

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



**Inhibice biosyntézy nukleových kyselin a bílkovin v nádorech**

**Účinky vybraných cytostatik a sacharidů a jejich chování v organismu**

**Pavel Tomšík**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program Lékařská chemie a biochemie**

**Hradec Králové**

**2008**

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Lékařská chemie a biochemie na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Disertant: MUDr. Pavel Tomšík  
Ústav lékařské biochemie  
Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Školitel: Doc. MUDr. Martina Řezáčová, PhD.  
přednostka Ústavu lékařské biochemie  
Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Oponenti: Prof. MUDr. Antonín Jabor, CSc.  
Oddělení klinické biochemie  
Institut klinické a experimentální medicíny, Praha  
.  
Prof. RNDr. Eva Táborská, CSc.  
přednostka Biochemického ústavu  
Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity v Brně

Stanovisko k disertační práci vypracoval Ústav lékařské biochemie, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové.

Obhajoba disertační práce se koná dne 4. 12. 2008 ve 13:30 hodin před komisí pro obhajoby disertačních prací ve studijním programu lékařská chemie a biochemie na Lékařské fakultě v Hradci Králové.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného projektu MŠM 0021620820.

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Doc. MUDr. RNDr. Milan Mělka  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Lékařská chemie a biochemie

## OBSAH

1.	SOUHRN	5
2.	SUMMARY	6
3.	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	7
3.1.	Protinádorový účinek nesubstituovaných deoxyhexos – 2-deoxy-D-glukosy a L-fukosy	7
3.2.	L-rhamnosa - výskyt, vlastnosti, metabolismus u savců a potenciální protinádorový účinek	8
3.3.	Kinetika L-rhamnosy v savčím organismu a testy permeability bariér	9
3.4.	Stanovení protinádorového účinku L-rhamnosy <i>in vitro</i>	10
4.	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	11
5.	MATERIÁL A METODY	12
5.1.	Studium farmakokinetiky L-rhamnosy a integrity hepatobiliární bariéry	12
5.2.	Testování protinádorového účinku zkoumaných látek	12
6.	VÝSLEDKY	15
6.1.	Studium farmakokinetiky melibiosy a L-rhamnosy a testování integrity hepatocelulární bariéry u potkana	15
6.2.	Účinek modelových cytostatik mitoxantronu a doxorubicinu na ovlivnění syntézy DNA a bílkovin v ascitické formě myších nádorů MC29 a ATE <i>in vitro</i>	17
6.3.	Protinádorová účinnost L-rhamnosy v porovnání s 2-deoxyglukosou	18
7.	DISKUSE	21
7.1.	Farmakokinetika L-rhamnosy a testy permeability bariér	21
7.2.	Účinek modelových cytostatik mitoxantronu a doxorubicinu na ovlivnění syntézy NA a bílkovin v ascitické formě myších nádorů MC29 a ATE <i>in vitro</i>	22
7.3.	Účinek L-rhamnosy <i>in vitro</i> v porovnání s 2-deoxy-D-glukosou	23
8.	POUŽITÁ LITERATURA	25
9.	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI	28

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALT	alaninaminotransferasa
AST	aspartátaminotransferasa
ATE	Ehrlichův ascitický tumor
BDO	obstrukce žlučového
BrdU	5-brom-2'-deoxyuridin
2-DG	2-deoxy-D-glukosa
DOX	doxorubicin
MC29	označení mamárního adenokarcinomu derivovaného z myši NMRI
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid
MX	mitoxantron
NA	nukleové kyseliny
NMRI	Naval Medical Research Institute; outbrední kmen myši
SEM	střední chyba aritmetického průměru

## 1. SOUHRN

O chování L-rhamnosy v savčím organismu není dosud mnoho známo. Tato deoxyhexosa je syntetizována bakteriemi a rostlinnými buňkami, ne však živočišnými. Možný je i její protinádorový účinek, který dosud také nebyl zkoumán. Cílem této práce tedy bylo osvětlit farmakokinetiku L-rhamnosy, její chování na hematobilární bariéře a dále antineoplastický účinek.

Jako první v literatuře jsme detailně popsali farmakokinetické parametry a biliární exkreci L-rhamnosy podané intravenózně v dávce  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  zdravým potkanům a potkanům s navozenou cholestázou. Ačkoli kumulativní hodnoty ukazují, že touto cestou je vylučována jen nepatrná část podaného množství, rychlé vyrovnání koncentrací L-rhamnosy v plazmě a žluči může tento deoxysacharid činit zajímavým jako marker biliární exkrece některých léků. Zjistili jsme, že tzv. „*dual-sugar*“ test s L-rhamnosou a disacharidem melibiosou může sloužit k detekci poškození hematobilární bariéry při akutní extrahepatální cholestáze u potkanů. Tímto testem jsme potvrdili, že u zvířat s obstrukcí *ductus choledochus* dochází k netěsnosti hematobilární bariéry a že toto poškození je možno měřit v průběhu prvních 60 minut po podání zkoumaných látek. Důležitým zjištěním je, že výsledky stanovování permeability slizniční bariéry, založeném na pětihodinovém sběru moči, by neměly být ovlivněny současně přítomnou cholestázou.

Účinek nesubstituovaných deoxyhexos, 2-deoxy-D-glukosy (2-DG) a L-fukosy, na nádorové buňky, byl v posledních desetiletích publikován v mnoha studiích. Případný efekt L-rhamnosy však dosud prozkoumán nebyl. Sledovali jsme účinek L-rhamnosy na biosyntézu DNA a proteinů, proliferaci a indukci apoptózy u nádorových buněk *in vitro*. S použitím 2-DG jako srovnávací látky jsme sledovali *in vitro* účinek L-rhamnosy v koncentracích do 20 (příp. 32)  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  na počáteční rychlost inkorporace značených prekurzorů DNA a proteinů v krátkodobých kulturách buněk Ehrlichova ascitického nádoru (ATE), nového myšího adenokarcinomu mléčné žlázy MC29 a lidské leukemie HL-60, a dále efekt na proliferaci a indukci apoptózy u buněk HL-60. Pro posouzení ovlivnění syntézy DNA a bílkovin byla s pomocí konvenčních cytostatik – mitoxantronu a doxorubicinu – ověřena metoda průběžného sledování specifických aktivit makromolekulárních frakcí. Senzitivita nového nádoru MC29 byla studována za použití mitoxantronu *in vivo*. Až na mírnou inhibici syntézy DNA u buněk EAT nebyl v případě L-rhamnosy pozorován ani cytotoxický, ani cytostatický účinek. Nepřítomnost inhibice proteosyntézy může vést k závěru, že L-rhamnosa neovlivňuje energetický metabolismus. Vzhledem k hypotetickým analogiím L-rhamnosy s L-fukosou by však bylo třeba prozkoumat případný potenciál L-rhamnosy na vhodných modelech *in vivo* v kontextu nádorové choroby.

## 2. SUMMARY

The behaviour of L-rhamnose, a deoxyhexose which is synthesized in bacteria and plants but not in animal cells, in the mammalian organism, as well as its anticancer potency, is poorly known. In the present study, we examined the pharmacokinetics, behaviour on the blood-biliary barrier and the antineoplastic activity of L-rhamnose.

Our study is the first to describe in detail pharmacokinetic parameters and the biliary excretion of intravenously administered ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) L-rhamnose in healthy and cholestatic rats. Despite the cumulative data having shown that this pathway takes only a negligible part of the applied dose of the sugar, the quick equilibration of L-rhamnose concentrations was seen between the plasma and bile which may be interesting for the future evaluation of biliary drug excretion with respect to bile production. We found that the dual-sugar permeability test with L-rhamnose and the disaccharide melibiose is a useful probe to describe the alteration of the blood-biliary barrier during acute extrahepatic cholestasis in rats. Using this test, we evidenced that the blood-biliary barrier becomes highly leaky in bile duct obstructed animals and that this impairment could be reliably measured during the first 60 min after administration of the probes. Importantly for sugar permeability studies in animals and humans, our data provide the evidence that overall results of intestinal mucosa integrity testing which are based on cumulative 5-h urine collection should not be altered by extrahepatic cholestasis.

