

**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**

**MUDr. Pavel Tomšík
Ústav lékařské biochemie
Hradec Králové 2008**

*„Wenn wir die Natur auf das reduzieren, was wir verstanden haben,
sind wir nicht überlebensfähig.“*

Hans-Peter Dürr (*1929), německý fyzik

Nejprve bych rád poděkoval své současné školitelce, doc. MUDr. Martině Řezáčové, PhD., za velmi cenné rady a připomínky při koncepci této práce, za její profesionální přístup i za plodnou experimentální spolupráci.

Panu doc. MUDr. RNDr. Milanu Mělkovi, dřívějšímu školiteli, bych chtěl vyjádřit dík za předání znalostí a dovedností při provádění pokusů s experimentálními nádory in vitro i in vivo a jejich vyhodnocování, ale také za vedení při chemických syntézách nových derivátů protinádorových látek, které do této disertační práce nemohly být zahrnuty.

Pan doc. MUDr. Jaroslav Cerman, CSc., jehož lidského přístupu i vědeckého interdisciplinárního nadhledu si neobyčejně vážím, významně přispěl také při praktické koordinaci experimentů této práce.

Panu MUDr. Stanislavu Mičudovi, PhD., a ing. Ludřkovi Šišperovi, CSc., jsem vděčen za konstruktivní spolupráci a předávání zkušeností při zavádění metod farmakokinetiky a analytiky deoxysacharidů.

Veliký dík patří paní doc. MUDr. Aleně Stoklasové, CSc., za cenné připomínky k práci i k textu, jakož i kriticky optimistické povzbuzení k mé tvorbě.

Rovněž je třeba připomenout výbornou spolupráci s ing. Jiřím Knížkem, CSc., a RNDr. Evou Čermákovou při matematicko-statistickém zpracování dat.

Laborantkám paní Lence Kriesfalussyové, Dagmar Ježkové, Věře Ročkové, Evě Vodákové a dalším pak děkuji za zručnou a perfektní technickou pomoc, bez níž by bylo velmi obtížné se obejít.

OBSAH

1. PŘEDMLUVA	6
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1. Protinádorový účinek nesubstituovaných deoxyhexos – 2-deoxy-D-glukosy a L-fukosy	8
2.2. L-Rhamnosa – výskyt a vlastnosti	10
2.3. Metabolismus, protinádorový efekt a kinetika L-rhamnosy v savčím organismu a testy permeability bariér	12
2.4. Stanovení chemosenzitivity nádorů <i>in vitro</i>	14
2.4.1. <i>Některé další metody sledující alteraci metabolismu a viabilitu nádorových buněk in vitro</i>	16
2.4.2. <i>Metody in vitro pro zjišťování inhibice syntézy nukleových kyselin a bílkovin</i>	18
2.4.3. <i>Modelová cytostatika – doxorubicin a mitoxantron</i>	21
3. CÍLE PRÁCE	25
4. MATERIÁL A METODY	26
4.1. Studium farmakokinetiky L-rhamnosy a integrity hepatobiliární bariéry	26
4.1.1. <i>Materiál a pokusná zvířata</i>	26
4.1.2. <i>Odběr vzorků</i>	26
4.1.3. <i>Stanovení zkoumaných sacharidů v tělních tekutinách</i>	27
4.1.4. <i>Analýza farmakokinetických dat</i>	28
4.2. Nádorové modely	30
4.2.1. <i>Myši adenokarcinomy mléčné žlázy</i>	30
4.2.2. <i>Lidská leukemie HL-60</i>	31
4.3. Testování účinku zkoumaných látek na počáteční rychlost biosyntézy makromolekul <i>in vitro</i>	32
4.3.1. <i>Provedení experimentů</i>	32
4.3.2. <i>Vyhodnocení vlivu zkoumaných látek na biosyntézu DNA a bílkovin in vitro</i>	33
4.4. Analýza buněčného cyklu	35
4.5. Detekce štěpů laminu B	35
4.6. Účinek MX na ascitickou formu nádoru MC29 <i>in vivo</i>	36
5. VÝSLEDKY	39
5.1. Studium farmakokinetiky melibiosy a L-rhamnosy a testování integrity hepatocelulární bariéry u potkana	39
5.1.1. <i>Farmakokinetika melibiosy a L-rhamnosy</i>	39
5.1.2. <i>Biliární a renální exkrece</i>	43
5.2. Účinek modelových cytostatik mitoxantronu a doxorubicinu na ovlivnění syntézy DNA a bílkovin v ascitické formě myších nádorů MC29 a ATE <i>in vitro</i>	50
5.3. Ověření senzitivity ascitické formy nádoru MC29 na MX <i>in vivo</i>	53
5.4. Protinádorová účinnost L-rhamnosy v porovnání s 2-deoxyglukosou	56

5.4.1. Účinek <i>L</i> -rhamnosy a 2-deoxyglukosy na syntézu DNA a bílkovin v nádorových buňkách	56
5.4.2. Účinek <i>L</i> -rhamnosy a 2-deoxyglukosy na proliferaci buněk HL-60	60
5.4.3. Ovlivnění buněčného cyklu a indukce apoptózy v přítomnosti <i>L</i> -rhamnosy a 2-deoxyglukosy a štěpení laminu B	61
6. DISKUSE	63
6.1. Studium farmakokinetiky melibiosy a <i>L</i> -rhamnosy a testování integrity hepatobiliární bariéry u potkana	63
6.2. Účinek modelových cytostatik mitoxantronu a doxorubicinu na ovlivnění syntézy NA a bílkovin v ascitické formě myších nádorů MC29 a ATE <i>in vitro</i>	65
6.3. Účinek <i>L</i> -rhamnosy <i>in vitro</i> v porovnání s 2-deoxy-D-glukosou	70
7. SOUHRN HLAVNÍCH VÝSLEDKŮ	72
8. POUŽITÁ LITERATURA	73
9. PŘÍLOHY	87
9.1. Ovlivnění syntézy NA a bílkovin v nádorových buňkách ascitické formy nádorů MC29 a ATE v přítomnosti MX a DOX <i>in vitro</i>	87
9.2. Účinek mitoxantronu na ascitickou formu nádoru MC29 <i>in vivo</i>	95
9.3. Ovlivnění syntézy NA a bílkovin v nádorových buňkách ascitické formy nádorů MC29 a ATE v přítomnosti 2-deoxyglukosy a <i>L</i> -rhamnosy <i>in vitro</i>	96
10. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI	106

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATE	ascitický tumor Ehrlichův
AUC _{tot}	plocha pod křivkou závislosti plazmatické koncentrace na čase
AUMC _{tot}	plocha pod momentovou křivkou závislosti plazmatické koncentrace na čase
BDO	obstrukce žlučovodu
BrdU	5-brom-2'-deoxyuridin
BT	3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenylen)bis(2,5-difenyl)-2H-tetrazoliumchlorid
C _{max}	maximální koncentrace
Cl _{bile}	biliární clearance
Cl _{CR}	clearance kreatininu
Cl _{ren}	renální clearance
Cl _{tot}	celková clearance
2-DG	2-deoxy-D-glukosa
DOX	doxorubicin
DPM	počet rozpadů za minutu
DSB	dvojláknový zlom DNA
F 1/1	izotonický roztok chloridu sodného
INT	2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-fenyltetrazoliumchlorid
K _{el}	eliminační konstanta
MC29	označení mamárního adenokarcinomu derivovaného z myší NMRI
MRT	střední pobytová doba
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium, vnitřní sůl
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitroimidazoliumbromid
MX	mitoxantron
NA	nukleové kyseliny
NBT	2,2'-dinitrofenyl-5,5'-difenyl-3,3'-dimethoxy-4,4'-difenylen)-ditetrazoliumchlorid
NMRI	Naval Medical Research Institute; outbrední kmen myší
PVDF	polyvinylidenfluorid
SDS	dodecylsulfát sodný
SEM	střední chyba aritmetického průměru
SSB	jednovláknový zlom DNA
TNBT	2,2',5,5'-tetra-p-nitrofenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-difenylen)-ditetrazoliumchlorid
V _{d_{ss}}	distribuční objem pro ustálený stav (<i>steady state</i>)
V _{d_z}	zdánlivý distribuční objem
WST-1	2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium, monosodná sůl
WST-3	2-(4-jodofenyl)-3-(2,4-dinitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium, monosodná sůl
WST-4	2-benzothiazothiazolyl-3-(4-carboxy-2-methoxyfenyl)-5-(2-sulfoethylkarbamoyl)fenyl-2H-tetrazolium monosodná sůl
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium, monosodná sůl
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-5[(fenylamino)karbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxid

1. PŘEDMLUVA

Každý den na světě umírá asi 20 000 lidí v důsledku onemocnění zhoubným nádorem. Značné části z nich by bylo možno předejít – tak se kupříkladu odhaduje, že v průběhu dvacátého století způsobily zhoubné nádory vzniklé v souvislosti s kouřením smrt asi 100 milionů lidí, pro 21. století se předpokládá jedna miliarda (WHO, 2008). Ačkoliv intenzivní výzkum v posledních desetiletích přinesl snížení smrtelnosti četných druhů nádorů, stále umírá každý pátý občan České republiky na následky maligních nádorových onemocnění (SVOD, 2008). Navíc incidence i letalita některých z nich, a to i těch, jež postihují mladší věkové kategorie, v průmyslových zemích stále stoupá. Jsou to zhoubné nádory převážně bez známé možnosti prevence, jako např. non-hodgkinské lymfomy, zhoubné novotvary mozku či karcinomy varlat a štítné žlázy (Zeeb et Blettner, 2004; Van der Horst, 2006; SVOD, 2008).

Možnosti léčby velké většiny nádorových onemocnění jsou v porovnání s jinými obory medicíny stále velmi nedostatečné. Vedle chirurgické léčby, radioterapie, imunoterapie, rozvíjející se genové terapie atd. má dosud velmi významné postavení chemoterapie, i když počet látek zaváděných nově do onkologické praxe od 70. let, která byla charakterizována často až nekritickým nadšením, postupně ubývá. Přesto však má chemoterapie zhoubných nádorů, zejména jako součást multimodálních léčebných postupů, nadále rozvojový potenciál. Zvláště nadějně se nyní navíc zdají cesty cíleného ovlivnění molekulárních mechanismů karcinogeneze.

Každý rok je registrováno přibližně 15 000 nových syntetických látek a 400 extraktů přírodních substancí s potenciálně protinádorovým účinkem (Klener, 1996). Vývoj většiny z nich se však zastaví v rámci orientačního výběru *in vitro* a dále při prvotním screeningu *in vivo*, velká část zbylých látkových „kandidátů“ pak odpadá při hledání vhodné lékové formy, při farmakologických a toxikologických preklinických studiích. Cílem neúnavné činnosti chemiků a experimentálních onkologů je tedy nejen nalézt slibnou látku, ale také správně otestovat její účinek a další vlastnosti se zřetelem na rychlost a ekonomičnost postupů a omezení nepříliš vítaných manipulací s pokusnými

Cílem předkládané práce bylo prozkoumat potenciální protinádorový účinek deoxycukrů. U 2-deoxy-D-glukosy je tento účinek znám, v této práci byla věnována pozornost jiné deoxyhexose – L-rhamnose, jejíž případný účinek v této oblasti dosud nebyl osvětlen. Nejprve byla prostudována její farmakokinetika, zejména biliární exkrece. Zásadní podmínkou této studie byla také část metodická, tedy modifikace a zavedení citlivé metody detekce monosacharidů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pro posouzení protinádorového účinku bylo třeba vybrat a ověřit vhodnou testovací metodu. Volba padla na ovlivnění biosyntézy nukleových kyselin a proteinů sledováním inkorporace radioaktivně značených prekurzorů v krátkodobých kulturách nádorových buněk *in vitro*. Jako nádorové modely byl použit ascitický Ehrlichův nádor a dále dosud netestovaný adenokarcinom mléčné žlázy MC29, který vznikl spontánně u myší linie NMRI, použité i v této práci, a mohl by tak být velmi vhodným modelem nádorové choroby. Jako látky, u kterých je protinádorový efekt prokázán a jsou zavedeny do klinické praxe, byly zvoleny mitoxantron a doxorubicin.

Ověřená metoda pak byla aplikována pro testování 2-deoxy-D-glukosy a L-rhamnosy s ohledem na jejich protinádorový účinek. Navíc byla přibrána ještě lidská nádorová linie HL-60 pro sledování ovlivnění proliferace a indukce apoptózy.

Pokud se autorovi podařilo čtenáře přesvědčit, že zdánlivá heterogenita této práce ve skutečnosti umožnila připravit pole pro důkladné studium vybraných deoxysacharidů, této neobyčejně zajímavé a možná dosti perspektivní skupiny látek, je již toto pro něj velkým zadostiučiněním.

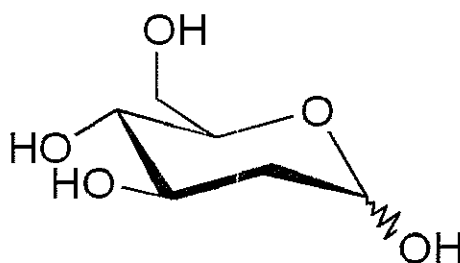
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. 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 (méně správně nazývaná také 2-deoxy-D-arabino-hexosa), 2-DG, je analog D-glukosy, uměle připravovaný z D-glukosy, D-mannosy, D-glukonové kyseliny,

D-arabinosy, chitinu či jeho derivátů (Bergmann et al., 1922; Arita et al., 1972; Monneret et Choay, 1981). Její účinek spočívá v inhibici glukosafosfátisomerasy (fosfohexosaisomerasy) (Sols et Crane, 1954; Tower, 1958) 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 (Karczmar et al., 1992; Yamada et al., 1999), se 2-DG stala nadějným kandidátem na protinádorově účinnou látku. Skutečně byl potvrzen inhibiční efekt 2-DG nejen u nádorových buněčných linií *in vitro* (Zhu et al., 2005) ale i *in vivo*, např. na růst potkaního fibrosarkomu (Kern 1987) a hepatocelulárního karcinomu (Cay et al., 1992). Inhibice glykolýzy a z toho vyplývající deplece ATP spouští apoptotický mechanismus buněčné smrti. V něm se účastní inhibice fosfatidylinositol-3-kinasy/Akt signální dráhy (Tzatsos et Tschichlis, 2007), zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku, interference s drahami MAPK a stabilizace p53 (Moley et Mueckler, 2000). Ve shodě s těmito známými mechanismy dokázal i Aft a kol. (2002), že 2-DG indukuje buněčnou smrt cestou apoptózy.



Obr. 1 2-deoxy-D-glukosa

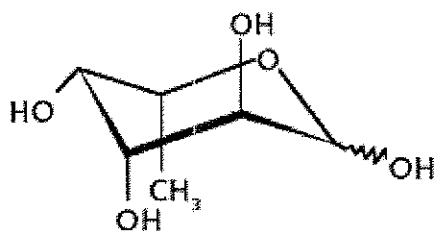
Nadějná by mohla být pak zvláště kombinace 2-DG s cytostatiky *in vitro* (Yamada et al., 1999; Kaplan et al., 1990) i *in vivo*, kdy např. Mashek a kol. (2004) zaznamenali vliv kombinace 2-DG s doxorubicinem či paklitaxelem na snížení růstu objemu xenotransplantátů lidských nádorů u myši. Zvláště citlivé jsou hypoxické nádorové buňky (Maher et al., 2003). Bohužel se však ukázalo, že 2-DG indukuje expresi glykoproteinu P, produktu genu *MDR-1*, a může tak zvyšovat chemorezistenci (Ledoux et al., 2003). Tento efekt by mohl být limitující při použití 2-DG v léčbě zhoubných nádorů a převážit tak i pravděpodobný inhibiční vliv 2-DG na funkci P-glykoproteinové pumpy, jež je závislá na ATP (Sauna et al., 2001).

Z hlediska protinádorového účinku by mohla být zajímavá i příbuzná 6-deoxy-D-glukosa, která je inhibitorem hexokinasy (Yeung et al., 2003). Její efekt na nádorové buňky dosud nebyl dostatečně studován.

L-fukosa (6-deoxy-L-galaktosa) je jediná endogenní deoxyhexosa v lidském organismu. Její aktivovaná forma, GDP-fukosa, užívaná 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 fukokinasou 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-[1-¹⁴C]fukosy pacientům bylo 39 % radioaktivity vyloučeno ve formě ¹⁴CO₂ (Segal et Topper, 1960). U potkanů bylo po *i. p.* podání takto vyloučeno pouze 1,6 % (Bekesi et Winzler, 1967). Po intraperitoneálním podání volné L-fukosy myším v dávce 200 mg.kg⁻¹ nebyla zaznamenána zvýšená tvorba glykogenu (Shull et Miller, 1960), což znamená, že u nich L-fukosa není štěpena na tříuhlíkaté meziproducty glykolýzy. Naproti tomu byla v pokusech *in vitro* s extrakty prasečích hepatocytů zaznamenána přeměna 1 mol L-fukosy na 2 mol L-laktátu (Chan et al., 1979). 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 intravenózně podané L-fukosy na velikost solidního adenokarcinomu mléčné žlázy u potkanů *in vivo* (Rosato et al., 1972; Wolfe et al., 1971; Seltzer et al., 1969; Mullen et al., 1973). Současně tito autoři pozorovali inhibiční účinek L-fukosy na růst nádorových buněk *in vitro* (Roseman et al., 1971; Wolfe et al., 1970). 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. Při hledání mechanismu tohoto účinku bylo zjištěno, že dochází k jistému zvýšení produkce 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).



Obr. 2 L-Fukosa

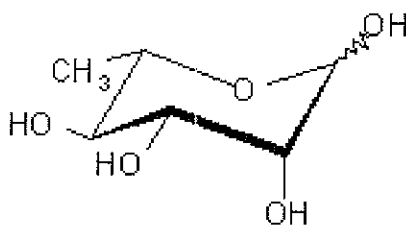
Je známo, že L-fukosa hraje významnou roli v patogenezi maligních nádorů. Jedním z pozorovaných jevů u malignit je např. ztráta exprese antigenů krevních skupin A a B se současným zvýšením exprese antigenů H a Lewis^y u nádorů, související s jejich zhoršenou prognózou. Podobný dopad má i zvýšená tvorba fukosylovaných epitopů sialyl-Lewis^x a sialyl-Lewis^a, sloužících jako ligandy pro selektin. Tím by mohla být usnadněna vazba hematogenně metastazujících nádorových buněk na selektiny E a P exprimované endoteliemi (Kim et Varki, 1997; Becker et Lowe, 2003).

2.2. L-Rhamnosa – výskyt a vlastnosti

L-Fukose je chemicky příbuzná další deoxyhexosa – **L-rhamnosa**, 6-deoxy-L-mannosa, L-mannomethylosa, isodulcitol, (2R,3R,4R,5R,6S)-6-methyloxan-2,3,4,5-tetrol, která je hojně syntetizována v bakteriích a v rostlinných buňkách, nikoli však v živočišných. Izolace byla popsána Clarkem (1919), a to z kůry dubu označovaného jako „black oak“, což může být *Quercus velutina* Lam. nebo *Q. kelloggii* Newberry. Dále byla L-rhamnosa izolována např. z glykosidů škumpy jedovaté [*Toxicodendron vernix* (L.) Kuntze, syn. *Rhus vernix* L.], řešetláku počistivého (*Rhamnus cathartica* L.) či krušiny olšové (*Rhamnus frangula* L., syn. *Frangula alnus* Mill.). Od rodu *Rhamnus* L. získala tato deoxyhexosa také své jméno. V *Rhamnaceae* se L-rhamnosa vyskytuje

zejména jako součást anthraglykosidů (tzv. laxativních anthranoidů), jejichž nejznámějším zástupcem je glukofrangulin A. L-Rhamnosa je mimoto součástí rhamnogalakturonanů, pektických polysacharidů buněčné stěny rostlin (Ridley et al., 2001), dále některých rostlinných glykoproteinů (Haruko et Haruko, 1999), arabinogalaktanových proteinů (Pellerin et al., 1995) a různých sekundárních metabolitů obsažených v mnohých rostlinách. K nim patří např. sladký rebaudiosid C ze *Stevia rebaudiana* Bert. (Sakamoto et al., 1977), kardioglykosid strophanthin (ouabain) ze *Strophanthus* DC., dále rutin, quercitrin, naringin a neohesperidin (Bar-Peled et al., 1991), ale i diterpenové glykosidy v tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) (Shinozaki et al., 1996), polysacharidy v arabské gumě z *Acacia senegal* (L.)Willd. a *A. seyal* Del. či glykoalkaloid

α -solanin v lilkovitých (*Solanaceae*). Z některých výše uvedených rostlinných, ale i dalších zdrojů (např. bakteriálního polysacharidu S60) se L-rhamnosa poměrně snadno získává enzymatickou nebo kyselou hydrolyzou a lze ji označit za nejdostupnější 6-deoxymonosacharid (Mixich et al., 1992). Význam L-rhamnosy jako složky stěny bakteriální buňky a její syntézu v bakteriích podrobně popsali Salton (1960) a Giraud et Naismith (2000). Narozdíl od L-izomeru rhamnosy je D-rhamnosa v přírodě velmi vzácná. Nalezena byla pouze ve vnější membráně některých bakterií, např. *Pseudomonas aeruginosa* (Webb et al., 2004).



Obr. 3 L-rhamnosa

L-Rhamnosa je bílý krystalický prášek tající při 82 – 92 °C (α -anomer), příp. 122 – 126 °C (β -anomer). Z vodného roztoku L-rhamnosa krystaluje jako α -forma, a to vždy jako monohydrát (holoedrické tyčky). Při zahřívání dochází ke ztrátě krystalové vody a částečné přeměně na β -formu, tato však na vlhkém vzduchu opět přechází v krystaly α -anomeru. Monohydrát L-rhamnosy je dobře rozpustný ve vodě (0,3 g

v 1 ml, 20 °C), hůře v ethanolu. Vodný roztok α -formy vykazuje mutarotaci $[\alpha]_D^{20} - 7,7^\circ \rightarrow + 8,9^\circ$. α -Anomer má výrazně sladkou chuť, jeho sladivost je však nižší než u sacharosy (Hudson et Yanovsky, 1917; Budavari et al., 1996).

2.3. Metabolismus, protinádorový efekt a kinetika L-rhamnosy v savčím organismu a testy permeability bariér

Pro případné podání L-rhamnosy je důležitá důkladná znalost jejího chování v savčím organismu. O metabolismu L-rhamnosy u živočichů je dosud známo poměrně málo. Do buněk proniká neprostředkovanou difúzí (Bjarnason et al., 1995), jeví k ní afinitu některé enzymy, např. jaterní aldosadehydrogenasa, jež je podobná galaktosadehydrogenase (Cuatrecasas et Segal, 1966) a je také pravděpodobně ve významné míře redukována na rhamnitol (viz níže). Je tedy možné, že tento deoxysacharid může vstupovat do některých metabolických drah, ačkoli asi nemůže být energeticky využíván (Eagle et al., 1958). Vzhledem k tomu, že může sloužit jako substrát L-fukokinasy (Ishihara et al., 1968), která katalyzuje první reakci v biosyntéze GDP-fukosy v „*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 zhoubné nádory se objevily v 60. letech 20. století (Tsuda et al., 1965; Fare et al., 1967). U nádorových buněk inkubovaných 1 h v přítomnosti různých monosacharidů a jejich metabolitů nedošlo v případě L-rhamnosy ke ztrátě schopnosti vytvořit tumor po následné inokulaci do myši. 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.

Po perorálním podání je L-rhamnosa absorbována jen částečně. Přes intaktní střevní sliznici prostupuje poměrně obtížně, a to i když prochází do buněk bez přenašeče prostou difúzí, takže pouze 8-17 % perorálně podané L-rhamnosy je u zdravých lidí vyloučeno do moči (FSANZ, 2005). Je-li podána intravenózně, vylučuje se také

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, nemohla uspokojivě vysvětlit osud zbylé čtvrtiny množství L-rhamnosy v plazmě, která není po *i. v.* podání vyloučena renálně. Předpokládalo se, že je tento zbytek plazmatické L-rhamnosy neznámým způsobem metabolizován (Krecic et al., 2003). Teprve roku 2006 našli Malagon a kol. (Malagon et al., 2006) 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. Nebylo však uvažováno, do jaké míry by mohl zmíněný rhamnitol vznikat redukcí neabsorbované L-rhamnosy za účasti střevní mikroflóry a následně pronikat do plasmy. Stanovení rhamnitolu po intravenózním podání

L-rhamnosy zatím v literatuře chybí. Navíc lze vyslovit i další domněnku, že je část uvedeného zbytku plazmatické L-rhamnosy vyloučena do žluči, i když jde o látku dobře rozpustnou ve vodě. Jedním z cílů předkládané práce bylo tuto hypotézu ověřit.

I přes neúplné znalosti osudu L-rhamnosy v organismu se tato deoxyhexosa využívá v potravinářském průmyslu i klinické praxi. Jako samostatné sladidlo je dnes již používána poměrně řídkce. Bylo však navrženo její přidávání k syntetickým sladidlům pro přiblížení k chuti sacharózy (Lotz, 1995). V klinické medicíně našla L-rhamnosa využití v tzv. „*dual-sugar*“ testech pro hodnocení permeability střevní sliznice (Bjarnason et al. 1995; Hallemeesch et al., 2000; Katouzian et al., 2005). Tyto testy jsou uplatňovány i pro posuzování paracelulárního transportu ve střevní sliznici u různých zvířecích modelů (Hallemeesch et al., 2000; Krecic, et al., 2003). Princip je založen na předpokladu, že zatímco L-rhamnosa proniká transcelulárně prostou difúzí, vybraný disacharid paracelulárně skrz mezibuněčné spoje (Bjarnason et al., 1995; D'Antiga et al., 1999). V praxi se podává perorálně směs L-rhamnosy a disacharidu a následně je měřena exkrece obou látek v moči sbírané po dobu obvykle 5 hodin. Nejčastěji užívaným disacharidem je laktulosa, která je však také známa pro své projímavé účinky. Proto byl do klinické praxe úspěšně zaveden jiný pro člověka nefyziologický sacharid, melibiosa (D'Antiga et al., 1999; Taylor et al., 2002). Jedná se o 6-O- α -D-galaktopyranosyl-D-glukosu, vznikající bakteriálním rozkladem raffinózy. Již koncem

třicátých let 20. století (Clarke et al., 1939) bylo zjištěno, že při jejím podávání hladovějícím potkanům nepřispívá k tvorbě glykogenu, od té doby dosud nebylo zaznamenáno její metabolické využití u savců.

Testování integrity intestinální bariéry je však založeno na předpokladech, které nemusejí být platné za některých patologických stavů. Především se předpokládá stabilní distribuce sledovaných látek v tkáních. Tento parametr lze však obtížně predikovat v přítomnosti extrahepatální cholestázy nebo cirhózy, 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 pevných spojení (*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 (Metz et al., 1977; Rahner et al.; 1996; Wiener et al., 2000; 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.

2.4. Stanovení chemosenzitivity nádorů *in vitro*

Pro zhodnocení potenciálního protinádorového účinku L-rhamnosy a případně dalších výhledově vybraných sloučenin bylo v rámci předkládané práce třeba zavést vhodnou metodu. Obecně vzato jsou testovací systémy *in vitro* výhodné nejen pro screening potenciálně protinádorových látek, ale i zjišťování jejich mechanismu účinku. Jejich výhodou oproti pokusům *in vivo* je jejich rychlost, nižší cena, snížení utrpení pokusných zvířat a možnost prověření účinnosti velkého množství látek, a to i je-li jich k dispozici pouze malé množství. Umožňují také stanovení individuální chemosenzitivity/chemorezistence nádoru odebraného přímo od pacienta biopticky nebo peroperačně. I přes nesporné výhody pokusů *in vitro* je třeba zvažovat, v jakém rozsahu

lze model *in vitro* považovat za izomorfní s nádorovým onemocněním celého organismu (Mělka, 1980).

Při posuzování cytostatického či cytotoxického účinku látek na buňky obecně rozlišujeme dva termíny popisující stav buněk: viabilitu a proliferaci. **Viabilitu** buněk v kultuře lze definovat jako počet zdravých buněk ve vzorku, bez ohledu na to, kolik se jich právě dělí a jak velká část se jich nachází v klidové fázi. Příkladem postupu stanovujícího viabilitu je vitální barvení (*dye exclusion method*) pomocí trypanové modři, eosinu, nigrosinu či erythrocinu B, kdy barvivo proniká pouze membránou mrtvých buněk (Weisenthal et al., 1983). Metody stanovující **proliferaaci** buněk naopak zjišťují počet dělících se buněk v kultuře. Mezi klasické metody proliferace patří např. klonogenní testy (Hamburger et Salmon, 1977; Hill, 1983). Jejich nevýhodou je, že se nehodí pro zpracování velkého množství vzorků a pro buňky s omezeným počtem dělení (kolonie jsou příliš malé). Alternativně lze sestrojít růstové křivky. Vedle klonogenních testů existují nepřímé metody měření průběhu buněčného cyklu, např. stanovení aktivity regulačních molekul (např. CDK kinasy) či zjišťování jejich množství (např. pomocí Western blotting, ELISA, imunohistochemicky). Obsah DNA v buňkách lze stanovit pomocí průtokového cytometru., obarví-li se DNA selektivně fluorescenčním barvivem (DNA-fluorochromy, např. propidiumjodid), případně je-li doplněno inkorporací 5-brom-2'-deoxyuridinu (BrdU).

Z prací mnoha autorů (např. Sen et D'Incalci, 1992; Darzynkiewicz et al., 1992; Fulda et al., 1998; Meyer et Franz, 2005) vyplývá, že smrt buněk nastávající působením cytostatik v terapeutických dávkách obecně probíhá mechanismem apoptózy. Existují dvě signální dráhy vedoucí k apoptóze – vnitřní a vnější. Vnitřní cesta je iniciovaná zejména poškozením jaderné DNA, klíčovou komponentou jsou v ní především mitochondrie, je řízena působením faktorů rodiny Bcl-2 a Bax/BH3. Vnější je zprostředkovaná aktivací domén smrtících receptorů (*death-receptors*) z rodiny TNF, nacházejících se v plazmatické membráně. Vykonavači apoptózy jsou pak téměř vždy kaspasy, členové ICE rodiny (*Interleukin-1 β Converting Enzyme*) cysteinových proteas, které štěpí životně důležité intracelulární proteiny buňky.

