Międzywydziałowe Koło Naukowe Biochemii Medycznej

Wydział Nauk Medycznych & Wydział Biologii i Biotechnologii

UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

Opiekun Koła Naukowego:

prof. dr hab. Elżbieta Kostyra, prof. zw.

Przewodniczący Koła Naukowego:

mgr Michał Matysiewicz

Kim jesteśmy?

- Międzywydziałowe Koło Naukowe Biochemii Medycznej istnieje **od 2011 roku.**
- Wcześniej Koło funkcjonowało jako *Koło Naukowe Biochemików* (założone w 2002 roku)
- Jesteśmy Kołem Naukowym zrzeszającym:
  - **studentów** Wydziału Biologii i Biotechnologii oraz Wydziału Nauk Medycznych
  - **doktorantów** Wydziału Biologii i Biotechnologii z Katedry Biochemii
- Obecnie Koło **zrzesza 9 członków**

Profil badawczy koła

Prowadzimy badania z zakresu biochemii medycznej, wykorzystując do tego posiadaną wiedzę, kreatywność, metody biologii molekularnej oraz technik hodowli komórkowych *in vitro*.

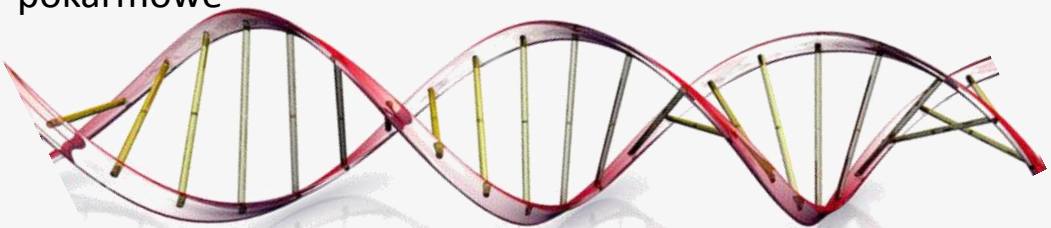
Prowadzimy badania z zastosowaniem nowotworowych linii komórkowych:

- **Caco-2 – linia raka okrężnicy,**
- **HCT116 – linia raka okrężnicy,**
- **MCF7 – linia raka piersi,**
- **HepG2 – linia raka wątroby,**

oraz **PBMC** (ang. peripheral blood mononuclear cel),

na których sprawdzamy cytotoksyczność związków biologicznie czynnych, transport związków przez monowarstwę komórkową, wpływ na proliferację komórek, wpływ na sekrecję cytokin oraz zmianę ekspresji wybranych genów (gł. *MOR - mu-opioid receptor*).

Dodatkowo prowadzimy badania nad wykrywaniem **mutacji punktowych SNP** u ludzi z uzależnieniami oraz różnymi zespołami chorobowymi takimi jak: ostre zapalenie trzustki, autyzm, nowotwory, alergie pokarmowe



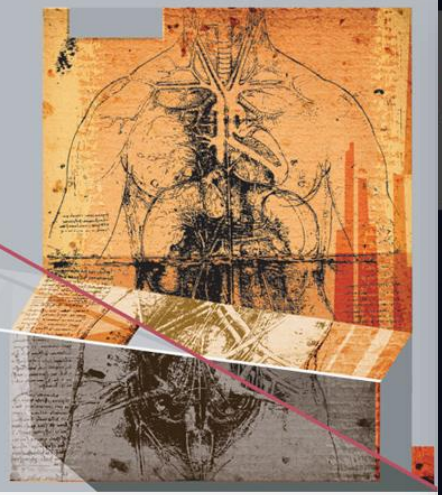
Przegląd działalność koła naukowego w roku akademickim 2013/2014

Wystąpienia ustne w Sekcji Nauk Medycznych

(Olsztyn, 14 maj 2014)