The effect of unsubstituted deoxyhexoses, 2-deoxy-D-glucose (2-DG) and L-fucose, on tumor cells has been reported in several papers throughout the last decades. That of L-rhamnose has until today not been explored. We examined the effect of L-rhamnose on the DNA and protein synthesis, growth and the potential induction of apoptosis of tumor cells *in vitro*. Using 2-DG for comparison, we studied the effect of L-rhamnose in concentration up to 20 (32 resp.)  $\text{mmol.l}^{-1}$  on the initial velocity of the incorporation of labeled precursors of DNA and proteins in short term cultures of mouse Ehrlich ascites tumor (EAT), a new mouse mammary adenocarcinoma MC29 and human HL-60 cells *in vitro*, and further, on cell proliferation and apoptosis induction in HL-60 cells. For the evaluation of the DNA and protein synthesis influencing, a method of dynamic monitoring of specific activities of DNA and protein fractions has been validated using conventional cytostatics, mitoxantrone and doxorubicin. The sensitivity of the new tumor MC29, syngenic in NMRI mice, was probed in an *in vivo* study with mitoxantrone. Neither cytotoxic nor cytostatic effects of L-rhamnose were observed with exception of slightly pronounced inhibition of DNA synthesis in EAT cells. From the lacking inhibition of the protein synthesis it can be considered that L-rhamnose does not interfere with the energy metabolism like 2-DG. Nevertheless, the hypothetical analogy of L-rhamnose to L-fucose in the influence on the behavior of tumor cells *in vivo* may retain unexplored potential of L-rhamnose that awaits future clarification.

### 3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

#### 3.1. Protinádorový účinek nesubstituovaných deoxyhexos – 2-deoxy-D-glukosy a L-fukosy

Využití deoxymonosacharidů k léčbě zhoubných nádorů bylo a je předmětem zájmu četných vědeckých týmů. Z nesubstituovaných deoxyhexos byla dosud věnována pozornost zejména 2-deoxy-D-glukose a L-fukose.

**2-deoxy-D-glukosa**, 2-DG, je uměle připravený analog D-glukosy. Její účinek spočívá v inhibici glukosafosfátisomerasy v první reakci glykolýzy. Vzhledem k tomu, že nádorové buňky, patrně v důsledku nižší vaskularizace a tedy saturace kyslíkem, vykazují vyšší intenzitu anaerobní glykolýzy a tudíž depleci ATP, se 2-DG stala nadějným kandidátem na protinádorově účinnou látku a její efekt byl potvrzen *in vitro* (Zhu et al., 2005) i *in vivo* (Kern 1987; Cay et al., 1992). Inhibice glykolýzy a z toho vyplývající deplece ATP spouští apoptotický mechanismus buněčné smrti. 2-DG, jak potvrdili Aft a kol. (2002), skutečně indukuje buněčnou smrt cestou apoptózy. Zvláště citlivé jsou hypoxické nádorové buňky.

**L-fukosa**, 6-deoxy-L-galaktosa, je jediná endogenní deoxyhexosa v lidském organismu. Její aktivovaná forma, GDP-fukosa, užívána na tvorbu fukosylovaných oligosacharidových řetězců, je v lidském organismu syntetizována buďto *de novo* z GDP-mannosy, nebo cestou tzv. „*salvage pathway*“. Při ní je volná fukosa z potravních zdrojů, jež do buněk proniká cestou usnadněné difúze specifickou pro fukosu, fosforylována fukokinásou na fukosa-1-fosfát, který je dále konvertován pomocí GDP-fukosapyrofosforylasy na GDP-fukosu (Becker et Lowe, 2003). Katabolismus L-fukosy u člověka dosud není podrobně znám. Po intravenózním podání L-[1-<sup>14</sup>C]fukosy pacientům bylo 39 % radioaktivity vyloučeno ve formě <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (Segal et Topper, 1960). Z velké části se L-fukosa u savců vylučuje v nezměněné formě do moči (Coffey et al., 1964).

Na přelomu 60. a 70. let 20. století popsala skupina amerických autorů v řadě prací inhibiční efekt L-fukosy na nádor potkana *in vivo* i *in vitro* (např. Rosato et al., 1972; Roseman et al., 1971). Od té doby nebyl účinek samotné L-fukosy na experimentálních nádory *in vivo* nebo jejich linie *in vitro* potvrzen. Objevily se však zprávy, že L-fukosa indukuje cytotoxickou aktivitu periferních lymfocytů, zvyšuje produkci interleukinu 2 a TNF-α (Staňková, 1992). U karcinomu plic L-1 rostoucího na myších BALB/c bylo navíc

zjištěno, že L-fukosa může působit antimetastaticky (Rozskowski et al., 1989). Je známo, že L-fukosa hraje významnou roli v patogenezi maligních nádorů. Jedním z pozorovaných jevů u malignit je např. ztráta exprese antigenů krevních skupin A a B se současným zvýšením exprese antigenů H a Lewis<sup>x</sup> u nádorů, související s jejich zhoršenou prognózou. Podobný dopad má i up-regulace fukosylovaných epitopů sialyl-Lewis<sup>x</sup> a sialyl-Lewis<sup>a</sup>, sloužících jako ligandy pro selektin. Tím by mohla být usnadněna vazba hematogenně metastazujících nádorových buněk na selektiny E a P exprimované endoteliemi (Becker et Lowe, 2003).

### **3.2. L-rhamnosa - výskyt, vlastnosti, metabolismus u savců a potenciální protinádorový účinek**

Chemicky příbuzná s L-fukosou je další deoxyhexosa – **L-rhamnosa**, 6-deoxy-L-mannosa, která je hojně syntetizována v rostlinných a bakteriálních buňkách, nikoli však živočišných. O chování L-rhamnosy v živočišné buňce je dosud známo poměrně málo. Do buněk proniká nezprostředkovanou difúzí (Bjarnason et al., 1995), jeví k ní afinitu některé enzymy, a je také pravděpodobně ve významné míře redukována na rhamnitol. Je tedy možné, že tento deoxysacharid může vstupovat do některých metabolických drah, ačkoli asi nemůže být energeticky využíván. Vzhledem k tomu, že může sloužit jako substrát L-fukokinasy (Ishihara et al., 1968), která katalyzuje první reakci v biosyntéze GDP-fukosy v tzv. „*salvage pathway*“, lze vyslovit hypotézu, že podaná L-rhamnosa by mohla ovlivňovat fukosylaci a tím chování nádorových buněk. To, že je fosforylovaná L-rhamnosa skutečně vestavována do glykosidů, potvrzují sporadické nálezy rhamnosidů v savčích tkáních (Tymiak et al., 1993; Malawista et Davidson, 1961).

Pokusy osvětlit vliv L-rhamnosy (vedle celé řady dalších monosacharidů a jejich metabolitů) na transplantabilitu nádorových buněk se objevily v 60. letech 20. století (Tsuda et al., 1965; Fare et al., 1967). Tyto výsledky však zdaleka neosvětlují účinek L-rhamnosy na metabolismus nádorových buněk, zejména na syntézu nukleových kyselin a proteinů, buněčný cyklus a proliferaci. Potenciální protinádorový účinek L-rhamnosy tak zůstává stále neobjasněn. Otevřená je i otázka ovlivnění fukosylace u zhoubných nádorů.



### 3.3 Kinetika L-rhamnosy v savčím organismu a testy permeability bariér

Pro případné podání L-rhamnosy je důležitá důkladná znalost jejího chování v savčím organismu. Po perorálním podání je L-rhamnosa absorbována jen částečně. Přes intaktní střevní sliznici prostupuje poměrně obtížně, a to i když prochází transcelulárně nezprostředkovanou difúzí, takže pouze 8-17 % perorálně podané L-rhamnosy je u zdravých lidí vyloučeno do moči (FSANZ, 2005). Je-li podána intravenózně, vylučuje se především ledvinami; 24-hodinová kumulativní renální exkrece intravenózně podané L-rhamnosy dosahuje u potkanů 65 % a u lidí zhruba 74 % (Bjarnason et al., 1995; Krecic et al., 2003). Z tohoto lze vyslovit předpoklad, že se po perorálním příjmu této deoxyhexosy vstřebává až pětina dávky. Potenciální účast L-rhamnosy v metabolických cestách u savců, uvedená výše (viz 2.2), nemohla uspokojivě vysvětlit osud zbylé čtvrtiny množství L-rhamnosy v plazmě, která není vyloučena renálně. Předpokládalo se, že je tento zbytek plazmatické L-rhamnosy neznámým způsobem metabolizován (Krecic et al., 2003). Teprve roku 2006 našli Malagon a spol. při testování intestinální permeability u dětí pomocí perorálně podané L-rhamnosy zvýšené koncentrace rhamnitolu v moči a domnívají se, že rhamnitol je hlavním metabolitem L-rhamnosy u lidí. Původ zmíněného rhamnitolu, zvláště pak účast střevní mikroflóry na redukci neabsorbované L-rhamnosy, však dosud nebyly objasněny. Stanovení rhamnitolu po intravenózním podání L-rhamnosy zatím v literatuře chybí. Navíc lze postulovat i další domněnku, že je část uvedeného zbytku plazmatické L-rhamnosy vyloučena do žluči. Jedním z cílů předkládané práce bylo tuto hypotézu ověřit.