Detekce apoptózy umožňuje zachytit časnější změny v porovnání s většinou klasických testů cytotoxicity. Morfologické změny začínají kondenzací jaderného chromatinu spojenou s jeho hyperchromasií, v cytoplazmě se objevují jaderné štěpy, barvitelné DNA barvami. Dochází k zmenšování jádra, svrašnění buňky způsobené

dehydratací, vydouvání výčnělků plazmatické membrány („*blebbing*“) a rozpadu obsahu buňky na apoptotická tělíčka, jež obsahují fragmenty jádra i části cytoplazmy s organelami. Zastoupení buněk s morfologickými znaky lze kvantifikovat na barvených cytopspinových preparátech či pomocí průtokového cytometru.

Apoptózu provází aktivace endonukleas a vznik fragmentů DNA s nízkou molekulární hmotností, které je možno detekovat elektroforeticky na agarózovém gelu. V některých případech však vznikají pouze relativně velké štěpy. Nízkomolekulární fragmenty z buňky unikají a tak se celkový obsah DNA v buňce oproti neapoptotickým v G₁-fázi snižuje. Tento jev je možné detekovat průtokovým cytometrem jako tzv. „sub-G₁-peak“ (Vindelov, 1977; Řezáčová, 2004). Dalšími detekovatelnými změnami jsou translokace fosfatidylserinu (zjišťovaná pomocí annexinu V), depolarizace mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c a faktoru indukujícího apoptózu (AIF) do cytoplazmy, exprese mitochondriálního membránového antigenu APO 2.7, aktivita kaspas, štěpení laminů A/C a B, štěpení poly-ADP-ribosapolymerasy (PARP) a další.

2.4.1. Některé další metody sledující alteraci metabolismu a viabilitu nádorových buněk in vitro

Vysokou validitu má tzv. BACTEC test, který měří inhibici utilizace ¹⁴C-glukosy na ¹⁴CO₂ jako míru cytotoxicity. Je využitelný pro screening potenciálních protinádorových látek na zvířecích i lidských nádorových liniích (von Hoff et al., 1985) i testování chemosenzitivity individuálních nádorů (von Hoff et al., 1986). Dalším radiometrickým testem je měření uvolněného proteinu značeného ⁵¹Cr po lýze buněk (Gardner et al., 1974).

Pro stanovování viability buněk *in vitro* jsou velmi často užívány tetrazoliové soli, většinou aromatické deriváty 1,2,3,4-tetrazolu (substituce v polohách 2, 3 a 5). Vedle monotetrazoliových solí existují i soli ditetrazoliové (NBT, TNBT, BT), kde jsou tetrazoliové kruhy spojené bifenylovou skupinou. Ve vodě rozpustné tetrazoliové soli jsou nažloutlé látky, které po redukci poskytují temně zbarvené formazany – monoformazany jsou žluté až červené, diformazany modré až černé. Formazany většiny tetrazoliových solí (MTT, INT, NBT či TNBT) jsou těžko rozpustné ve vodě a vyžadují solubilizaci např. v dimethylsulfoxidu (Scudiero et al., 1988), zatímco XTT, MTS,

WST 1, 3, 4 či 8 poskytují ve vodě dobře rozpustné formazany, které umožňují citlivější a spolehlivější analýzu než MTT (Scudiero et al., 1988; Cory et al., 1991; Dunigan et al., 1995; Takamatsu, 1998).

Redukce a štěpení tetrazoliového kruhu probíhá pomocí systému sukcináttetrazolium-reduktasy v aktivních mitochondriích živých buněk příp. i buněk v ranném stádiu apoptózy. Tyto testy tedy především odrážejí stav mitochondriálního metabolismu. Novější výsledky však ukazují na významný podíl redukce v cytosolu (Rode et al., 2005). Jelikož je množství vodíku a elektronů, přenášené pomocí NAD(P)H na většinu tetrazoliových solí omezené, využívají se navíc další přenašeče vodíku a elektronů. Je jím buď flavoenzym diaforasa nebo neenzymový přenašeč fenazinmetosulfát (N-methylfenazinium methylsulfát, PMS) (Scudiero et al., 1988; Serva, 2006.). Aktivované buňky produkují více formazanu než buňky v klidové fázi – je tedy možné kvantitativně měřit aktivaci buněk i bez jejich proliferace (Mosmann, 1983).

Z běžně užívaných metod stanovování chemosenzitivity nádorů *in vitro* lze uvést použití neutrální (toluolenové) červeně (N⁸, N⁸,3 – trimethyl-2,8-fenazindiaminu monochloridu, NR), slabě kationického barviva, které se váže na anionická místa v lyzozomální matrix živých buněk. Mrtvé nebo poškozené buňky po fixaci a vymývání barvivo nezadržují. Mezi množstvím zadrženého barviva a počtem viabilních buněk je možno prokázat lineární závislost. NR je citlivější než MTT, je možné použít menší buněčnou hustotu (Borenfreund et al., 1990).

Jinou metodou je sledování ovlivnění spotřeby kyslíku izolovanými mitochondriemi nádorových buněk (Gosalves et al., 1974).

Metodou zjišťující počet buněk, které podlely lýze při apoptóze (např. v důsledku působení protinádorové látky) nebo nekróze je luminometrické stanovování ATP uvolněného do media pomocí systému luciferin/luciferasa z *Photinus pyralis* L. (Brolin et al., 1979; Squirrell et al., 2005). Metodu lze používat pro stanovení chemosenzitivity/chemorezistence individuálního nádoru pacienta (Andreotti et al., 1995, Cree et al., 1995).

V tkáních pokusných zvířat nebo pacienta je možno detekovat míru proliferace buněk pomocí monoklonálních protilátek proti endogennímu markeru PCNA (proliferating cell nuclear antigen) jako alternativu k inkorporaci ³H-thymidinu a BrdU (Greenwell et al., 1991, Eldrige et al., 1993). Dnes je jako marker proliferace hojně užívána

imunodetekce proteinu Ki67 přítomného ve fázích G₁, S, G₂ a M, nikoli však G₀. (Gerdes et al. 1983).

2.4.2. Metody *in vitro* pro zjišťování inhibice syntézy nukleových kyselin a bílkovin

Jinou možností hodnocení stavu metabolických procesů je stanovení rychlosti syntézy DNA, případně RNA a proteinů jako úzce spolu souvisejících dějů nutných k buněčné proliferaci. Během proliferace syntetizuje buňka RNA a bílkoviny a následně DNA dříve, než se rozdělí na dvě dceřiné buňky. Je nepochybné, že míra syntézy NA a bílkovin a stav buněčného replikačního a transkripčního potenciálu jsou v úzkém vztahu s nádorovým bujením. Na intenzitě proteosyntézy se mimo vstupu aminokyselin do buňky, stavu proteosyntetického aparátu v ribosomech a regulace na translační úrovni ještě více odráží celková koncentrace ATP v nádorové buňce, závislá na přísunu substrátů, intenzitě glykolýzy a aerobní fosforylace (Mělka 1980, Castiglione et al., 1990). Proteosyntéza, která je dosti energeticky náročná (Müller et al., 1986), tak může být snadno narušena látkami inhibujícími tvorbu ATP. Jako spolehlivý parametr viability buněk proto může sloužit také sledování celkového obsahu buněčného proteinu (Ebbehoj et Langkjer, 1995).

Při studiu syntézy nukleových kyselin a proteinů *in vitro* se ke kulturám buněk přidávají značené prekurzory makromolekul (radioaktivní nebo nefyziologické neradioaktivní) a po skončení inkubace je kvantifikována jejich inkorporace do makromolekul NA a/nebo proteinů. Jako neradioaktivní prekurzory DNA jsou užívány zejména 5-brom-2'-deoxyuridin (BrdU) a 5-jod-2'-deoxyuridin (IdU), radioaktivně značené prekurzory NA a proteinů obsahují především ³H a ¹⁴C (viz níže).

Množství inkorporované značky se kvantifikuje buďto měřením celkového množství značené DNA či bílkoviny v populaci buněk, nebo detekcí značených jader mikroskopicky (při studiu syntézy NA). V druhém případě, pokud je značený prekurzor (radioaktivní i neradioaktivní) buňkám nabídnut jen krátkou dobu (např. 16 – 50 min), lze stanovit tzv. „*labeling index*“, tedy podíl buněk s inkorporovanou značkou a všech buněk v asynchronicky rostoucí populaci, neboť jsou značeny především buňky nacházející se v S-fázi. Toto „pulsní značení“, prováděné *in vitro* nebo *in vivo* (parenterálním podáním prekurzoru zvířeti) je výhodné pro zjištění podílu buněk právě

procházejících S-fází. Naproti tomu značení po delší dobu (např. celý buněčný cyklus) lze využít pro určení populace buněk, které zreplikovaly svou DNA (Rode et al., 2005).

O metodách prvního způsobu, studujícího celkové množství inkorporované značky jako míru vlivu látek na biosyntézu NA a proteinů, bylo od poloviny minulého století publikováno již velké množství prací. Neradioaktivní prekurzory, BrdU a IdU, jsou analoga thymidinu, kde došlo k náhradě methylové skupiny na C⁵ příslušným halogenem. Přestože mají atomy halogenů větší van der Waalsův atomový radius než methylová skupina, nejsou přítomny žádné sterické zábrany při inkorporaci do DNA (Prusoff, 1963). Dnes je BrdU hojně užíván především pro studium ovlivnění syntézy DNA. Experimentálně bylo dokázáno, že BrdU je do buněčné DNA inkorporován jako thymidin (Rode et al., 2005). Inkorporovaný BrdU může být kvantifikován za použití monoklonálních protilátek proti BrdU. První publikované metodiky inkorporace BrdU používaly izolaci DNA z buněk značených BrdU, načež následovalo oddělené stanovení BrdU enzymovou imunoanalýzou. Pro velkou pracnost tohoto provedení byla metoda adaptována na vícejamkové destičky. Není tak již třeba buňky přemísťovat – celá procedura od kultivace (obvykle 2–24 h), přes fixaci, denaturaci, přidání monoklonálních protilátek a substrátu po měření čtečkou ELISA probíhá v jedné jamce. Metody inkorporace BrdU jsou použitelné pro suspenzní i adhezní kultury a je možné jako detekci zvolit kolorimetrickou nebo chemiluminometrickou koncovku. K měření obsahu komplexu BrdU-protilátka se používá i průtoková cytometrie (Nunez, 2001), příp. kombinovaná s měřením obsahu DNA. Senzitivita metod inkorporace BrdU je srovnatelná s metodami inkorporace radioaktivně značeného thymidinu. Konjugát monoklonální protilátky a peroxidasy (BrdU-POD) se po denaturaci DNA váže na BrdU s vysokou specificitou a nevykazuje zkříženou afinitu s jinými endogenními substráty, jako jsou thymidin a uridin (Rode et al., 2005).

Při použití BrdU je třeba mít na paměti některá úskalí. Nižší pKa molekul BrdU a IdU oproti thymidinu způsobuje relativně vyšší podíl enolické formy a tak větší sílu vazby řetězců DNA-dvojšroubovice (Prusoff, 1963). Již Littlefield a kol. (1960) pozorovali inhibiční účinek BrdU na proliferaci savčích buněk u koncentrací nad 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Kaminkas (1972) popisuje inhibici transkripce mRNA a tím proteosyntézy. BrdU ovlivňuje i translaci, délku buněčného cyklu a indukuje buněčnou smrt (Taupin, 2006).

Nejčastěji používané izotopy pro radioaktivní značení prekurzorů NA (nukleotidů) a proteinů (aminokyselin) jsou ^3H a ^{14}C . V obou případech se jedná o beta zářiče s relativně nízkou maximální energií záření (0,019 MeV u ^3H a 0,156 MeV u ^{14}C). Jejich aktivita je měřena kapalinovým scintilačním detektorem. Již autoři starších prací upozorňují, že pro zajištění korelace výsledků z pokusů *in vitro* a situace *in vivo* při testování dané protinádorové látky příp. kombinace látek je důležitý výběr vhodného nukleotidu (Volm et al., 1975a; Wayss et al., 1975; Sondak et al., 1988). Možnosti a limity použití různých radioaktivně značených prekurzorů byly podrobně a metodicky zajímavě popsány např. v pracích Volma a kol. (Volm et al., 1975a, b, 1979, 1984) a Matterna a kol. (Mattern 1976a; Mattern et al., 1976b).

Nádorové buňky mohou být pro krátkodobé kultury získávány od pacientů (Huang et al., 2000; Lin et al., 2001) nebo odběrem z laboratorních zvířat, kde jsou udržovány pravidelnými transplantacemi (např. Ellem et al., 1970; Miko et al., 1979, 1989; Mělka 1980; Matsuba et al., 2000). Stále častěji užívají inkorporační studie dlouhodobé linie lidských nádorů (např. Glavas-Obrovac et al., 2001; Peters et al., 2001; Byers et al., 2005).

Nejčastěji jsou suspenzní nebo adherentní buněčné kultury inkubovány spolu se značeným prekurzorem v přítomnosti zkoumaného inhibitoru. Také je užíváno pulzní značení prekurzorem o vysoké aktivitě, jemuž předcházela inkubace se zkoumanou noxou (Byers et al., 2005). Uvádí se také možnost nejprve inkubovat buňky delší dobu (24 h) se značeným prekurzorem o nízké aktivitě, poté je vystavit testované noxe a následně pulsnímu značení prekurzorem o vysoké aktivitě (30 min) (Peters et al., 2001).

Ve většině dostupných studií je množství značky inkorporované do makromolekulární frakce měřeno po skončení inkubace, tedy posouzením jediného bodu inkorporační křivky, přičemž doba inkubace se pohybuje od 2 hodin až do jednoho dne i déle (Ellem et al., 1970; Huang et al., 2000). Jen někteří autoři (Miko et al., 1979, 1989; Mělka, 1980) sledují průběh inkorporace v ekvidistantních časových intervalech během celé inkubace.

Metody sledující inkorporace radioaktivně značených prekurzorů do DNA, RNA a proteinů obvykle separují makromolekulární frakci promytím buněk, jejich následnou lýzou a precipitací roztokem kyseliny trichloroctové (obvykle 5 – 20 %). Precipitát je pak oddělen centrifugací (Huang et al., 2000), zachycením na membránových filtrech (Ellem et al., 1970; Miko et al., 1979, 1989; Peters et al., 2001; Byers et al., 2005) nebo

může být např. po vymytí neprecipitované frakce precipitát solubilizován hydroxidem sodným s přídatkem SDS (Mujoomdar et al., 2004). V poloautomatizovaných provedeních jsou buňky zachyceny na skleněných filtrech bez precipitace kyselinou trichloroctovou (Calvete et al., 1994; Yuan et al., 2000).

Precipitát obsahující makromolekulární frakci je též možné oddělit originální metodou popsanou poprvé Matternem (Mattern et al., 1976b). Tato instrumentálně poměrně nenáročná metoda byla použita i v předkládané práci. Metoda spočívá v nanesení vzorků na kolečka filtračního papíru a následné eluci neprecipitované frakce vychlazenou 5% trichloroctovou kyselinou a dále směsí ethanol:diethylether.

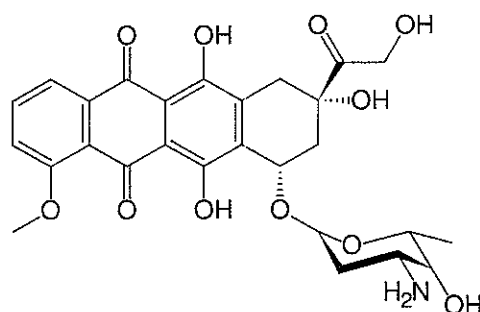
Sledování inkorporace značeného prekurzoru DNA, jmenovitě thymidinu, je podle dostupných údajů z literatury citlivějším markerem cytotoxicity látek s přímým účinkem na DNA než některé jiné postupy – MTT, produkce $^{14}\text{CO}_2$, stanovení celkového buněčného proteinu (Romijn et al., 1988; Ebbehøj et Langkjær, 1995). Proto byla v rámci této práce inkorporační metoda zavedena. V případě testovaných látek s předpokládaným mechanismem účinku jiným než přímé poškození DNA (vybrané deoxysacharidy) byla tato metoda doplněna ještě dalšími způsoby detekce protinádorového účinku (ovlivnění proliferace, indukce apoptózy).

2.4.3. Modelová cytostatika – doxorubicin a mitoxantron

Pro zavedení metody studia ovlivnění biosyntézy DNA a bílkovin v modelových nádorech v této práci byla vybrána dvě klasická cytostatika – doxorubicin a mitoxantron, obě s převážně interkalačním mechanismem účinku. Interkalace spočívá v navázání cytostatika vodíkovými vazbami na DNA. Interkalační látky také často vytvářejí komplexy s RNA či syntetickými polynukleotidy, v některých případech i volnými purinovými nukleotidy, nukleosidy a bazemi. Výsledkem tvorby stabilního komplexu s DNA je inhibice replikace a transkripce, a to její iniciace či elongace; dochází ke zlomům vláken. U obou použitých modelových látek však v koncentracích dosažených podáváním terapeutických dávek hraje zásadní roli **inhibice topoisomerasy II**. Tento enzym mění topologii nadobrátek DNA molekul tak, že se váže na oba řetězce dvojspirály DNA, postupně je přerušuje, uvolní nadšroubovici a následně DNA opět spojí. Tím umožní průběh replikace a separaci chromosomů během mitózy. Doxorubicin i mitoxantron patří k tzv. „*topoisomerase-II poisons*“. Vytvářejí s tímto enzymem

kovalentní komplex a způsobí, že nedojde ke zpětnému spojení DNA. Vzniká tak permanentní dvojláknový zlom. Pro dostatečný účinek na topoisomerasu II je však nutné v terapii udržet účinnou koncentraci cytostatika nejméně 3 dny (Klener, 1996, Piccart-Gebhart 2006).

Doxorubicin (adriamycin), (7*S*,9*S*)-7-[(2*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-9-(2-hydroxyacetyl)-4-methoxy-8,10-dihydro-7*H*-tetracen-5,12-dion (NCS 123127), DOX, je antracyklinové antibiotikum, skládající se z planárního čtyřcyklického aromatického chromoforu vázaného glykosidovou vazbou na aminohexosu daunosamin (jehož základem je 2-deoxyglukosa).



Obr.4 Doxorubicin

Izolován byl v 50. letech minulého století z kultur půdní aerobní bakterie *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, v literatuře (Klener, 1996) často nesprávně řazené mezi plísně. V těchto kulturách, původně tvořících daunorubicin, byly pomocí N-nitroso-N-methyl-urethanu indukovány mutace. Bylo tak docíleno produkce DOX, jevícího se rovněž jako červený pigment, který se však od daunorubicinu liší hydroxylovou skupinou na C¹⁴ (Arcamone et al., 1969) a je využitelný pro mnohem širší spektrum nádorů. Velmi důležitý efekt DOX představuje inhibice topoisomerasy II (Liv et al, 1980; Tewey et al, 1984). Dále se uplatňuje již zmíněná vazba DOX na DNA s následným blokem syntézy DNA i RNA, fragmentací a inhibicí reparace DNA. Planární tetracyklická část molekuly DOX interkaluje mezi dvěma páry bazí DNA, zatímco daunosamin interaguje s bazemi bezprostředně sousedícími (Pigram et al., 1972). DOX poškozují funkci mitochondrií a způsobuje jejich nabytí, lýzu krist a inhibici přenosu elektronu pomocí koenzymu Q₁₀ (Jaenke, 1974). Poškození membrány může být způsobeno přímou vazbou na záporně nabitě fosfolipidy jako jsou kardiolipin (jeho výskyt v membráně je u nádorových buněk vyšší podobně jako fyziologicky u

kardiomyocytů) a fosfatidylserin. Dochází ke změnám permeability pro Na^+ a mění se i koncentrace vápníku (Olson et al, 1974; Tritton et al, 1978; Goormaghtigh et al, 1980). Navíc DOX alteruje metabolismus karnitinu a působí depleci selenu. Dalším efektem je tvorba volných radikálů vlivem redukce DOX mikrosomální cytochrom- P_{450} -reduktasou. Semichinon, vzniklý redukcí chinonového kruhu, indukuje vznik superoxidu. Také dochází ke vzniku komplexu s ADP a Fe^{3+} , který s kyslíkem poskytuje perferylový komplex, rozpadající se za vzniku peroxidu vodíku (Klener, 1996). Tyto děje jsou považovány za hlavní příčiny kardiotoxicity DOX. Redukovaný DOX působí tvorbu jednovláknových zlomů DNA (SSB). Ačkoli je tvorba SSB synergní s inhibicí topoisomerasy II, zdá se, že SSB nemají přímou korelaci s cytotoxickým účinkem (Young et al., 1981, Fornari et al. 1994).

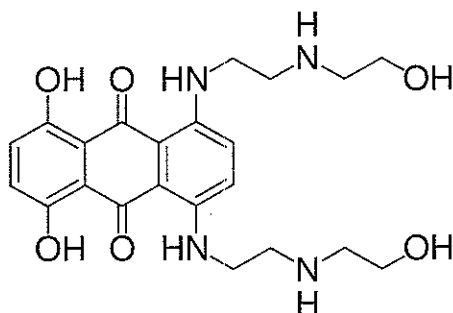
DOX se dnes řadí mezi základní cytostatika. Nejčastěji je používán jako součást kombinací pro léčbu Hodgkinovy choroby, ne Hodgkinských lymfomů, mnohočetných myelomů, v indukční léčbě akutních leukémií a téměř u všech solidních zhoubných nádorů, zvláště nádorů prsu, vaječníků, močového měchýře (i intravezikálně), endometria, sarkomů měkkých tkání (včetně Kaposiho sarkomu u AIDS), malobuněčného bronchogenního karcinomu a dalších. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem tohoto cytostatika (při celkovém podání) je vedle dřevňového útlumu zmíněná kardiotoxicita, zvláště při překročení dávky $550 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ (Ghione et al., 1975, Klener 1996). Zajímavá je experimentální aplikace DOX v podobě imunokonjugátu proti HIV-1 (Johansson et al., 2006).

Mitoxantron, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]-ethyl]amino]9,10-antra-cendion dihydrochlorid (NSC 279836), MX, je syntetický derivát antracendionu, vyvinutý původně jako modrá náplň do kuličkových per.

Do terapie zhoubných nádorů byl zaveden pro svou relativně nízkou kardiotoxicitu oproti DOX, která pravděpodobně souvisí s absencí tvorby reaktivních forem kyslíku. V nebuněčných systémech byla interkalace dvojláknové DNA potvrzena mnoha studiemi (Johnson et al., 1979, Kapuscinski et al., 1981, Lown et al., 1984, Kapuscinski et Darzynkiewicz 1985, Li et al., 2005). Navíc se bazický postranní řetězec MX váže elektrosta-

tickými interakcemi na anionické struktury řetězce DNA (Foye et al., 1982). Byla zaznamenána preference vazby na polynukleotidy obsahující pár cytosin-guanin (Foye et al., 1982; Lown et al., 1985; Chen et al., 1986). Velmi důležitá je opět inhibice

topoisomerasy II. Mimo shora uvedené účinky na DNA, RNA a topoisomerasu II se váže i na cytokeratin 8. Z hlediska buněčného cyklu není MX specifický, převažuje inhibice G₂ fáze (Kapuscinski et al., 1981; Alberts et al., 1985; Klener, 1996). MX také *in vitro* inhibuje proteosyntézu (Safa et Tseng, 1984).



Obr. 5 Mitoxantron

MX je protinádorově účinný na modelech *in vitro* i *in vivo*. Na klasických myších nádorových modelech (P 338, L 1210, karcinom tlustého střeva 26 a melanom B 16) vykazoval vyšší protinádorovou účinnost než některá jiná cytostatika (např. DOX, daunorubicin, bleomycin, mitomycin C) (Johnson et al., 1979; Durr et Wallace, 1980; Goldin et Vendetti, 1980; Fujimoto et Ogawa, 1982).

V klinické praxi je MX užíván k léčbě karcinomu prsu a vaječníků, dále v kombinaci s cytosinarabiosidem k indukční léčbě akutní myeloblastické leukemie a jako cytostatikum druhé volby u Hodgkinovy choroby a nehodgkinských lymfomů, příp. dalších zhoubných nádorů. Mezi hlavní nežádoucí účinky patří poškození krvetvorby (zejména granulocytopenie), nevolnost, pyretická reakce, stomatitidy a flebitidy (Batra et al. 1986; Klener, 1996). Alopecie a kardiotoxicita jsou v porovnání s antracykliny méně časté. Riziko vzniku kardiomyopatie se zvyšuje při překročení kumulativní dávky 160 mg.m⁻² (Schell et al., 1982; Stuart-Harris et al., 1984; Unverferth, 1984; Klener, 1996).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo studovat protinádorový účinek L-ramnosy *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-ramnosy 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-ramnosy 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-ramnosy byl porovnáván s 2-deoxyglukosou.

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

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Studium farmakokinetiky L-rhamnosy¹ a integrity hepatobiliární bariéry

4.1.1. Materiál a pokusná zvířata

L-Rhamnosa, melibiosa, cellobiosa a fluorenylmethoxykarbonylhydrazin (fluorenylmethoxykarbazát, Fmoc) byly získány v nejvyšší dostupné čistotě od fy Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Všechna ostatní činidla byla získána v nejvyšší dostupné čistotě od SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Německo) a Sigma Chemical Co. Samci potkanů kmene Wistar o hmotnosti 280 – 320 g byli rozděleni do 3 skupin (n = 7 ve skupině): intaktní (bez zvláštní operační přípravy), skupina s imitovanou operací a manipulací žlučovodu, „sham“, (24 h před farmakokinetickou studií byla provedena preparace žlučovodu bez kanylace a ligatury) a skupina, u níž byla 24 h před farmakokinetickou studií provedena kanylace a obstrukce ductus choledochus (BDO). Operace byly prováděny laparotomicky v celkové anestézii pentobarbitalem (*i. v.*, 50 mg.kg⁻¹). Zacházení s pokusnými zvířaty bylo ve shodě s doporučením Evropské Unie (ILAR, 1996), Zákonem České národní rady č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, a pokus byl schválen Etickou komisí Univerzity Karlovy.

4.1.2. Odběr vzorků

V celkové anestézii po intravenózní aplikaci pentobarbitalu (50 mg.kg⁻¹) byla provedena kanylace žlučovodu (u skupin intaktních potkanů a potkanů po imitované operaci), příp. povolení ligatury u zvířat s obstrukcí žlučovodu. Poté byly u všech zvířat kanylovány pravá *vena jugularis*, levá *arteria carotis communis* a močový měchýř. Po této přípravě byl potkanům v intaktní skupině, zvířatům po imitované operaci a zvířatům s obstrukcí žlučovodu intravenózně podán jednorázový bolus směsi melibiosy a L-rhamnosy (obě 100 mg.kg⁻¹). V časových intervalech -5, 1, 10, 30, 60, 90, 120, 180

¹ Chirální separace rhamnosy v analyzovaných biologických tekutinách nebyla prováděna. Lze však předpokládat, že v organismu potkana nedošlo k L-D-izomerizaci.

a 240 min byly odebírány vzorky krve (0,3 ml). Plazma byla získávána centrifugací plné krve (5 min, $1200 \times g$, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Žluč a moč byly sbírány do předvážených Eppendorfových zkumavek v 30 minutových intervalech po celou dobu pokusu. Vzorky byly do analytického vyhodnocení uchovávány při -80°C . Tělesná teplota potkanů byla udržována na $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ umístěním na ohřevnou desku.

4.1.3. Stanovení zkoumaných sacharidů v tělních tekutinách

Pro stanovení sacharidů vysokoučinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) byl užit systém Shimadzu (Japonsko), sestávající z pumpy LC-20 AD, fluorescenčního detektoru RF-10 Ax1, autosampleru SIL-20AC, komunikačního modulu CBM-20A a softwaru LCsolution. Derivatizační činidlo bylo připravováno smíšením 5 mg FMOC-hydrazinu, 1 ml acetonitrilu a 40 μl ledové kyseliny octové. Vzorky plazmy, moči, resp. žluči, byly zpracovány následujícím postupem: Moč byla před analýzou ředěna 20 – 100 \times vodou. Ke 100 μl roztoku vnitřního standardu (cellobiosa v 90% ethanolu, $80 \mu\text{mol.l}^{-1}$) bylo přidáno 20 μl analyzovaného vzorku, kalibračního standardu nebo vzorku kontroly kvality. Po protřepání na vortexu a 10 min stání byla směs centrifugována (10 min, $18000 \times g$). Množství 60 μl supernatantu bylo smíšeno se 150 μl derivatizačního činidla. Reakční směs byla inkubována při $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 6 h, následně ochlazena na laboratorní teplotu a centrifugována (10 min, $18000 \times g$). Odebráno bylo 100 μl a přeneseno do 2 ml lahvičky s šroubovacím uzávěrem (vialky) opatřené 300 μl skleněným insertem a umístěn do autosampleru temperovaného na $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Nastříkovan byl 1 μl vzorku. Separace byla prováděna na analytické koloně Spherisorb ODSII ($125 \times 4 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$, Waters) opatřené předkolonou C_{18} ($4 \times 3,5 \text{ mm}$, Phenomenex) při $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a průtoku 1 ml/min. K eluci analytů byl užit lineární gradient. Počáteční eluent obsahoval 22,5 % acetonitrilu a 77,5 % vody. Obsah acetonitrilu byl během 22,5 min zvýšen na 26,5 %. Následovalo promývání kolony směsí ethanol – kyselina octová v poměru 100:1 (v/v) po dobu 19 min (odstranění derivatizačního činidla a vedlejších produktů) a její ekvilibrace výchozím eluentem po dobu 17 min. Excitační a emisní vlnové délka fluorescenčního detektoru byla nastavena na 270 a 320 nm.

