawdopodobieństw struktur mózgu, również z podziałem na płeć oraz wiek. Badania wykazały różnice w mapach pomiędzy grupami o odmiennej płci oraz pomiędzy niektórymi mapami pochodzenia zewnętrznego. Nie wykazano różnic w grupach wiekowych.

Analiza trendów zmian strukturanych w genomie w odpowiedzi na wybrane dawki promieniowania jonizującego

Bożena Rolnik¹, Najla Al-Harbi², Sara Bin Judia², Salma Majid², Ghazi Alsbeih², Joanna Polańska¹

¹Zakład Analizy Eksploracyjnej Danych, Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Politechnika Śląska
²Faisal Specialist Hospital & Research Centre, Riyadh 11211, Kingdom of Saudi Arabia

Promieniowanie jonizujące jest jednym z czynników powodujących powstawanie uszkodzeń w materiale genetycznym. Jego działanie sprowadza się zarówno do powstawania bezpośrednich uszkodzeń pod wpływem zaabsorbowania dawki wysokoenergetycznego promieniowania, jak i pośrednio wpływając na poziom stresu oksydacyjnego poprzez zwiększanie ilości wolnych rodników tlenowych w procesie radiolizy wody. W wyniku tych działań dochodzi m.in. do pęknięć łańcucha DNA i uruchomienia procesów naprawczych, które mają na celu odtworzenie zaburzonej struktury genomu. W przypadku kiedy uruchomione mechanizmy okazują się niewystarczające, bądź działanie mechanizmów jest wadliwe powstające uszkodzenia mogą zostać zachowane w postaci zmian strukturalnych charakteryzujących się zwielokrotnieniem (amplifikacją), lub usunięciem fragmentów materiału genetycznego.

Cel: Celem prowadzonych badań była analiza typów zmian zachodzących w komórkach pod wpływem wybranych dawek promieniowania jonizującego pod kątem odnalezienia trendów zmian w komórkach o normalnej i zwiększonej wrażliwości na promieniowanie.

Metodyka pracy: Dane pochodzą z eksperymentu mikromacierzowego z wykorzystaniem platformy CytoScan HD firmy Affymetrix dla linii komórkowej o normalnej i zwiększonej wrażliwości na promieniowanie. Typ powstających zmian strukturalnych określano jako insercje (w przypadku zwielokrotnienia fragmentów materiału genetycznego), albo delecje (w przypadku usunięcia fragmentów materiału genetycznego). Do określenia typu powstających zmian posłużono się Modelem Mieszanin Gaussowskich (GMM, ang. Gaussian Mixture Model) wykorzystując go do zamodelowania rozkładu SLR (ang. Signal Log Ratio) jako sumy trzech składowych: składowej insercji, składowej delecji oraz składowej braku istotnych zmian. Określone typy zmian posłużyły do stworzenia trendów odpowiedzi na wybrane, rosnące dawki promieniowania jonizującego, które następnie pogrupowano w obrębie linii komórkowych.

Wyniki: W wyniku wykonanej analizy zaobserwowano trendy charakterystyczne dla danej linii komórkowej (o zwiększonej oraz normalnej odpowiedzi na promieniowanie jonizujące). Pojawiły się również trendy wspólne dla obu linii komórkowych, co wskazuje na podobieństwo w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące w tych fragmentach genomu.

Acknowledgements: Praca była finansowana w ramach grantu Politechniki Śląskiej BK/213/Rau1/2016/t.10 (JP,BR) i projektu NCN Harmonia 2013/08/M/ST/00924 (JP,GA). Obliczenia zostały wykonane z wykorzystaniem infrastruktury GeCONiI (POIG.02.03.01-24-099/13).

Profil ekspresji genów w raku brodawkowym tarczycy w zależności od występowania mutacji w genach BRAF oraz TERT

Rusinek Dagmara, Cieślicka Marta, Pfeifer Aleksandra, Szpak-Ulczo Sylwia, Czarniecka Agnieszka, Krajewska Jolanta, Kowalska Małgorzata, Halczok Monika, Chmielik Ewa, Zembala-Nożyńska Ewa, Cyplińska Renata, Oczko-Wojciechowska Małgorzata, Jarzab Barbara

Rak brodawkowy tarczycy (PTC) jest pierwszy pod względem częstości występowania wśród raków tarczycy. Najczęściej występującą mutacją w przypadku tego nowotworu jest mutacja BRAF V600E. U części chorych występuje ona razem z mutacją w genie TERT – C250T oraz C288T – co ma związek ze zwiększoną agresywnością nowotworu.