I přes neúplné znalosti jejího osudu v organismu je L-rhamnosa využívána v klinické praxi. Nalezla zde využití v tzv. „*dual-sugar*“ testech pro hodnocení permeability střevní sliznice (Bjarnason et al. 1995; Hallemeesch et al., 2000; Katouzian et al., 2005). Princip je založen na předpokladu, že zatímco L-rhamnosa proniká transcelulárně nezprostředkovanou difúzí, vybraný disacharid paracelulárně skrz mezibuněčné spoje (D'Antiga et al., 1999; Bjarnason et al., 1995). V praxi se podává perorálně směs L-rhamnosy a disacharidu a následně je měřena exkrece obou látek do moči sbírané po dobu obvykle 5 hodin. Nejčastěji užívaným disacharidem je laktulosa. Z důvodů relativně častého výskytu průjmů byl do klinické praxe úspěšně zaveden jiný pro člověka nefyziologický a pravděpodobně nemetabolizovatelný sacharid, melibiosa, 6-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-D-glukosa (D'Antiga et al., 1999; Taylor et al., 2002).

Při testování integrity intestinální bariéry se předpokládá stabilní distribuce sledovaných látek v tkáních, které může být narušeno např. v přítomnosti extrahepatální cholestázy nebo cirrhózy, kde může porušená hepatobiliární bariéra umožňovat disacharidům alternativní cestu úniku z organismu (Pastor et al., 2000; Zuckerman et al., 2004; Kalaitzakis et al., 2006). „Hepatobiliární bariéra“ je pojem popisující spojení hepatocytů pomocí *tight junctions*, jež umožňuje tok produkované žluči bez jejího návratu do krve a hraje významnou roli při regulaci pohybu solutů, iontů a vody skrz paracelulární prostory mezi hepatocyty (Kojima et al., 2003). Bylo zjištěno, že většina jaterních chorob s vyvinutou cholestázou je spojena s poškozením této bariéry (např. Pastor et al., 2000; Takakuwa et al., 2002). Zde může být ovlivněn výsledek zmíněných testů permeability střevní sliznice. Význam biliární exkrece na celkovou farmakokinetiku L-rhamnosy a melibiosy, a tedy i na výsledky testů intestinální bariéry, však dosud není znám. Zkoumání vlivu poškození hepatobiliární bariéry na průnik L-rhamnosy a melibiosy do žluči bylo dalším z cílů této disertační práce.

### **3.4 Stanovení protinádorového účinku L-rhamnosy *in vitro***

Pro zhodnocení potenciálního protinádorového účinku L-rhamnosy a případně dalších výhledově vybraných sloučenin bylo v rámci předkládané práce třeba zavést vhodnou metodu *in vitro*. Spektrum metod používaných pro posuzování cytostatického či cytotoxického účinku látek na buňky je velmi široké. Vybráno bylo studium inkorporace  $^3\text{H}$ -thymidinu, které je podle dostupných údajů z literatury citlivějším testem cytotoxicity látek s přímým účinkem na DNA než některé jiné postupy – MTT, produkce  $^{14}\text{CO}_2$ , stanovení celkového buněčného proteinu (Romijn et al., 1988; Ebbehoj et Langkjer, 1995). Zvláště vhodné se jevílo použít metodu sledování ovlivnění počáteční rychlosti biosyntézy DNA a proteinů v buňkách ascitických forem myších adenokarcinomů mléčné žlázy v krátkodobých kulturách *in vitro*. Metoda byla ověřena za požití modelových cytostatik, mitoxantronu (MX) a doxorubicinu (DOX). Jejich mechanismus účinku spočívá mimo jiné především v interkalaci DNA a inhibici topoisomerasy II. Protože byl u L-rhamnosy očekáván jiný mechanismus účinku než přímé poškození DNA, byla tato metoda doplněna ještě dalšími způsoby detekce protinádorového účinku (ovlivnění proliferace, indukce apoptózy).

## 4. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo studovat protinádorový účinek L-rhamnosy *in vitro*. Předpokladem bylo zavést vhodné metody testování protinádorového účinku, konkrétně systémy pro testování inhibice biosyntézy DNA a proteinů. Dalším cílem bylo přispět k poznání chování L-rhamnosy v savčím organismu, a to zejména její farmakokinetiky a biliární exkrece.

Jako modelová cytostatika pro zavedení metody testující inhibici počáteční rychlosti biosyntézy DNA a bílkovin *in vitro* byly vybrány mitoxantron a doxorubicin. Jejich účinek byl prověřen *in vitro* na myších adenokarcinomech mléčné žlázy: MC29 a ascitickém Ehrlichově karcinomu. Dále byl proveden pokus *in vivo* s mitoxantronem na MC29, novém a dosud nedostatečně charakterizovaném nádorovém modelu.

Při studiu potenciálního protinádorového účinku L-rhamnosy bylo u buněk ascitického Ehrlichova karcinomu, MC29 a lidské leukemie HL-60 sledováno ovlivnění biosyntézy DNA a bílkovin, dále se pozornost zaměřila na ovlivnění proliferace buněk HL-60 a známky indukce apoptózy. Účinek L-rhamnosy byl porovnáván s 2-deoxyglukosou.

Byla detailně zkoumána farmakokinetika intravenózně podané L-rhamnosy samotné i v kombinaci s melibiosou u potkanů. Zaměřili jsme se především na dosud nepopsanou biliární exkreci. „*Dual sugar*“ test s melibiosou a L-rhamnosou byl dále užít pro hodnocení integrity hepatobiliární bariéry u extrahepatální cholestázy, navozené podvazem *ductus choledochus*.

## 5. MATERIÁL A METODY

### 5.1 Studium farmakokinetiky L-rhamnosy a integrity hepatobiliární bariéry

Samci potkanů kmene Wistar byli rozděleni do 3 skupin ( $n = 7$  ve skupině): intaktní (bez zvláštní operační přípravy), skupina s imitovanou operací a manipulací žlučového („*sham*“) (24 h před farmakokinetickou studií byla provedena preparace žlučového bez kanylace a ligatury) a skupina, u níž byla 24 h před farmakokinetickou studií provedena kanylace a obstrukce ductus choledochus (BDO). Po této přípravě byl potkanům v intaktní skupině, zvířatům po imitované operaci a zvířatům s obstrukcí žlučového intravenózně podán jednorázový bolus směsi melibiosy a L-rhamnosy (obě 100 mg.kg<sup>-1</sup>). V časových intervalech -5, 1, 10, 30, 60, 90, 120, 180 a 240 min byly odebrány vzorky krve, ve 30-minutových intervalech moč a žluč.

Pro stanovení sacharidů vysokoučinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) byl užit systém Shimadzu (Japonsko). Derivatizace byla prováděna pomocí FMOC-hydrazinu. Separace probíhala na analytické koloně Spherisorb ODSII (125 × 4 mm, 3 μm, Waters) opatřené předkolonou C<sub>18</sub> (4 × 3,5 mm, Phenomenex). K eluci analytů byl užit lineární gradient směsi acetonitril : voda. Excitační a emisní vlnové délka fluorescenčního detektoru byla nastavena na 270 a 320 nm. Koncentrace kreatininu a bilirubinu (konjugovaného a celkového) a aktivity AST a ALT v plazmě byly měřeny přístrojem Modular PP (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo).