Koncentrace melibiosy a rhamnosy ve vzorcích byly počítány pomocí kalibrační funkce ($y = b \cdot x + a$). K vyjádření závislosti poměru výšek *peaků* (analyt vs. vnitřní

standard) na koncentraci analytu ve vodných kalibračních standardech byla užita vážená regresní analýza. Kalibrační křivky vykazovaly vyhovující linearitu v rozmezí 12 až 1250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (melibiosa, koef. determinace $R^2 \approx 0,999$), resp. 25 až 2500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (L-rhamnosa, koef. determinace $R^2 \approx 0,998$). Za spodní mez stanovitelnosti byly zvoleny koncentrace odpovídající nejnižšímu nenulovému kalibračnímu standardu a činily 12 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ pro melibiosu a 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ pro L-rhamnosu.

K ověření přesnosti a správnosti metody byly připraveny vzorky kontroly kvality pro koncentrační úrovně 12, 48, 480 a 960 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (melibiosa), resp. 25, 100, 1000 a 2000 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (rhamnosa), a to ve slepém vzorku plazmy, žluči a naředěné moči (ředění 1:20 vodou). Analyzovány byly v sérii ($n = 6$). Nalezená analytická návratnost („*recovery*“, množství nalezené $\cdot 100$ / množství přidané) se ve pohybovaly v rozmezí od 95,0 – 105,6 %. Jedinou výjimkou byla nejnižší koncentrační úroveň pro melibiosu v moči (118,6 %). Přesnost charakterizovaná variačním koeficientem se potom pohybovala v rozmezí 1,3 – 5,3 %, a to pro oba sacharidy ve všech třech matricích. Přes to, že absolutní výtěžnosti sacharidů z tělních tekutin nebyly kvantitativní, analýzy vzorků kontroly kvality neodhalily přítomnost výraznějších proporcionálních chyb. Vodné roztoky kalibračních standardů byly tudíž užívány i v rámci analytické studie.

Koncentrace kreatininu a bilirubinu (konjugovaného a celkového) a aktivity AST a ALT v plazmě byly měřeny přístrojem Modular PP (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo).

4.1.4. Analýza farmakokinetických dat

Pokusy byly prováděny na sedmi potkanech v každé skupině. Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm SEM (SEM = *Standard Error of Mean*, střední chyba průměru). Data byla analyzována programy Kinetica (ThermoScientific, USA) a MS Excel. Statistická významnost byla vypočtena pomocí funkce ANOVA programu Graphpad Prism 5.0 (Graphpad Software, San Diego, USA); hodnoty, pro které $p < 0,05$, byly posuzovány jako statisticky významné.

Farmakokinetické parametry obou sacharidů podaných potkanům intravenózně jako jednorázový bolus byly počítány standardními nonkompartmentovými technikami

(Jacobs et al., 2005). Nejvyšší naměřená plazmatická koncentrace látky (c_{\max}) a příslušná doba dosažení této koncentrace (t_{\max}) byly odečteny z křivek závislosti plazmatických koncentrací na čase. Eliminační konstanta (k_{el}) byla vypočtena pomocí lineární regrese plazmatických koncentrací v terminální fázi časové křivky. Biologický poločas eliminace ($t_{1/2}$) byl vypočten jako podíl $\ln 2$ a k_{el} . Plocha pod křivkou vyjadřující závislost plazmatických koncentrací na čase ($\text{AUC}_{0-\infty}$) byla počítána jako součet $\text{AUC}_{0-T_{\text{last}}}$ určené logaritmicko-lineárním lichoběžníkovým pravidlem mezi časem 0 a časem poslední měřené koncentrace (T_{last}) a AUC extrapolované do nekonečna ($\text{AUC}_{T_{\text{last}}-\infty}$), počítané jako podíl poslední měřené koncentrace dělené k_{el} . Celková clearance (CL_{tot}) byla počítána vztahem:

$$\text{CL}_{\text{tot}} = \frac{x}{\text{AUC}_{0-\infty}} \quad /1/$$

kde x je dávka. Zdánlivý distribuční objem (Vd_z) byl počítán rovnicí:

$$\text{Vd}_z = \frac{\text{CL}_{\text{tot}}}{k_{\text{el}}} \quad /2/$$

Distribuční objem pro *steady-state* (Vd_{ss}) byl získán vztahem:

$$\text{Vd}_{\text{ss}} = \text{CL}_{\text{tot}} \frac{\text{AUMC}}{\text{AUC}_{T_{\text{last}}-\infty}} \quad /3/$$

kde AUMC je plocha pod křivkou na počátku závislosti plazmatické koncentrace na čase.

Biliární (CL_{bile}) a renální (CL_{R}) clearance byly vypočteny vztahy:

$$CL_{\text{bile}} = \frac{X_{\text{bile}}}{AUC_{0-T_{\text{last}}}} \quad /4/$$

$$CL_{\text{R}} = \frac{X_{\text{urine}}}{AUC_{0-T_{\text{last}}}} \quad /5/$$

kde X_{bile} a X_{urine} jsou množství melibiosy nebo rhamnosy vyloučené do žluči a moči během sledovaného období, a $T_{\text{last}} = 240$ min (Ghibellini et al., 2006). Poměr melibiosy a rhamnosy v biologických tekutinách byl počítán jednak pro každý sběrný interval zvlášť, jednak kumulativně.

4.2. Nádorové modely

V této práci bylo použito několik modelů nádorové choroby: Adenokarcinom mléčné žlázy MC29, ascitický Ehrlichův tumor (ATE) a lidská promyelocytární leukemie HL-60.

4.2.1. Myší adenokarcinomy mléčné žlázy

Zhoubné nádory mléčné žlázy patří k nejčastějším spontánním nádorům myší outbrední linie NMRI (Naval Medical Research Institute), jejichž celková incidence dosahuje přibližně 50 % (Löhrke et al., 1984; Bomhard et Mohr, 1989). V nedávné době byl ze samic myší NMRI izolován spontánní adenokarcinom mléčné žlázy, nazvaný MC29. Tento syngenní nádor byl dosud použit pouze při studiu vlivu hypertermie (Hladík, 2000), jinak však v literatuře nebyl blíže charakterizován.

Ehrlichův tumor je myší adenokarcinom mléčné žlázy, jenž byl do výzkumu zaveden roku 1886 a popsán roku 1905 německým chemikem a lékařem Paulem Ehrlichem (Ehrlich et Apolant, 1905; Ehrlich, 1906). Tento zprvu pouze solidní nádor byl r. 1932 převeden i do ascitické podoby (Loewenthal et Jahn, 1932). Jedná se o nízcce diferencovaný zhoubný nádor (Klein, 1950), který je udržován na myších liniích (např. H, A/Ph, NMRI, Swiss albino, ICR,) pravidelnými transplantacemi a do dnešní doby byl použit již ve více než 10 000 vědeckých pracích.

K udržení nádorových linií a jako zdroj buněk pro pokusy *in vitro* byly vždy 10. den prováděny pravidelné transplantace 10^6 buněk MC29 nebo ATE *i. p.* myším samicím NMRI (dodavatel Bio Test s.r.o., Konárovice, ČR), hmotnost před transplantací 23–29 g. Zvířata byla ustájena na prachuprostých hoblinách v PVC klecích ve skupinách do 8 jedinců (při teplotě vzduchu 20–24 °C, vlhkosti 30–70 %, světelném režimu 12 h tma + 12 h světlo, dvanácti výměnách kubatury místnosti za 1 h) a krmena standardizovanou peletizovanou stravou ST1 a vodou *ad libitum*. Zacházení s pokusnými zvířaty bylo ve shodě s příslušnými předpisy, viz 4.1.1.

Ascites pro pokusy *in vitro* byl získán punkcí břišní dutiny 7. den po intraperitoneální aplikaci 10^6 buněk mamárního karcinomu. Při izolaci buněk ascitu bylo postupováno podle Míka a Drobnič (Míko et al., 1969, 1979). Ascites, odebraný za sterilních podmínek od 4–5 zvířat byl smíšen v ledem vychlazené centrifugační zkumavce obsahující 1 kapku heparinu a centrifugován při $600 \times g$ po dobu 10 min při teplotě 3 °C (Centrifuga MPW 360, Mechanika precyzyjna, Polsko). Buněčný sediment byl po odebrání supernatantu ascitické tekutiny resuspendován v Krebsově roztoku III bez CaCl_2 s přidávkem glukosy (540 mg.l^{-1}) a supernatantu ascitické tekutiny (25 ml.l^{-1}) (Kocourek et al., 1967, Míko et al., 1969, 1979). Krebsův roztok III byl připraven vždy čerstvý před pokusem. Součásti Krebsova média III (KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , KCl , NaCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, glukosa) pocházely rovněž od fy Sigma Chemical Co a byly v čistotě BioChemika Ultra $\geq 99,5 \%$.

4.2.2. *Lidská leukemie HL-60*

Lidská promyelocytární leukemie HL-60 byla získána roku 1979 od 36-leté pacientky v National Cancer Institute (USA) (Gallagher et al., 1979). Pro proliferaci buňky této linie vyžadují aktivaci receptorů pro insulin a transferin (Breitman et al., 1980). Buňky HL-60, které odpovídají především promyelocytům, jsou udržovány v suspenzních kulturách jako modelová choroba pro četné studie, jichž je k dnešnímu dni již mnoho přes deset tisíc. Vzhledem k nepřítomnosti p53 (Wolf et Rotter, 1985) byla tato linie vybrána pro předkládanou studii jako zajímavý porovnávací nádorový model. Buňky HL-60 byly získány z banky *European Collection of Animal Cell Cultures* (Porton Down, Salisbury, UK) a kultivovány v inkubátoru s kontrolovanou vlhkostí a 5% atmosférou CO_2 , v Dulbeccově mediu modifikovaném podle Iscoveho (Sigma-Aldrich

Co, St. Louis, USA), jež bylo obohaceno 20% fetálním bovinním sérem. Kultury byly pasážovány každý druhý den ředěním na $2 \cdot 10^5$ buněk/ml. Počítání buněk bylo prováděno hemocytometrem. Integrita buněčné membrány byla zjišťována barvením trypanovou modří. Pro tuto studii byly použity buňky pasážované max. 20krát.

4.3. Testování účinku zkoumaných látek na počáteční rychlost biosyntézy makromolekul *in vitro*

4.3.1. Provedení experimentů

Pro pokusy studující vliv cytostatika na rychlost inkorporace radioaktivně značených prekurzorů NA a bílkovin, $[6\text{-}^3\text{H}]$ thymidinu a $[\text{U}\text{-}^{14}\text{C}]$ -aminokyselinové směsi, byla použita buněčná koncentrace $1,5 \cdot 10^6$ /ml (Bürkerova komůrka, roztok eosinu v izotonickém roztoku NaCl). $6\text{-}[^3\text{H}]$ thymidin a $\text{U}\text{-}[^{14}\text{C}]$ -aminokyselinová směs (bílkovinový hydrolyzát) byly zakoupeny od firmy Lacomed, s.r.o. (ČR). Značený proteinový hydrolyzát byl dle údajů výrobce získán z *Chlorella*, sladkovodní řasy z třídy *Trebouxiophyceae*. U $6\text{-}[^3\text{H}]$ thymidinu byla provedena kontrola radiochemické čistoty tenkovrstevnou chromatografií (> 98 %). Inhibitory byly pro pokusy *in vitro* ředěny v izotonickém roztoku NaCl.

Se supernatanty i sedimentem ascitické tekutiny se pracovalo při laboratorní teplotě, před zahájením inkubace byly buněčné suspenze po dobu 5 min zchlazeny v ledové lázni s vodou (0 °C). Bylo pracováno v duplikátech, příp. triplikátech. Naředěné buněčné suspenze byly přidány v objemu 1 ml do zkumavek s 0,75 ml Krebsova roztoku III bez CaCl_2 s přídavkem glukosy (540 mg.l^{-1}) o pH 7,4, 0,15 ml roztoku inhibitoru (MX nebo DOX o koncentracích $0,0604 - 3,87 \text{ mmol.l}^{-1}$, L-rhamnosa nebo 2-DG o koncentracích $4,167 - 267 \text{ mmol.l}^{-1}$) ve F1/1 a 0,1 ml roztoku $[6\text{-}^3\text{H}]$ thymidinu a $\text{L}\text{-}[\text{U}\text{-}^{14}\text{C}]$ aminokyselinové směsi – měrné aktivity viz Přílohu. Základní roztoky MX (Refador, 30 mg/15 ml, inj. roztok, PLIVA-Lachema a.s., ČR) a DOX (Doxorubicin Teva 0,2%, 10 mg/5ml, inj. roztok, Teva Pharmaceuticals s.r.o., ČR) byly ve formě aplikačních přípravků. Monohydrát L-rhamnosy, 2-deoxyglukosa a melibiosa byly v nejvyšší dostupné čistotě od fy Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Okamžitě po

přidání suspenze buněk byl roztok krátce protřepán a bylo odebráno 75 µl vzorku. Další odběry stejných množství pro stanovení aktivit byly provedeny po 30, 60, 90, 120 a 150 min během inkubace při 37 °C. V čase 150 min byly navíc odebrány vzorky na stanovení viability (Bürkerova komůrka, roztok eosinu v F1/1).

Všechny odebrané vzorky byly okamžitě nanášeny na kolečka filtračního papíru (Filtrak Niederschlag, býv. NDR, průměr 20 mm) fixovaná špendlíky na polystyrénové destičce. Kolečka byla po nanesení vysušena pod infračervenou lampou a promyta vychlazenou 5% kys. trichloroctovou (3 x 30 min) a pak směsí ethanol:diethylether 1:1 (2 x 45 min).

Po dosušení pod infračervenou lampou byly vzorky přeneseny do scintilačních lahvíček a jejich aktivita měřena po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) automatickým spektrometrem Beckman LS6000 LL (Beckman Coulter, Inc., USA) za použití scintilačního roztoku Triton (Chemopetrol, býv. ČSSR) v objemu 10 ml na vzorek. U naměřených hodnot byla provedena korekce vzhledem k účinnosti za použití vnějšího standardu. Některé hodnoty aktivit ^3H a ^{14}C a z nich vypočítané výsledky pocházejí ze dvou samostatných experimentů.

4.3.2. *Vyhodnocení vlivu zkoumaných látek na biosyntézu DNA a bílkovin in vitro*

Byly použity a porovnány dva způsoby výpočtu IC_{50} : V prvním, „**kinetickém**“ byl vliv buněčné koncentrace a inhibitorů na biosyntézu NA a bílkovin posuzován podle ovlivnění počáteční rychlosti inkorporace (v_0) jejich prekurzorů, vyjádřené derivací funkce /6/ (resp. jejího tvaru /13/ uvedeného v Diskusi) v čase $t = 0$, tedy tangentou inkorporační křivky protínající počátek souřadnic – viz kapitola Diskuse.

Pro výpočet počáteční rychlosti inkorporace byl použit vztah (Mělka, 1980):

$$\ln \left(\frac{I_t - I_0}{t I_{\max}} \right) = \ln(A) - Bt , \quad /6/$$

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. Rovnici /6/ odvodil Mělka (1980) zlogaritmováním vztahu:

$$I_t - I_0 = I_{\max} \frac{w_1}{a} t e^{-t\left(\frac{w_2}{b} + \frac{v}{c}\right)}, \quad /7/$$

kde konstanta a vyjadřuje celkovou analytickou koncentraci prekurzoru, w_1 je rychlost tvorby produktu precipitovatelného kyselinou trichloroctovou, w_2 rychlost jeho rozpadu, b značí koncentraci tohoto produktu, c je koncentrace produktů nesrážených kyselinou trichloroctovou a v je rychlost jejich tvorby. Poměr w_1/a je ve vztahu /6/ vyjádřen empirickou konstantou A , výraz $w_1/a + v/c$ pak empirickou konstantou B . Při odvození vztahu /6/ byl člen v/c zavzat do empirické konstanty B (Mělka, 1980).

IC_{50} vyjadřuje koncentraci inhibitoru, snižující počáteční rychlost inkorporace značky (vypočtenou podle vztahu /6/, dále viz Diskuse) na polovinu počáteční rychlosti inkorporace

u kontroly (bez inhibitoru). Pro výpočet empirických konstant, počátečních rychlostí inkorporace a další statistické zhodnocení byly použity programy MS Excel 2003 a NCSS 2004 (Number Cruncher Statistical Systems, USA). Hodnoty IC_{50} jako koncentrace inhibitoru snižující počáteční rychlost inkorporace na polovinu kontroly byly počítány ze závislosti počáteční rychlosti (v_0) na logaritmu koncentrace plus jedna, pomocí lineární regresní analýzy programem NCSS 2004.

V druhém přístupu, „**jednobodovém**“ je 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) = hodnocení podle jednoho bodu inkorporační křivky. I v tomto případě byly hodnoty IC_{50} získány pomocí lineární regrese.

4.4. Analýza buněčného cyklu

Přibližně $5 \cdot 10^5$ buněk HL v suspenzi bylo 2x promyto ledovým fosfátovým pufrům (PBS), zcentrifugováno (1200 ot., 10 min, 4 °C) a sediment byl resuspendován v 70% ethanolu. Zde byly buňky fixovány 24 h. Poté byl ethanol odstraněn centrifugací (2300 ot, 15 min), supernatant odsát a přidáno cca 3 ml fyziologického roztoku. Opět byla provedena centrifugace (2300 ot. 15 min). Po odsátí supernatantu byl přidán PBS. Následovala další centrifugace (2300 ot. 15 min). Následně byl odsát supernatant, přidáno 0,5 ml citrátového pufru a suspenze inkubována 5 min při pokojové teplotě. Do zkumavky byly přidány 3 ml PBS a následovala opět centrifugace (2300 ot. 15 min). Po důkladném odsátí a přidání 0,5 ml Vindelova roztoku (Vindel, 1977) byla směs 1 h inkubována v termostatu při 37 °C.

Použité roztoky:

Citrát-fosfátový pufr pH 7,8: Na_2HPO_4 ($0,2 \text{ mol.l}^{-1}$)	192 ml
kyselina citronová ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$)	8 ml
Vindelův roztok: TRIS (1,24114 g/10 ml)	1 ml
RNAasa	1 mg/1 ml PBS
propidiumjodid (PI)	5 mg/5 ml PBS
voda	ad 100 ml

Obsah DNA (fluorescence, PI) 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.

4.5. Detekce štěpů laminu B

V požadovaných časových intervalech byly připraveny buněčné lyzáty pomocí pufru s obsahem octyl β -D-glucopyranosidu (dezintegrace buněčných membrán) a orthovanadanu sodného (inhibice fosfatasy). Obsah bílkoviny ve vzorku byl stanoven BCA zkouškou (bicinchoninová kyselina, roztok síranu měďnatého, Sigma-Aldrich).

Lyzáty obsahující stejné množství proteinu (30 μg) byly denaturovány pomocí vzorkového pufru s obsahem SDS a β -merkapt ethanolu a jednotlivé vzorky nasazeny do jamek polyakrylamidového gelu (5-15%). Po elektroforetickém rozdělení proteinů na SDS polyakrylamidovém gelu byly proteiny přeneseny na PVDF membránu (BioRad, USA). Membrány byly zablokovány fyziologickým roztokem s TRIS-pufrem, obsahujícím 0,05 % Tween 20 a 5 % odtučněného mléka. Následovala inkubace s primární protilátkou (anti-lamin B-Calbiochem, Merck, Německo) při 4 °C přes noc za mírného třepání. Druhý den byla membrána promyta a poté hodinu inkubována s patřičnou sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (Dako, Dánsko). Vizualizace byla provedena detekčním kitem pro chemiluminiscenci (Boehringer Ingelheim, Německo).

4.6. Účinek MX na ascitickou formu nádoru MC29 *in vivo*

Nádor MC29 byl získán po usmrcení myši cervikokraniální dislokací a otevření břišní dutiny NMRI myši 10. den po jeho *i.p.* transplantaci (viz 2.2.1). Směsný ascites 3 myši o objemu 6,5 ml byl naředěn F 1/1 celkem 20x, takže v aplikovaném objemu suspenze 0,2 ml/myš bylo 10^6 buněk (počítání v Bürkerově komůrce, použit Schreckův roztok). Aplikace byla provedena 0. den do 80 myších samic NMRI starších než 6 týdnů o průměrné hmotnosti 29,6 g (SD = 4,52 g).

První den po transplantaci nádoru byly náhodným výběrem vytvořeny 3 dávkové skupiny a 1 kontrolní skupina, vše po 20 zvířatech (rozdělené vždy na 2 podskupiny po 10 zvířatech). Myším v dávkových skupinách byl intravenózně podán MX (Refador, 30 mg/15 ml, inj. roztok, PLIVA-Lachema a.s., ČR) v dávkách 3, 6 a 9 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (výše dávek byla odvozena od postupu v naší předešlé studii, Niang et al., 2006) kontrole pak F 1/1. Objemy aplikovaných roztoků byly úměrné objemu 0,450 ml/30 g myš. Po aplikaci MX bylo každý den zaznamenáváno přežití myši, jednou týdně pak celková hmotnost jednotlivých podskupin s udáním počtu přežívajících zvířat v podskupinách.

Stanovování hmotnosti nádoru: 10. den byly v parách diethyletheru usmrceny myši vždy jedné ze dvou podskupin všech dávkových skupin i kontroly. Zvířata byla individuálně zvážena, byla jim otevřena břišní dutina, nasát ascites do 3 heparinizovaných kapilár a poté byl zbylý ascites z břišní dutiny odstraněn. Po odstranění ascitu byla zvířata opět zvážena a z rozdílu hmotností vypočtena hmotnost

ascitu. Kapiláry byly zcentrifugovány v hematokritové centrifuze (1000 ot., 60 s) a následně byl odečten ascitokrit. Z mediánů 3 hodnot ascitokritu každé myši byla vypočtena „hmotnost buněčné frakce ascitu“ m_T :

$$m_T = a (m_1 - m_2), \quad /8/$$

kde a je medián 3 hodnot ascitokritu dané myši (%), m_1 hmotnost myši před odebráním ascitu, m_2 hmotnost myši po odebrání ascitu. Zbylá zvířata byla ponechána pro zjišťování přežití.

Stanovování přežití: Přežití myši bylo zaznamenáváno každý den, jednou týdně byla skupina žijících zvířat vážena. Přežití zvířat v jednotlivých dávkových skupinách bylo porovnáváno s kontrolní skupinou.

Pro určení vztahu mezi cytostatickou léčbou a délkou přežití byl použit Coxův model proporcionálních rizik (Carter, 1982):

$$\lambda(t) = \lambda_0(t) e^{\beta_1 x + \beta_2 x^2} \quad /9/$$

$$\ln R = \frac{\lambda(t)}{\lambda_0(t)}, \quad /10/$$

kde $\lambda(t)$ je odezva rizika v čase t u zvířat, jež byla léčena dávkou x mg kg⁻¹, $\lambda_0(t)$ je funkce rizika v čase t pro kontrolní zvířata; β_1 a β_2 jsou koeficienty polynomu druhého stupně bez absolutního členu podle Cartera a spol. (1982) a R je index relativního rizika. Nejnižší bod funkce /4/, odpovídající optimální dávce x_{opt} , byl vypočten při položení 1. derivace funkce podle dávky x rovno nule, tedy:

$$\left(\frac{\partial \lambda(t)}{\partial x} \right)_{x=x_{opt}} = \lambda_0(t) e^{\beta_1 x_{opt} + \beta_2 x_{opt}^2} (\beta_1 + 2\beta_2 x_{opt}) = 0 \quad \text{takže} \quad x_{opt} = \frac{-\beta_1}{2\beta_2}. \quad /11/$$

Koeficienty regrese byly odhadnuty programem NCSS 2004. Statistická významnost polynomů byla určena užitím Fisher-Snedecorova rozložení. Zacházení s pokusnými zvířaty bylo ve shodě s příslušnými předpisy, viz 4.1.1.

5. VÝSLEDKY

5.1. Studium farmakokinetiky melibiosy a L-rhamnosy² a testování integrity hepatocelulární bariéry u potkana

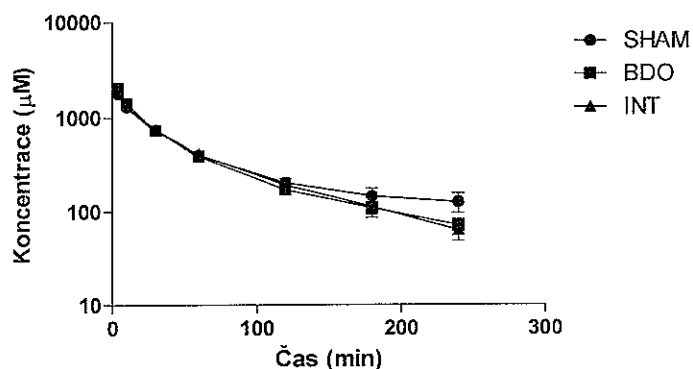
5.1.1. Farmakokinetika melibiosy a L-rhamnosy

Primárně sledovaným ukazatelem byl časový vývoj koncentrací L-rhamnosy a melibiosy v plazmě po jednorázovém *i.v.* podání 100 mg.kg⁻¹ potkanům (obr. 6). 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.

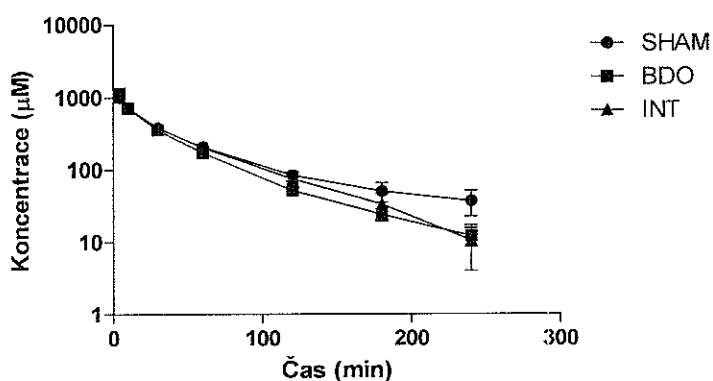
Farmakokinetické parametry obou sloučenin vypočtené z časových profilů plazmatických koncentrací jsou shrnuty v tab. 1. a 2. Při porovnání farmakokinetických parametrů obou sloučenin mezi skupinou intaktních a imitovaně operovaných zvířat nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl. Hodnoty distribučních objemů zjišťované oběma způsoby (Vd_z i Vd_{ss}) byly v jednotlivých skupinách pro konkrétní cukr obdobné. 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 jsou uvedeny v tab. 1. a 2. a dosahují u obou sacharidů hodnot přibližně 1, což potvrzuje glomerulární filtraci jako hlavní mechanismus renální eliminace obou látek. U potkanů s obstrukcí žlučového 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 u melibiosy (tab. 2). Změna žádného ze systémových farmakokinetických parametrů melibiosy nebo L-rhamnosy však nebyla po obstrukci žlučových cest pozorována.

² Viz pozn. 1 (4.1).