W poniższym badaniu wykorzystano 54 mikromacierze ekspresyjne Human Gene 1.0 ST firmy Affimetrix. Wśród próbek w siedemnastu występowała jedynie mutacja V600E w genie BRAF, a w ośmiu dodatkowe mutacje w genie TERT (dwie próbki z mutacją C250T i sześć C288T). Dane mikromacierzowe zostały poddane przetwarzaniu wstępnemu z wykorzystaniem algorytmów fRMA oraz ComBat – dodatkowy krok przetwarzania był konieczny ze względu na występujący w danych efekt serii powstały na etapie przygotowania mikromacierzy. Po przeprowadzeniu analizy głównych składowych na wstępnie przetworzonych danych, w pierwszych dwóch głównych składowych można było zaobserwować grupowanie się próbek ze względu na obecność oznaczonych mutacji. W analizie ekspresji wykorzystano test t-Studenta. Na podstawie wyniku testu wybrano geny o istotnej statystycznie ($FDR < 0.05$) różnicy w ekspresji między próbkami, w których wystąpiła mutacja w genie BRAF od tych, w których nie była ona obecna – wybrano 2623 geny różnicujące. Taką samą analizę przeprowadzono porównując próbki z mutacją tylko w genie BRAF z tymi, w których wystąpiła mutacja również w genie TERT – 9 genów okazało się mieć istotną statystycznie różnicę w ekspresji.

Na danych ekspresyjnych policzono dwa współczynniki charakterystyczne dla danych tarczycowych: Thyroid Differentiation Score (TDS) oraz BRAF-like, RAS-like score (BRS). Wartości TDS opartego na ekspresji genów charakterystycznych dla tarczycy nie wykazały istotnej statystycznie różnicy między próbkami z mutacją w genie BRAF od tych z mutacją w genach BRAF oraz TERT ($p=0.17$). W przypadku BRS na podstawie wizualnej oceny heatmapy stwierdzono wyraźne zróżnicowanie między próbkami z mutacją oraz bez mutacji w genie BRAF, przy czym obecność mutacji w genie TERT nie miała wpływu na wartość policzonego współczynnika. W analizie genów związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym wykazano, iż próbki różnicują się głównie ze względu na obecność mutacji BRAF V600E, analiza głównych składowych wykazała również tendencję do różnicowania się próbek ze względu na obecność mutacji TERT.

Powyższa analiza wykazała tendencje do występowania różnic w profilu ekspresji genów w PTC ze względu na obecność mutacji w genach BRAF oraz TERT, jednakże konieczne są dalsze badania w celu potwierdzenia tych obserwacji.

Źródła finansowania: projekt „Nowe narzędzia diagnostyki molekularnej i obrazowania w indywidualizowanej terapii raka piersi, tarczycy i gruczołu krokowego” [MILESTONE]: STRATEGMED2/267398 /4/NCBR/2015.

Różnicowanie ADSC w kierunku nabłonka rogówki

Bartosz Sikora^{1*}, Aleksandra Skubis¹, Bartłomiej Skowronek², Klaudia Simka²,
Urszula Mazurek¹

¹Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z OML, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Wydział Zdrowia Publicznego, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

*e-mail do korespondencji: bartoszsikora90@gmail.com

Komórki macierzyste od wielu lat stanowią interesujący obiekt badań naukowców z całego świata. Nieograniczona zdolność do podziałów i tym samym odbudowy rezerwuaru tych komórek w organizmie człowieka a także zdolność do różnicowania w inne typy spowodowała, że obecnie z powodzeniem komórki macierzyste są wykorzystywane w medycynie regeneracyjnej. Udowodniono, że poza wysokim potencjałem proliferacyjnym oraz możliwością przekształcenia się w inny rodzaj, komórki macierzyste posiadają także właściwości stymulujące do namnażania i poprawę żywotności.