Farmakokinetické parametry obou sacharidů podaných potkanům intravenózně jako jednorázový bolus byly počítány standardními nonkompartmentovými technikami (Jacobs et al., 2005).

### 5.2 Testování protinádorového účinku zkoumaných látek

Jako nádorové modely byly použity: Adenokarcinom mléčné žlázy MC29 (nový nádorový model, vzniklý sponánně na myších NMRI) a ascitický Ehrlichův tumor (ATE), oba udržované pravidelnými transplantacemi na myších samicích NMRI. Dále byla použita buněčná linie lidské promyelocytární leukemie HL-60.

Pokusy studující vliv cytostatika na inkorporaci radioaktivně značených prekurzorů DNA a bílkovin, [ $6\text{-}^3\text{H}$ ]thymidinu a [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]-aminokyselinové směsi, byly provedeny dle Mika (Míko, 1979) s menšími modifikacemi (Mattern, 1976). Při „kinetickém“ přístupu byly hodnoty  $\text{IC}_{50}$  počítány jako koncentrace inhibitoru snižující počáteční rychlost inkorporace na polovinu kontroly. Pro výpočet počáteční rychlosti inkorporace byl použit vztah (Měška, 1980):

$$\ln\left(\frac{I_t - I_0}{t I_{\max}}\right) = \ln(A) - Bt, \quad /1/$$

kde  $I_t$  je intenzita nainkorporované značky do makromolekulární frakce precipitované kys. trichloroctovou v čase  $t$ ,  $I_0$  intenzita inkorporované značky v čase 0,  $I_{\max}$  celková aktivita přidané značky. Empirická konstanta  $A$  je přímo úměrná počáteční rychlosti inkorporace značky,  $B$  je empir. konstanta závislá na rychlosti degradace makromolekulární frakce. V druhém přístupu, „jednododovým“ byla  $\text{IC}_{50}$  vypočtena jako koncentrace inhibitoru, snižující aktivitu inkorporovanou do makromolekulární frakce po 120 min inkubace na polovinu aktivity makromolekulární frakce po 120 min u kontroly (bez inhibitoru).

Obsah DNA (fluorescence, propidiumjodid) v buňkách byl analyzován pomocí průtokového cytometru (Coulter Epics XL, Hialeah, USA). Pro určení podílu buněk v jednotlivých fázích byl analyzován minimální počet 5 000 buněk z každého vzorku. K vyhodnocení byl použit software Multicycle AV.

Při detekci štěpů laminu B byly buňky HL-60 v požadovaných časových intervalech lyzovány a lyzáty byly přeneseny na polyakrylamidový gel s dodecylsulfátem sodným. Následovala elektroforéza, přenesení proteinů na polyvinylidenfluoridovou membránu a zablokování membrány. Poté byla provedena inkubace s primární (anti-lamin B-Calbiochem, Merck, Německo) a sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidásou (Dako, Dánsko). Vizualizace byla provedena detekčním kitem pro chemiluminiscenci (Boehringer Ingelheim, Německo).

V pokuse *in vivo*, sledujícím účinek MX podaného *i.v.* (3, 6 a 9  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) první den po inokulaci ascitické formy nádoru MC29, byla u jedné skupiny zvířat sledována hmotnost nádoru, u druhé pak přežití myši. Při stanovování hmotnosti nádoru byly myši 10. den usmrceny a zváženy před a po vypuštění nádorového ascitu. Z hodnot ascitokritu pak byla

získána hmotnost buněčné frakce ascitu. Pro vyhodnocení přežití myší v pokusu *in vivo* a výpočet optimální dávky byl použit Coxův model proporcionálních rizik (Carter, 1982).

## 6. VÝSLEDKY

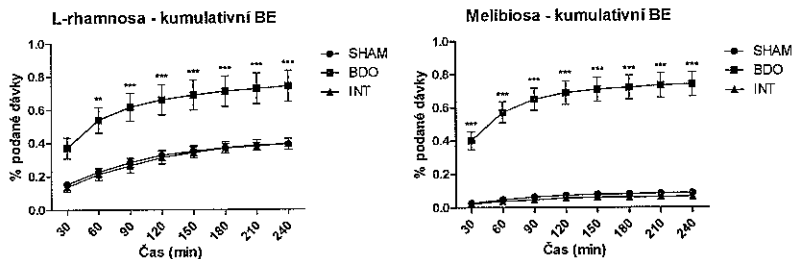
### 6.1 Studium farmakokinetiky melibiosy a L-rhamnosy a testování integrity hepatocelulární bariéry u potkana

Primárně sledovaným ukazatelem byl časový vývoj koncentrací L-rhamnosy a melibiosy v plazmě po jednorázovém *i.v.* podání 100 mg.kg<sup>-1</sup> potkanům. Biexponenciální pokles plazmatických koncentrací v čase s přechodem v 30 – 60 minutě sledování odpovídá rychlému ukončení distribuce obou látek do tkání v první fázi a následné eliminaci v další fázi.

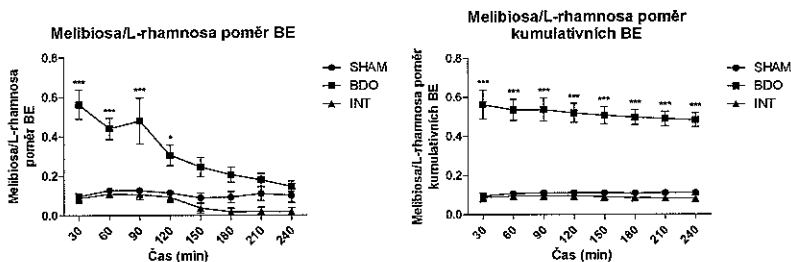
Porovnání hodnot clearance ukázalo vysokou převahu renální exkrece obou látek. Pro ozřejmění mechanismu renální exkrece obou sacharidů byly stanoveny poměry jejich renálních clearance a clearance kreatininu, markeru glomerulární filtrace. Tyto dosahují u obou sacharidů hodnot přibližně 1, což potvrzuje glomerulární filtraci jako hlavní mechanismus renální eliminace obou látek. U potkanů s obstrukcí žlučovéhoodu byla celková clearance L-rhamnosy mírně, nevýznamně vyšší než u kontrolních zvířat, což vyplývá z významného zvýšení hodnot biliární clearance ve srovnání s potkany po imitované operaci. Podobné výsledky byly naměřeny i u melibiosy. Po obstrukci žlučových cest však nebyla pozorována změna žádného ze systémových farmakokinetických parametrů L-rhamnosy nebo melibiosy.

U intaktních (neoperovaných) potkanů byla hlavní cestou eliminace obou cukrů renální exkrece, čítající za 4 h 61,7 % (L-rhamnosa) a 70,6 % (melibiosa) podané dávky. Biliární exkrece byla naproti tomu nízká, a to 0,40 % (L-rhamnosa) a 0,06 % (melibiosa) aplikované dávky. V renální ani biliární kumulativní exkreci obou látek nebyly mezi zvířaty po imitované operaci a kontrolními zvířaty nalezeny v hodnocených časových intervalech žádné statisticky významné rozdíly. U potkanů s obstrukcí žlučovéhoodu se v prvních 60 minutách pokusu objevilo významné zvýšení biliární exkrece obou sacharidů. Důsledkem toho byly u potkanů s obstrukcí žlučovéhoodu kumulativní biliární exkrece obou látek značně vyšší než u obou skupin kontrolních zvířat (obr. 1). Kumulativní renální exkrece obou látek byla u potkanů s obstrukcí žlučovéhoodu nezměněna. Poměr kvantitativních hodnot biliární exkrece melibiosy/L-rhamnosy, indikující paracelulární permeabilitu, byl zvýšen u zvířat s obstrukcí žlučovéhoodu v průběhu prvních čtyř intervalů odběru (během 120 min po podání obou sacharidů) s následným poklesem na úroveň hodnot pozorovaných u kontrolních skupin (obr. 2). Kumulativní biliární

ekrece proto vykazovaly zvýšení tohoto poměru během celého pokusu. Obstrukce žlučového však neměla vliv na poměr kumulativních hodnot renální exkrece melibiosy a rhamnosy. Vzhledem k zvýšenému poměru biliární exkrece melibiosy/L-rhamnosy bylo provedeno porovnání poměrů plazmatických/žlučových koncentrací L-rhamnosy a melibiosy (obr. 3). V případě L-rhamnosy nebyl u potkanů s obstrukcí žlučového zaznamenán žádný pokles tohoto poměru. U melibiosy byl naproti tomu ve skupině s obstrukcí žlučového tento poměr v porovnání s intaktními a imitovaně operovanými zvířaty výrazně snížen.