66 KONGRES TOWARZYSTWA CHIRURGÓW POLSKICH

WARSZAWA

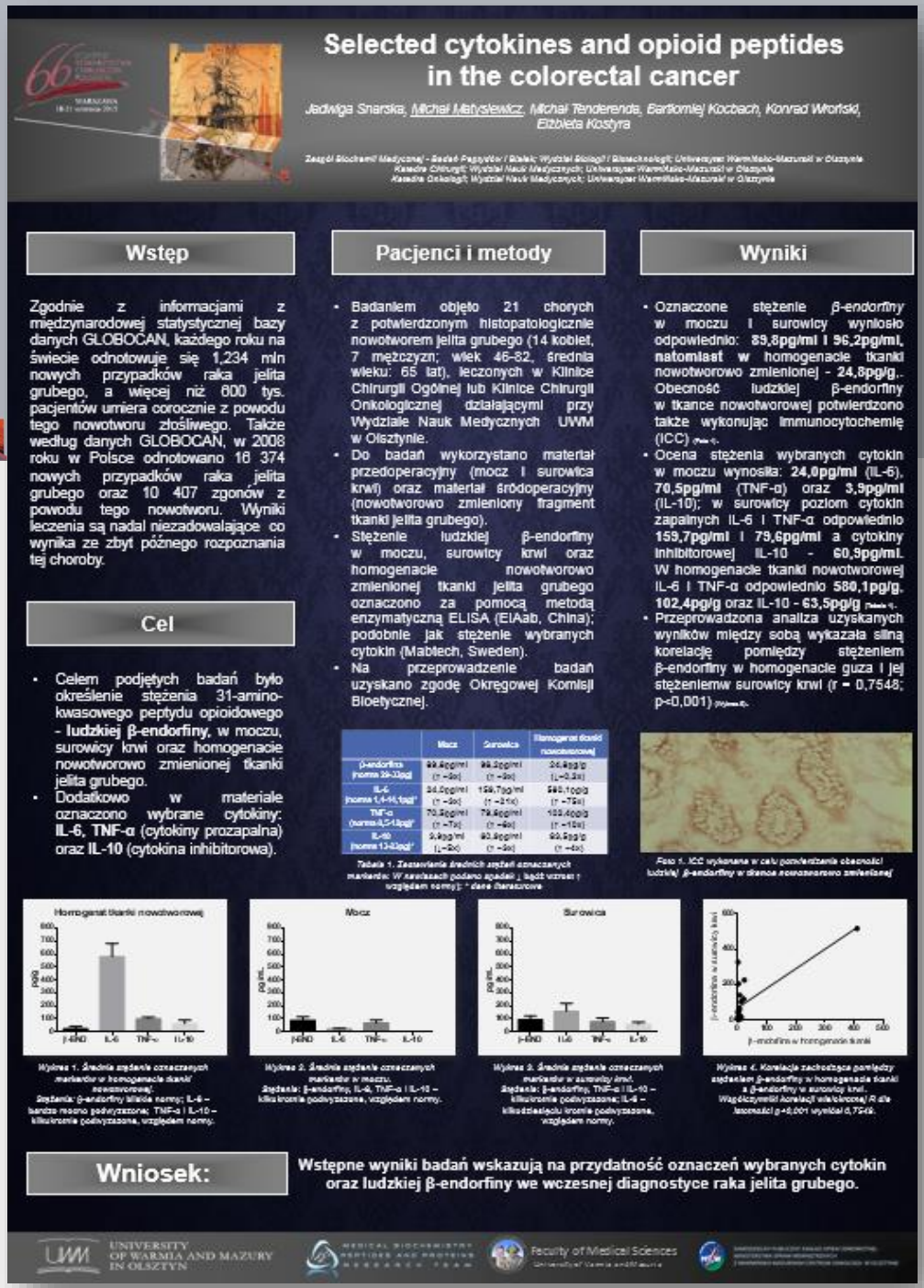


Poster

(Warszawa, 18-21 wrzesień)

I miejsce

w XII sekcja posterowej



Selected cytokines and opioid peptides in the colorectal cancer

Jadwiga Snarska, Michał Matyslewicz, Michał Tenderenda, Bartłomiej Kocbach, Konrad Wroński, Elżbieta Kostyra