ADSC to mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej. Posiadają zdolność do przekształcania się w wiele typów komórek. Cechą charakterystyczną jest różnicowanie się w kierunku osteocytów, chondrocytów oraz adipocytów. Pewne badania wskazują, że mezenchymalne komórki macierzyste posiadają zdolność do różnicowania się nie tylko w kierunku mezodermy, ale również pozostałych dwóch listków zarodkowych.

Nabłonkowe komórki rąbka rogówki wykazują ekspresję markerów takich jak cytokeratyna 3, cytokeratyna 12, koneksyna 43, integryny oraz kadheryny. Białka te są charakterystyczne dla komórek już zróżnicowanych, natomiast komórki progenitorowe tj. rąbkowe komórki macierzyste (LESC) wykazują ekspresje białek takich jak: cytokeratyna 5, cytokeratyna 19 oraz wimentyna.

Celem badania jest określenie czy mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej wykazują zdolność do różnicowania w kierunku komórek nabłonka rogówki. W tym celu przeprowadzono hodowlę w układzie kokultury mającą na celu zaindukowanie różnicowania. Komórki linii ADSC (PT-5006, Lonza) hodowano w kokulturze z limbalnymi komórkami macierzystymi (LESC) wyizolowanymi z rąbka rogówki świni. Hodowlę prowadzono przez 14 dni. Po przeprowadzeniu eksperymentu wyekstrahowano całkowite RNA z wykorzystaniem odczynnika Trizol. Analizę badanych genów oceniano techniką RTqPCR z wykorzystaniem zestawu SYBR GREEN Quanti Tect (Qiagen).

Analiza wykazała, że komórki macierzyste rąbka rogówki już po 14 dniach hodowli w kokulturze wpływają na fenotyp mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej. Sugeruje to, że być może mogłyby one zostać wykorzystane w regeneracji uszkodzeń rogówki jednakże wymagana jest dalsza optymalizacja procesu różnicowania i poszerzenie panelu badania.

Wpływ cukrzycy typu 2 na ekspresję genu CD90 w mezenchymalnych komórkach macierzystych z tkanki tłuszczowej różnicowanych w kierunku osteoblastów.

Klaudia Simka¹, Bartłomiej Skowronek¹, Aleksandra Skubis², Bartosz Sikora², Agnieszka Witkowska³, Urszula Mazurek², Małgorzata Muc-Wierzoń¹

¹Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

³Katedra Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC, ang. mesenchymal stem cells) to somatyczne, niehematopoetyczne komórki macierzyste, wykazujące wysoki potencjał terapeutyczny. Procedurę ich identyfikacji można przeprowadzić na podstawie ekspresji białek powierzchniowych takich jak: CD29, CD44, CD73, CD90 oraz CD105. CD90 (Thy-1) to mała glikoproteina, znajdującą się na powierzchni błony komórkowej licznych komórek, uczestnicząca w adhezji oraz komunikacji międzykomórkowej. Białko to jest ważnym markerem mezenchymalnych komórek macierzystych.

Mezenchymalne komórki macierzyste posiadają zdolność do różnicowania się w kierunku osteoblastów, chondrocytów i adipocytów. Obecnie prowadzone są badania nad wykorzystaniem MSC w terapii licznych schorzeń. W medycynie regeneracyjnej wykorzystuje się zwykle autologiczne MSC, pozyskane z tkanki tłuszczowej pacjenta. Takie rozwiązanie jest wyjątkowo korzystne ze względu na niskie ryzyko odrzutu przeszczepu. Niestety, wiele doniesień naukowych sugeruje, iż cukrzyca typu 2 ma niekorzystny wpływ na właściwości proliferacyjne oraz zdolność dyferencjacji komórek macierzystych, co prowadzi do redukcji ich zdolności terapeutycznych, a tym samym ogranicza możliwość ich zastosowania w terapii.

Celem badania było wyznaczenie poziomu ekspresji genu kodującego białko powierzchniowe CD90 po 7, 14 oraz 21 dniach różnicowania MSC, pozyskanych od osób ze zdiagnozowaną cukrzycą typu 2 oraz osób zdrowych, w kierunku osteoblastów.