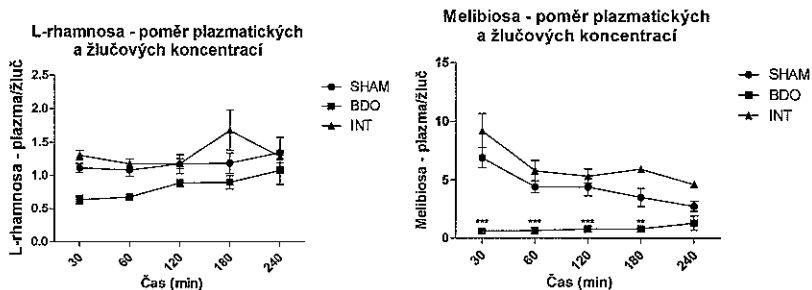


Obr. 1 Kumulativní biliární (BE) exkrece L-rhamnosy a melibiosy u intaktních potkanů (INT), zvířat po imitované operaci (SHAM) a potkanů s obstrukcí žlučového (BDO). Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku arit. průměru ( $n = 7$  v každé skupině). Statisticky významně odlišné od zvířat po imitované operaci (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ ).



Obr. 2 Poměr exkrece melibiosy a L-rhamnosy do žluči (BE) a změny tohoto poměru při korekci na kumulativní hodnoty u intaktních potkanů (INT), zvířat po imitované operaci (SHAM) a potkanů s obstrukcí žlučového (BDO). Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku arit. průměru ( $n = 7$  v každé skupině). Statisticky významně odlišné od zvířat po imitované operaci (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ).





**Obr. 3** Poměry plazmatických a žlučových koncentrací L-rhamnosy a melibiosy u intaktních potkanů (INT), zvířat po imitované operaci (SHAM) a potkanů s obstrukcí žlučového (BDO). Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku aritm. průměru ( $n = 7$  v každé skupině). Statisticky významně odlišné od zvířat po imitované operaci (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) pouze pro melibiosu.

## 6.2 Účinek modelových cytostatik mitoxantronu a doxorubicinu na ovlivnění syntézy DNA a bílkovin v ascitické formě myších nádorů MC29 a ATE

### *in vitro*

Cílem této části předkládané práce bylo ověřit zavedenou metodu sledující vliv potenciálních inhibitorů na časový průběh simultánní inkorporace  $[6\text{-}^3\text{H}]\text{-thymidinu}$  a L-[U- $^{14}\text{C}]\text{-aminokyselinové}$  směsi do buněk ascitických forem dvou myších karcinomů, MC29 a ATE, udržovaných v krátkodobých suspenzních kulturách *in vitro*. Tab. I přehledně shrnuje porovnání dvou různých postupů („kinetického“ a „jednobodového“) při výpočtu hodnot  $\text{IC}_{50}$  pro suspenze obou experimentálních nádorů v přítomnosti modelových cytostatik MX nebo DOX.

V přítomnosti MX došlo k významné inhibici inkorporace  $^3\text{H-thymidinu}$  i L-[U- $^{14}\text{C}]\text{-aminokyselinové}$  směsi, v případě DOX byla efektně tlumena pouze inkorporace  $^3\text{H-thymidinu}$ . Vedle poklesu konstant  $A$  ze vztahu  $1/1$  a tedy i počátečních rychlostí inkorporace značek je ve většině případů zřejmý i současný vzestup hodnot rychlosti degradace makromolekulární frakce (konstanta  $B$ ) a tedy i pokles poměrů  $A/B$  se stoupající koncentrací cytostatika.

Pro doplnění poznatků o vlastnostech nového nádorového modelu MC29 byl proveden pokus *in vivo*, sledující vliv MX v dávkách 3, 6 a 9  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  na hmotnost tohoto nádoru a přežití myši s inokulovaným nádorem MC29. Ovlivnění hmotnosti nádoru MC29 (resp.

buněčné frakce jeho ascitické formy) užitými dávkami mitoxantronu, zjišťované 10. den po inokulaci nádoru, je statisticky významné, se stoupající dávkou MX účinek roste prakticky lineárně. Po vyhodnocení přežití metodou podle Catera (Carter, 1982) byla zjištěna optimální dávka MX  $x_{opt} = 4,726 \text{ mg.kg}^{-1}$ , tedy  $14,2 \text{ mg.m}^{-2}$ , jako dávka, která odpovídá nejnižšímu riziku smrti.

nádor	inhibitor	prekurzor	IC <sub>50</sub> (1) (μmol.l <sup>-1</sup> ) <sup>*</sup>	IC <sub>50</sub> (2) (μmol.l <sup>-1</sup> ) <sup>†</sup>
MC29	MX	<sup>3</sup> H-thymidin	15,91	16,69
		L-[U- <sup>14</sup> C]-aminokyselinová směs	36,26	41,07
ATE	MX	<sup>3</sup> H-thymidin	28,79	23,41
		L-[U- <sup>14</sup> C]-aminokyselinová směs	77,84	75,34
MC29	DOX	<sup>3</sup> H-thymidin	16,01	9,64
		L-[U- <sup>14</sup> C]-aminokyselinová směs	inhibice nebyla prokázána	inhibice nebyla prokázána
ATE	DOX	<sup>3</sup> H-thymidin	22,91	16,80
		L-[U- <sup>14</sup> C]-aminokyselinová směs	inhibice nebyla prokázána	inhibice nebyla prokázána

**Tab. 1** Hodnoty IC<sub>50</sub> mitoxantronu a doxorubicinu u krátkodobých kultur ascitických forem nádorů MC29 a ATE *in vitro*, pro inkorporace <sup>3</sup>H-thymidinu a [U-<sup>14</sup>C]-aminokyselinové směsi. <sup>\*</sup>IC<sub>50</sub>(1) = koncentrace inhibitoru, snižující počáteční rychlost inkorporace značky na polovinu počáteční rychlosti inkorporace u kontroly (bez inhibitoru) – „kinetický přístup“. <sup>†</sup>IC<sub>50</sub>(2) = koncentrace inhibitoru, snižující aktivitu inkorporovanou do makromolekulární frakce po 120 min inkubace na polovinu aktivity makromolekulární frakce po 120 min u kontroly (bez inhibitoru) - „jednobodový přístup“.

### 6.3 Protinádorová účinnost L-rhamnosy v porovnání s 2-deoxyglukosou

V přítomnosti 2-DG došlo v rozmezí koncentrací 0 – 20 mmol.l<sup>-1</sup> k významné inhibici inkorporace [6-<sup>3</sup>H]-thymidinu i L-[U-<sup>14</sup>C]-aminokyselinové směsi do buněk nádorů ATE a MC29. U linie HL-60 byla hodnocena pouze inkorporace značeného thymidinu, kde byla rovněž pozorována inhibice (tab. 2). U L-rhamnosy naopak nebyla zaznamenána statisticky

významná inhibice ani [6-<sup>3</sup>H]-thymidinu ani L-[U-<sup>14</sup>C]-aminokyselínové směsi u žádného z nádorů, s jedinou výjimkou, a to inkorporace <sup>3</sup>H-thymidinu do ATE, kde při 20 mmol.l<sup>-1</sup> hodnota počáteční rychlosti inkorporace dosáhla 68,4 % kontroly.