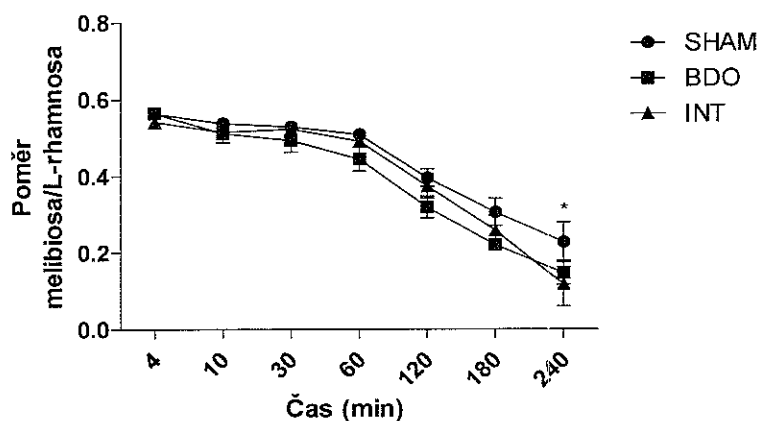
Profil plazmatických koncentrací L-rhamnosy



Profil plazmatických koncentrací melibiosy



Melibiosa/L-rhamnosa - poměr v plazmě



Obr. 6 Vývoj plazmatických koncentrací L-rhamnosy, melibiosy a jejich poměru v čase u intaktních potkanů (INT), zvířat po imitované operaci (SHAM) i potkanů s obstrukcí žlučového (BDO) po jednorázovém *i. v.* podání těchto sacharidů v dávce 100 mg.kg⁻¹). Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± SEM ($n = 7$ v každé skupině). Statisticky významně odlišné od zvířat po imitované operaci (* $p < 0,05$).

	intaktní	sham	BDO
Dávka (μmol)	$214 \pm 3,4$	$202 \pm 2,5$	$210 \pm 3,9$
C_{max} (μM)	1910 ± 124	1780 ± 119	2050 ± 134
AUC_{tot} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}$)	1510 ± 122	1790 ± 204	1490 ± 99
K_{el} (min^{-1})	$0,01 \pm 0,001$	$0,01 \pm 0,001$	$0,01 \pm 0,001$
$AUMC_{\text{tot}}$ ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}$)	2200 ± 425	4490 ± 1080	2240 ± 262
$t_{1/2}$ (min)	$78,3 \pm 10,2$	127 ± 12	$85 \pm 4,4$
MRT (h)	$1,4 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,09$
CL_{tot} (ml.h^{-1})	145 ± 11	124 ± 16	$144 \pm 9,8$
Vd_z (L)	$0,27 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,02$
Vd_{ss} (L)	$0,2 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,01$
CL_{bile} (ml.h^{-1})	$0,63 \pm 0,07$	$0,58 \pm 0,06$	$1,2 \pm 0,18^{***}$
CL_{ren} (ml.h^{-1})	99 ± 11	85 ± 16	106 ± 12
CL_{CR} (ml.h^{-1})	104 ± 13	126 ± 10	106 ± 15
$CL_{\text{ren}}/CL_{\text{CR}}$	$1,0 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$

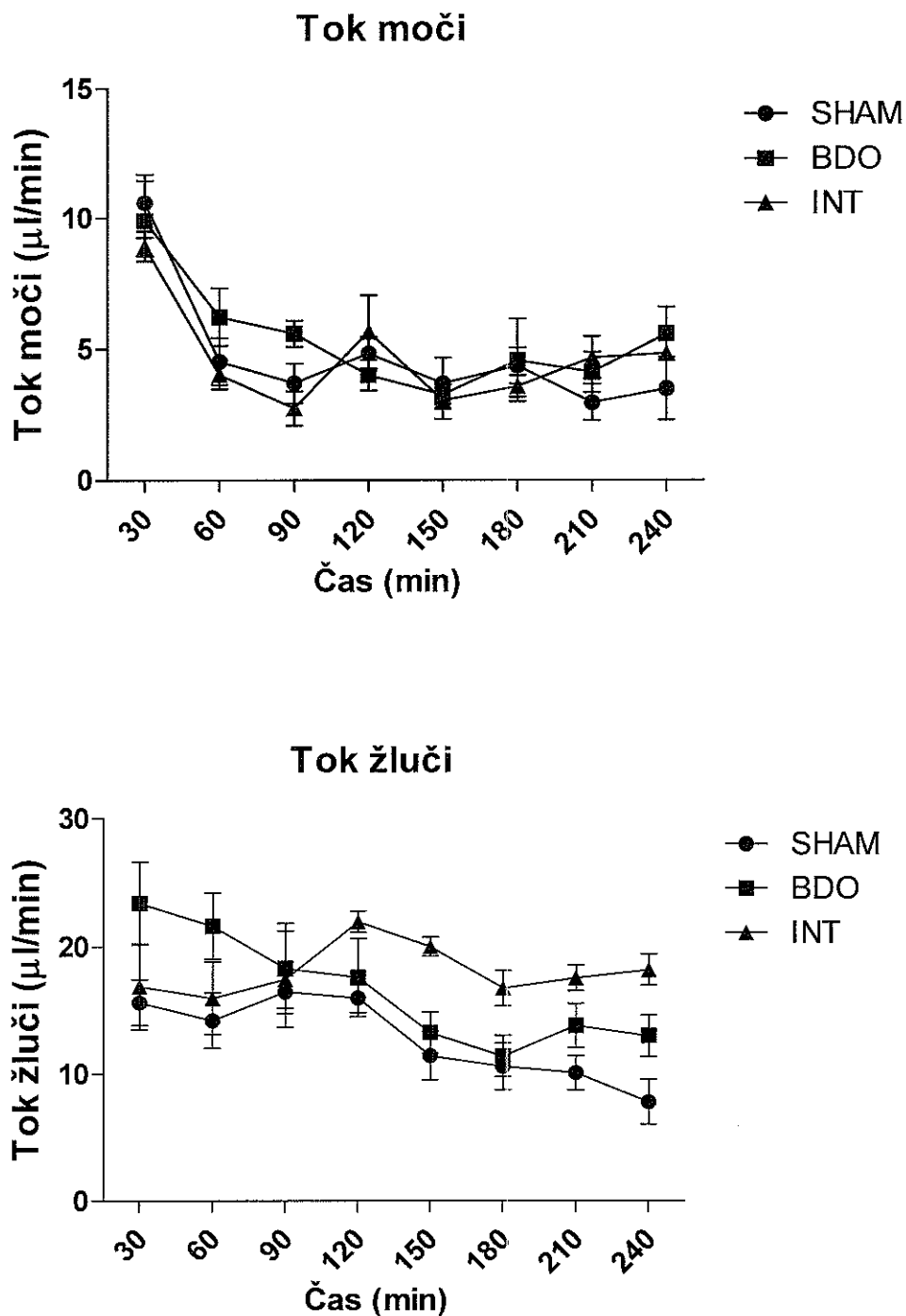
Tab. 1 Farmakokinetické parametry L-rhamnosy po jednorázovém intravenózním podání v dávce 100 mg.kg^{-1} : Intaktním zvířatům (INT), potkanům po imitované operaci (SHAM) a potkanům s obstrukcí žlučového (BDO) (24 h po případném zákroku). Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr \pm SEM ($n = 7$ v každé skupině). Statisticky významně odlišné od zvířat po imitované operaci ($***p < 0,001$). AUC_{tot} = plocha pod křivkou závislosti plazmatické koncentrace na čase, $AUMC_{\text{tot}}$ = plocha pod momentovou křivkou (na počátku) této závislosti, MRT = střední pobytová doba, CL = clearance, Vd = distribuční objem.

	intaktní	sham	BDO
Dávka (μmol)	$103 \pm 1,6$	$97 \pm 1,2$	$101 \pm 1,9$
C_{max} (μM)	1033 ± 61	1003 ± 66	1150 ± 77
AUC_{tot} ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}$)	662 ± 64	758 ± 88	598 ± 33
K_{el} (min^{-1})	$0,02 \pm 0,002$	$0,01 \pm 0,002$	$0,01 \pm 0,002$
AUMC_{tot} ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}$)	648 ± 158	1190 ± 364	531 ± 51
$t_{1/2}$ (min)	$44,5 \pm 6,4$	$73,3 \pm 12,2$	$51 \pm 4,6$
MRT (h)	$0,9 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,06$
CL_{tot} ($\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$)	160 ± 14	141 ± 19	$172 \pm 11,1$
Vd_z (L)	$0,17 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$	$0,2 \pm 0,02$
Vd_{ss} (L)	$0,14 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,01$
CL_{bile} ($\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$)	$0,10 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$1,28 \pm 0,15^{***}$
CL_{ren} ($\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$)	117 ± 13	102 ± 18	134 ± 12
CL_{CR} ($\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$)	104 ± 13	126 ± 10	106 ± 15
$\text{CL}_{\text{ren}}/\text{CL}_{\text{CR}}$	$1,2 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$

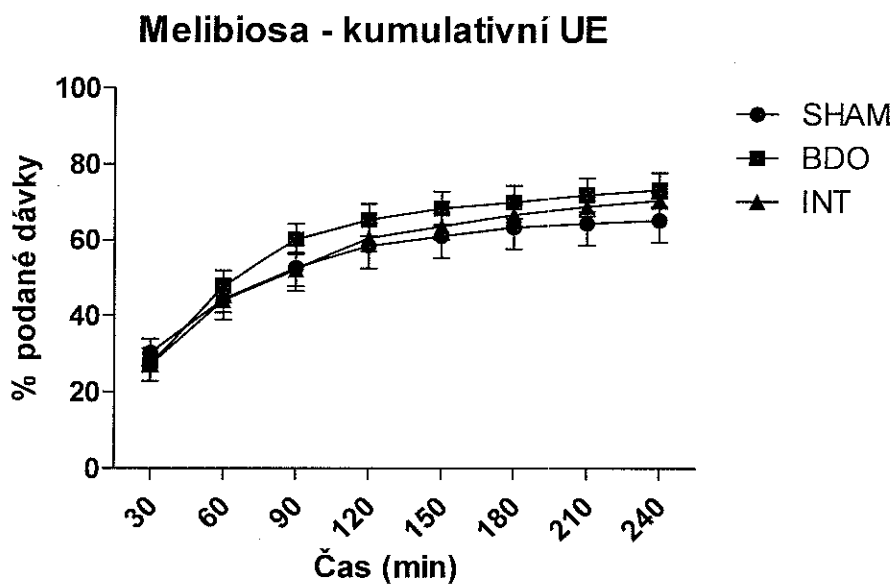
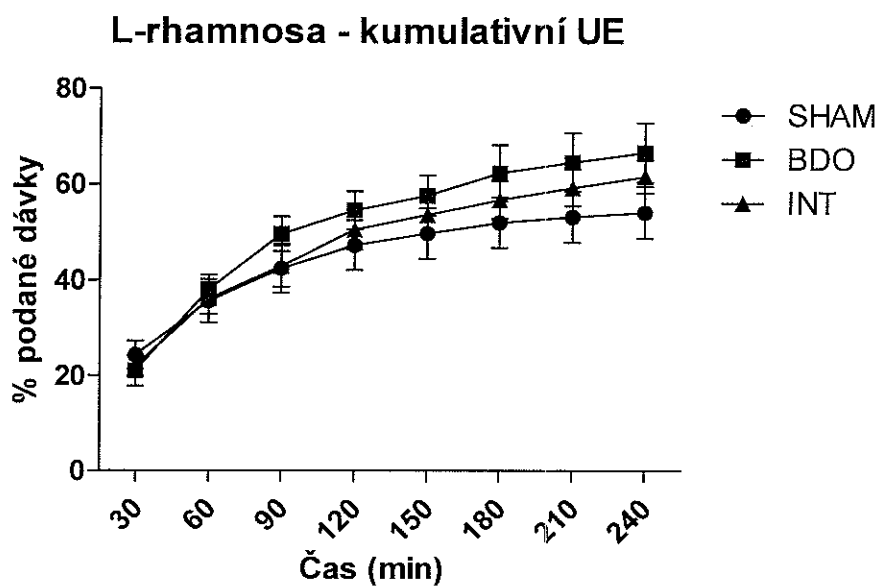
Tab. 2 Farmakokinetické parametry melibiosy po jednorázovém intravenózním podání v dávce $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: Intaktním potkanům (INT), potkanům po imitované operaci (SHAM) a potkanům s obstrukcí žlučovéhoodu (BDO) (24 h po případném zákroku). Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr \pm SEM ($n = 7$ v každé skupině). Statisticky významně odlišné od zvířat po imitované operaci ($^{***}p < 0,001$). Zkratky farmakokinetických parametrů viz tabulku 1.

Toky moče a žluče v průběhu pokusu u jednotlivých skupin ukazuje obr. 7. Nebyl zde pozorován žádný statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami v žádném ze sledovaných intervalů. Časový vývoj kumulativní močové a žlučové exkrece L-rhamnosy a melibiosy je na obr. 8 a 9. 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 (obr. 8). Biliární exkrece byla naproti tomu nízká, a sice 0,40 % (L-rhamnosa) a 0,06 % (melibiosa) aplikované dávky L-rhamnosy, resp. melibiosy (obr. 9). 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 žlučového se v prvních 60 minutách pokusu objevilo významné zvýšení biliární exkrece obou sacharidů. Důsledkem toho byly u potkanů s obstrukcí žlučového kumulativní biliární exkrece obou látek značně vyšší než u obou skupin kontrolních zvířat (obr. 9). Kumulativní renální exkrece obou látek byla u potkanů s obstrukcí žlučového nezměněna. Poměr melibiosa/L-rhamnosa jako indikátor paracelulární permeability byl vypočítán z kvantitativních hodnot exkrece. Byl zjištěn významný vzestup tohoto poměru u biliární exkrece zvířat s obstrukcí žlučového v průběhu prvních čtyř intervalů odběru (během 120 min po podání obou sacharidů) s následným poklesem na úroveň hodnot pozorovaných u kontrolních skupin (obr. 10). Kumulativní biliární exkrece proto vykazovaly zvýšení tohoto poměru během celého pokusu. Významným zjištěním bylo, že poměr renálních exkrecí těchto sacharidů u potkanů s obstrukcí žlučového nebyl změněn. Obstrukce žlučového neměla vliv na poměr kumulativních hodnot renální exkrece melibiosy a rhamnosy (obr. 11). Vzhledem k zvýšenému poměru biliární exkrece melibiosy/L-rhamnosy je zajímavé porovnání poměrů plazmatických/žlučových koncentrací L-rhamnosy a melibiosy (obr. 12A a B). 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.

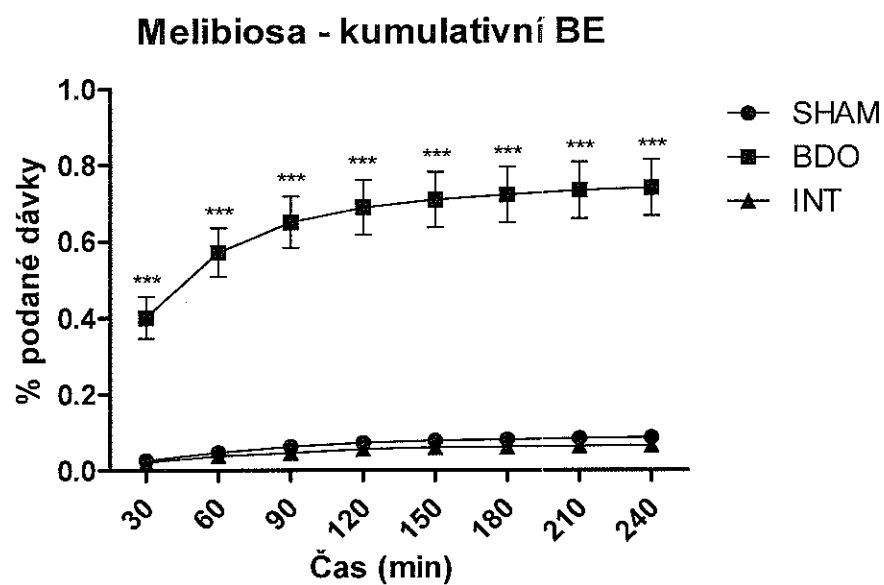
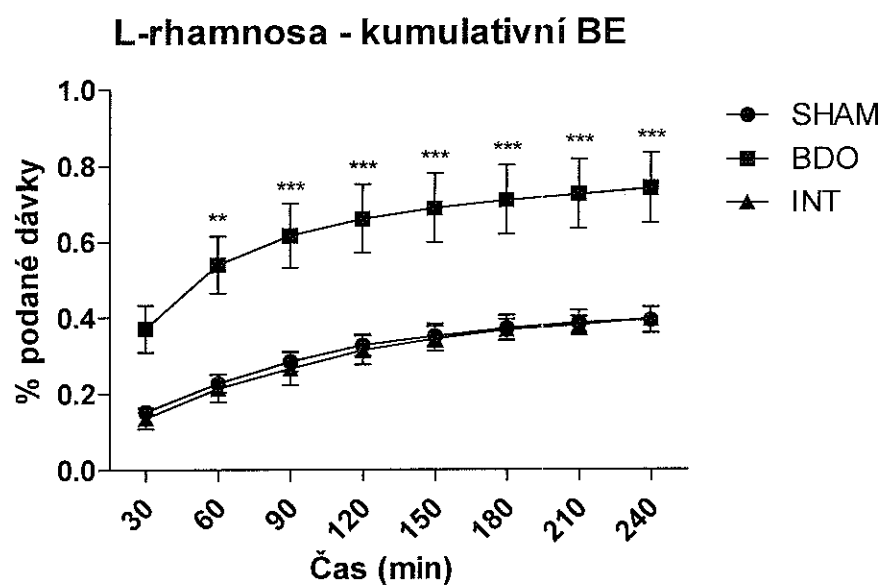
Změny v hodnotách biochemických ukazatelů jaterních funkcí jsou uvedeny v tab. 3. Podle očekávání byl druhý den po obstrukci žlučového byl zaznamenán významný vzestup koncentrací celkového a konjugovaného bilirubinu a aktivit ALT a AST v séru.



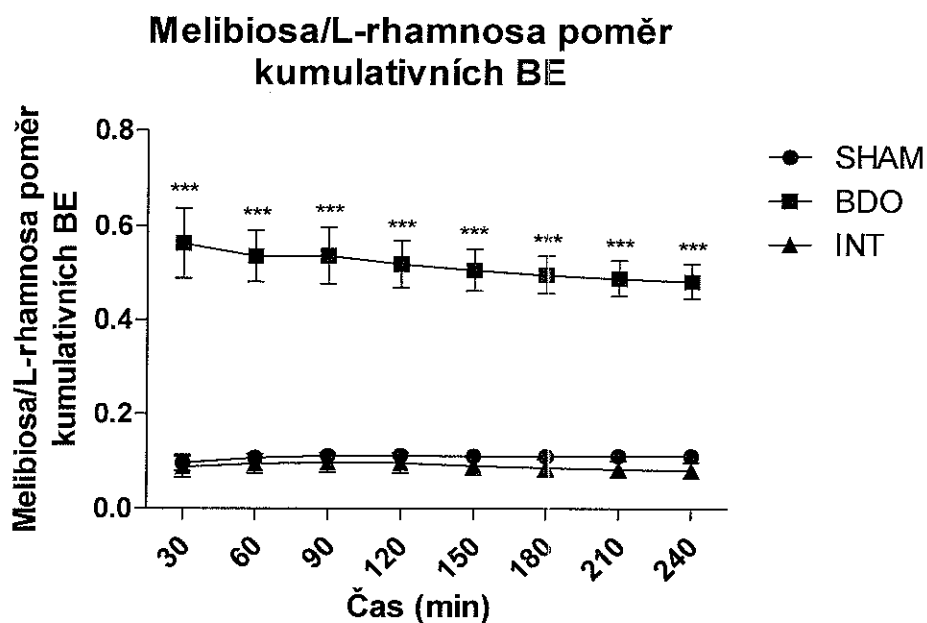
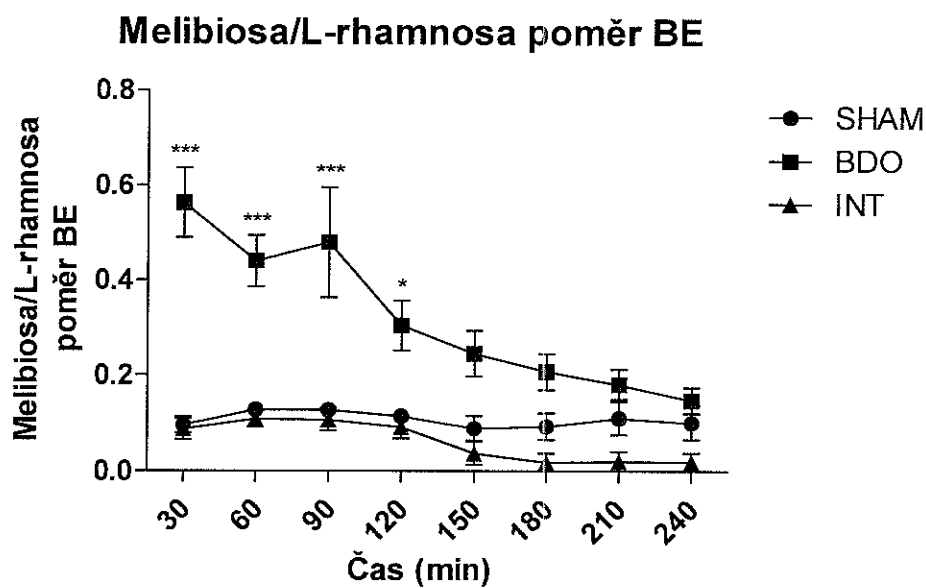
Obr. 7 Tok moči (A) a žluči (B) u intaktních potkanů (INT), zvířat po imitované operaci (SHAM) a potkanů s obstrukcí žlučového (BDO). Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± SEM ($n = 7$ v každé skupině). Mezi skupinami nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly.



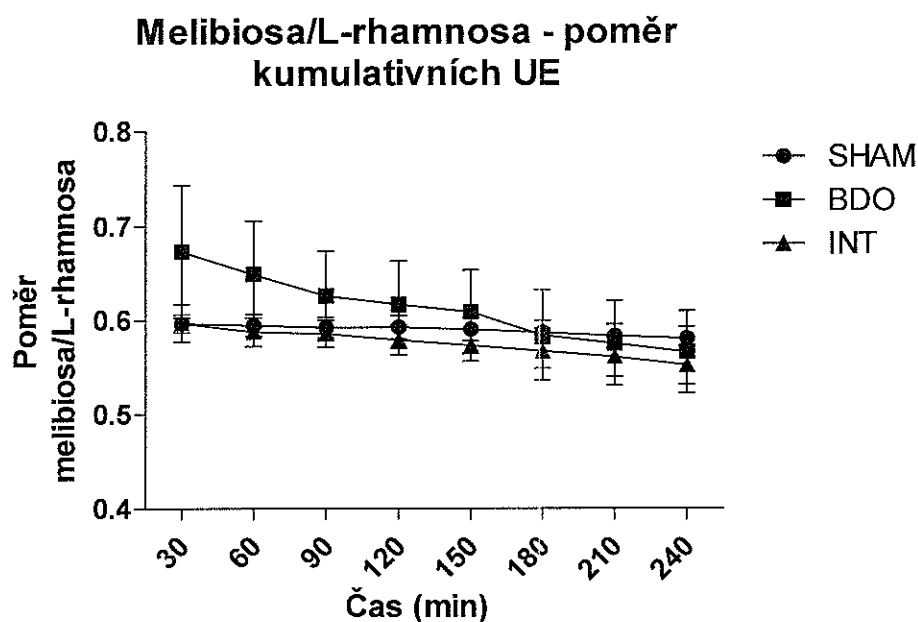
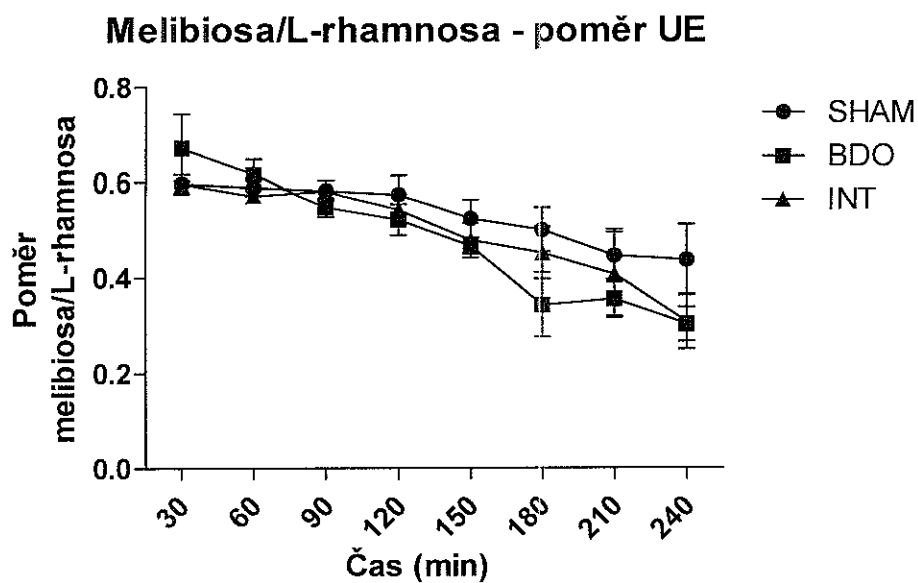
Obr. 8 Kumulativní renální (UE) exkrece L-rhamnosy a melibiosy u intaktních potkanů (INT), zvířat po imitované operaci (SHAM) a potkanů s obstrukcí žlučového (BDO). Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr \pm SEM ($n = 7$ v každé skupině). Mezi skupinami nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly.



Obr. 9 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 aritm. průměru ($n = 7$ v každé skupině). Statisticky významně odlišné od zvířat po imitované operaci (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

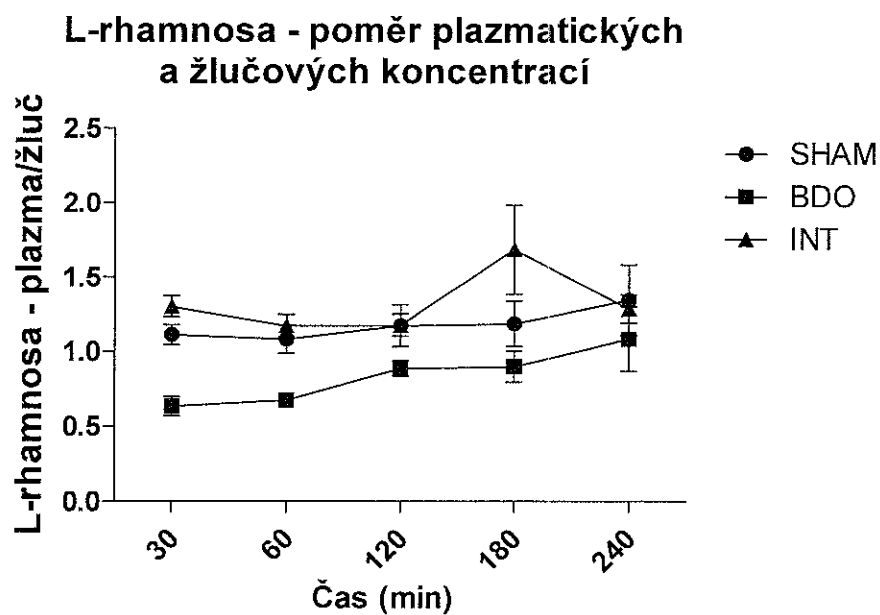


Obr. 10 Poměr exkrecí melibiosy a L-rhamnosy do žluči (BE) a změny tohoto poměru při korekci na kumulativní hodnoty u intaktních potkanů (INT), zvířat po imitované operaci (SHAM) a potkanů s obstrukcí žlučového (BDO). Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr \pm směrodatnou odchylku aritm. průměru ($n = 7$ v každé skupině). Statisticky významně odlišné od zvířat po imitované operaci ($p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

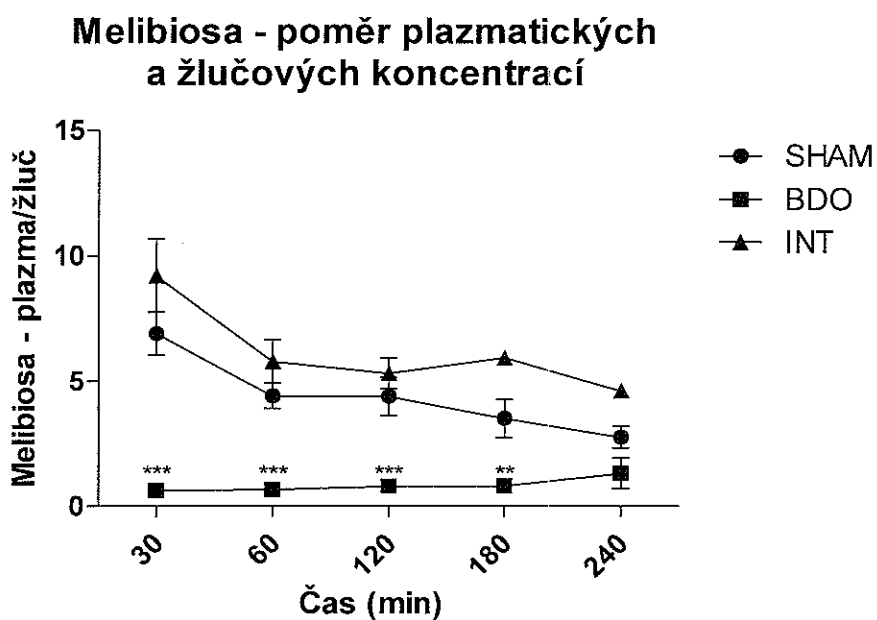


Obr. 11 Poměr exkrecí melibiosy a L-rhamnosy do moči (UE) a změny tohoto poměru při korekci na kumulativní hodnoty u intaktních potkanů (INT), zvířat po imitované operaci (SHAM) a potkanů s obstrukcí žlučového (BDO). Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr \pm směrodatnou odchylku aritm. průměru ($n = 7$ v každé skupině). Mezi skupinami nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly.

A)



B)



Obr. 12 Poměry plazmatických a žlučových koncentrací L-rhamnosy (A) a melibiosy (B) u intaktních potkanů (INT), zvířat po imitované operaci (SHAM) a potkanů s obstrukcí žlučového (BDO). Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± 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.

	INT	SHAM	BDO
ALT (IU/l)	2,5 ± 0,6	3,0 ± 0,8	15,3 ± 1,3 ***
AST (IU/l)	4,8 ± 0,9	4,7 ± 1,1	16,0 ± 1,2 ***
Celkový bilirubin	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,2	11,6 ± 1,6 **
Konjugovaný bilirubin	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	5,3 ± 1,9 *

Tab. 3 Hodnoty biochemických ukazatelů jaterních funkcí u potkanů bez předchozí operace (INT), po imitované operaci (SHAM) a u potkanů s obstrukcí žlučového (BDO). Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± SEM ($n = 7$ v každé skupině). Statisticky významně odlišné od zvířat po imitované operaci ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

5.2. Účinek modelových cytostatik mitoxantronu a doxorubicinu na ovlivnění syntézy DNA a bílkovin v ascitické formě myších nádorů MC29 a ATE *in vitro*

V této části předkládané práce byly provedeny pokusy *in vitro* s modelovými cytostatiky, MX a DOX. Cílem bylo ověřit zavedenou metodu sledující časový průběh simultánní inkorporace [6-³H]-thymidinu a L-[U-¹⁴C]-aminokyselinové směsi do buněk ascitických forem dvou myších karcinomů, MC29 a ATE, udržovaných v krátkodobých suspenzních kulturách. V tabulkách P1, P3, P5, P7, P9, P11, P13 a P15 v Příloze jsou uvedeny primární data získaná z experimentů, tedy hodnoty aktivit ³H a ¹⁴C ve frakci vzorků těchto kultur precipitované zředěnou kyselinou trichloroctovou. Vzorky byly odebírány v časových intervalech 0, 30, 60, 90, 120 a 150 min. Hodnoty I_{max} , značící celkovou měrnou aktivitu přidané značky, byly měřeny v 7. minutě inkubace. Z těchto aktivit byly pro jednotlivé nádory v přítomnosti jednotlivých cytostatik a pro každé značení zvlášť pomocí vztahu /6/ vypočteny hodnoty počátečních rychlostí (v_0), empirických konstant A a B . Tyto výsledky jsou uvedeny v tabulkách P2, P4, P6, P8, P10, P12, P14 a P16 v Příloze. Niže uvedená tab. 4 přehledně shrnuje porovnání dvou různých postupů („kinetického“ a „jednobodového“) při výpočtu hodnot IC_{50} pro suspenze obou experimentálních nádorů v přítomnosti MX nebo DOX.