Zespół Biochemii Medycznej - Badań Pagwików / Katedr: Wydział Biologii / Biotechnologii Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Katedra Chirurgii Wydział Nauk Medycznych; Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Katedra Onkologii; Wydział Nauk Medycznych; Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wstęp

Zgodnie z informacjami z międzynarodowej statystycznej bazy danych GLOBOCAN, każdego roku na świecie odnotowuje się 1,234 mln nowych przypadków raka jelita grubego, a więcej niż 600 tys. pacjentów umiera corocznie z powodu tego nowotworu złośliwego. Także według danych GLOBOCAN, w 2008 roku w Polsce odnotowano 16 374 nowych przypadków raka jelita grubego oraz 10 407 zgonów z powodu tego nowotworu. Wyniki leczenia są nadal niezadowalające co wynika ze zbyt późnego rozpoznania tej choroby.

Cel

- Celem podjętych badań było określenie stężenia 31-amino-kwasowego peptydu opioidowego - **ludzkiej β-endorfiny**, w moczu, surowicy krwi oraz homogenacie nowotworowo zmienionej tkanki jelita grubego.
- Dodatkowo w materiale oznaczono wybrane cytokiny: **IL-6, TNF-α** (cytokiny prozapalna) oraz **IL-10** (cytokina inhibitorowa).

Pacjenci i metody

- Badaniem objęto 21 chorych z potwierdzonym histopatologicznie nowotworem jelita grubego (14 kobiet, 7 mężczyzn; wiek 46-82, średnia wieku: 65 lat), leczonych w Klinice Chirurgii Ogólnej lub Klinice Chirurgii Onkologicznej działającymi przy Wydziale Nauk Medycznych UWM w Olsztynie.
- Do badań wykorzystano materiał przedoperacyjny (mocz i surowica krwi) oraz materiał śródoperacyjny (nowotworowo zmieniony fragment tkanki jelita grubego).
- Stężenie ludzkiej β-endorfiny w moczu, surowicy krwi oraz homogenacie nowotworowo zmienionej tkanki jelita grubego oznaczono za pomocą metodą enzymatyczną ELISA (EIAab, China); podobnie jak stężenie wybranych cytokin (Mabtech, Sweden).
- Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Okręgowej Komisji Bioetycznej.

Wyniki

- Oznaczone stężenie β-endorfiny w moczu i surowicy wyniosło odpowiednio: **89,8pg/ml i 96,2pg/ml, natomiast** w homogenacie tkanki nowotworowo zmienionej - **24,8pg/g.** Obecność ludzkiej β-endorfiny w tkance nowotworowej potwierdzono także wykonując immunocytochemię (ICC) (Rys 1).
- Ocena stężenia wybranych cytokin w moczu wynosiła: **24,0pg/ml** (IL-6), **70,5pg/ml** (TNF-α) oraz **3,9pg/ml** (IL-10); w surowicy poziom cytokin zapalnych IL-6 i TNF-α odpowiednio **159,7pg/ml i 79,6pg/ml** a cytokiny inhibitorowej IL-10 - **60,9pg/ml.** W homogenacie tkanki nowotworowej IL-6 i TNF-α odpowiednio **580,1pg/g, 102,4pg/g** oraz IL-10 - **63,5pg/g** (Tabela 1).
- Przeprowadzona analiza uzyskanych wyników między sobą wykazała silną korelację pomiędzy stężeniem β-endorfiny w homogenacie guza i jej stężeniemw surowicy krwi ($r = 0,7548$; $p<0,001$) (Wykres 4).