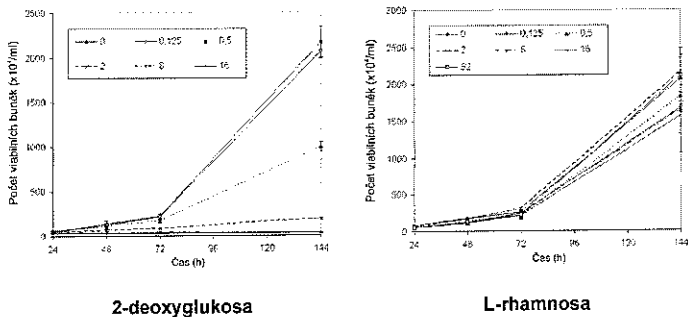
2-deoxyglukosa – IC <sub>50</sub> (mmol.l <sup>-1</sup> )		
Nádor	[6- <sup>3</sup> H]-thymidin	L-[U- <sup>14</sup> C]-AK směs
ATE	1,87	3,64
MC29	3,67	5,54
HL-60	19,3	-

**Tab.2** Hodnoty IC<sub>50</sub> 2-deoxyglukosu, mmol.l<sup>-1</sup> (koncentrace 2-DG, snižující počáteční rychlost inkorporace značky na polovinu počáteční rychlosti inkorporace u kontroly bez inhibitoru – „kinetický přístup“) pro inkorporaci [6-<sup>3</sup>H]-thymidinu i L-[U-<sup>14</sup>C]-aminokyselínové směsi do buněk nádorů ATE, MC29 a HL-60.

Při sledování vlivu obou deoxysacharidů na proliferaci buněk HL-60 došlo u 2-DG již při koncentraci 0,5 mmol.l<sup>-1</sup> ke snížení proliferace (analyzované jako počet viabilních buněk) v porovnání s kontrolními buňkami. Koncentrace 2-DG 2 – 16 mmol.l<sup>-1</sup> kompletně inhibovaly buněčnou proliferaci (obr. 4). V přítomnosti L-rhamnosy v koncentracích 0,125 – 32 mmol.l<sup>-1</sup> nebylo zaznamenáno žádné významné ovlivnění počtu viabilních buněk v porovnání s kontrolou (obr. 4). Inhibice proliferace v přítomnosti 2-DG byla koncentračně závislá a byla zaznamenána při koncentracích nad 0,5 mmol.l<sup>-1</sup> po inkubaci 48 h a delší.

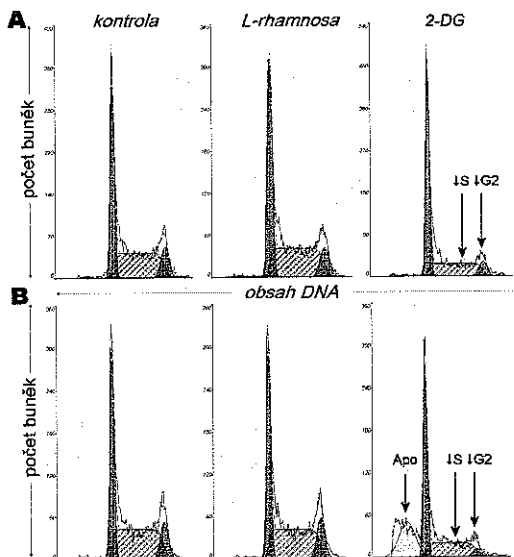
Po 24-hodinové inkubaci buněk HL-60 s 2-DG o koncentraci 5 mmol.l<sup>-1</sup> docházelo k zástavě buněčného cyklu ve fázi G<sub>1</sub>. Podíl buněk v S fázi klesl z 50 % (kontroly) na 38 %, podíl buněk v G<sub>2</sub>/M fázi z 12 % na 8 % (obr. 5A). Při hodnocení 72 h od začátku inkubace s 2-DG (obr. 5B) byl zachycen *sub-G<sub>1</sub>-peak*, ukazující na apoptózu (29 % buněk). V průběhu apoptózy je jaderná DNA štěpena na kratší internukleosomální sekvence a vznikají krátké štěpy DNA, jež následně z buněk unikají. Apoptotické buňky tak mají nižší obsah DNA než normální buňky v G<sub>1</sub> fázi buněčného cyklu. L-Rhamnosa ve stejné koncentraci (5 mmol.l<sup>-1</sup>) neovlivnila rozložení buněk ve fázích buněčného cyklu a neindukovala apoptózu.

Tyto výsledky potvrzuje i detekce štěpení laminu B. Fragменты tohoto proteinu vnitřní jaderné membrány se objevují v průběhu apoptózy. Zjistili jsme, že zatímco v přítomnosti 2-DG se štěpy laminu B v buňkách HL-60 objevují, nejsou po inkubaci s L-rhamnosou detekovatelné.



Obr. 4 Účinek 2-DG (levý graf) a L-rhamnosy na proliferaci buněk HL-60.

HL-60 byly vystaveny L-rhamnose nebo 2-DG v koncentracích od 0,125 mmol.l<sup>-1</sup> do 32 resp. 16 mmol.l<sup>-1</sup>, v plném kultivačním mediu. Body vyznačují průměr třech experimentálních hodnot ± SD.



Obr. 5 Účinek L-rhamnosy a 2-DG na rozložení buněčného cyklu a indukci apoptózy. Buňky HL-60 byly inkubovány s L-rhamnosou nebo 2-DG o koncentraci 5 mmol.l<sup>-1</sup> po dobu 24 h (A) a 72 h (B). Obsah DNA byl měřen flow-cytometricky. 2-DG indukovala blok buněčného cyklu ve fázi G1 a následnou apoptózu. Apoptóza byla detekována jako *subG1-peak*, t.zn. nižší obsah DNA než v normálních buňkách v G1 fázi.

## 7. DISKUSE

### 7.1 Farmakokinetika L-rhamnosy a testy permeability bariér

Jedním z cílů naší farmakokinetické studie bylo ozřejmit detailní farmakokinetiku L-rhamnosy se zvláštním zaměřením na dosud nepopsanou biliární exkreci. Renální exkrece L-rhamnosy zjištěná v této studii koresponduje s hodnotami v literatuře (Hallemesch et al., 2000; Krecic et al., 2003). Možný vliv ostatních cest, jako jsou přeměny na potenciální metabolity – rhamnitol nebo rhamnonovou kyselinu, vyžadují v budoucnosti další studie. Pro testování permeability bariér však nejsou podstatné. Tato práce poprvé ve světové literatuře kvantifikuje biliární exkreci L-rhamnosy a melibiosy u potkanů a ukazuje, že tato cesta hraje jen velmi malou roli v celkovém obratu obou látek. Avšak poměr koncentrací L-rhamnosy v plazmě a žluči mírně vyšší než 1 ukazuje, že rychlá pasivní difúze tohoto deoxysacharidu skrz hepatocyty (rychlé vyrovnání koncentrací ve žluči a plazmě) je velmi podobná situaci u enterocytů.

Detailní farmakokinetická studie intravenózně podané L-rhamnosy a melibiosy ukázala, že biliární exkrece obou sacharidů byla u potkanů s obstrukcí žlučového zvýšena v průběhu prvních 60 minut po podání v porovnání se zvířaty po imitované operaci a intaktními jedinci. Nárůst byl vyšší u melibiosy. Důsledkem toho bylo zvýšení poměru melibiosa/L-rhamnosa počítaného z hodnot žlučové exkrece u potkanů s obstrukcí žlučového během počátečních 120 minut. Kumulativní hodnoty tohoto poměru byly zvýšeny po celou dobu experimentu. Biliární exkrece těchto sacharidů je v porovnání s jejich renální exkrecí tak nízká, že exkrece obou sacharidů ledvinami ani její kumulativní hodnoty nebyly ovlivněny cholestázou. Z toho vyplývá, že přítomná cholestáza by neměla ovlivňovat výsledky hodnocení permeability střevní sliznice pomocí „*dual sugar*“ testu.

Při použití „*dual sugar*“ testu pro zjišťování integrity intestinální bariéry se předpokládá, že L-rhamnosa prochází skrz bariéry nezprostředkovanou transcelulární difúzí, zatímco melibiosa penetruje selektivně paracelulárními spojeními (Bjarnason et al., 1995). Výsledky naší studie souhlasně s těmito předpoklady ukazují, že distribuční objem L-rhamnosy koresponduje s množstvím celkové tělesné tekutiny potkana uváděné běžně v literatuře, což potvrzuje schopnost L-rhamnosy pronikat transcelulárně. Melibiosa, soudě podle jejího distribučního objemu, zůstává v extracelulárním prostoru. Pozorované zvýšení

biliární exkrece především melibiosy u potkanů s obstrukcí žlučového bylo spojeno s vzrůstem poměru melibiosa/L-rhamnosa ve vzorcích žluči sbíraných v průběhu prvních 120 minut po i.v. podání obou sacharidů. Tato data jsou v souladu se zvýšenou paracelulární permeabilitou ve studiích s křenovou peroxidásou, avšak v předkládané práci je tato detailní informace poprvé zjištěna u 24-hodinové obstrukce žlučového, běžně užívaného modelu akutní cholestázy. „Dual sugar“ test tedy může sloužit jako indikátor paracelulární permeability v transportu látek mezi žlučí a krví. Ačkoli kumulativní data ukazují, že se do žluči vylučuje jen velmi malá část podané L-rhamnosy, mohla by tato deoxyhexosa být díky rychlému vyrovnání jejich koncentrací v plazmě a žluči zajímavá jako marker biliární exkrece při studiu různých xenobiotik.