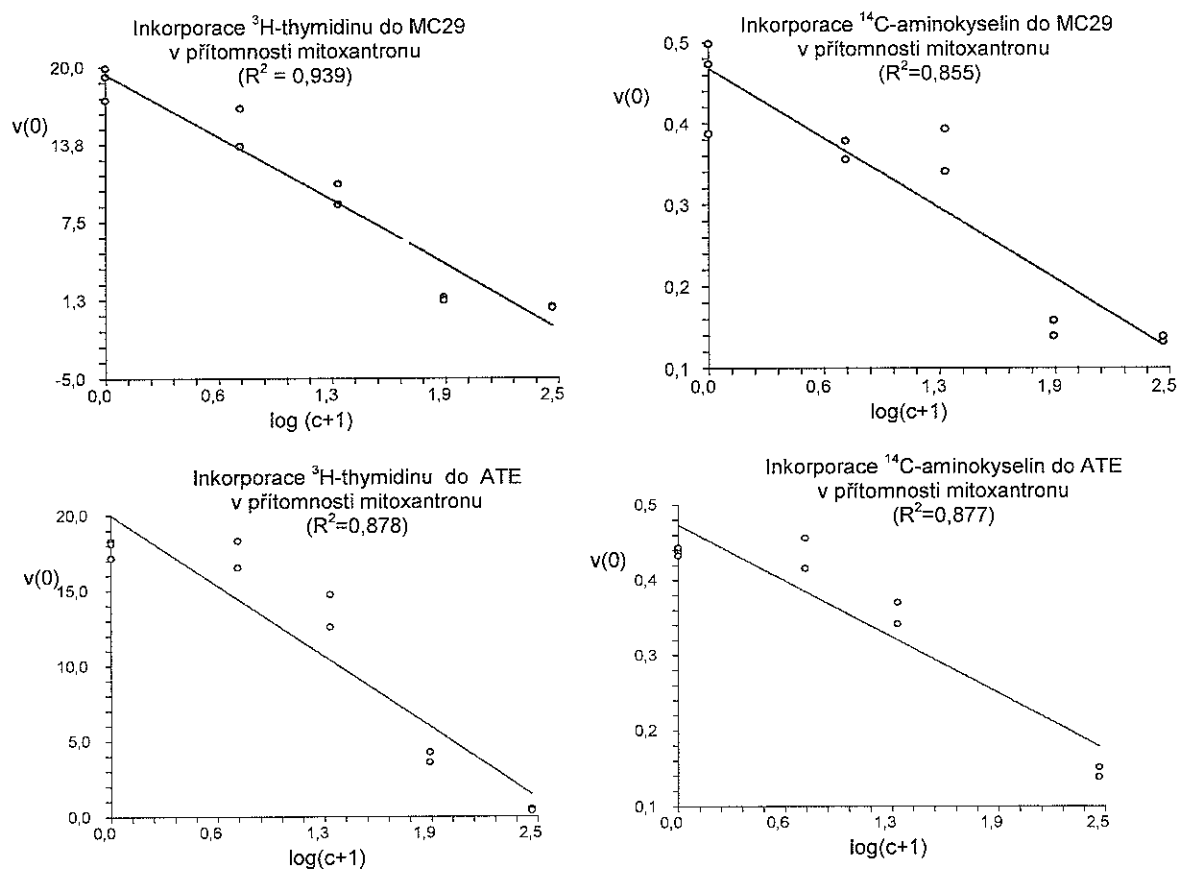
nádor	inhibitor	prekurzor	IC ₅₀ (1) (μmol.l ⁻¹)*	IC ₅₀ (2) (μmol.l ⁻¹)†
MC29	MX	³ H-thymidin	15,91	16,69
		L-[U- ¹⁴ C]-aminokyselin. směs	36,26	41,07
ATE	MX	³ H-thymidin	28,79	23,41
		L-[U- ¹⁴ C]-aminokyselin. směs	77,84	75,34
MC29	DOX	³ H-thymidin	16,01	9,64
		L-[U- ¹⁴ C]-aminokyselin. směs	inhibice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

Tab. 4 Hodnoty IC₅₀ mitoxantronu a doxorubicinu u krátkodobých kultur ascitických forem nádorů MC29 a ATE *in vitro*, pro inkorporaci ³H-thymidinu a [U-¹⁴C]-aminokyselinové směsi. *IC₅₀(1) = koncentrace inhibitoru, snižující počáteční rychlost inkorporace značky na polovinu počáteční rychlosti inkorporace u kontroly (bez inhibitoru) – „kinetický přístup“. †IC₅₀(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“.

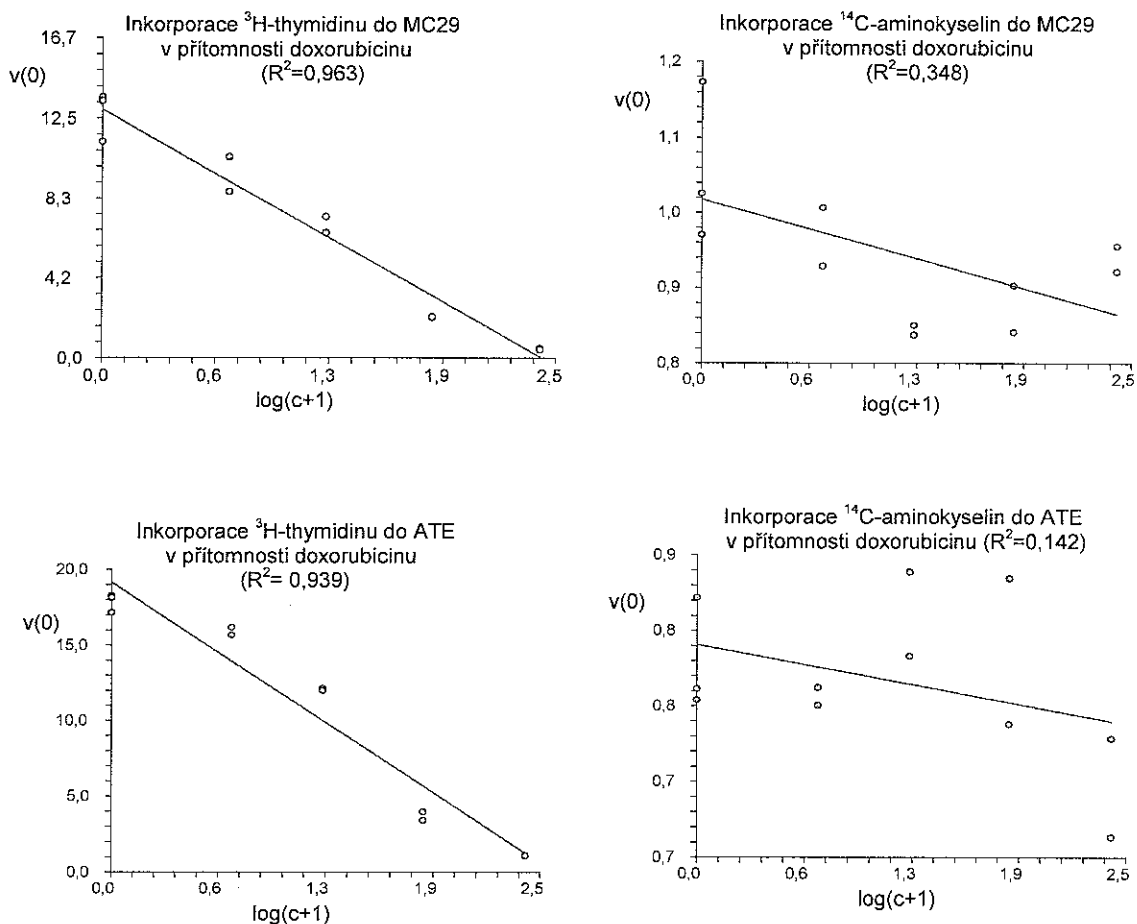
U obou nádorů je v přítomnosti MX i DOX patrný pokles hodnot počátečních rychlostí inkorporace ³H-thymidinu (obr. 13A, B). Hodnoty IC₅₀ pro inkorporaci ³H-thymidinu jsou v případě ascitické formy karcinomu MC29 u DOX i MX nižší než při použití ATE. V přítomnosti MX došlo k útlumu inkorporace aminokyselin u obou nádorů, zvláště MC29. U DOX nebyla ani u jednoho z nádorových modelů v rozmezí použitých koncentrací po dobu trvání inkubace dosažena IC₅₀ pro inkorporaci L-[U-¹⁴C]-aminokyselinové směsi. Hodnota IC₅₀ získaná lineární extrapolací závislosti v_0 na logaritmu koncentrace DOX zde o několik řádů převyšuje použité koncentrace. Nulová

hypotéza H_0 o tom, že směrnice přímky vyjadřující závislost počáteční rychlosti inkorporace na logaritmu koncentrace DOX je rovna nule ($H_0: b = 0$), nebyla na hladině významnosti 0,05 zamítnuta. Znamená to, že se počáteční rychlost inkorporace L-[U- 14 C]-aminokyselinové směsi za daných experimentálních podmínek při stoupajících koncentracích DOX prakticky nemění (obr. 13B).

Z tab. P2, P6, P10 a P14 v Příloze je vedle poklesu konstant A a tedy i počátečních rychlostí inkorporace značek 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. Dalším zjištěním je, jak je vidět v tab. P1, P3, P9 či P13 v Příloze, mírný pokles hodnot inkorporovaných aktivit v posledních intervalech odběru.



Obr. 13A Závislost počáteční rychlosti inkorporace ^3H -thymidinu nebo L-[U- ^{14}C]-aminokyselinové směsi do buněk MC29 a ATE na koncentraci MX. Na ose x je vyneseno $\log(c + 1)$, uveden je koeficient determinace (R^2) pro lineární regresi.



Obr. 13B Závislost počáteční rychlosti inkorporace ^3H -thymidinu nebo L-[U- ^{14}C]-aminokyselinové směsi do buněk MC29 a ATE na koncentraci DOX. Na ose x je vyneseno $\log(c+1)$, uveden je koeficient determinace (R^2) pro lineární regresi.

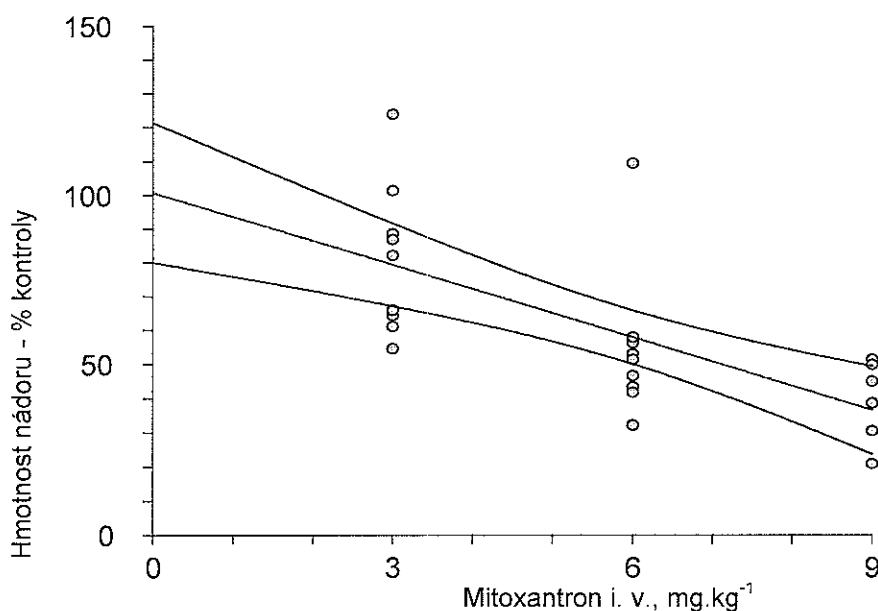
5.3. Ověření senzitivity ascitické formy nádoru MC29 na MX *in vivo*

Experiment zjišťující citlivost nádoru MC29 na MX byl proveden pro doplnění poznatků o vlastnostech tohoto nového nádorového modelu, získaných *in vitro*. Sledován byl vliv intravenózně podaného MX v dávkách 3, 6 a 9 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ na hmotnost nádoru (zjišťovanou jako hmotnost buněčné frakce nádorového ascitu) a přežití myší. Cytostatikum bylo podáno den po inokulaci 10^6 buněk nádoru *i.p.* Ovlivnění **hmotnosti** nádoru MC29 (resp. buněčné frakce jeho ascitické formy) užitými dávkami mitoxantronu, zjišťované 10. den po inokulaci nádoru, je statisticky významné. Průměrné hmotnosti buněčné frakce nádorového ascitu jsou shrnuty v tab. 5.

Dávka (mg.kg ⁻¹)	Aritmetický průměr hmotnosti buněčné frakce ascitu (m_T) (interval spolehlivosti) (g)	p (t-test, Bonferroniho modifikace $\alpha = 0,05/3$)	Liší se od skupin (mg/kg) (Fisherův LSD-test, $\alpha = 0,05$)	Procento kontroly
0	0,621 (0,4862 - 0,7558)	-	9; 6	100
3	0,503 (0,3974 - 0,6093)	0,07130	9; 6	81
6	0,340 (0,2347 - 0,4453)	0,000930	3; 0	55
9	0,239 (0,1721 - 0,3054)	0,000033	3; 0	38

Tab. 5 Hmotnost buněčné frakce nádorového ascitu u skupin myši 10. den po *i. v.* podání mitoxantronu v dávkách 0, 3, 6 a 9 mg.kg⁻¹, n=10 v každé skupině.

Regresní křivku závislosti hmotnosti buněčné frakce ascitu na dávce znázorňuje obr. 14. Z něho je zřejmé, že se stoupající dávkou tento účinek roste prakticky lineárně.



Obr. 14 Hmotnost buněčné frakce ascitického nádoru MC29 (m_T) 10.den po *i. v.* podání mitoxantronu.

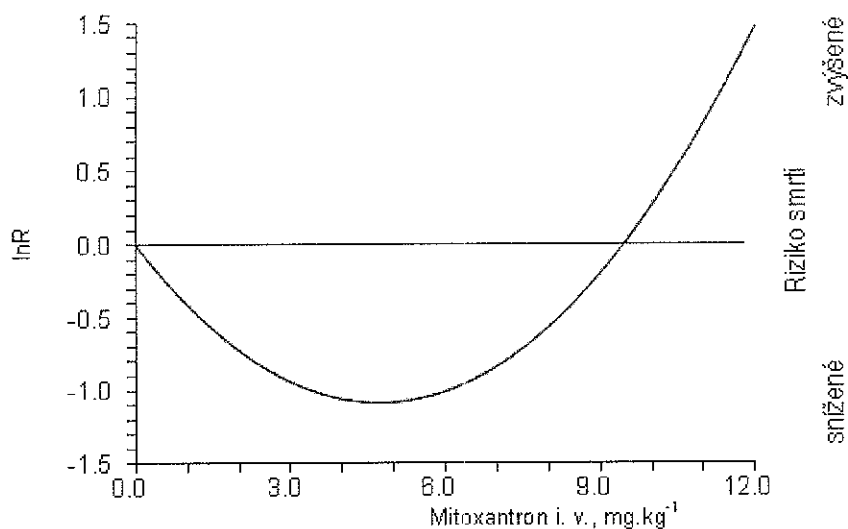
F -test (1,24 stupňů volnosti): F -ratio = 20,4; $p=0,0001$; $R^2 = 0,46$

Za předpokladu normality rozdělení a shodnosti rozptylů byla pro jednotlivé dávkové skupiny provedena Bonferroniho modifikace Studentova t-testu na hladinu významnosti $\alpha = 0,05/3$. Z hodnot p vyplývá, že je u dávkových skupin 9 a 6 mg.kg^{-1} významný pokles hmotnosti buněčné frakce ascitu. Při vícenásobném porovnání jednotlivých skupin mezi sebou Fisherovým LSD-testem byla na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ skutečně nalezena především odlišnost skupin s dávkami 6 a 9 mg.kg^{-1} od kontroly. Primární data měření hodnot ascitokritů a hmotnosti buněčných frakcí ascitu u jednotlivých dávkových skupin myši podrobně ukazuje tab. P17 v Příloze.

Dále byl sledován účinek MX na **přežití** myši s intraperitoneálně inokulovaným nádorem MC29. Doby přežití byly statisticky zpracovány Coxovým regresním modelem podle Cartera (Carter et al., 1982), který umožňuje vyjádřit závislost indexu relativního rizika smrti na dávce cytostatika. Graf této závislosti je na obr. 15. Body křivky odpovídající $\ln R < 0$ značí snížené riziko smrti proti kontrole, tedy zvýšený terapeutický benefit. Pro nádor MC29 jsme na základě zjištěné závislosti (obr. 15) vypočítali pomocí vztahu /11/, uvedeném v oddílu Materiál a metody, optimální dávku MX $x_{opt} = 4,726 \text{ mg.kg}^{-1}$, tedy $14,2 \text{ mg.m}^{-2}$ (Freireich et al., 1966), která odpovídá nejnižšímu riziku smrti. Průměry přežití shrnuje tab. 6. V tab. P18 v Příloze jsou podrobněji uvedeny doby přežití jednotlivých myši.

Dávka (mg.kg^{-1})	Geometrický průměr přežití (interval spolehlivosti) (dny)	Procento kontroly
0	14,69 (11,61 - 18,58)	100
3	16,42 (12,20 - 22,11)	112
6	21,07 (15,02 - 29,54)	143
9	14,29 (11,05 - 18,49)	97

Tab. 6 Přežití myších samic NMRI, jimž byl intravenózně aplikován mitoxantron 1. den po transplantaci adenokarcinomu MC29.



Obr. 15 Závislost logaritmu indexu relativního rizika (R) na dávce MX a účinnost MX na MC29. Regresní model /9/. $\beta_1 = -0,459162 \pm 0,179494$; $p = 0,0105$; $\beta_2 = 0,048582 \pm 0,019791$; $p = 0,0141$. Minimum křivky ukazuje na optimální dávku, při které je relativně nejvýhodnější poměr mezi rizikem smrti způsobené nádorovou chorobou a rizikem smrti v důsledku toxicity cytostatika.

5.4. Protinádorová účinnost L-rhamnosy v porovnání s 2-deoxyglukosou

5.4.1. Účinek L-rhamnosy a 2-deoxyglukosy na syntézu DNA a bílkovin v nádorových buňkách

Protinádorový účinek L-rhamnosy v porovnání s 2-DG byl zjišťován metodou simultánní inkorporace $[6\text{-}^3\text{H}]\text{-thymidinu}$ a $\text{L-}[U\text{-}^{14}\text{C}]\text{-aminokyselinové}$ směsi do nádorových buněk ATE, MC29 a HL-60 v krátkodobých kulturách *in vitro*. Uspořádání pokusů bylo analogické jako u studie *in vitro* s DOX a MX (viz. 5.2). Primární data, tedy hodnoty aktivit ^3H a ^{14}C ve frakci vzorků těchto kultur, precipitovatelné zředěnou kyselinou trichloroctovou, jsou uvedeny v tabulkách P19, P21, P23, P25, P27, P29, P31, P33, P35 a P37 v Příloze. Hodnoty počáteční rychlosti (v_0) a empirických konstant A a B , vypočtené z těchto aktivit pomocí vztahu /6/ jsou pro jednotlivé nádory v přítomnosti L-rhamnosy a pro každé značení zvlášť uvedeny v tabulkách P20, P22, P24, P26, P28, P30, P32, P33, P36 a P38 v Příloze.

Ascitický Ehrlichův nádor (ATE)

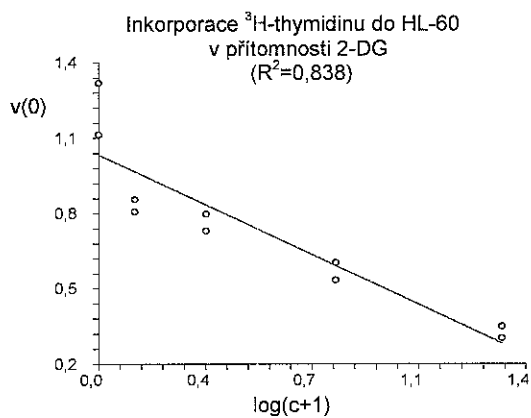
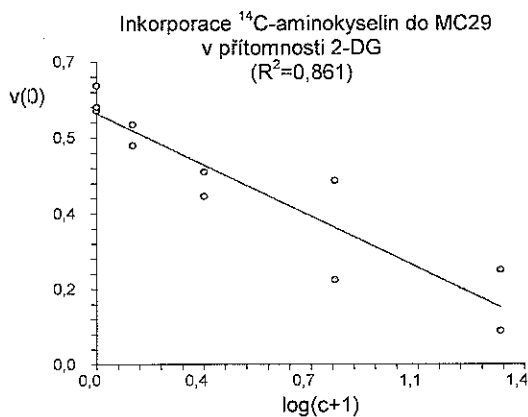
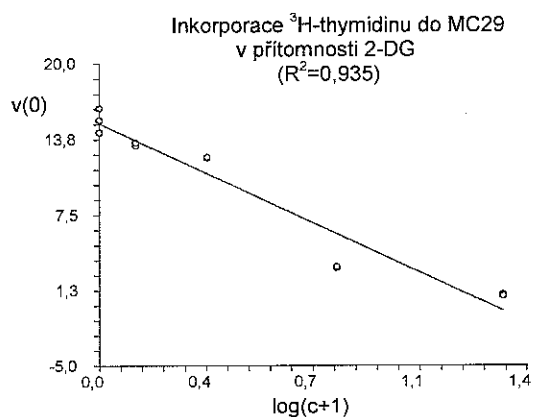
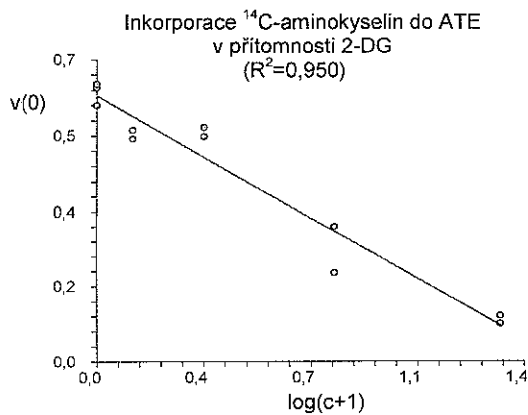
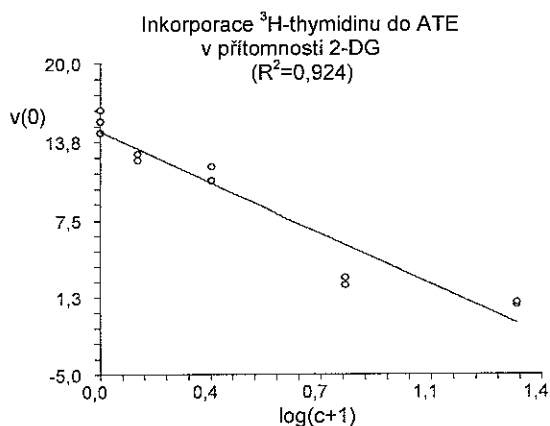
V přítomnosti 2-DG došlo k významné inhibici inkorporace [6-³H]-thymidinu i L-[U-¹⁴C]-aminokyselinové směsi (obr. 16A, tab. P19, P20, P21, P22). Hodnoty IC₅₀ byly 1,87 resp. 3,64 mmol.l⁻¹. V tab. P20 v příloze je navíc zřetelný důležitý jev: Zatímco se, stejně jako u modelových cytostatik MX a DOX, konstanta *A* (ze vztahu /6/), která značí biosyntézu DNA, při zvyšující se koncentraci 2-DG snižuje, konstanta *B*, jež ukazuje na degradaci DNA, v případě 2-DG (na rozdíl od MX a DOX) současně nestoupá. Pravděpodobně lze tedy konstatovat, že s rostoucí koncentrací 2-DG dochází ke stále silnější inhibici syntézy DNA, avšak nezvyšuje se její degradace.

Při inkubaci s L-rhamnosou byla zaznamenána pouze slabá inhibice inkorporace [6-³H]-thymidinu (při 20 mmol.l⁻¹ byla hodnota počáteční rychlosti inkorporace 68,4 % kontroly) a žádná významná inhibice inkorporace L-[U-¹⁴C]-aminokyselinové směsi (obr. 16B): Nulová hypotéza H_0 o tom, že směrnice přímky vyjadřující závislost počáteční rychlosti inkorporace na logaritmu koncentrace L-rhamnosy je nulová ($H_0: b = 0$), nebyla na hladině významnosti 0,05 zamítnuta. To znamená, že L-rhamnosa zde nemá prakticky žádný efekt na inkorporaci značených aminokyselin.

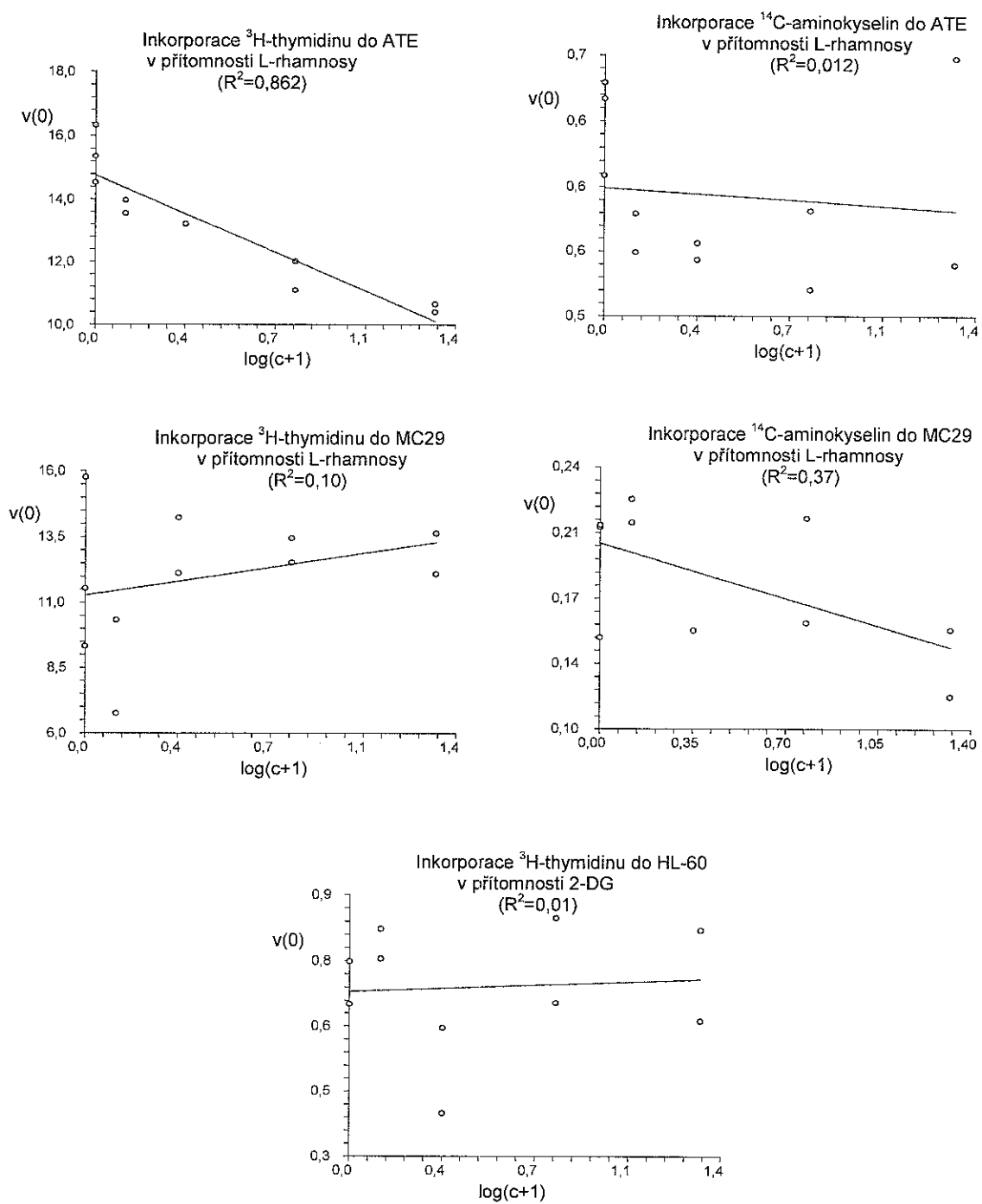
Myší adenokarcinom mléčné žlázy MC29

V přítomnosti 2-DG došlo k významné inhibici inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk MC29 (IC₅₀ = 3,67 mmol.l⁻¹) i L-[U-¹⁴C]-aminokyselinové směsi (IC₅₀ = 5,54 mmol.l⁻¹), viz obr. 16A.

U buněk inkubovaných s L-rhamnosou však nebyla pozorována žádná významná inhibice inkorporace ani jednoho ze značených prekurzorů (H_0 o směrnici přímky nebyla zamítnuta, viz výše), viz obr. 16B. Podobně jako u ATE nebyl ani zde zaznamenán vzestup konstanty *B* se zvyšující se koncentrací 2-DG.



Obr.16A Závislost počáteční rychlosti inkorporace ^3H -thymidinu nebo L-[U- ^{14}C]-aminokyselinové směsi do buněk ATE, MC29 a HL-60 na koncentraci 2-DG. Na ose x je vyneseno $\log(c+1)$, uveden je koeficient determinace (R^2) pro lineární regresi.



Obr.16B Závislost počáteční rychlosti inkorporace ^3H -thymidinu nebo L-[U- ^{14}C]-aminokyselinové směsi do buněk ATE, MC29 a HL-60 na koncentraci L-rhamnosy. Na ose x je vyneseno $\log(c + 1)$, uveden je koeficient determinace (R^2) pro lineární regresi.