	Mocz	Surowica	Homogenat tkanki nowotworowej
β-endorfina (norma 20-32pg)	89,8pg/ml (↑ ~3x)	96,2pg/ml (↑ ~3x)	24,8pg/g (↓ ~0,8x)
IL-6 (norma 1,4-14,1pg)*	24,0pg/ml (↑ ~2x)	159,7pg/ml (↑ ~21x)	580,1pg/g (↑ ~75x)
TNF-α (norma 8,1-13pg)*	70,5pg/ml (↑ ~7x)	79,6pg/ml (↑ ~8x)	102,4pg/g (↑ ~10x)
IL-10 (norma 13-32pg)*	3,9pg/ml (↓ ~3x)	60,9pg/ml (↑ ~2x)	63,5pg/g (↑ ~4x)

Tabela 1. Zestawienie średnich stężeń oznaczanych markerów. W nawiasach podano spadek ↓ bądź wzrost ↑ względem normy); * dane literaturowe

Rys 1. ICC wykonane w celu potwierdzenia obecności ludzkiej β-endorfiny w tkance nowotworowo zmienionej

Wykres 1. Średnie stężenie oznaczanych markerów w homogenacie tkanki nowotworowej. Stężenia: β-endorfiny tkanka norma; IL-6 – bardzo mocno podwyższona; TNF-α i IL-10 – kilkukrotnie podwyższona, względem normy.

Wykres 2. Średnie stężenie oznaczanych markerów w moczu. Stężenia: β-endorfiny, IL-6, TNF-α i IL-10 – kilkukrotnie podwyższona, względem normy.

Wykres 3. Średnie stężenie oznaczanych markerów w surowicy krwi. Stężenia: β-endorfiny, TNF-α i IL-10 – kilkukrotnie podwyższona; IL-6 – kilkudziesięciu krotnie podwyższona, względem normy.

Wykres 4. Korelacja zachodząca pomiędzy stężeniem β-endorfiny w homogenacie tkanki a β-endorfiny w surowicy krwi. Współczynnik korelacji wilkoxona/ R ale istotności p<0,001 wynosi 0,7548.

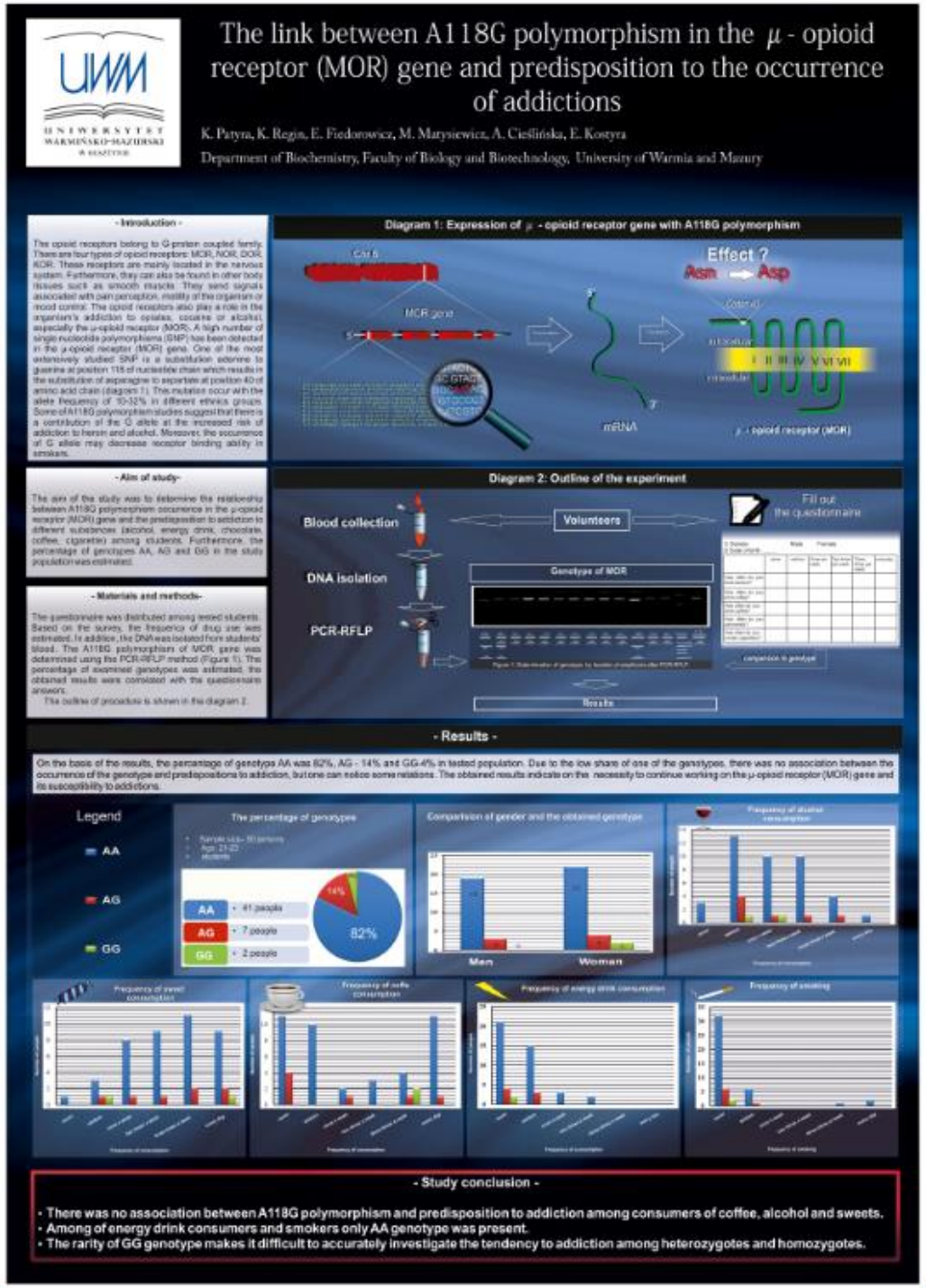
Wniosek:

Wstępne wyniki badań wskazują na przydatność oznaczeń wybranych cytokin oraz ludzkiej β-endorfiny we wczesnej diagnostyce raka jelita grubego.

UNIVERSITY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN
Faculty of Medical Sciences

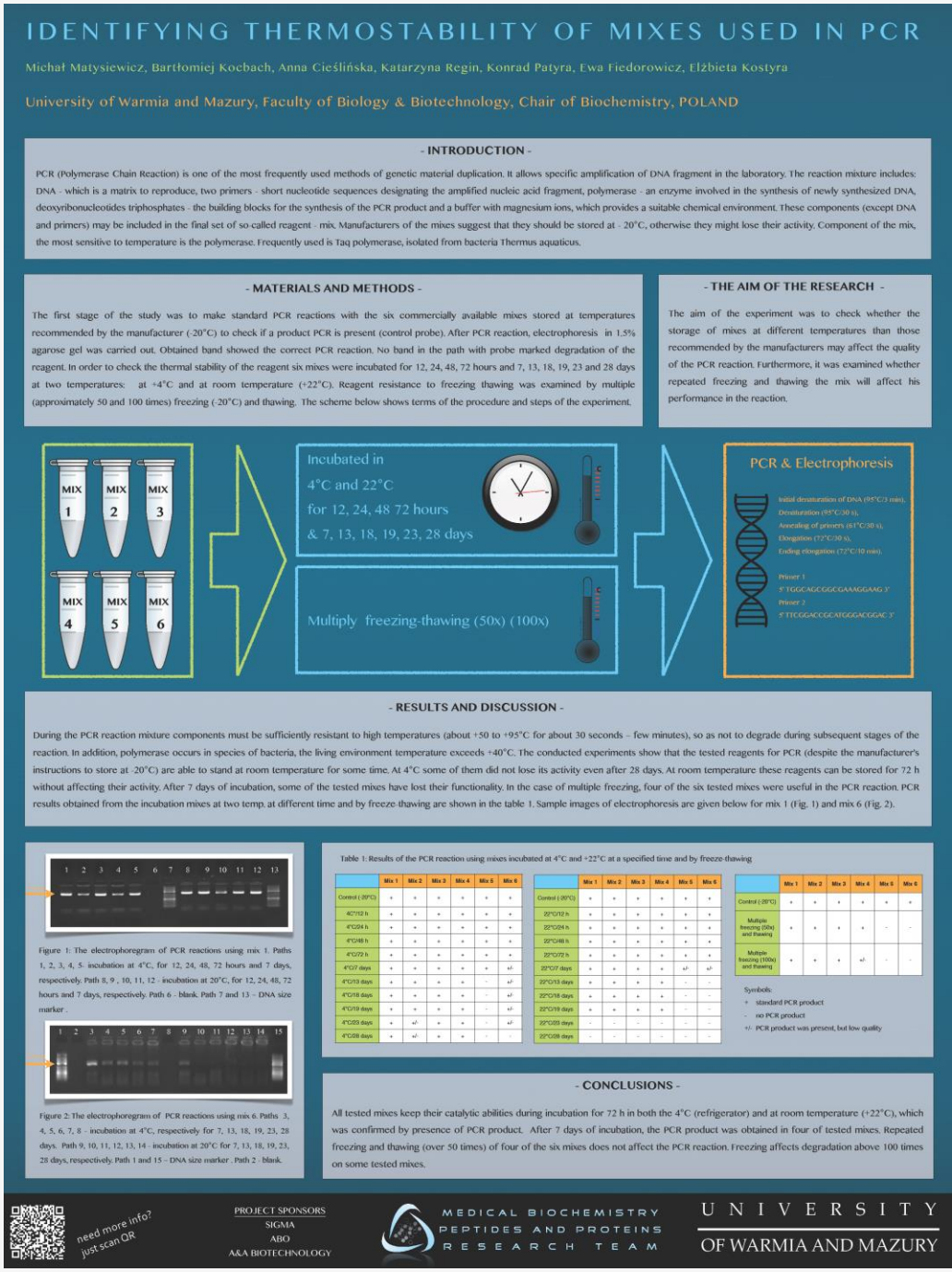
Poster

(Warszawa, 9-12 wrzesień)



Poster

(Warszawa, 9-12 wrzesień)



Transport of the opioid peptides across Caco-2 monolayer

Matysiewicz Michał, Jarmołowska Beata, Bukało Marta, Smulska Natalia, Fiedorowicz Ewa, Cieślińska Anna, Elżbieta Kostyra

Medical Biochemistry Peptides and Proteins Research Team; Faculty of Biology & Biotechnology; University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 1a Street, 10-719 Olsztyn

Corresponding author: michal.matysiewicz@uwm.edu.pl

1. Introduction

Milk is the source of β-casomorphins (BCMs) – biologically active peptides with opioid activity – which are suspected to play various roles in the human body. The local influence of exogenous opioid peptides on gastrointestinal functions has been widely reported. After passing the gut barrier, β-casomorphins may affect the functions of immunological system, as well as dopaminergic, serotoninergic and GABA-ergic systems in brain, regulate the opioid receptor development and elicit behavioral effects. However, possibilities and mechanisms of the intestinal transport of β-casomorphins in human body in vivo have not been accurately described so far. However, it is known that in the gastrointestinal tract as well as in the blood, β-casomorphins can be degraded by the dipeptidyl peptidase IV (DPPIV; EC 3.4.14.5), a highly specified aminopeptidase that cleaves dipeptides (X-Pro) from N-terminus fragments of peptide.

2. Aim

The aim of this research was to determine the permeability coefficients of the μ-opioid agonists human β-casomorphin-5 and -7 in time intervals, and to compare them with the permeability coefficient of μ-opioid antagonist peptide, human lactoferroxin A.

3. Materials and methods

The human colon adenocarcinoma cell line, Caco-2, was obtained from American Type Culture Collection.

Human β-casomorphin-5 (Tyr-Pro-Phe-Val-Glu), β-casomorphin-7 (Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile), and lactoferroxin A (Tyr-Leu-Gly-Ser-Gly-Tyr) have been custom synthesized at Gdansk University (Poland).