Mezenchymalne komórki macierzyste pozyskano z tkanki tłuszczowej pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycą typu 2 leczonych metforminą oraz pacjentów zdrowych. Identyfikację komórek przeprowadzono z zastosowaniem cytometrii przepływowej oraz techniki RT-qPCR. Ekstrakcję całkowitego RNA wykonano z zastosowaniem odczynnika Trizol, zgodnie z protokołem producenta. Profil ekspresji genu kodującego białko CD90 wyznaczono metodą RT-qPCR. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z wykorzystaniem licencjonowanej wersji programu Statistica 12 PL.

Ekspresja genu kodującego białko CD90 po 7, 14, i 21 dniach różnicowania MSC w kierunku osteoblastów maleje w kolejnych dniach hodowli różnicującej. Dla obydwu badanych grup zaobserwowano istotny statystycznie spadek ekspresji genu kodującego białko CD90 podczas różnicowania się MSC w kierunku osteoblastów.

Uzyskane wyniki wskazują, iż cukrzyca typu 2 nie wpływa na potencjał oraz zdolność do różnicowania się mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku osteoblastów.

Skuteczność acelularyzacji tkanek świńskich w eliminacji zagrożenia transmisji wirusów

Bartłomiej Skowronek¹, Aleksandra Niemieć-Cyganek³, Klaudia Simka¹, Bartosz Sikora²,
Aleksandra Skubis², Celina Kruszniewska-Rajs², Piotr Wilczek³, Urszula Mazurek², Teresa
Kokot¹

¹Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Wydział Zdrowia Publicznego, Śląski
Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z OML, Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

³Pracownia Bioinżynierii, Fundacja Rozwoju Kardiologii im. prof. Zbigniewa Religi w Gliwicach

W ostatnim okresie czasu medycyna regeneracyjna stara się łączyć acelularyzowane tkanki pochodzenia zwierzęcego z autologicznymi komórkami pacjenta. Taka metoda, pozwala na zniwelowanie ryzyka odrzutu tak skonstruowanego przeszczepu tkanek, których przeszczep autologiczny jest trudny lub nawet niemożliwy do wykonania. Acelularyzacja jest techniką polegającą na eradykacji z macierzy kolagenowej natywnych komórek, pozostawiając rusztowania nadające się do zasiedlenia nowymi komórkami. Jednak stosowanie tkanek pochodzenia zwierzęcego niesie ze sobą ryzyko przeniesienia patogenów. Jednym z najczęściej wykorzystywanych zwierząt do roli „dawców” acelularnych tkanek są świnię, jednakże na stałe związane z ich tkankami są świńskie endogenne retrowirusy (PERV) mogące, w sprzyjających warunkach, infekować również tkanki ludzkie.

Niniejsze badanie ma na celu sprawdzenie skuteczności acelularyzacji w usuwaniu materiału genetycznego świńskich endogennych retrowirusów.

Tkanki świńskie zostały podane acelularyzacji. Z 12 natywnych i 12 acelularyzowanych tkanek wyizolowano DNA metodą wysalania oraz RNA metodą fenolowo-chloroformową. Ocenę stężenia kwasów nukleinowych dokonano przy pomocy pomiaru spektrofotometrycznego. Wyizolowany materiał został następnie wykorzystany jako matryca w ilościowej reakcji PCR, która posłużyła do oceny kopii świńskich endogennych retrowirusów.

Wstępne wyniki badań wskazują, że proces acelularyzacji nie jest w pełni skuteczny w kompletnej eradykacji kwasów nukleinowych z badanych próbek na co wskazują pomiary absorbancji i wyniki reakcji RT-qPCR oraz qPCR.

Analiza genu kodującego osteopontynę w mezenchymalnych komórkach macierzystych pochodzących od pacjentów z cukrzycą typu 2 poddanych osteogenezie

Aleksandra Skubis¹, Bartosz Sikora¹, Agnieszka Witkowska², Bartłomiej Skowronek³,
Klaudia Simka³, Urszula Mazurek¹

¹Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z OML, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Katedra Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

³Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Wydział Zdrowia Publicznego, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

adres e-mail do korespondencji: aleksandra.skubis@gmail.com

Osteogeneza czyli kościotworzenie jest naturalnym procesem związanym z organogenezą oraz regeneracją. Komórkami odpowiedzialnymi za przebudowę kości są osteoblasty; komórki wywodzące się z komórek mezenchymalnych, które tworzą osteoid i doprowadzają do mineralizacji macierzy kostnej. Bogatym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych jest tkanka tłuszczowa. Problem stanowi jednak potencjał MSC pochodzących od pacjentów z zaburzeniami metabolicznymi. Badania wskazują, że komórki macierzyste pacjentów z cukrzycą mogą wykazywać mniejsze zdolności do różnicowania m.in. w kierunku osteoblastów.