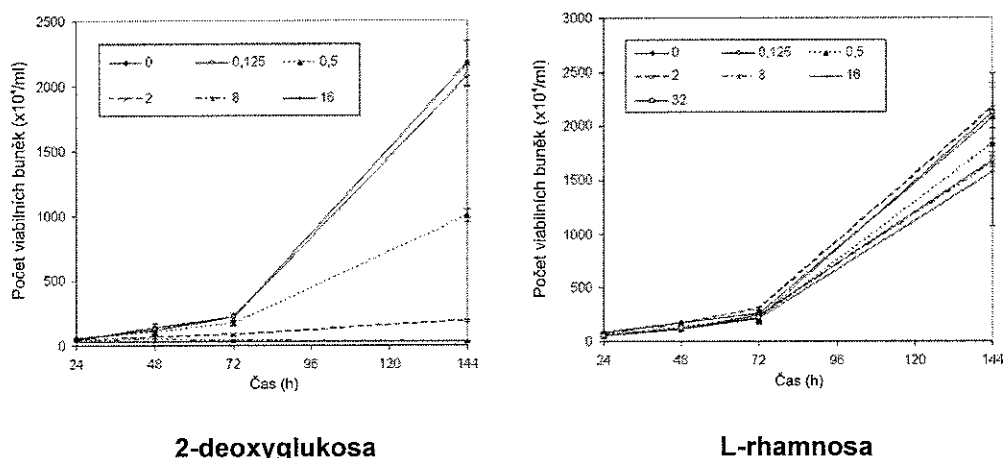
Lidská promyelocytární leukemie HL-60

Počáteční rychlost inkorporace [6-³H]-thymidinu byla v přítomnosti 2-DG snížena (obr. 16A), hodnota IC₅₀ dosáhla 19,31 mmol.l⁻¹. Inhibice inkorporace L-[U-¹⁴C]-aminokyselinové směsi nebyla hodnocena (výrazný rozptyl bez zaznamenaného trendu hodnot).

Buňky v prostředí s L-rhamnosou nevykazovaly žádné ovlivnění inkorporace [6-³H]-thymidinu (obr. 16B), inkorporace ¹⁴C-značených aminokyselin nebyla hodnocena (viz výše).

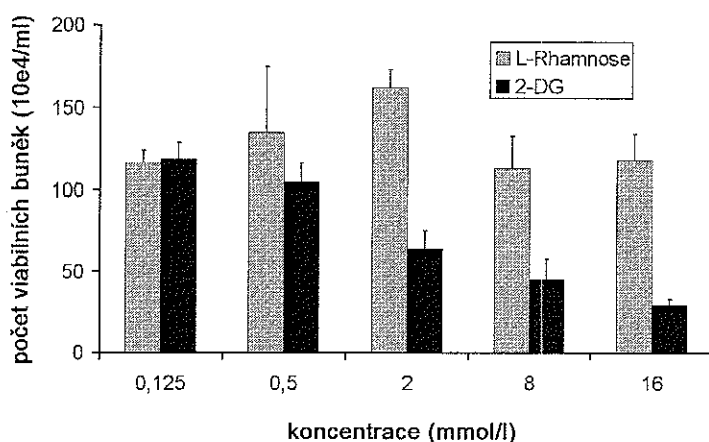
5.4.2. Účinek L-rhamnosy a 2-deoxyglukosy na proliferaci buněk HL-60

Buňky HL-60 byly na začátku zředěny na koncentraci 2 · 10⁵ ml⁻¹. V průběhu sledovaného intervalu byl zaznamenán exponenciální růst (obr. 17). Již při koncentraci 2-DG 0,5 mmol.l⁻¹ došlo v porovnání s kontrolními buňkami ke snížení proliferace (analyzované jako počet viabilních buněk). Koncentrace 2-DG 2-16 mmol.l⁻¹ kompletně inhibovaly buněčnou proliferaci (obr. 17). V přítomnosti L-rhamnosy v koncentracích 0,125 – 32 mmol.l⁻¹ nebylo zaznamenáno žádné významné ovlivnění počtu viabilních buněk v porovnání s kontrolou (obr. 17). Inhibice proliferace v přítomnosti 2-DG byla koncentračně závislá (obr. 18) a byla zaznamenána při koncentracích nad 0,5 mmol.l⁻¹ po inkubaci 48 h a delší.



Obr. 17 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⁻¹ do 32 resp. 16 mmol.l⁻¹, v plném kultivačním mediu. Body vyznačují průměr třech experimentálních hodnot ± SD.

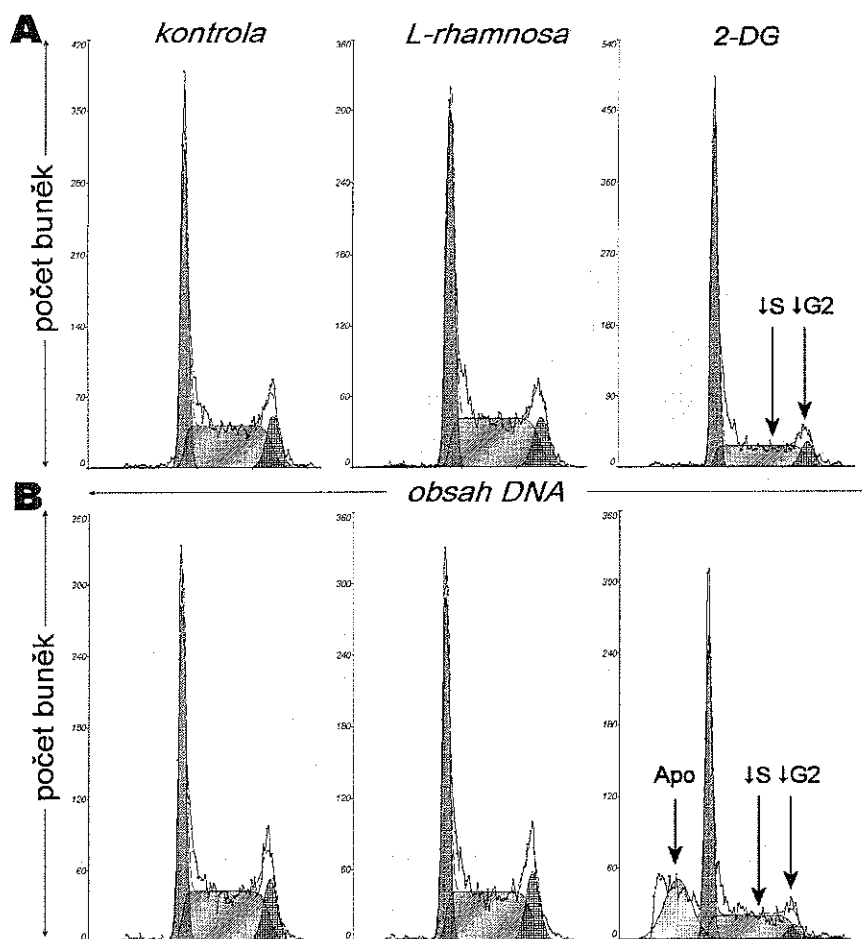


Obr. 18 Porovnání účinku L-rhamnosy a 2-DG na buněčnou proliferaci po 48 h inkubace. Buňky HL-60 byly inkubovány s L-rhamnosou nebo 2-DG v koncentracích od 0,125 mmol.l⁻¹ do 16 mmol.l⁻¹ v plném kultivačním médiu po dobu 48 h. Data vyznačují průměry třech experimentálních hodnot ± SD.

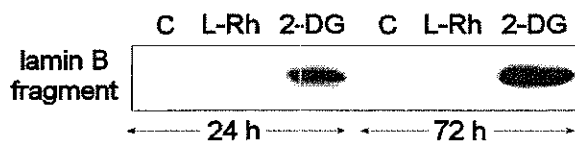
5.4.3. *Ovlivnění buněčného cyklu a indukce apoptózy v přítomnosti L-rhamnosy a 2-deoxyglukosy a štěpení laminu B*

Po 24-hodinové inkubaci buněk HL-60 s 2-DG o koncentraci 5 mmol.l⁻¹ docházelo k zástavě buněčného cyklu ve fázi G₁. Podíl buněk v S fázi klesl z 50 % (kontroly) na 38 %, podíl buněk v G₂/M fázi z 12 % na 8 % (obr. 19A). Při hodnocení 72 h od začátku inkubace s 2-DG byl zachycen *sub-G₁-peak*, ukazující na apoptózu (29 % buněk) (obr. 19B). 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 G₁ fázi buněčného cyklu. L-Rhamnosa ve stejné koncentraci (5 mmol.l⁻¹) neovlivnila rozložení buněk ve fázích buněčného cyklu a neindukuje apoptózu.

Tyto výsledky potvrzuje i detekce štěpení laminu B. Fragmenty 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. 20).



Obr. 19 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^{-1} 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.



Obr. 20 Účinek L-rhamnosy a 2-DG na štěpení laminu B. Buňky HL-60 byly inkubovány s L-rhamnosou nebo 2-DG o koncentraci 5 mmol.l^{-1} po dobu 24 h nebo 72 h, lyzovány, a štěp laminu B byl detekován v plném buněčném lyzátu pomocí western blottu. 2-DG indukuje výrazné štěpení laminu B, což ukazuje na aktivitu kaspas a apoptózu v těchto buňkách, zatímco L-rhamnosa tyto změny nepůsobí.

6. DISKUSE

6.1. Studium farmakokinetiky melibiosy a L-rhamnosy a testování integrity hepatobiliární bariéry u potkana

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 (Hallemeesch 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 ledvinami obou sacharidů ani jejich kumulativní hodnoty nebyly ovlivněny cholestázou.

Permeabilita hepatobiliární bariéry hraje důležitou roli při regulaci tvorby žluči. Jejím strukturálním podkladem jsou spojení mezi hepatocyty typu *tight junctions* a spolu s *gap junctions* je regulována komplexní souhrou několika faktorů (Kojima et al., 2003). Při extrahepatální cholestáze je integrita bariéry porušena, což je spojeno s prostupováním látek ze žluči do krve a naopak. Většina dosavadních znalostí byla získána mikroskopickými technikami s funkčními výsledky omezenými na několik studií s křenovou peroxidasou (Rahner et al., 1996, Takakuwa et al., 2002). Podle těchto studií vykazuje průnik peroxidasy ze žluči do krve při obstrukční cholestáze dvě

maxima: První za 4 – 6 minut po injekci, jehož podkladem je paracelulární transport, a druhý za 20 – 25 minut, způsobený průchodem transcelulární cestou (Takakuwa et al., 2002; Monte et al., 2003). Tato data vyvolala otázku o případném omezení interpretace těchto testů, neboť transportní procesy hepatocytů jsou výrazně ovlivňovány cholestázou (Geier et al., 2007). Proto byl v naší práci použit popsáný a osvědčený postup pro testování paracelulární permeability: „*Dual-sugar*“ test s L-rhamnosou a melibiosou, užívaný pro hodnocení integrity intestinální bariéry (D'Antiga et al., 1999; Taylor et al., 2002). Předpokládá se, 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 (cca 68 % w/w), 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 žlučovéhoodu 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 v pracích s křenovou peroxidasou, avšak zde je tato detailní informace poprvé zjištěna u 24-hodinové obstrukce žlučovéhoodu, běžně užívaného modelu akutní cholestázy. „*Dual sugar*“ test tedy může sloužit jako indikátor paracelulární permeability v transportu látek mezi žlučí a krví. Jinou otázkou bylo, zda přítomnost akutní cholestázy může ovlivnit výsledky testování integrity střevní bariéry. Při těchto testech bývá poměr disacharidu melibiosy a L-rhamnosy sledován v moči sbírané 5 hodin po podání (D'Antiga et al. 1999). V této studii neukázala kumulativní data sbíraná po dobu 4 h žádný rozdíl mezi kontrolou a skupinou potkanů s obstrukcí žlučovéhoodu, až na skutečnost, že biliární clearance melibiosy byla zvýšena cholestázou. Toto ukazuje na možnost spolehlivého testování permeability intestinální bariéry i v případě poškozené hepatobiliární bariéry.

Ačkoli kumulativní data ukazují, že se do žluči vylučuje jen velmi malá část podané L-rhamnosy, mohla by tato deoxyhexosa být díky rychlému vyrovnání jejích koncentrací v plazmě a žluči zajímavá jako marker biliární exkrece při studiu různých xenobiotik.

6.2 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*. Ebbehøj a Langkjer (1995) a mnoho dalších autorů potvrdilo validitu těchto metod v porovnání s testováním jiných parametrů buněčné viability a proliferace. 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 senzitivitou. Pro tuto první fázi zavádění metodiky byla vybrána modelová cytostatika MX a DOX, 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 (např. Ellem et al., 1970, Calvete et al., 1994, Huang et al., 2000) sledovat časový průběh inkorporace. Primární data získaná při „kinetickém“ provedení sice umožňují i zpracování „jednobodové“, ale může tak dojít ke ztrátě důležité informace. Již Gorodisskaja a kol. (1949) uvádějí, že vyvozování závěrů o rychlosti biosyntézy pouze z jednoho bodu křivky závislosti měrné aktivity makromolekul na čase může být zatíženo chybou. 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} jak vedle výpočtu jako koncentrace inhibitoru snižující počáteční rychlost inkorporace značky na polovinu počáteční rychlosti inkorporace u kontroly, i běžně užívaným „jednobodovým“ způsobem, tedy jako koncentrace inhibitoru, snižující aktivitu inkorporovanou do makromolekulární frakce po 120 min inkubace na polovinu aktivit srovnatelné kontroly. V případě MX je rozdíl hodnot získaných těmito dvěma postupy minimální (Tab. 4. v kapitole Výsledky). U DOX jsou však hodnoty IC_{50} snižující počáteční rychlost inkorporace na polovinu kontroly v tomto porovnání poněkud vyšší. Podíl buněk barvitelných vitálním barvivem je přitom po 120 min

inkubace u obou cytostatik podobný, takže vysvětlení sníženou viabilitou po delší inkubaci a tedy odlišnou kinetikou inkorporace není pravděpodobné. Tento jev není z hlediska mechanismu účinku DOX zatím vysvětlen.

Základem pro odvození vztahu /7/, vyjadřujícího kinetické vztahy jednotlivých frakcí, byla tzv. „kinetická izotopová metoda“, navržená Nejmanem (Nejman et Gal, 1970, Mělka, 1980). Tato vycházela z představy homogenního látkového toku, probíhajícího současně s izotopovou výměnou. Je řešením soustavy diferenciálních rovnic, popisujících model uzavřené soustavy za předpokladu stacionárního stavu sledovaného děje, kdy nedochází po čas krátkodobé inkubace ke změnám analytických koncentrací sledovaných prekurzorů ani makromolekul $[M]$, tedy rychlost jejich syntézy w_1 je rovna rychlosti degradace w_2 :

$$\frac{d[M]}{dt} = w_1 - w_2 = 0 \quad /12/$$

Při odvozování vztahu /6/ byla provedena celkem dvě hlavní zjednodušení původního triexponenciálního modelu /7/: Zavzetí členu v/c do konstanty B a linearizace exponenciály vzestupu inkorporační křivky. Přesto takto získaný vztah dobře popisuje závislost aktivity na době inkubace a byl již použit v několika předcházejících pracích (např. Mělka et Niang, 1996; Niang, 2000). Je tomu tak patrně i proto, že bere v úvahu snižování měrné aktivity prekurzoru ředěním produkty degradace makromolekulární frakce. Z derivace vztahu /13/

$$I_t = A I_{\max} t e^{-Bt} + I_0, \quad /13/$$

získaného z /6/, podle času, kdy $t = 0$, vyplývá že rychlosti sledovaného děje je úměrná pouze počáteční rychlost inkorporace v_0 ; ta je přímo úměrná empirické konstantě A a celkové aktivitě značky I_{\max} :

$$v_0 = v_{t=0} = \left(\frac{\partial I_t}{\partial t} \right)_{t=0} = \left[A I_{\max} e^{-Bt} (1 - Bt) \right]_{t=0} = A I_{\max}. \quad /14/$$

Pokusy provedené v této práci i dřívější práce Mělky a kol. (Mělka, ústní sdělení) ukazují, že, narozdíl od představy většiny autorů, hodnoty měrné aktivity frakce precipitovatelné kyselinou trichloroctovou po počátečním vzrůstu v čase, připomínajícím zprvu rovnoosou hyperbolu prvního řádu, dosahují maxima a opět klesají. Toto maximum je v souladu s „kinetickým izotopovým modelem“ (Nejman et Gal, 1970) a je během krátkodobé inkubace pozorováno především u vzorků inkubovaných s inhibítorem, kde dostatečný podíl buněk po celou dobu kultivace zůstává viabilní, ovšem maximum má rozdílnou polohu (v přítomnosti inhibítorů je maxima dosaženo dříve, a to u jejich vyšších koncentrací dříve než u nižších). Tento „posun“ maxima u vzorků s přítomným inhibítorem souvisí se zvýšením hodnoty konstanty B , určující pokles inkorporační křivky charakterizovaný exponenciálou

$$y = \kappa e^{-Bt} \quad /15/$$

kde κ je konstanta nezávislá na čase t . Křivka závislosti nainkorporované aktivity na době inkubace tedy pravděpodobně není limitována shora, jako u hyperboly prvního řádu, ale zdá se být teoreticky limitována zdola. Na rozdíl od Nejmanova otevřeného modelu je v provedených inkorporačních studiích užívána soustava uzavřená a dolní limitou křivky tedy není nulová hodnota, ale rovnovážný stav.

Prokázali jsme, že vedle poklesu konstant A /6/ a tedy i počátečních rychlostí inkorporace značek, je se stoupající koncentrací cytostatika patrný i současný vzestup hodnot konstant B z téhož vztahu /6/ a s tím související prudký pokles poměrů A/B . Vzrůst konstanty B je působen všemi faktory snižujícími aktivitu makromolekulární frakce precipitovatelné kyselinou trichloroctovou – vlivem cytostatika na degradaci makromolekul v poškozených buňkách (případně vstupem buněk do apoptózy), ale může být teoreticky působen i vlivem nevhodných experimentálních podmínek nebo snížením analytické koncentrace volného prekurzoru. Ovlivnění konstanty B tak může vypovídat i o mechanismu účinku látky – za povšimnutí stojí situace, zjištěná v této práci u 2-deoxyglukosy. Zde při stoupající koncentraci tohoto deoxysacharidu nedochází u inkorporace značeného thymidinu k vzestupu hodnot empirické konstanty B . Tento jev je možno interpretovat tak, že 2-DG nepůsobí přímé poškození DNA.

Metoda použití krátkodobých (cca 3 h, max. 6 h) kultur nádorových buněk čerstvě odebraných z pokusného zvířete má výhodu nejen v tom, že standardně není nutná přítomnost antibiotik v médiu, čímž odpadají úvahy o případném ovlivnění některých biochemických dějů eukaryotické buňky, ale buňky čerstvě získané z nádoru také relativně dobře vystihují chování nádorové choroby. Použitý pracovní postup izolace frakce precipitovatelné vychlazenou zředěnou kyselinou trichloroctovou, vyvinutý původně pro stanovení individuální chemosenzitivity/chemorezistence solidního nádoru odebraného přímo od pacienta biopticky nebo při operaci (Mattern, 1976a, Mattern et al., 1976b), je proveditelný i bez náročného technického vybavení. Je třeba myslet na to, že kyselina trichloroctová jako chaotropní činidlo za studena sráží mimo proteinů, peptidů a nukleových kyselin s délkou nad cca 20 nukleotidů také cukerné složky glykoproteinů a lipidy (Mělka, 1980). Eluce ve směsi diethylether : ethanol však odstraňuje pouze lipoidní látky. Miko a Drobnica (1972) zjistili u Ehrlichova tumoru *in vitro*, že 90 % inkorporovaného thymidinu se nachází ve DNA frakci a 87,5 % inkorporovaného uridinu je v RNA. Z pohledu kvantitativního není tedy třeba ostatní složky v daných případech brát v úvahu.

Ačkoli použití směsi aminokyselin může řešení kinetických vztahů komplikovat a nejvýhodnějším se pak jeví k empirické řešení kinetiky (Mělka, 1980), je možné jej označit za správnější oproti užití jedné značené aminokyseliny (např. leucinu). Knorre (Knorre, 1959) ukázal, že kinetika inkorporace vybraných aminokyselin se může lišit v důsledku syntézy bílkovin různého složení. Navíc může jen část syntetizovaných proteinů obsahovat sledovanou aminokyselinu.

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 ascitický Ehrlichův tumor. Senzitivita obou použitých nádorových modelů je však podobná a lze ji zhruba srovnat např. s Yoshidovým ascitickým retikulosarkomem, který při použití srovnatelné metodiky inkorporace $[6-^3H]$ thymidinu *in vitro* vykazoval podobnou citlivost vůči DOX ($IC_{50} = 16 \mu\text{mol.l}^{-1}$), a MX ($IC_{50} = 25 \mu\text{mol.l}^{-1}$) (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. Toto je ve shodě s publikovanými výsledky u Yoshidova ascitického nádoru (Mělka et Niang, 1996), kde bylo rovněž hodnoceno ovlivnění počáteční rychlosti inkorporace značky, i když studie provedené na kulturách myšního lymfomu L5178Y ukazují vyšší inhibiční efekt MX (Smith, 1983).

V přítomnosti MX byla zaznamenána také značná inhibice inkorporace $[U-^{14}C]$ -aminokyselinové směsi, a to u karcinomu MC29 výrazněji než u ATE. Inhibiční účinek MX na inkorporaci aminokyselin do nádorových buněk *in vitro* je znám (Safa et al., 1984).

Na rozdíl od mitoxantronu doxorubicin, přes svůj významný efekt na syntézu DNA a proliferaci, inhibuje proteosyntézu primárně poměrně slabě (Israel et al., 1987, Schäfer et al., 1988). Naše výsledky jednoznačně potvrzují, že v použitých systémech je MX mnohem efektivnějším inhibitorem proteosyntézy než DOX.

Pokus *in vivo* hodnotící vliv modelového cytostatika MX na nádor MC29 byl proveden pro potvrzení výsledků získaných u tohoto nového nádorového modelu *in vitro*. Výsledkem byl jednoznačný průkaz účinnosti MX u MC29 *in vivo*. Komparativní studie s ATE v této první fázi nebyla provedena, účinek MX na ATE *in vivo* však již potvrdilo více studií (Hubalek, 1991; Medina et al., 1991; Latha et al., 1996). Významný účinek na přežití i velikost nádoru byl prokázán i u solidního Ehrlichova karcinomu (Niang 2000; Niang et al. 2006).

Vliv MX na hmotnost nádoru (buněčné frakce nádorového ascitu), prokázaný v předkládané práci, ukazuje na cytotoxický účinek látky, což potvrzuje naše výsledky *in vitro*. Hmotnost buněčné frakce ascitického nádoru se snižuje se vzrůstající dávkou prakticky lineárně. Protože je však podání vyšších dávek spojeno se stoupajícím vlivem toxicity, je třeba při testování cytostatik na modelech *in vivo* do studie vždy zahrnout hodnocení přežití.

Použitý způsob hodnocení přežití, tedy času jako biologické odpovědi, umožňuje s neobyčejnou správností určit optimální dávku s relativně nejvýhodnějším poměrem příznivého protinádorového a nežádoucího toxického působení cytostatika. Výsledky této části disertační práce definují základní podmínky pro možné využití adenokarcinomu mléčné žlázy MC29 pro testování účinnosti cytostatik s předpokládaným mechanismem účinku podobným jako použitá modelová látka.

6.3 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. Zatímco 2-DG snižovala počáteční rychlost syntézy DNA a proteinů u ATE a MC29 a syntézy DNA u HL-60, 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 G₁ fázi a indukuje apoptózu u buněk HL-60, zatímco u L-rhamnosy tento efekt není patrný.

Jak zjistili Müller a kol. (1986) u buněk ATE, proteosyntéza je energeticky mimořádně náročný proces. U 2-DG, která snižuje intracelulární koncentraci ATP v nádorových buňkách (Karczmar et al. 1992, Kossowska et al. 2005), tedy byla očekávána výrazná inhibice proteosyntézy. Naše výsledky tento předpoklad potvrzují. Na rozdíl od 2-DG však L-rhamnosa v použitých koncentracích počáteční rychlost proteosyntézy prakticky neovlivňuje. Toto je možno chápat jako nepřímý důkaz, že L-rhamnosa do energetického metabolismu nezasahuje, přinejmenším ne obdobným způsobem jako 2-DG. Mechanismus slabého ovlivnění syntézy DNA u buněk ATE v přítomnosti L-rhamnosy není dosud jasný. Obecně nižší citlivost buněk HL-60 je možno vysvětlit nepřítomností p53 (Wolf et Rotter, 1985). Vliv zkoumaných deoxysacharidů na proteosyntézu v buňkách HL-60 nebyl zřetelný, pravděpodobně v důsledku poměrně vysokých koncentrací aminokyselin v médiu, potřebných pro kontinuální růst této linie, a nebyl tedy zatím ani předmětem podrobnějšího studia.

Pomocí flow-cytometrické analýzy obsahu DNA a detekce štěpení laminu B jsme prokázali, že 2-DG inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu u buněk lidské promyelocytární leukémie HL-60. 2-DG v koncentraci 5 mmol.l⁻¹ po 24 h inhibuje buněčnou proliferaci a indukuje změny v buněčném cyklu: Zvyšuje počet buněk v G₁ fázi a snižuje jejich počet v S a G₂/M fázi. Po 72 h od počátku expozice 2-DG se objevují buňky se subG₁-množstvím DNA, tedy buňky vstoupivší do apoptózy. Mnoho studií s buňkami bez p53, včetně linie HL-60, uvádí, že tyto buňky reagují na faktory poškozující DNA zastavením cyklu ve fázi G₂/M, po čemž následuje indukce apoptózy (Mareková et al., 2000; Theron et al., 2000; Bache et al., 2001; Szumiel et al., 2001; Schafer et al., 2002; Vávrová et al., 2003; Vávrová et al., 2004a, b). Toto jsme po

expozici 2-DG nepozorovali. Lze tedy vyvodit, že protinádorový účinek 2-DG není založen na přímém poškození DNA. 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 fakt, že při našem studiu vlivu 2-DG na syntézu NA a bílkovin nedocházelo, na rozdíl od MX a DOX, při zvyšování koncentrace látky ke zvyšování konstanty B ze vztahu /6/ (ukazující na degradaci sledovaných makromolekul, viz výše). V přítomnosti L-rhamnosy jsme u buněk HL-60 nezaznamenali ani inhibici proliferace, ani ovlivnění buněčného cyklu, ani indukci apoptózy.

Lze tedy konstatovat, že u L-rhamnosy v koncentracích do 20 (příp. 32) mmol.l^{-1} nebyl nalezen ani cytotoxický ani cytostatický účinek na použité nádorové modely *in vitro*. Dále je velmi pravděpodobné, že L-rhamnosa nezasahuje do energetického metabolismu jako 2-DG. Vzhledem k hypotetickým analogiím L-rhamnosy s L-fukosou (viz 2.3) by však bylo třeba prozkoumat případný potenciál L-rhamnosy na vhodných modelech *in vivo*, v kontextu nádorové choroby.

7. SOUHRN HLAVNÍCH VÝSLEDKŮ

V rámci předkládané práce jsme provedli důkladnou studii farmakokinetiky intravenózně podané L-rhamnosy. Poprvé ve světové literatuře jsme popsali biliární exkreci L-rhamnosy a melibiosy. Zjistili jsme, že tato je velmi nízká.

Zjistili jsme, že „*dual sugar*“ test s L-rhamnosou a melibiosou lze použít pro zjišťování integrity hepatobiliární bariéry. Z našich výsledků dále vyplývá, že testování permeability střevní sliznice by nemělo být ovlivněno přítomnou cholestázou.

Výsledky naší práce dále ukazují, že rychlé vyrovnání koncentrací mezi plazmou a žlučí u rhamnosy umožňuje její využití pro hodnocení biliární exkrece léků s ohledem na produkci žluči.

Provedli jsme studium protinádorového účinku L-rhamnosy na buňky myších adenokarcinomů mléčné žlázy ATE a MC29 a lidské leukémie HL-60. Ve srovnání s 2-deoxyglukosou nevykazovala L-rhamnosa ani významnou inhibici biosyntézy DNA a proteinů, ani vliv na proliferaci, buněčný cyklus či vstup do apoptózy.

Ověřili jsme vhodnost zvolené metody pro testování inhibice biosyntézy NA a proteinů v nádorových buňkách. Přispěli jsme k zavedení nového nádorového modelu, myšního adenokarcinomu mléčné žlázy MC29, na kterém jsme pro potvrzení výsledků *in vitro* provedli studii *in vivo* s mitoxantronem.

L-Rhamnosa se z hlediska lékařského výzkumu jeví jako velmi zajímavá látka. Naše poznatky o její biliární exkreci, příp. exkreci kombinace L-rhamnosy s melibiosou, mohou přispět k lepšímu poznání permeability bariér a usnadnit studium farmakokinetiky některých léků. Ačkoli nebyl protinádorový efekt L-rhamnosy prokázán *in vitro*, existuje, vzhledem k její podobnosti s L-fukosou, možnost jejího vlivu na fukosylaci u nádorových onemocnění *in vivo*. Metody a modely *in vitro* i *in vivo*, ověřené v této disertační práci, jsou předpokladem pro řešení této i mnoha dalších otázek.

8. POUŽITÁ LITERATURA

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.

Akman SA, Ross DD, Rosen H, Salinger C, Andrews PA, Chou FE, Bachur NR. Growth inhibition by thymidine of leukemic HL-60 and normal human myeloid progenitor cells. *Cancer Res* 1981;41:2141-6.

Alberts DS, Peng YM, Bowden GT, Dalton WS, Mackel C. Pharmacology of mitoxantrone: mode of action and pharmacokinetics. *Invest New Drugs* 1985;3:101-7.

Andreotti PE, Cree IA, Kurbacher CM, Hartmann DM, Linder D, Harel G, Gleiberman I, Caruso PA, Ricks SH, Untch M, et al. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:5276-82.

Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, A New Antitumor Antibiotic from *S. peuceetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 1969;11:1101-10.