## 7.2 Účinek modelových cytostatik mitoxantronu a doxorubicinu na ovlivnění syntézy NA a bílkovin v ascitické formě myších nádorů MC29 a ATE *in vitro*

Metody zjišťující vliv zkoumané látky na syntézu NA, případně i bílkovin, jsou součástí standardního repertoáru postupů při screeningu i studiu mechanismu protinádorového účinku *in vitro*. Úkolem této části disertační práce bylo charakterizovat modely krátkodobých kultur ascitických forem myších adenokarcinomů mléčné žlázy ATE a MC29 jako jeden z kroků při zavádění metody pro testování potenciálně protinádorových látek, mezi něž mohou patřit i vybrané deoxysacharidy. Spontánní karcinom MC29, syngenní u myši NMRI, je navíc novým nádorem s dosud neupřesněnou chemosenzitivitou. Pro tuto první fázi zavádění metodiky byla vybrána modelová cytostatika mitoxantron a doxorubicin, u nichž je znám přímý účinek na syntézu nukleových kyselin, příp. i bílkovin.

Metoda průběžného sledování aktivity makromolekulární frakce precipitovatelné kyselinou trichloroctovou užitá v této práci umožňuje v porovnání s „jednobodovým“ postupem běžně užívaným v převážné většině studií sledovat časový průběh inkorporace. Výhodou zjištěné funkční závislosti je navíc i její využitelnost u obtížně hodnotitelných výsledků, zatížených vysokým rozptylem. Pro porovnání byly v této práci z naměřených aktivit provedeny výpočty  $IC_{50}$  jednak jako koncentrace inhibitoru snižující počáteční rychlost inkorporace značky na polovinu počáteční rychlosti inkorporace u kontroly, jednak běžně užívaným „jednobodovým“ způsobem, tedy jako koncentrace inhibitoru, snižující aktivitu inkorporovanou do makromolekulární frakce po 120 min inkubace na polovinu aktivit

srovnatelné kontroly. Zejména u MX jsou hodnoty  $IC_{50}$  získané oběma postupy velmi podobné.

Z výsledků získaných při zavádění metody vyplývá, že karcinom MC29 vykazuje v případě DOX i MX poněkud nižší hodnoty  $IC_{50}$  pro počáteční rychlost syntézy DNA než ATE. Senzitivita obou použitých nádorových modelů je však podobná a lze ji zhruba srovnat např. s Yoshidovým ascitickým retikulosarkomem (Mělka et Niang, 1996). Buňky ascitické formy nového modelového nádoru MC29 tedy mohou sloužit vedle ATE jako další vhodný model v krátkodobých kulturách *in vitro* pro porovnávání účinnosti nových potenciálních protinádorových látek s předpokládaným interkalačním mechanismem účinku či pravděpodobně i dalšími mechanismy inhibice biosyntézy DNA.

U obou použitých adenokarcinomů mléčné žlázy vykazuje MX lehce vyšší hodnoty  $IC_{50}$  pro inkorporaci  $[6-^3H]$ thymidinu než DOX. Navíc byla, ve shodě s literárními údaji (Safa et al., 1984) v přítomnosti MX zaznamenána značná inhibice inkorporace  $[U-^{14}C]$ -aminokyselinové směsi. U DOX naše výsledky ukazují poměrně slabou primární inhibici proteosyntézy, což také potvrzují dostupné studie (Israel et al., 1987; Schäfer et al., 1988).

Pokus *in vivo* hodnotící vliv modelového cytostatika MX na nádor MC29 byl proveden pro potvrzení výsledků získaných u tohoto nového nádorového modelu *in vitro*. Sledovaná byla jednak hmotnost buněčné frakce ascitického nádoru, jednak přežití léčených myší. Výsledkem byly jednoznačný průkaz účinnosti MX u MC29 *in vivo* a stanovení optimální dávky s nejvyšším terapeutickým benefitem pro přežití. Zjistili jsme, že tento nový nádorový model, syngenní na myších NMRI, je vhodným modelem pro testování účinnosti cytostatik *in vivo*.

### 7.3 Účinek L-rhamnosy *in vitro* v porovnání s 2-deoxy-D-glukosou

V této části práce byl porovnán protinádorový účinek dvou deoxyhexos: 2DG a L-rhamnosy. Jako nádorové modely byly použity buňky myších nádorů ATE, MC29 a lidské leukemie HL-60. 2-DG snižovala počáteční rychlost syntézy DNA a proteinů u ATE a MC29 a syntézy DNA u HL-60 (zde jsou dle očekávání hodnoty  $IC_{50}$  poněkud vyšší, pravděpodobně v souvislosti s chyběním p53). L-rhamnosa vykazovala pouze velmi slabou inhibici syntézy DNA u ATE žádné statisticky významné ovlivnění proteosyntézy. Prokázali jsme také, že 2-DG inhibuje buněčnou proliferaci, zastavuje buněčný cyklus v  $G_1$  fázi a indukuje apoptózu u buněk HL-60, zatímco u L-rhamnosy žádný z těchto efektů není patrný. Účinek

2-DG na nádorové buňky však zřejmě nespočívá v primárním poškození DNA. Pro to svědčí fakt, že 2-DG, na rozdíl faktorů přímo poškozujících DNA (např. Mareková et al., 2000; Vávrová et al., 2004a, b) u linie HL-60 nepůsobí zastavení cyklu ve fázi G<sub>2</sub>/M s následnou indukci apoptózy. Tento závěr je v souladu s výsledky Afta a kol. (2002) a s předpokládaným mechanismem protinádorového účinku 2-DG, tedy inhibicí glykolýzy a z toho vyplývající energetickou deplecí, projevující se zvláště u nádorových buněk. Dalším potvrzením tohoto závěru může být i pozorování, že při našem studiu vlivu 2-DG na syntézu DNA a bílkovin nedocházelo, na rozdíl od MX a DOX, při zvyšování koncentrace látky ke zvyšování empirické konstanty značící degradaci sledovaných makromolekul (Mělka, 1980).

V koncentracích do 20 (příp. 32) mmol.l<sup>-1</sup> tedy nebyl nalezen ani cytotoxický ani cytostatický účinek L-rhamnosy na použité nádorové modely *in vitro*. Na základě našich výsledků je velmi pravděpodobné, že L-rhamnosa nezasahuje do energetického metabolismu jako 2-DG. Vzhledem k hypotetickým analogiím L-rhamnosy s L-fukosou by však bylo třeba prozkoumat případný potenciál L-rhamnosy na vhodných modelech *in vivo*, v kontextu nádorové choroby.



## 8. POUŽITÁ LITERATURA

(40 vybraných citací z 212)

Aft RL, Zhang FW, Gius D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: Mechanism of cell death. *Br J Cancer* 2002;87:805-12.

Becker DJ, Lowe JB. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 2003;13:41R-53R.

Bjarnason I, Macpherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995; 108:1566-81.

Carter WH Jr., Wampler GL, Stablein DM, Campbell ED. Drug activity and therapeutic synergism in cancer treatment. *Cancer Res* 1982;42:2963-71

Cay O, Radnell M, Jeppsson B, Ahrén B, Bengmark S. Inhibitory effect of 2-deoxy-D-glucose on liver tumor growth in rats. *Cancer Res* 1992; 52:5794-6

Coffey JW, ON, Sellinger OZ. The metabolism of L-fucose in the rat. *J Biol Chem* 1964; 39:4011-7.