3.1. Cell culture

Caco-2 cells were cultured in DMEM with 10% FBS, 1 % NEAA and 50 mg/dm³ of gentamicin. They were incubated at 37°C In an atmosphere of 5% CO_2 in air. For transport studies Caco-2 cells were seeded in cell culture inserts with polycarbonate membranes (pore sizes 0,4 μm; area 4.2 cm^2) at a cell density of $4{,}5x10^5/cm^2$ and incubated in six-well culture plates with medium change every second day. The confluent monolayers were used between days 21 and 25 after seeding.

3.2. Transport studies

The peptide transport has been determined in both directions: apical to basolateral (A–B) and basolateral to apical (B–A).

After incubation for 30 min, the Hank's solution was replaced with peptide solutions: β-casomorphin-5, β-casomorphin-7 and lactoferroxin A (300 μl in apical side and 400 μl in basolateral side) to final concentrations of 400 μg/mL for each peptide. To determine the rate of A→B transport, the peptide solutions (respectively in HBSS or HBSS with diprotin A) were added to the apical chamber and to determine the (B→A) flux the peptide solutions were added to basolateral chamber. The samples of apical or basolateral solutions were taken after 15, 30, 45 and 60 min of incubation at 37°C and replaced by a fresh buffer. Peptide concentration in apical and basolateral solutions was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC).

4. Results

The permeability coefficients (Papp) were calculated according to:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt}\frac{1}{AC_0}$$

where: Q is the final amount of the peptide in the basolateral con-tainer (ng ml^{-1}), t is the time of the experiment (s), C_0 is the initialamount of the peptide in the apical container (ng ml^{-1}), A is thearea of the insert (cm^2).

4.1. Transepithelial flux of peptides across the Caco-2 monolayer

Table I.Comparison of permeability coefficients for three investigates peptides in two transport directions

Peptide	Papp [×10⁻⁶ cm s⁻¹] ± S.D.	
	Apical-basolateral	Basolateral -apical
β-Casomorphin-5	0.63 ± 0.03	0.19 ± 0.03
β-Casomorphin-5 with diprotin A	5.12 ± 0.12	2.08 ± 0.12
β-Casomorphin-7	6.70 ± 0.83	4,95 ± 0,84
β-Casomorphin-7 with diprotin A	14.04 ± 0.80	19.07 ± 0.85
Lactoferroxin A	1.32 ± 0.15	0.81 ± 0.18

4.2. Effect of diprotin A on β-casomorphins transport

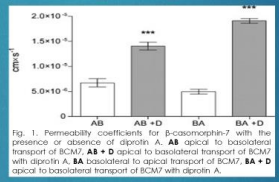


Fig. 1. Permeability coefficients for β-casomorphin-7 with the presence or absence of diprotin A. **AB** apical to basolateral transport of BCM7, **AB + D** apical to basolateral transport of BCM7 with diprotin A, **BA** basolateral to apical transport of BCM7, **BA + D** apical to basolateral transport of BCM7 with diprotin A.

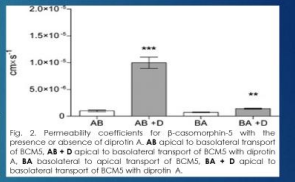


Fig. 2. Permeability coefficients for β-casomorphin-5 with the presence or absence of diprotin A. **AB** apical to basolateral transport of BCM5, **AB + D** apical to basolateral transport of BCM5 with diprotin A, **BA** basolateral to apical transport of BCM5, **BA + D** apical to basolateral transport of BCM5 with diprotin A.

4.3. Concentration of peptides in donor chambers after 60-min incubation

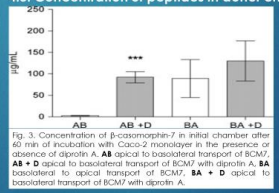


Fig. 3. Concentration of β-casomorphin-7 in initial chamber after 60 min of incubation with Caco-2 monolayer in the presence or absence of diprotin A. **AB** apical to basolateral transport of BCM7, **AB + D** apical to basolateral transport of BCM7 with diprotin A, **BA** basolateral to apical transport of BCM7, **BA + D** apical to basolateral transport of BCM7 with diprotin A.