Celem doświadczenia zróżnicowanie komórek macierzystych pobranych z tkanki tłuszczowej do osteoblastów. Otrzymane w ten sposób osteoblasty mogłyby zostać wykorzystane w przypadku nieprawidłowego zrośnięcia się kości po złamaniach lub wspomagać przeszczep tkanki kostnej.

Komórki macierzyste wyizolowano z tkanki tłuszczowej pacjentów z cukrzycą typu 2 leczonych metforminą (9 pacjentów) oraz pacjentów zdrowych (3 pacjentów). Tkanka tłuszczowa została pobrana metodą mikrolipoaspiracji na co została wydana zgoda komisji bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach: KNR/0022/KB1/82/II/15/16. Komórki hodowano w warunkach standardowych, a następnie dodano pożywkę różnicującą zawierającą: deksametazon, kwas askorbinowy oraz β glicerofosforan. Identyfikację komórek przeprowadzono z zastosowaniem cytometrii przepływowej w oparciu o ocenę białek kodujących markery komórek macierzystych: CD73, CD90, CD105. Całkowite RNA wyekstrahowano z zastosowaniem odczynnika Trizol zgodnie z zaleceniami producenta. Profil ekspresji genu kodującego białko CD90 wyznaczono metodą RT-qPCR z wykorzystaniem odczynnika SYBR Green (SYBR Green Quantitect RT-PCR Kit, Qiagen). Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica 12 PL.

Wyniki wskazują na różnice w mechanizmie procesu osteogenezy w warunkach *in vitro* w przypadku komórek pochodzących od pacjentów z cukrzycą typu 2 oraz od osób zdrowych. Jednak zmiany te zależą od czasu różnicowania komórek MSC. Statystycznie istotne zmiany między grupą badaną i kontrolną zaobserwowano głównie po 7 dniach różnicowania. Podobnych efektów nie zauważono po 14 i 21 dniach.

Wpływ zahamowania ekspresji białek szoku cieplnego HSPA na chemioporność komórek niedrobnokomórkowego raka płuca

Damian Sojka, Agnieszka Gogler-Piğłowska, Katarzyna Klarzyńska, Krystyna Klyszcz, Dorota Ścieglińska

¹Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej – Curie, Oddział w Gliwicach

Białka szoku cieplnego (ang. heat shock protein, HSP) to białka opiekuńcze, które są odpowiedzialne za utrzymanie proteostazy komórek. W wielu typach ludzkich nowotworów obserwuje się nadprodukcję HSP, co powiązано z opornością na leczenie przeciwnowotworowe oraz zmniejszoną przeżywalnością. Obserwacje te skłoniły badaczy, do podjęcia prób opracowania skutecznych inhibitorów HSP jako nowych leków przeciwnowotworowych.

HSPA2 człowieka jest słabo zbadanym przedstawicielem rodziny HSPA (HSP70), która grupuje kilkanaście białek o właściwościach cytoprotekcyjnych. Wysoki poziom HSPA2 występuje w komórkach spermatogenicznych, wyspecjalizowanych populacjach komórek somatycznych oraz w wielu typach nowotworowych linii komórkowych oraz guzów litych. **W oparciu o prace innej grupy badaczy uważa się, że HSPA2 jest zaangażowane w podtrzymywanie proliferacji oraz nasilanie zdolności migracyjnych i inwazyjnych linii komórek nowotworowych o różnym pochodzeniu (m.in. rak piersi i szyjki macicy).**