Arita H, Ueda N, Matsushima Y. The reduction of chlorodeoxy sugars by tributyltin hydride. *Bull. Chem Soc Japan* 1972;45: 567-69.

Bache M, Pigorsch S, Dunst J, Wurl P, Meye A, Barte F, Schmidt H, Rath FW, Taubert H. Loss of G2/M arrest correlates with radiosensitization in two human sarcoma cell lines with mutant p53. *Int J Cancer* 2001;96:110-117.

Bar-Peled M, Lewinsohn E, Fluhr R, Gressel J. UDP-rhamnose-flavanone-7-O-glucoside-2"-O-rhamnosyltransferase - purification and characterization of an enzyme catalyzing the production of bitter compounds in citrus. *J Biol Chem* 1991;266: 20953-9

Batra VK, Morrison JA, Woodward DL, Siverd NS, Yacobi A. Pharmacokinetics of mitoxantrone in man and laboratory animals. *Drug Metab Rev* 1986;17:311-29

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

Bekesi JG, Winzler RJ. The metabolism of plasma glycoproteins. Studies on the incorporation of L-fucose-1-14C into tissue and serum in the normal rat. *J Biol Chem* 1967;242:3873-9.

Bergmann M, Schott H, Lechinsky W. Über die ungesättigten Reduktionsprodukte der Zuckerketten und ihre Umwandlungen. III: Über 2-Deoxyglucose(Glucose-desose). *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 1922;55;158-72.

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

Bomhard E, Mohr U. Spontaneous tumors in NMRI mice from carcinogenicity studies. *Exp Pathol* 1989;36:129-45

Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Rapid chemosensitivity assay with human normal and tumor cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990;26:1030-4.

Breitman TR, Collins SJ, Keene BR. Replacement of serum by insulin and transferrin supports growth and differentiation of the human promyelocytic cell line, HL-60. *Exp Cell Res* 1980;126:494-8

Brolin SE, Borglund E, Agren A. Photokinetic microassay of adenylate kinase using the firefly luciferase reaction. *J Biochem Biophys Methods* 1979;1:163-9.

Budavari S (ed.) et al. The Merck index. Twelfth edition. Merck & CO., Inc. Whitehouse Station, NJ, USA. 1996.

Byers SA, Schafer B, Sappal DS, Brown J, Price DH. The antiproliferative agent MLN944 preferentially inhibits transcription. *Mol Cancer Ther* 2005;4:1260-7.

Calvete JA, Newell DR, Wright AF, Rose MS. In Vitro and in Vivo Antitumor Activity of ZENECA ZD0490, a Recombinant Ricin A-Chain Immunotoxin for the Treatment of Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1994;54: 4684-90.

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

Castiglione S, Paggi MG, Delpino A, Zeuli M, Floridi A. Inhibition of protein synthesis in neoplastic cells by rhein. *Biochem Pharmacol* 1990;40:967-73.

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

Chan JY, Nwokoro NA, Schachter H. L-Fucose metabolism in mammals. The conversion of L-fucose to two moles of L-lactate, of L-galactose to L-lactate and glycerate, and of D-arabinose to L-lactate and glycollate. *J Biol Chem* 1979;254:7060-8.

Chegini N, Safa AR. Influence of mitoxantrone on nucleolar function in MDA-MB-231 human breast tumor cell line. *Cancer Letters* 1987; 37: 327-36.

Chen KX, Gresh N, Pullman B. A theoretical investigation on the sequence selective binding of mitoxantrone to double-stranded tetranucleotides. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 3799-812.

Clark EP. Preparation of rhamnose. *J Biol. Chem* 1919;38:255-6.

Clarke F, Solkot R, Corley RC. Metabolism of certain rare sugars. *J Biol Chem* 1939;131:135-8.

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

Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 1991;3:207-12.

Cree IA, Pazzagli M, Mini E, Mazzei T, Hunter EM, Sutherland LA, Pinzani P, Gerli A, Andreotti PE. Methotrexate chemosensitivity by ATP luminescence in human leukemia cell lines and in breast cancer primary cultures: comparison of the TCA-100 assay with a clonogenic assay. *Anticancer Drugs* 1995;6:398-404.

- Cuatrecasas P, Segal S. Mammalian galactose dehydrogenase. II. Properties, substrate specificity, and developmental changes. *J Biol Chem* 1966;241:5910-8.
- 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.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992;13:795-808.
- Dunigan DD, Waters SB, Owen TC. Aqueous soluble tetrazolium/formazan MTS as an indicator of NADH- and NADPH-dependent dehydrogenase activity. *Biotechniques* 1995;19:640-9.
- Durr FE, Wallace RE. Comparison of the antitumor activity of mitoxantrone, a novel aminoantraquinone, with standard anticancer agents. Proceedings of the 11th ICC and the 19th ICAAC. *Am Soc Microbiology* 1980;1595-6.
- Eagle H, Barban S, Levy M, Schulze HO. The utilization of carbohydrates by human cell cultures. *J Biol Chem* 1958;233:551-8.
- 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
- Ehrlich P, Apolant H. Beobachtungen über maligne Mäusetumoren. *Berl Klin Wschr* 1905; 42:871-4.
- Ehlich P. Experimentelle Carcinomstudien an Mäusen. *Arb Inst Exp Ther Frakfurt* 1906;1:78-80.
- Eldrige SR, Butterworth BE, Goldsworthy TL. Proliferating cell nuclear antigen: a marker for hepatocellular proliferation in rodents *Environ Health Perspect* 1993;101(Suppl 5):211-218.
- Ellem KA, Fabrizio AM, Jackson L. The dependence of DNA and RNA synthesis on protein synthesis in asparaginase-treated lymphoma cells. *Cancer Res* 1970;30:515-27.
- Fare G, Sammons DC, Seabourne FA, Woodhouse DL. Lethal action of sugars on ascites tumor cells in vitro. *Nature* 1967;213:308-9.
- Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep* 1966;50:219-44.
- FSANZ (Food Standards Australia New Zealand). D-Tagatose. A human health risk assessment. Technical Report Series No. 29. 2005; s. 25.
- Fornari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK, Gewirtz DA. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol* 1994;45:649-56.
- Foye WO, Vajragupta O, Sengupta SK. DNA-binding specificity and RNA polymerase inhibitory activity of bis(aminoalkyl)anthraquinones and bis(methylthio)vinylquinolinium iodides. *J Pharm Sci* 1982;71:253-7.
- Fujimoto S, Ogawa M. Antitumor activity of mitoxantrone against murine experimental tumors: comparative analysis against various antitumor antibiotics. *Cancer Chemother Pharmacol* 1982;8:157-62.

- Fulda S, Los M, Friesen C, Debatin KM. Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system. *Int J Cancer* 1998;76:105-14.
- Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1979;54:713-33.
- Gardner I, Bowern NA, Blanden RV. Cell-mediated cytotoxicity against ectromelia virus-infected target cells. I. Specificity and kinetics. *Eur J Immunol* 1974;4:63-7.
- Geier A, Wagner M, Dietrich CG, Trauner M. Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:283-308.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.
- Ghibellini G, Vasist LS, Hill TE, Heizer WD, Kowalsky RJ, Brouwer KL. Determination of the biliary excretion of piperacillin in humans using a novel method 3. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2006;62:304-8.
- Ghione M., Fetzer J., Maier H. (Ed.): *Ergebnisse der Adriamycin-Therapie. Adriamycin-Symposium, Frankfurt/Main 1974.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1975.
- Giraud MF, Naismith JH. The rhamnose pathway. *Curr Opin Struct Biol* 2000;10:687-96.
- Glavas-Obrovac L, Karner I, Zinic B, Pavelic K. Antineoplastic activity of novel N-1-sulfonypyrimidine derivatives. *Anticancer Res.* 2001;21:1979-86
- Goldin A, Venditti JM. Progress report on the screening program at the Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute. *Cancer Treat Rev* 1980;7:167-76.
- Goormaghtigh E, Chatelain P, Caspers J, et al: Evidence of a specific complex between adriamycin derivatives and negatively charged phospholipids. *Biochem Biophys Acta* 1980;597:1-9.
- Gorodisskaja GJ, Nejman MB, Rybakova SI, Šnol RB. Doklady AN SSSR 89, 1949. s. 833. In: Nejman MB, Gal D. *Primenenije radioaktivnyh izotopov v chimičeskoj kinetike.* Moskva, Nauka 1970.
- Gosalves M, Blanco M, Hunter J, Miko M, Chance B. Effects of anticancer agents on the respiration of isolated mitochondria and tumor cells. *Europ J Cancer* 1974;10:564-574.
- Greenwell A, Foley JF, Maronpot RR. An enhancement method for immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen in archival rodent tissues. *Cancer Lett* 1991;59:251-6
- Guyot C, Combe C, Desmouliere A. The common bile duct ligation in rat: A relevant in vivo model to study the role of mechanical stress on cell and matrix behaviour. *Histochem Cell Biol* 2006;126: 517-23.
- 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.

- Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*. 1977;197:461-3.
- Haruko U, Haruko O. Glycobiology of the plant glycoprotein epitope: structure, immunogenicity and allergenicity of plant glycotopes. *Trends Glycosci Glycotech* 1999;11: 413–28
- Hill BT. Use of continuous human tumor cell lines to evaluate drugs by clonogenic assays. In: Dendy PP and Hill BT (eds.). *Human Tumor Drug Sensitivity Testing in vitro*, 4:164-165, 1983.
- Hladík P. Využití laserové intersticiální hypertermie k léčbě maligních onemocnění. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové 2000.
- Hubalek. F. Detection of single-strand breaks in DNA induced by mitoxantrone in experimental tumors after in vivo treatment. *Neoplasma* 1991;38:101-8.
- Huang P, Sandoval A, Van Den Neste E, Keating MJ, Plunkett W. Inhibition of RNA transcription: a biochemical mechanism of action against chronic lymphocytic leukemia cells by fludarabine. *Leukemia*. 2000;14:1405-13
- Hudson CS, Yanovsky E. Indirect measurements of the rotatory powers of some alpha and beta forms of the sugars by means of solubility experiments. *J Am Chem Soc* 1917; 39:1013-38.
- ILAR, Institute of Laboratory Animal Resources. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.
- 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.
- Israel M, Idriss JM, Koseki Y, Khetarpal VK. Comparative effects of adriamycin and DNA-non-binding analogues on DNA, RNA, and protein synthesis in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1987;20:277-84.
- Jacobs RF, Maples HD, Aranda JV, Espinoza GM, Knirsch C, Chandra R, Fisher JM, Kearns GL. Pharmacokinetics of intravenously administered azithromycin in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:34–9.
- Jaenke RS: An anthracycline antibiotic induced cardiomyopathy in rabbits. *Lab Invest* 1974; 30:292-304.
- Jelínek V. Substance with antineoplastic action. 13. 6(4-Carboxybutyl) thiopurine metabolite; some pharmacological properties of 6-(2-carboxyacetyl) thiopurine. *Neoplasma* 1965,12: 469–71.
- Johansson S, Goldenberg DM, Griffiths GL, Wahren B, Hinkula J. Elimination of HIV-1 infection by treatment with a doxorubicin-conjugated anti-envelope antibody. *AIDS* 2006;20:1911-5.
- Johnson RK, Zee-Cheng RK, Lee WW, Acton EM, Henry DW, Cheng CC. Experimental antitumor activity of aminoanthraquinones. *Cancer Treat Rep* 1979;63:425-39.
- Kalaitzakis E, Johansson JE, Bjarnason I, Bjornsson E. Intestinal permeability in cirrhotic patients with and without ascites. *Scand. J. Gastroenterol* 2006;41:326–30.

Kaminskas E. Serum-mediated stimulation of protein synthesis in Ehrlich ascites tumor cells. *J Biol Chem* 1972;247:5470-6.

Kaplan O, Navon G, Lyon RC, Faustino PJ, Straka EJ, Cohen JS. Effects of 2-deoxyglucose on drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells: toxicity and magnetic resonance spectroscopy studies of metabolism. *Cancer Res* 1990;50:544-51.

Kapuscinski J, Darzynkiewicz Z, Traganos F, Melamed MR. Interactions of a new antitumor agent, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]amino]-9,10-anthracenedione, with nucleic acids. *Biochem Pharmacol* 1981;30:231-40.

Kapuscinski J, Darzynkiewicz Z. Interactions of antitumor agents Ametrantrone and Mitoxantrone (Novatrone) with double-stranded DNA. *Biochem Pharmacol* 1985;34:4203-13.

Karczmar GS, Arbeit JM, Toy BJ, Speder A, Weiner MW. Selective depletion of tumor ATP by 2-deoxyglucose and insulin, detected by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res* 1992; 52:71-6

Katouzian F, Sblattero D, Not T, Tommasini A, Giusto E, Meiacco 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

Kim YJ, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J* 1997;14:569-76.

Klein G. Use of the Ehrlich ascites tumor of mice for quantitative studies of the growth and biochemistry of neoplastic cells. *Cancer* 1950;4:1052-57.

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

Knorre DG. *Biochimija* 24, 1959. p. 545. In: Nejman MB, Gal D. *Primenenije radioaktivnykh izotopov v chimičeskoj kinetike*. Moskva, Nauka 1970.

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.

Kocourek J, Leblová S, Šípal Z. *Biochemické praktikum*, Praha, SPN 1967 (2. vydání, 309 s.) s. 263.

Kossowska B, Ferens-Sieczkowska M, Gancarz R, Passowicz-Muszyńska E, Jankowska R. Fucosylation of serum glycoproteins in lung cancer patients. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:361-9

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.

Kuhn R, Löw I. Zur Konstitution der Leptine. *Chemische Berichte* 1961;94:1088-95.

Latha MS, Latha PG, Subramoniam A, Jayakrishnan A. Anti-tumor effect of mitoxantrone-loaded bovine casein microspheres on Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents* 1996;3: 75-79

- Ledoux S, Yang R, Friedlander G, Laouari D. Glucose depletion enhances P-glycoprotein expression in hepatoma cells: role of endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res* 2003;63:7284-90
- Li N, Ma Y, Yang C, Guo L, Yang X. Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *Biophys Chem* 2005;116:199-205.
- Lin SY, Liu JD, Chang HC, Yeh SD, Lin CH, Lee WS. Magnolol suppresses proliferation of cultured human colon and liver cancer cells by inhibiting DNA synthesis and activating apoptosis. *J Cell Biochem* 2001;84: 532-44 .
- Littlefield JW, Gould EA. The toxic effect of 5-bromodeoxyuridine on cultured epithelial cells. *J Biol Chem* 1960;235:1129-33
- Liv LF, Liv CC, & Alberts BM: Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. *Cell* 1980; 19:697-707.
- Löhrke H, Hesse B, Goertler K. Spontaneous tumors and lifespan of female NMRI mice of the outbred stock Sut: NMRT during a lifetime study. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984;108:192-6.
- Loewenthal H, Jahn G. Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mäuse-Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen. *Ztschr F Krebsforsch* 1932;37:439-47
- Lotz, A. Sweetener with an improved saccharose-like taste; process for preparing it; uses thereof. European Patent EP0681789, 1995.
- Lown JW, Haustock CC, Bradley RD, Scraba DG. Interactions of the antitumor agents mitoxantrone and bisantrene with deoxyribonucleic acids studied by electron microscopy. *Mol Pharmacol* 1984;25:178-84.
- Maher J, Krishan A, Lampidis T. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-d-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2004;53:116-22
- 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.
- Martin A, Butters TD, Fleet GWJ. A highly cytotoxic L-rhamnose analogue of the antitumour agent spicamycin. *Chem Commun* 1998;19:2119-20
- Matsuba Y, Edatsugi H, Mita I, Matsunaga A, Nakanishi O. A novel synthetic DNA minor groove binder, MS-247: antitumor activity and cytotoxic mechanism. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46:1-9.

Mattern J: Cell Suspension Cultures. In: „Human Tumours in Short Term Culture“ (red. Dendy PP), London, New York, San Francisco, Academic Press 1976(a); s. 29.

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.

Medina MA, Luque P, Núñez De Castro I. Mitoxantrone toxicity on Ehrlich ascites tumour cells: inhibition of the transplasma membrane redox activity. *Cell Biochem Funct* 1991;9:95-8.

Mělka M, Krepelka J, Miko M, Pokorná S, Kejhová I, Reichlová R, Beitová M, Grimová J, Kargerová A, Sedivá J. Substances with antineoplastic activity. XCVI. Some pharmacological properties and therapeutic synergism of 6-purinyln-(2-chloroethyl)thiocarbamate with cytosine arabinoside. *Neoplasma* 1989;36:419-25

Mělka M. Průběh inkorporace směsi L-[U-¹⁴C]-aminokyselin in vitro v závislosti na koncentraci buněk Ehrlichova ascitického karcinomu: rigorózní práce. Přírodovědecká fakulta University Karlovy v Praze. Praha 1980. 67 l.

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

Metz J, Aoki A, Merlo M, Forssmann WG. Morphological alterations and functional changes of interhepatocellular junctions induced by bile duct ligation. *Cell Tissue Res* 1977;182:299-310.

Meyer A, Franz J. Chemosensitivity determination using phosphatidylserine. United States Patent 6949350, 2005

Miko M, Drobnica L. Metabolic activity of the Ehrlich ascites cells in synthetic media and the significance of ascites serum addition. *Neoplasma* 1972;19:163-73

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.

Miko, M, Křepelka, J, Mělka, M. In vitro cytotoxicity and mode of action of benzo(c)fluorene derivatives, *Biológia* 1989;44, 253-66.

Mixich J, Rapp KM, Vogel M. Process for producing rhamnose from rhamnolipids. WIPO Patent WO/1992/005182, 1992.

Moley KH, Mueckler MM. Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis* 2000;5:99-105.

Monneret C, Choay P. A convenient synthesis of 2-deoxy-D-arabino-hexose and its methyl and benzyl glucosides. *Carbohydr Res* 1981;96:299-305.

Monte MJ, Villanueva GR, Macias RI et al. Effect of maternal obstructive cholestasis during pregnancy on the biliary transport of horseradish peroxidase in the rat offspring. *Clin Sci (Lond.)* 2003;105:347-53.

Mons S, Fleet GWJ, An approach to the generation of simple analogues of the antitumour agent spicamycin. *Org Biomol Chem* 2003;1:3685-91

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.

- Mujoomdar M, Bennett A, Hoskin D, Blay J. Adenosine stimulation of proliferation of breast carcinoma cell lines: evaluation of the [³H]thymidine assay system and modulatory effects of the cellular microenvironment in vitro. *J Cell Physiol* 2004;201:429-38.
- Mullen JL, Rosato FE, Allen TR, Miller EE, Roseman J, Rosato EF. Continuous intravenous fucose therapy in rat mammary cancer II. *J Surg Oncol* 1973; 5:6-9.
- Müller M, Siems W, Buttgereit F, Dumdey R, Rapoport SM. Quantification of ATP-producing and consuming processes of Ehrlich ascites tumour cells. *Eur J Biochem* 1986;161:701-5.
- Nejman MB, Gal D. *Primenenije radioaktivnyh izotopov v chimičeskoj kinetike: Kinetičeskij izotopnyj metod.* Moskva, Nauka 1970 (238 s.).
- Niang, M. Biochemical aspets of possible therapeutic synergism of mitoxantrone with some L-carnitine derivatives, deoxysaccharides and trypsin: Thesis on The Charles University in Prague, Faculty of Medicine Hradec Králové, 2000. 101 l.
- 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 tumour in mice. *Pharmacol Res* 2006;54:447-51.
- Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol* 2001;3:67-70.
- Olson HM, Young DM, Prieur DL, et al: Electrolyte and morphologic alterations of myocardium in adriamycin treated rabbits. *Am J Pathol* 1974; 77:439-454.
- 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.
- Pellerin P, Vidal S, Williams P, Brillouet JM. Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydr Res* 1995;277:135–43
- Peters KB, Wang H, Brown JM, Iliakis G. Inhibition of DNA replication by tirapazamine. *Cancer Res* 2001;61:5425-31
- Piccart-Gebhart MJ. Anthracyclines and the tailoring of treatment for early breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354:2177-9.
- Pigram WJ, Fuller W, Hamilton LD. Stereochemistry of Intercalation: Interaction of Daunomycin with DNA. *Nat New Biol* 1972;235:17-9.
- Prusoff WH. A review of some aspects of 5-iododeoxyuridine and azauridine. *Cancer Res* 1963;23:1246-59.
- Rahner C, Stieger B, Landmann L. Structure-function correlation of tight junctional impairment after intrahepatic and extrahepatic cholestasis in rat liver. *Gastroenterology* 1996; 110: 1564–78.
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 2001;57: 929–67
- Rode HJ, Eisel D, Frost I (edd.). Roche Applied Science, Apoptosis, Cell Death and Cell proliferation, 3rd edition 2004/2005.

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.

Řezáčová M: Regulace buněčného cyklu a indukce apoptózy u nádorových buněk: habilitační práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, 2004. 59 l., 90 l. příl.

Safa AR, Chegini N, Tseng MT. Influence of mitoxantrone on nucleic acid synthesis on the T-47D breast tumor cell line. *J Cell Biochem* 1983; 22:111 – 120.

Safa AR, Tseng MT. Inhibition of protein synthesis and cell proliferation in cultured human breast cancer cells treated with mitoxantrone. *Cancer Letters* 1984;24:317-26.

Sakamoto I, Yamasaki K, Tanaka O. Application of ¹³C NMR-spectroscopy to chemistry of natural glycosides—rebaudioside-C, a new sweet diterpene glycoside of *Stevia rebaudiana*, *Chem Pharm Bull* 1977;25:844-6.

Salton MR. Studies of the bacterial cell wall. VII. Monosaccharide constituents of the walls of gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1960;45:364-71.

Sauna ZE, Smith MM, Müller M, Kerr KM, Ambudkar SV. The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein. *J Bioenerg Biomembr* 2001;33:481-91

Schaefer A, Boldt J, Westendorf J, Steinheider G, Marquardt H. Inhibition of amino acid uptake and incorporation into proteins in Friend erythroleukemia cells by the anthracycline antitumor antibiotic aclacinomycin A. *Biochem Pharmacol* 1988;7:1377-82

Schäfer, J., Bachtler, J., Engling, A., Little, J. B., Weber, K. J., Wenz, F.: Suppression of apoptosis and clonogenic survival in irradiated human lymphoblasts with different TP53 status. *Radiat Res* 2002;158: 699-706.

Schell FC, Yap HY, Blumenschein G, Valdivieso M, Bodey G. Potential cardiotoxicity with mitoxantrone. *Cancer Treat Rep* 1982;66:1641-3.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth an drug sensitivity in culture using human and other tumor cell Lines. *Cancer Res* 1988;48:4827-33.

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

Seltzer MH, Roseman JM, Wolfe DE, Tsou KC, Miller EE, Rosato FE. The effects of L-fucose on rat mammary tumor growth. *Growth* 1969;33:353-59.

- Sen S, D'Incalci M: Apoptosis: Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy. FEBS Lett 1992;307:122-7.
- Serva Elektrophoresis GmbH, firemní zdroje 2006
- Shinozaki Y, Tobita T, Mizutani M, Matsuzaki T. Isolation and identification of two new diterpene glycosides from *Nicotiana tabacum*. Biosci Biotechnol Biochem 1996;60:903-5
- Shull KH, Miller ON. Formation in vivo of glycogen by certain intermediates of the lactate-propanediol pathway. J Biol Chem 1960;235:551-3.
- Smith IE. Mitoxantrone (novantrone): A review of experimental and early clinical studies. Cancer Treat Rev 1983;10:103-115
- Sols A, Crane RK. Substrate specificity of brain hexokinase. J Biol Chem 1954;210:581-595.
- Sondak VK, Korn EL, Kern DH. In vitro testing of chemotherapeutic combinations in a rapid thymidine incorporation assay. Int J Cell Cloning 1988;6:378-91.
- Squirrell DJ, Murphy MJ, Price RL. Cell assay, method and reagents. United States Patent 6949351, 2005.
- Staňková J. Fucose-activated killer cells. I. Enhanced TNF- α mRNA accumulation and protein production. J Leukoc Biol 1992;52:188-196.
- Stuart-Harris R, Pearson M, Smith IE, Olsen EG. Cardiotoxicity associated with mitoxantrone. Lancet 1984;2:219-20.
- SVOD. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. <<http://www.svod.cz>>; 20. 6. 2008.
- Szumiel I, Kapiszewska M, John A, Gradska I, Kowalczyk D, Janik P. Caffeine-inhibitable control of the radiation-induced G2 arrest in L5178Y-S cells deficient in non-homologous end-joining: Radiat. Environ. Biophys 2001;40:137-43.
- 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.
- Takamatsu N. The new colorimetric assay (WST-1) for cellular growth with normal aging and Alzheimer's disease. Nippon Ronen Igakkai Zasshi 1998;35:535-42
- Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. Brain Res Rev 2007;53:198-214.
- 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.
- Tewey KM, Chen GL, Nelson EM, et al: Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage - reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. J Biol Chem 1984; 14:9182-9187

Theron T, Binder A, Verheye-Dua F, Bohm L. The role of G2-block abrogation, DNA double-strand break repair and apoptosis in the radiosensitization of melanoma and squamous cell carcinoma cell lines by pentoxifylline. *Int J Radiat Biol* 2000;76:1197-1208.

Tower DB. The effects of 2-deoxy-D-glucose on metabolism of slices of cerebral cortex incubated in vitro. *J Neurochem* 1958;3:185-205.

Tritton TR, Murphree SA, & Sartorelli AC: Adriamycin: a proposal on the specificity of drug action. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;84:802-8.

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.

Tzatsos A, Tsihlis PN. Energy Depletion Inhibits Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling and Induces Apoptosis via AMP-activated Protein Kinase-dependent Phosphorylation of IRS-1 at Ser-794. *J Biol Chem* 2007; 282:18069-82.

Unverferth DV. Evaluation of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cancer Treatment Symposia* 1984;3: 67-70

Van Der Horst M, Winther, JF, Olsen, JH. Cancer incidence in the age range 0-34 years: Historical and actual status in Denmark. *Int J Canc* 2006;118: 2816-2826

Vávrová J, Mareková M, Vokurková D, Psutka J. Cell cycle alteration and response to low-dose-rate gamma radiation in leukemic cell lines. *Physiol Res* 2004;53:335-42 (a)

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 odpovědi na poškození buněk HL-60 ionizujícím zářením. *Radiační Onkologie* 2004, 86-9 (b)

Vindelov LL. Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1977;24:227-42.

Volm M, Kaufmann M, Mattern J, Wayss K. Möglichkeiten und Grenzen der prätherapeutischen Sensibilitätsstestung von Tumoren gegen Zytostatika im Kurzzeittest. *Schweiz Med Wochenschr.* 1975;105:74-82 (a)

Volm M, Kaufmann M, Mattern J, Wayss K. Sensitivity tests of tumors to cytostatic agents. I. Comparative investigations on transplanted tumors in vivo and in vitro. *Z-Krebsforsch-Klin-Onkol-Cancer-Res-Clin-Oncol* 1975;83:85-96(b)

Volm M, Wayss K, Kaufmann M, Mattern J. Pretherapeutic detection of tumour resistance and the results of tumour chemotherapy. *Eur J Cancer* 1979;15:983-93

Volm M. Use of tritiated nucleotide incorporation for prediction of sensitivity of tumors to cytostatic agents. *Behring Inst Mitt.* 1984;74:273-84.

- Von Hoff DD, Forseth B, Warfel LE. Use of a radiometric system to screen for antineoplastic agents: correlation with a human tumor cloning system. *Cancer-Res* 1985;45:4032-8
- Von Hoff DD, Forseth BJ, Turner JN, Clark GM, Warfel LE. Selection of chemotherapy for patient treatment utilizing a radiometric versus a cloning system. *Int J Cell Cloning* 1986;4:16-26
- Wayss K, Mattern J, Volm M. Korrelation von In-vitro-Testung und Therapieergebnis bei tierischen Transplantationstumoren nach Behandlung mit Zytostatika. *Arzneimittelforschung*. 1975;25:77-81
- Webb NA, Mulichak AM, Lam JS, Rocchetta HL, Garavito RM. Crystal structure of a tetrameric GDP-D-mannose 4,6-dehydratase from a bacterial GDP-D-rhamnose biosynthetic pathway. *Protein Sci* 2004;13:529-39
- Weisenthal LM, Dill PL, Kurnick NB, Lippman ME. Comparison of dye exclusion assays with a clonogenic assay in the determination of drug-induced cytotoxicity. *Cancer Res* 1983;43:258-64.
- Wiener SM, Hoyt RF, Jr., Deleonardis JR, Clevenger RR, Jeffries KR, Nagashima K, Mandel M, Owens J, Eckhaus M, Lutz RJ, Safer B. Manometric changes during retrograde biliary infusion in mice. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 2000;279:G49-G66.
- World Health Organization. The WHO report on the global tobacco epidemic 2008 (MPower).
- Wolf D, Rotter V. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:790-4.
- Wolfe D, Roseman JM, Miller E, Seltzer MH, Rosato FE. The effect of L-fucose on rat mammary tumor growth I. In vivo Studies. *J Surg Oncol* 1971;3:73-77.
- Wolfe DE, Roseman JM, Seltzer MH, Miller FE, Rosato FE. Further observations of L-fucose as a specific inhibitor of rat mammary carcinoma in tissue culture. *Growth* 1970;34:379-384.
- Yamada M, Tomida A, Yun J, Cai B, Yoshikawa H, Taketani Y, Tsuruo T. Cellular sensitization to cisplatin and carboplatin with decreased removal of platinum-DNA adduct by glucose-regulated stress. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1999;44:59-64
- Yeung GFC, Setiadi DH, Chass GA, Csizmadia IG. An exploratory conformational analysis of D and L β -6-deoxyglucose. An ab initio and DFT approach. *J Mol Struct Theochem* 2003: 666-667: 393-6
- Young RC, Ozols RF, Myers CE. The anthracycline antineoplastic drugs. *N Engl J Med* 1981;305:139-53.
- Yuan JH, Zhang RP, Zhang RG, Guo LX, Wang XW, Luo D, Xie Y, Xie H. Growth-inhibiting effects of taxol on human liver cancer in vitro and in nude mice. *World J Gastroenterol*. 2000;6:210-15.
- Zeeb H, Blettner M. Steigende Inzidenz und Mortalität der Non-Hodgkin-Lymphome. *Medizinische Klinik* 2004;96:87-100.