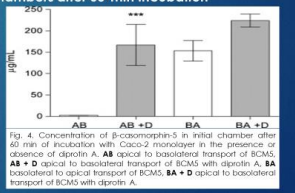


Fig. 4. Concentration of β-casomorphin-5 in initial chamber after 60 min of incubation with Caco-2 monolayer in the presence or absence of diprotin A. **AB** apical to basolateral transport of BCM5, **AB + D** apical to basolateral transport of BCM5 with diprotin A, **BA** basolateral to apical transport of BCM5, **BA + D** apical to basolateral transport of BCM5 with diprotin A.

5. Conclusions

Our studies have shown that the transport of opioid peptides across epithelial cells may be more efficient in the case of lower DPPIV activity. These data have also confirmed that DPPIV is the main factor limiting the half-life of opioid peptides in the intestine. Intestinal transport of m-opioid receptor agonist and antagonist peptide has the potential to regulate the access of those peptides to their target sites in the body. It prompts the need to investigate the transport abilities of opioid peptides, especially in the cases of diseases such as allergy, mucosal immunity, celiac disease, autism and schizophrenia.

MEDICAL BIOCHEMISTRY PEPTIDES AND PROTEINS RESEARCH TEAM

UNIVERSITY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN

Poster

(Warszawa, 9-12 wrzesień)

www.nocbiologow.home.pl

NOC BIOLOGÓW

10 stycznia 2014 (piątek)
godz. 10.00-22.00

Wydział Biologii i Biotechnologii UWM

http://biologiaolsztyn.blogspot.com

Międzywydziałowe Koło Naukowe Biochemii Medycznej
Wydział Nauk Medycznych & Wydział Biologii i Biotechnologii UWM

Plany na najbliższy rok akademicki 2014/2015

- Wpływ ekstraktów roślinnych na proliferację komórek nowotworowych linii komórkowych Caco-2
- Badań nad częstością występowania mutacji punktowych SNP w genie MOR w różnych stadiach chorobowych.

PREZENTACJE WYNIKÓW NA STUDENCKICH I MEDYCZNYCH KONFERENCJACH NAUKOWYCH

Kontakt

Międzywydziałowe Koło Naukowe Biochemii Medycznej
Wydział Nauk Medycznych & Wydział Biologii i Biotechnologii UWM

Katedra Biochemii
Wydział Biologii i Biotechnologii UWM
ul. Michała Oczapowskiego 1A, p. 320
10-719 Olsztyn

89 523-37-19

medpeptides@gmail.com

www.uwm.edu.pl/peptides

Opiekun Koła Naukowego

prof. dr hab. Elżbieta Kostyra, prof. zw.

Przewodniczący Koła Naukowego

mgr Michał Matysiewicz


THANK
YOU
GRACIAS
BOLZÏN
MERCI
BÏYAN
ARIGATO
SHUKURIA
GRAZIE
MEHRBANI
SUKSAMA
EKHMET
TASHAKKUR ATU
YAQHANYELAY
DANKSCHEEN
JUSPAXAR
KOMAPSUMNIDA
EFCHARISTO
GOZAIMASHITA
SHUKRIA
TINGKI
MAAKE
PALDIES
MINMONCHAR
SPASSIBO
SNACHALHUYA
NUHUN
CHALTU
WABEEJA
MAITEKA
HUI
YUSPAGABÀTAM
DHANYABAAD
ANIHA
ATTO
MERSI
SPASIBO
DENKAUJA
NENACHALHIYA
UNALCHÉESH
GUI
HÀTUR
EKOJU
SIKOMO
MAKETAI
SANCO
MERASTAWHY
GAEJTHO
LAH
AGUYJE
FAKAAUE
TAVTAPUCH
MEDAWAGSE
BAIKA