We wcześniejszych badaniach in vitro wykazaliśmy, że HSPA2 ulega nadprodukcji w liniach komórkowych i guzach niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC- Non-small-cellung carcinoma). **Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu białka HSPA2 na oporność komórek NSCLC na pochodne platyny, leki cytotoksyczne standardowo stosowane w terapii NSCLC. Do stabilnego i silnego obniżenia poziomu HSPA2 w kilku liniach komórkowych NSCLC wykorzystaliśmy technologię interferencyjnego RNA.** Zaobserwowaliśmy, że spadkowi poziomu HSPA2 nie towarzyszyło obniżenie żywotności komórek NSCLC, jak też komórek wywodzących się z raka piersi i raka szyjki macicy. Nie obserwowaliśmy także wpływu obniżenia poziomu HSPA2 na wrażliwość komórek na cisplatynę. Efekt taki obserwowano dopiero po zastosowaniu cisplatyny w skojarzeniu z chemicznymi inhibitorami aktywności białek rodziny HSPA. Odpowiedź komórek zależała od całkowitego poziomu białek HSPA, rodzaju użytego inhibitora oraz schematu podania związków.

Nasze wyniki sugerują, że obniżenie poziomu jednego białka rodziny HSPA, prawdopodobnie ze względu na występowanie zjawiska redundancji, nie zmienia wrażliwości komórek NSCLC na cisplatynę. Wydaje się, że dopiero hamowanie aktywności grupy białek HSPA, może zwiększać chemiowrażliwość komórek nowotworowych.

Efekty selekcji klonalnej podczas modyfikacji genomów za pomocą CRISPR/Cas9

Agnieszka Toma-Jonik, Joanna Korfanty, Marek Chadalski, Natalia Vydra, Wiesława Widłak

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów
Centrum Onkologii - Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-101 Gliwice
tel. 32 278 9637

System CRISPR/Cas9 jest sposobem wprowadzania zmian w sekwencji nukleotydowej DNA. Uważa się, że jest szybszy, tańszy i bardziej dokładny niż poprzednie techniki edycji DNA. W naszych badaniach wykorzystaliśmy system CRISPR-Cas9 firmy Clontech (z wektorem kodującym białko czerwonej fluorescencji oraz nukleazę Cas9) w celu usunięcia w komórkach linii HECa10 sekwencji HSE (heat shock element) w drugim intronie genu *Pmaip1*, będącej miejscem wiązania czynnika transkrypcyjnego HSF1. Zastosowaliśmy dwie sekwencje *guide RNA* (druga sekwencja została wprowadzona w wektorze kodującym białko zielonej fluorescencji), flankujące sekwencję HSE (tzw. *double nickase*). Celem eksperymentu było potwierdzenie, że obserwowana po szoku termicznym aktywacja genu *Pmaip1* zależy od wiązania HSF1 do sekwencji HSE obecnej w intronie.

Komórki HECa10, do których wprowadzono sekwencje kodujące *guide RNA* sortowano za pomocą cytometru na podstawie czerwonej i zielonej fluorescencji. Ponieważ w całkowitej puli tak otrzymanych komórek delekcja fragmentu DNA długości 42bp nie była widoczna, wyprowadzono klon z pojedynczych komórek, co jest rutynową procedurą zalecaną w systemie edycji genów metodą CRISPR/Cas9. Uzyskano i przetestowano za pomocą PCR (pod kątem delekcji HSE) 30 klonów. Jedynie w kilku klonach zaobserwowano skrócenie jednego z docelowych alleli sugerujące hemidelekcję. Wykonano sekwencjonowanie metodą Sangera produktu PCR wokół spodziewanej delekcji w sześciu klonach, które wykazało, że jedynie w jednym klonie została usunięta sekwencja HSE w jednym z alleli, natomiast w czterech doszło do nacięcia i naprawy DNA, bez delekcji sekwencji HSE.

Uzyskany klon z hemidelekcją sekwencji HSE wykazuje dwukrotnie obniżoną zdolność do indukcji *Pmaip1* pod wpływem szoku termicznego w porównaniu do komórek typu dzikiego. Efekt ten wydaje się być niespecyficzny, gdyż pozostałe linie komórkowe uzyskane z pojedynczych komórek charakteryzują się również zmniejszoną zdolnością do indukcji ekspresji *Pmaip1* przez szok termiczny (ale nie przez kamptotecynę, która działa za pośrednictwem p53). Także geny *Hsp70*, *Hsp105* i *Hsp25* (*Hspa1*, *Hsph1*, *Hspb1*) są znacznie słabiej indukowane. Prawdopodobną przyczyną tego efektu może być utrata heterogenności po selekcji pojedynczych komórek. Ocena wpływu HSF1 na ekspresję *Pmaip1* z użyciem tego modelu badawczego nie przyniosła rozstrzygających rezultatów.