D'Antiga L, Dhawan A, Davenport M, Mieli-Vergani G, Bjarnason I. Intestinal absorption and permeability in paediatric short-bowel syndrome: a pilot study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999;29:588-93.

Ebbehoj E, Langkjer ST. Comparison between different parameters of cell viability. In vitro studies in a human cervix cancer cell line. *J Exp Cancer Res* 1995;14:95-101

Fare G, Sammons DC, Seabourne FA, Woodhouse DL. Lethal action of sugars on ascites tumor cells in vitro. *Nature* 1967;213:308-9.

FSANZ (Food Standards Australia New Zealand). D-Tagatose. A human health risk assessment. Technical Report Series No. 29. 2005; s. 25.

Hallemeesch MM, Lamers WH, Soeters PB, Deutz NE. Increased lactulose/rhamnose ratio during fluid load is caused by increased urinary lactulose excretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278:G83-G88.

Ishihara H, Massaro DJ, Heath EC. The metabolism of L-fucose. 3. The enzymatic synthesis of beta-L-fucose 1-phosphate. *J Biol Chem* 1968;243:1103-9.

Kalaitzakis E, Johansson JE, Bjarnason I, Bjornsson E. Intestinal permeability in cirrhotic patients with and without ascites. *Scand. J. Gastroenterol* 2006;41:326-30.

Katouzian F, Sblattero D, Not T, Tommasini A, Giusto E, Meiaccio D, Stebel M, Marzari R, Fasano A, Ventura A. Dual sugar gut-permeability testing on blood drop in animal models. *Clin Chim Acta* 2005;352:191-7.

Kern KA, Norton JA. Inhibition of established rat fibrosarcoma growth by the glucose antagonist 2-deoxy-D-glucose. *Surgery* 1987;102:380-5

Klener P. Protinádorová chemoterapie, Galén 1996 (první vydání, 614 s.).

Kojima T, Yamamoto T, Murata M, Chiba H, Kokai Y, Sawada N. Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes. *Med Electron Microsc* 2003;36:157–64.

Krecic MR, Steiner JM, Kern MR, Williams DA. Kinetics and postmucosal effects on urinary recovery of 5 intravenously administered sugars in healthy cats. *Can J Vet Res* 2003;67: 88–93.

Malagon I, Onkenhout W, Klok M, van der Poel PF, Bovill JG, Hazekamp MG. Rhamnose and rhamnitol in dual sugar permeability tests. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43:265–6.

Malawista I, Davidson EA. Isolation and identification of rhamnose from rabbit skin. *Nature* 1961;192:871–2.

Mareková M, Vávrová J, Vokurková D. Dose dependent biological effects of idarubicin in HL-60 cells: alterations of the cell-cycle and apoptosis. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2000;43:69-73.

Mattern J, Kaufmann M, Wayss K, Volm M: Studies on the Drug Sensitivity of Short Term Cultivated Tumour Cell Suspensions. In: „Human Tumours in Short Term Culture“ (red. Dendy PP), London, New York, San Francisco, Academic Press 1976(b); s. 301.

Mělka M. Průběh inkorporace směsi L-[U-<sup>14</sup>C]-aminokyseliny in vitro v závislosti na koncentraci buněk Ehrlichova ascitického karcinomu: rigorózní práce. Přírodovědecká fakulta University Karlovy v Praze. Praha 1980. 671.

Mělka M, Niang M. Mitoxantrone and inhibition of [8-<sup>3</sup>H] adenosine incorporation. *Chemické listy* 90;1996:761-2.

Miko M, Drobnica L, Chance B. Inhibition of energy metabolism in Ehrlich ascites cells treated with dactylarin in vitro. *Cancer Res* 1979;39:4242-51.

Pastor A, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Factors influencing the inhibition of biliary glutathione efflux induced by biliary obstruction. *Life Sci* 2000; 68: 69–79.

Romijn JC, Verkoelen CF, Schroeder FH. Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: establishment of test conditions and assessment of hormone-stimulated growth and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects. *Prostate* 1988;12:99-110

Rosato FE, Mullen JL, Rosato EF, Steiger E, Miller EE. Continuous intravenous fucose treatment of rat mammary tumor. *J Surg Oncol* 1972; 4:94–101

Roseman JM, Miller EE, Seltzer MH, Wolfe D, Rosato FE. The effect of L-fucose on rat mammary tumor growth II. In vitro studies. *J Surg Oncol* 1971; 3:79-88.

Roszkowski W, Beuth J, Ko HL, Uhlenbruck G, Pulverer G. Blocking of lectin-like adhesion molecules on pulmonary cells inhibits lung sarcoma L-1 colonization in BALB/c-mice. *Experientia*. 1989;45:584-8.

Segal S, Topper YJ. On the biosynthesis of L-fucose and L-fucose metabolism in man. *Biochem Biophys Acta* 1960;42:147-51.

Staňková J. Fucose-activated killer cells. I. Enhanced TNF- $\alpha$  mRNA accumulation and protein production. *J Leukoc Biol* 1992;52:188-196.

Takakuwa Y, Kokai Y, Sasaki K, Chiba H, Tobioka H, Mor M, Sawada N. Bile canalicular barrier function and expression of tight-junctional molecules in rat hepatocytes during common bile duct ligation. *Cell Tissue Res* 2002;307:181–9.

Taylor RM, Bjarnason I, Cheeseman P, Davenport M, Baker AJ, Mieli-Vergani G, Dhawan A. Intestinal permeability and absorptive capacity in children with portal hypertension. *Scand. J Gastroenterol* 2002; 37: 807–11.

Tsuda M, Yoshioka Y, Kataoka N, Tachibana M, Maeda Y, Uehara N, Kawazoe Y, Chihara G, Nakahara W. Isolation and characterization of carcinostatic liver factors active in vitro. *Gann* 1965;56:69-74.

Tymiak AA, Norman JA, Bolgar M, DiDonato GC, Lee MH, Parker WL, Lo LC, Berova N, Nakanishi K, Haber E. Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993;90:8189–93.

Vávrová J, Mareková M, Vokurková D, Szkanderová S, Psutka J. Caffeine induces a second wave of apoptosis after low dose-rate gamma radiation of HL-60 cells. *Radiat Environ Biophys* 2003;42:193-99

Vávrová J, Řezáčová M, Vokurková D, Östereicher J, Vilasová Z. Degradace Cdc25A fosfatasy v odpočívání poškození buněk HL-60 ionizujícím zářením. *Radiační Onkologie* 2004, 86-9 (b)

Zhu Z, Jiang W, McGinley JN, Thompson HJ. 2-Deoxyglucose as an energy restriction mimetic agent: Effects on mammary carcinogenesis and on mammary tumor cell growth in vitro. *Cancer Res* 2005;65:7023-30.

Zuckerman MJ, Menzies IS, Ho H, Gregory GG, Casner NA, Crane RS, Hernandez JA. Assessment of intestinal permeability and absorption in cirrhotic patients with ascites using combined sugar probes. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 621–6.

## 9. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

### Originální práce *in extenso*:

Tomsik, P., Sispera, L., Rezacova, M., Niang, M., Stoklasova, A., Cerman, J., Knizek, J., Brckova, E., Cermanova, J., Míčuda, S. Increased melibiose/rhamnose ratio in bile of rats with acute cholestasis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*; In press

Tomšík, P., Stoklasová, A., Mičuda, S., Niang, M., Šuba, P., Knižek, J., Řezáčová, M. Evaluation of the antineoplastic activity of L-rhamnose *in vitro*. A comparison with 2-deoxyglucose. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2008; 51(2).

Niang, M., Mělka, M., Stoklasová, A., Cerman, J., Tomšík, P. Evaluation of the antineoplastic activity of mitoxantrone-L-carnitine combination therapy on an experimental solid form of Ehrlich tumor in mice. *Pharmacological Research*, 2006 Dec;54(6):447-51.

Niang, M., Tomšík, P., Mělka, M., Stoklasová, A., Cerman, J., Šišpera, L. Effect of L-carnitine against acute mitoxantrone toxicity in mice. *Central European Journal of Biology* 2008;3:268-272.

### Prezentace:

Tomšík P: Závislost rychlosti biosyntézy proteinů na koncentraci nádorových buněk.

444. Plenární zasedání Fyziologické sekce České lékařské společnosti J. E. Purkyně v Hradci Králové dne 4. května 2005.