Wpływ czynnika transkrypcyjnego HSF1 na fenotyp komórek piersi

Natalia Vydra, Agnieszka Toma-Jonik, Patryk Janus, Joanna Korfanty,
Wiesława Widłak

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut
im.M.Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, ul. Wybrzeże AK 15, Gliwice.

HSF1 (ang. Heat Shock Factor 1) jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym pod wpływem stresu środowiskowego, co prowadzi do wzmożonej ekspresji białek HSP (ang. Heat Shock Proteins). HSP to białka opiekuńcze, biorące udział w fałdowaniu innych białek i chroniące komórki przed apoptozą wywołaną działaniem stresu. W wielu typach nowotworów HSF1 i HSP ulegają zwiększonej ekspresji. Wykazano, że HSF1 może wspierać transformację nowotworową, a także ułatwiać przetrwanie zmienionych nowotworowo komórek modulując ścieżki sygnałowe związane ze wzrostem i proliferacją komórek, apoptozą, metabolizmem oraz ruchliwością komórek.

Celem prowadzonych badań jest zrozumienie roli HSF1 w nowotworowej transformacji komórek piersi indukowanej 17β -estradiolem (E2). Wykorzystujemy dwie nietumorigenne linii komórkowe wywodzące się z gruczołu piersiowego, MCF10a oraz MCF12a. Linie te, mimo, że zostały wyprowadzone w podobny sposób, różnią się morfologicznie. Wykazaliśmy, że MCF12a mają niektóre cechy komórek mezenchymalnych (ekspresja wimentyny), a w hodowli trójwymiarowej (3D) tworzą bardziej rozproszone struktury niż komórki MCF10a. W obu liniach obniżyliśmy ekspresję HSF1 za pomocą swoistych shRNA. W komórkach MCF10a prowadziło to do zmniejszenia tempa proliferacji, oraz do utraty zdolności tworzenia struktur przestrzennych w warunkach 3D. Pod koniec trzeciego tygodnia hodowli 3D komórek MCF10a z obniżoną ekspresją HSF1 obserwowano raczej obumierające organoidy, a nie w pełni zróżnicowane struktury pęcherzykowe. Obniżenie ekspresji HSF1 w komórkach MCF12a nie zmieniało tempa proliferacji, lecz komórki zaczynały tworzyć bardziej zróżnicowane struktury pęcherzykowe w hodowli 3D. Badając wzór ekspresji białek związanych z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym, zaobserwowaliśmy obniżenie ekspresji wimentyny w komórkach MCF12a z wyciszoną ekspresją HSF1. Zwiększenie ekspresji HSF1 poprzez wprowadzenie cDNA kodującego HSF1 za pomocą systemu lentiwirusowego do komórek MCF10a prowadziło do zwiększenia ekspresji wimentyny i obniżenia ekspresji E-kadheryny (marker komórek nabłonkowych). Uzyskane wyniki sugerują, że HSF1 może wspierać przejście komórek piersi do fenotypu mezenchymalnego ułatwiającego tworzenie przerzutów w nowotworach.

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, nr grantów 2014/13/B/NZ7/02341, 2015/17/B/NZ3/03760.

Uprzejmie prosimy o wypełnienie danych do wystawienia faktury i przekazanie ich drogą elektroniczną lub osobiście w trakcie konferencji, organizatorowi:

dr Jackowi Rogolińskiemu

rogolinski@io.gliwice.pl

Dane do faktury za uczestnictwo w konferencji:

Pełna Nazwa Instytucji			
Miasto		Kod pocztowy	
Ulica/Aleja/Plac		Nr	
NIP			
Imię i Nazwisko Uczestnika			
Wartość poniesionej opłaty			



CENTRUM ONKOLOGII – INSTYTUT
IM. MARIII SKŁODOWSKIEJ-CURIE
ODDZIAŁ W GLIWICACH