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. PŘÍLOHY

9.1. Ovlivnění syntézy NA a bílkovin v nádorových buňkách ascitické formy nádorů MC29 a ATE v přítomnosti MX a DOX *in vitro*

c_{MX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	čas						I_{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	602	28145	43708	49027	50635	53746	52191
0	684	28709	39469	46254	44499	45118	44808
0	562	24846	37609	38678	42069	41878	41973
4,531	601	20905	30134	34833	40375	38830	41263
4,531	742	24579	33322	36661	39074	37886	43063
18,12	719	13555	15256	16530	17147	16175	41837
18,12	703	15849	20071	20144	21520	21764	44142
72,49	526	2683	2819	3202	3066	3220	39077
72,49	529	2366	2537	2628	2847	2858	37818
290,0	459	1398	1359,6	1308	1312	1241	37782
290,0	438	1334	1362,19	1258	1316	1332	37057

Tab. P1 Účinek MX na syntézu DNA v MC29. Průběh inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu MC29, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti MX. Koncentrace buněk: $1,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$. Aktivita ³H: $67,5 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$. Vzorky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

c_{MX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,02215	0,0082	2,7	19,3	10,0
0	0,02668	0,0096	2,78	19,9	
0	0,02480	0,0091	2,72	17,3	
4,531	0,01979	0,0078	2,54	13,6	6,85
4,531	0,02321	0,0095	2,33	16,7	
18,12	0,01276	0,0114	1,12	8,90	13,7
18,12	0,01433	0,0106	1,35	10,5	
72,49	0,00221	0,0112	0,198	1,44	7,39
72,49	0,00192	0,011	0,174	1,21	
290,0	0,001070	0,0144	0,0696	0,675	2,49
290,0	0,001001	0,0132	0,0813	0,618	

Tab. P2 Účinek MX na syntézu DNA v MC29. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s^{-1}] inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu MC29, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti MX. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

c_{MX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	čas						I_{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	472	961	1051	1024	1162	1058	13376
0	465	1021	1030	999	948	853	13101
0	428	1054	1139	1028	1177	1147	13079
4,531	468	895	925	869	847	820	13530
4,531	506	951	967	936	977	959	13696
18,12	473	894	915	909	924	922	13549
18,12	524	1021	1060	1061	1087	1072	13967
72,49	461	606	624	673	641	619	13729
72,49	421	557	607	581	642	637	13269
290,0	422	556	570	565	616	611	12987
290,0	405	545	566	553	608	598	12669

Tab. P3 Účinek MX na proteosyntézu v MC29. Průběh inkorporace [$U\text{-}^{14}\text{C}$]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu MC29 7. den po inokulaci myším NMRI v přítomnosti MX. Koncentrace buněk: $1,5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Aktivita ^{14}C : $5,4 \text{ kBq. ml}^{-1}$. Vzorky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

c_{MX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,001516	0,0112	0,135	0,337	7,20
0	0,002055	0,016	0,128	0,449	
0	0,001944	0,0119	0,163	0,424	
4,531	0,001458	0,015	0,097	0,329	6,54
4,531	0,00134	0,0128	0,105	0,306	
18,12	0,001287	0,0126	0,102	0,291	10,0
18,12	0,001475	0,0122	0,121	0,343	
72,49	0,000473	0,0121	0,039	0,108	4,45
72,49	0,000404	0,0094	0,043	0,0894	
290,0	0,000381	0,0098	0,0387	0,0824	1,51
290,0	0,000421	0,0101	0,0416	0,0888	

Tab. P4 Účinek MX na proteosyntézu v MC29. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s^{-1}] inkorporace [$U\text{-}^{14}\text{C}$]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu MC29, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti MX. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

c_{MX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	čas						I_{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	730	25390	51759	64009	70770	74349	50834
0	595	28590	47524	58578	60070	73327	49816
0	547	29166	45590	56778	68727	70663	47320
4,531	616	24802	43923	51425	54534	61181	49526
4,531	465	26197	43331	47617	53190	51343	48584
18,12	494	19197	31066	36212	43152	37788	49833
18,12	459	22467	33806	40151	46254	44908	48539
72,49	525	6575	11170	14258	13768	14860	46873
72,49	493	5995	9325	12999	12497	13606	47653
290,0	393	1168	1217	1295	1237	1336	43899
290,0	417	986	1069	1092	1089	1059	47369

Tab. P5 Účinek MX na syntézu DNA v ATE. Průběh inkorporace $[6-^3\text{H}]$ -thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu ATE, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti MX. Koncentrace buněk: $1,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$. Aktivita ^3H : $71,3 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$. Vzorčky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

c_{MX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,020278	0,0047	4,31	17,2	7,75
0	0,02204	0,0059	3,74	18,3	
0	0,02302	0,0057	4,04	18,2	
4,531	0,02005	0,0062	3,23	16,6	7,36
4,531	0,02262	0,0078	2,90	18,3	
18,12	0,01517	0,0069	2,199	12,6	7,77
18,12	0,01823	0,0073	2,499	14,7	
72,49	0,00547	0,0066	0,828	4,27	7,22
72,49	0,00453	0,0057	0,795	3,60	
290,0	0,000711	0,0117	0,0609	0,521	10,44
290,0	0,000516	0,0121	0,0426	0,407	

Tab. P6 Účinek MX na syntézu DNA v ATE. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s^{-1}] inkorporace $[6-^3\text{H}]$ -thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu ATE, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti MX. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

c_{MX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	čas						I_{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	585	1239	1729	1836	2969	2061	26804
0	674	1312	1740	2155	2204	2295	27357
0	602	1261	1748	2016	2160	2325	29543
4,531	574	1284	1498	1965	2090	1983	29376
4,531	780	1270	1692	2461	2007	-	28411
18,12	662	1216	1539	2248	1981	2283	30225
18,12	583	1003	1660	2011	1909	2032	29024
72,49	589	990	1721	1888	1788	2108	29072
290,0	703	849	895	910	794	1033	27200
290,0	599	745	841	819	829	852	26908

Tab. P7 Účinek MX na proteosyntézu v ATE. Průběh inkorporace [$U-^{14}C$]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu ATE 7. den po inokulaci myším NMRI v přítomnosti MX. Koncentrace buněk: $1,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$. Aktivita ^{14}C : $10 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$. Vzorky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi, hodnoty I_{max} odpovídají $3 \times 0,025 \text{ ml}$. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

c_{MX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,000965	0,0052	0,185	0,430	4,80
0	0,000931	0,0056	0,166	0,425	
0	0,000886	0,0056	0,158	0,436	
4,531	0,00092	0,0068	0,135	0,450	8,36
4,531	0,000856	0,004	0,214	0,405	
18,12	0,000703	0,0045	0,156	0,354	7,77
18,12	0,000665	0,0041	0,162	0,322	
72,49	0,000638	0,004	0,1595	0,309	-
290,0	0,000207	0,0101	0,0205	0,0936	8,17
290,0	0,000241	0,0095	0,0253	0,107	

Tab. P8 Účinek MX na proteosyntézu v ATE Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s^{-1}] inkorporace [$U-^{14}C$]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu ATE, získaného z ascitu myší NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti MX. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

c_{DOX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0'	30'	60'	90'	120'	150'	I_{max}
0	391	19171	35295	43593	44711	44479	45597
0	323	18878	36976	41181	44738	46364	50053
0	300	17177	31713	41881	48978	47876	43807
4,041	311	14845	25925	30125	33364	31896	47047
4,041	290	12610	22651	28705	30740	30022	48245
16,16	442	10721	16620	17697	19364	18632	49522
16,16	358	9300	14787	16412	16710	16507	43200
64,65	321	3262	4264	4410	4690	4353	44383
64,65	338	3275	4180	4030	4800	4710	45838
258,6	393	1183	1318	1329	1557	1454	44627
258,6	340	1112	1014	1244	1306	1400	45834

Tab. P9 Účinek DOX na syntézu DNA v MC29. Průběh inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu MC29, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti DOX. Koncentrace buněk: $1,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$. Aktivita ³H: $71,3 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$. Vzorky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi, hodnoty I_{max} odpovídají $3 \times 0,025 \text{ ml}$. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

c_{DOX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,01791	0,0066	2,71	13,6	6,59
0	0,01608	0,0063	2,55	13,4	
0	0,01548	0,0047	3,3	11,3	
4,041	0,01341	0,0072	1,86	10,5	6,20
4,041	0,0108	0,0061	1,77	8,69	
16,16	0,00894	0,0087	1,03	7,38	9,57
16,16	0,00909	0,0087	1,04	6,54	
64,65	0,002874	0,0106	0,27	2,12	4,38
64,65	0,002814	0,0115	0,245	2,15	
258,6	0,000702	0,0103	0,0681	0,52	8,80
258,6	0,000579	0,0097	0,0597	0,44	

Tab. P10 Účinek DOX na syntézu DNA v MC29. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s^{-1}] inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu MC29, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti DOX. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

c_{DOX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	čas						I_{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	889	2039	2738	3201	3055	3480	45524
0	836	2199	3276	3085	3137	3532	44745
0	761	2079	2942	3121	3255	3343	48028
4,041	697	2023	2697	3135	3067	3441	45804
4,041	739	2217	2814	3149	3221	3516	47446
16,16	810	1950	2704	3053	3142	3283	48275
16,16	715	1858	2756	2879	2971	3300	46636
64,65	878	1980	2709	2782	2919	2954	49615
64,65	736	2074	2427	2626	2995	2924	44657
258,6	737	1994	2500	2598	2511	2556	45728
258,6	738	1925	2611	2591	2714	2626	45226

Tab. P11 Účinek DOX na proteosyntézu v MC29. Průběh inkorporace [$U\text{-}^{14}\text{C}$]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu MC29 7. den po inokulaci myším NMRI v přítomnosti DOX. Koncentrace buněk: $1,5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$. Aktivita ^{14}C : $20 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$. Vzorky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

c_{DOX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,001542	0,0071	0,217	1,17	4,79
0	0,001346	0,0067	0,201	1,00	
0	0,001177	0,0081	0,145	0,942	
4,041	0,001172	0,0076	0,154	0,895	3,15
4,041	0,001242	0,008	0,155	0,982	
16,16	0,000985	0,0081	0,122	0,792	3,67
16,16	0,001038	0,008	0,130	0,807	
64,65	0,000964	0,0083	0,116	0,797	5,02
64,65	0,001164	0,0088	0,132	0,866	
258,6	0,001214	0,0106	0,115	0,925	2,21
258,6	0,001177	0,0098	0,120	0,887	

Tab. P12 Účinek DOX na proteosyntézu v MC29. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s^{-1}] inkorporace [$U\text{-}^{14}\text{C}$]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu MC29, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti DOX. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

c_{DOX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	čas						I_{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	730	25390	51759	64009	70770	74349	50834
0	595	28590	47524	58578	60070	73327	49816
0	547	29166	45590	56778	68727	70663	47320
4,041	400	24500	39425	53167	57363	56482	45971
4,041	464	24510	40741	47406	52281	-	48062
16,16	389	17241	27554	28752	30715	30658	47884
16,16	427	18319	24326	28527	28955	28046	44872
64,65	350	5403	5585	6630	6292	5944	44056
64,65	367	5754	6476	1007	6525	6160	43036
258,6	324	2043	2122	1967	2057	2088	43305
258,6	263	1919	1869	1864	1961	1987	43033

Tab. P13 Účinek DOX na syntézu DNA v ATE. Průběh inkorporace $[6\text{-}^3\text{H}]$ -thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu ATE, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti DOX. Koncentrace buněk: $1,5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Aktivita ^3H : $71,3 \text{ kBq. ml}^{-1}$. Vzorčky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

c_{DOX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,02028	0,0047	4,32	17,2	7,75
0	0,02205	0,0059	3,75	18,3	
0	0,02301	0,0057	4,05	18,2	
4,041	0,02112	0,0061	3,45	16,2	5,50
4,041	0,01956	0,006	3,21	15,7	
16,16	0,01524	0,0087	1,75	12,2	5,23
16,16	0,01608	0,0089	1,81	12,0	
64,65	0,00465	0,011	0,423	3,42	4,47
64,65	0,00558	0,0125	0,447	3,99	
258,6	0,001545	0,0119	0,130	1,12	6,46
258,6	0,00153	0,0126	0,121	1,09	

Tab. P14 Účinek DOX na syntézu DNA v ATE. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s^{-1}] inkorporace $[6\text{-}^3\text{H}]$ -thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu ATE, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti DOX. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

c_{DOX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	čas						I_{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	781	1900	2823	3084	3602	3333	44100
0	899	2146	2918	3211	3339	3482	47773
0	809	1980	2727	2945	3209	3478	45192
4,041	881	2004	2750	3056	3536	3254	46963
4,041	775	1960	2614	3054	3145	3375	47068
16,16	839	2060	2458	2990	3083	2978	49847
16,16	861	2231	2521	3068	2910	3207	48162
64,65	838	1997	2848	3124	3013	2979	46717
64,65	818	1862	2587	2600	2504	2860	46439
258,6	796	1817	2475	2669	2715	2681	44524
258,6	811	1670	2445	2429	2538	2454	45576

Tab. P15 Účinek DOX na proteosyntézu v ATE. Průběh inkorporace [$U\text{-}^{14}\text{C}$]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu ATE 7. den po inokulaci myším NMRI v přítomnosti DOX. Koncentrace buněk: $1,5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Aktivita ^{14}C : 20 kBq. ml^{-1} . Vzorky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

c_{DOX} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,001074	0,0065	0,165	0,789	4,96
0	0,001086	0,0076	0,143	0,865	
0	0,001036	0,0068	0,152	0,780	
4,041	0,000991	0,0069	0,144	0,776	4,19
4,041	0,001008	0,007	0,144	0,791	
16,16	0,000983	0,0082	0,120	0,816	3,40
16,16	0,001104	0,0088	0,125	0,886	
64,65	0,001132	0,0086	0,132	0,881	7,05
64,65	0,000982	0,0087	0,113	0,760	
258,6	0,001008	0,0085	0,119	0,748	4,30
258,6	0,000878	0,0085	0,103	0,667	

Tab. P16 Účinek DOX na proteosyntézu v ATE. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s^{-1}] inkorporace [$U\text{-}^{14}\text{C}$]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu ATE, získaného z ascitu myší NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti DOX. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

9.2. Účinek mitoxantronu na ascitickou formu nádoru MC29 in vivo

Kontrola (0 mg.kg ⁻¹)				MX 3 mg.kg ⁻¹			
m_1	$m_1 - m_2$	ascitokrit (%)	m_T	m_1	$m_1 - m_2$	ascitokrit (%)	m_T
28,2	2,8	25	0,70	23,1	0,9	44	0,40
28,6	3,0	23	0,69	27,9	1,6	32	0,51
29,9	3,1	10	0,31	24,6	2,2	35	0,77
29,2	3,0	29	0,87	29,9	2,5	22	0,55
19,2	0,7	74	0,52	29,4	3,0	21	0,63
30,2	3,4	18	0,61	25,9	2,9	13	0,38
27,7	3,9	15	0,59	29,0	2,0	27	0,54
19,9	0,7	57	0,40	27,7	3,4	10	0,34
27,2	2,5	24	0,60	22,2	1,5	27	0,41
28,3	4,0	23	0,92	-	-	-	-
Aritmetický průměr m_T			0,621	Aritmetický průměr m_T			0,503
P (t-test, $\alpha = 0,05/3$)			-	P (t-test, $\alpha = 0,05/3$)			0,07130
Liší se od (mg/kg) (Fisher-LSD)			9; 6	Liší se od (mg/kg) (Fisher-LSD)			9; 6
% kontroly				% kontroly			81

MX 6 mg.kg ⁻¹				MX 9 mg.kg ⁻¹			
m_1	$m_1 - m_2$	ascitokrit (%)	m_T	m_1	$m_1 - m_2$	ascitokrit (%)	m_T
28,8	1,4	25	0,35	18,5	0,3	43	0,13
28,5	2,5	13	0,33	24,8	0,6	54	0,32
24,2	0,9	30	0,27	24,4	0,8	35	0,28
21,4	0,4	49	0,20	22,6	0,6	31	0,19
22,7	0,7	41	0,29	22,1	0,6	52	0,31
25,2	1,9	19	0,36	22,4	0,7	34	0,24
20,7	0,7	45	0,32	20,0	0,5	61	0,31
23,9	2,0	13	0,26	28,9	0,6	22	0,13
22,1	2,2	31	0,68	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
Aritmetický průměr m_T			0,340	Aritmetický průměr m_T			0,239
P (t-test, $\alpha = 0,05/3$)			0,000930	P (t-test, $\alpha = 0,05/3$)			0,000033
Liší se od (mg/kg) (Fisher-LSD)			3; 0	Liší se od (mg/kg) (Fisher-LSD)			3; 0
% kontroly			55	% kontroly			38

Tab. P17 Výsledky hodnocení vlivu MX na hmotnost ascitické formy adenokarcinomu mléčné žlázy MC29 myši NMRI. m_1 = hmotnost myši před odebráním ascitu (g), $(m_1 - m_2)$ = hmotnost ascitu zjištěná odečtením hmotnosti myši před a po odstranění ascitu (g), m_T = hmotnost buněčné frakce ascitu (g), /8/. V tabulce je uvedeno porovnání dávkových skupin proti kontrole Studentovým t-testem s Bonferroniho modifikací na hladinu významnosti $\alpha = 0,05/3$ a dále vícenásobné porovnání Fisherovým t-testem jednotlivých dávkových skupin mezi sebou.

MX (mg.kg ⁻¹)	n	dny přežití
0	10	8, 11, 13, 13, 13, 14, 18, 19, 22, 23
3	10	7, 10, 14, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 28
6	10	9, 10, 18, 21, 21, 23, 32, 32, 32, 32
9	10	8, 9, 10, 14, 14, 16, 18, 19, 20, 23

Tab. P18 Vliv MX na přežití myši NMRI s inokulovaným karcinomem MC29 (dny).

9.3. Ovlivnění syntézy NA a bílkovin v nádorových buňkách ascitické formy nádorů MC29 a ATE v přítomnosti 2-deoxyglukosy a L-rhamnosy *in vitro*

C ₂ -DG (mmol.l ⁻¹)	čas						I _{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	542	24626	42874	54769	56501	62292	48847
0	451	21704	41697	54389	58835	62652	49186
0	381	22416	43941	55101	62083	60869	49412
0,3125	451	19390	40130	52073	55598	63560	47626
0,3125	408	17779	40809	53110	58073	60234	48975
1,25	520	17639	36526	50678	50991	56913	45629
1,25	451	16019	36160	45680	52057	56374	45230
5	506	5057	9539	13899	15830	17635	45858
5	488	3867	8546	12305	14495	14502	46521
20	431	1417	2507	3387	3873	4198	46490
20	564	1238	2530	4142	5354	5756	44345

Tab. P19. Účinek 2-DG na syntézu DNA v ATE. Průběh inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu ATE, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti 2-DG. Koncentrace buněk: 1,5 · 10⁶.ml⁻¹. Aktivita ³H: 67,5 kBq.ml⁻¹. Vzorky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

C ₂ -DG (mmol.l ⁻¹)	A	B	A/B	v ₀	rel. sm. odch. (%)
0	0,02007	0,0058	3,46	16,3	5,63
0	0,01765	0,0047	3,76	15,4	
0	0,01874	0,0051	3,68	14,5	
0,3125	0,01616	0,0039	4,14	12,8	3,78
0,3125	0,01511	0,0036	4,20	12,3	
1,25	0,01555	0,004	3,89	11,8	4,51
1,25	0,01420	0,0033	4,30	10,7	
5	0,00374	0,0024	1,56	2,86	9,63
5	0,002927	0,0017	1,72	2,27	
20	0,000819	0,0024	0,341	0,634	14,6
20	0,001131	0,0023	0,492	0,836	

Tab. P20. Účinek 2-DG na syntézu DNA v ATE. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v₀) [s⁻¹] inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu ATE, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti 2-DG. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

C ₂ -DG (mmol.l ⁻¹)	čas						I _{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	702	1655	1909	2142	2179	2228	28132
0	673	1515	2006	2249	2236	2314	27678
0	667	1561	2075	2185	2329	2236	28762
0,3125	682	1434	1900	2080	2129	2269	28203
0,3125	598	1346	1978	1941	2168	2202	28583
1,25	682	1382	1934	2281	2048	2192	27539
1,25	609	1387	1962	2053	2132	2329	27241
5	628	1089	1553	1863	1929	2051	28381
5	640	991	1370	-	1967	2217	27304
20	647	809	950	1031	1170	1107	27206
20	728	868	978	1215	1284	1204	27618

Tab. P21. Účinek 2-DG na proteosyntézu v ATE. Průběh inkorporace [U-¹⁴C]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu ATE 7. den po inokulaci myším NMRI v přítomnosti 2-DG. Koncentrace buněk: 1,5 10⁶ ml⁻¹. Aktivita ¹⁴C: 12,6 kBq. ml⁻¹. Vzorky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

C ₂ -DG (mmol.l ⁻¹)	A	B	A/B	v ₀	rel. sm. odch. (%)
0	0,00136	0,0092	0,148	0,637	3,23
0	0,00130	0,0081	0,160	0,596	
0	0,00135	0,0087	0,155	0,645	
0,3125	0,00110	0,0075	0,147	0,519	4,15
0,3125	0,00113	0,0075	0,151	0,539	
1,25	0,00114	0,0076	0,150	0,524	3,97
1,25	0,00120	0,0074	0,162	0,545	
5	0,000666	0,0044	0,151	0,315	3,96
5	0,000456	0,001	0,456	0,207	
20	0,000235	0,0043	0,0546	0,106	6,58
20	0,000192	0,0022	0,0873	0,088	

Tab. P22. Účinek 2-DG na proteosyntézu v ATE. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v₀) [s⁻¹] inkorporace [U-¹⁴C]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu ATE, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti 2-DG. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

c_{2-DG} (mmol.l ⁻¹)	čas						I_{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	227	2719	3568	7772	9450	11739	21094
0	212	3004	4197	6278	10319	14060	21965
0,3125	259	2849	4219	6511	10014	12669	21606
0,3125	282	2991	4298	6281	10616	13154	21159
1,25	202	2718	3846	4968	8997	10411	21032
1,25	216	2675	3097	4531	7715	10634	20832
5	216	1917	2415	2515	3029	4922	21690
5	242	2201	2245	2610	3112	4818	22404
20	202	1760	2311	2513	2816	4644	22490
20	223	1831	2502	2656	3019	4543	22998

Tab. P23. Účinek 2-DG na syntézu DNA v HL-60. Průběh inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk HL-60. Koncentrace buněk: 1,5 10⁶.ml⁻¹. Aktivita ³H: 51 kBq.ml⁻¹. Vzorčky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

c_{2-DG} (mmol.l ⁻¹)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,0410	-0,0005	-82	14,4	9,55
0	0,03396	-0,0007	-48,5	12,4	
0,3125	0,02783	-0,0004	-69,6	10,0	3,35
0,3125	0,0304	-0,0005	-60,8	10,7	
1,25	0,03212	0,0008	40,2	11,3	6,66
1,25	0,02932	-0,001	-29,3	10,2	
5	0,02610	0,0054	4,83	9,44	4,83
5	0,02323	0,0062	3,75	8,68	
20	0,01755	0,0053	3,31	6,58	4,30
20	0,01826	0,005	3,65	7,00	

Tab. P24. Účinek 2-DG na syntézu DNA v HL-60. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s⁻¹] inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk HL-60, v přítomnosti 2-DG. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

C_{2-DG} (mmol.l ⁻¹)	čas						I_{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	489	21001	40119	52948	58112	61394	51160
0	439	22515	39941	55137	59034	63127	55309
0	401	21649	44151	50334	63954	63354	48996
0,3125	534	18645	41420	54201	54184	56941	48151
0,3125	411	18944	42027	54173	52099	58911	46494
1,25	439	16885	40102	45967	46992	52784	46448
1,25	513	17004	39975	46797	48154	52466	48445
5	555	6545	10298	13597	14681	26551	47120
5	539	5881	10484	15064	14185	21644	45464
20	502	2010	3107	5113	5054	5959	45691
20	497	1955	2697	5231	5165	6112	47484

Tab. P25. Účinek 2-DG na syntézu DNA v MC29. Průběh inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu MC29, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti 2-DG. Koncentrace buněk: 1,5 10⁶.ml⁻¹. Aktivita ³H: 67,5 kBq.ml⁻¹. Vzorky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

C_{2-DG} (mmol.l ⁻¹)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,015221	0,0048	3,17	13,9	5,11
0	0,015824	0,0048	3,30	14,6	
0	0,017728	0,0046	3,85	14,5	
0,3125	0,016548	0,0046	3,60	13,3	4,30
0,3125	0,017428	0,0047	3,71	13,5	
1,25	0,015817	0,0048	3,30	12,2	2,52
1,25	0,015221	0,0048	3,17	12,3	
5	0,003999	0,002	2,00	3,140	5,83
5	0,004258	0,0028	1,52	3,226	
20	0,001201	0,0026	0,462	0,915	2,93
20	0,001025	0,0015	0,683	0,811	

Tab. P26. Účinek 2-DG na syntézu DNA v MC29. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s⁻¹] inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu MC29, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti 2-DG. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

c_{2-DG} (mmol.l ⁻¹)	čas						I_{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	698	1539	2123	2164	2216	2451	28097
0	709	1613	2269	2236	2398	2507	28213
0	639	1555	2218	2279	2374	2442	29012
0,3125	674	1399	1864	1987	2011	2169	29014
0,3125	601	1365	1976	2012	2139	2189	29656
1,25	649	1139	2014	2198	2236	2281	28064
1,25	597	1216	1866	1983	2060	2229	28649
5	576	1259	1624	1691	2116	2134	29061
5	615	1034	1223	1142	2099	2031	29466
20	609	707	966	1146	1243	1108	28288
20	667	997	1046	1186	1209	1143	27988

Tab. P27. Účinek 2-DG na proteosyntézu v MC29. Průběh inkorporace [U-¹⁴C]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu ATE 7. den po inokulaci myším NMRI v přítomnosti 2-DG. Koncentrace buněk: $1,5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Aktivita ¹⁴C: 12,6 kBq. ml⁻¹. Vzorky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

c_{2-DG} (mmol.l ⁻¹)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,001266	0,0079	0,160	0,593	3,23
0	0,00138	0,0082	0,168	0,649	
0	0,001379	0,0083	0,166	0,667	
0,3125	0,00105	0,0078	0,135	0,508	3,31
0,3125	0,001125	0,0078	0,144	0,556	
1,25	0,000834	0,0045	0,185	0,390	5,10
1,25	0,000936	0,0061	0,153	0,447	
5	0,000881	0,0063	0,140	0,427	11,7
5	0,000402	0,0019	0,211	0,197	
20	0,000166	0,003	0,0554	0,0784	7,12
20	0,00047	0,0094	0,0500	0,219	

Tab. P28. Účinek 2-DG na proteosyntézu v MC29. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s⁻¹] inkorporace [U-¹⁴C]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu MC29, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti 2-DG. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

$c_{L\text{-rhamnosy}}$ (mmol.l ⁻¹)	čas						I_{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	542	24626	42874	54769	56501	62292	48847
0	451	21704	41697	54389	58835	62652	49186
0	381	22416	43941	55101	62083	60869	49412
0,3125	501	20297	43265	52076	58767	65496	47860
0,3125	395	21741	40817	55709	60160	67702	50360
1,25	464	19817	39757	54035	60818	60896	49226
1,25	439	20341	40107	50300	57553	63443	47882
5	523	18792	37014	48953	55102	60954	47457
5	489	17629	36927	50181	58257	65194	46206
20	443	16862	35822	50853	55351	60501	44742
20	352	16572	32818	49458	54820	59719	47521

Tab. P29. Účinek L-rhamnosy na syntézu DNA v ATE. Průběh inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu ATE, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti L-rhamnosy. Koncentrace buněk: 1,5 10⁶.ml⁻¹. Aktivita ³H: 67,5 kBq.ml⁻¹. Vzorky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

$c_{L\text{-rhamnosy}}$ (mmol.l ⁻¹)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,02007	0,0058	3,45	16,3	5,63
0	0,01875	0,0047	3,99	15,4	
0	0,01764	0,0051	3,45	14,5	
0,3125	0,01701	0,0041	4,14	13,6	5,75
0,3125	0,01665	0,0041	4,05	14,0	
1,25	0,01608	0,004	4,02	13,2	3,04
1,25	0,01656	0,0041	4,02	13,2	
5	0,01521	0,0037	4,11	12,0	3,31
5	0,0144	0,0026	5,55	11,1	
20	0,01431	0,0027	5,31	10,7	3,85
20	0,01314	0,0027	4,86	10,4	

Tab. P30. Účinek L-rhamnosy na syntézu DNA v ATE. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s⁻¹] inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu ATE, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti L-rhamnosy. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

c _{L-rhamnosy} (mmol.l ⁻¹)	čas						I _{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	702	1655	1909	2142	2179	2228	28132
0	673	1515	2006	2249	2236	2314	27678
0	667	1561	2075	2185	2329	2236	28762
0,3125	605	1409	1963	2148	2198	2251	27628
0,3125	621	1430	1865	2164	2274	2247	29023
1,25	685	1463	1894	2214	2309	2162	27349
1,25	605	1413	1899	2144	2215	2280	28538
5	637	1541	1813	1897	2136	2221	28252
5	618	1452	1796	2078	2117	2383	27198
20	638	1447	1793	2110	2121	2170	26277
20	476	1420	1840	2079	1924	2177	27513

Tab. P31. Účinek L-rhamnosy na proteosyntézu v ATE. Průběh inkorporace [U-¹⁴C]aminokyselínové směsi do buněk ascitické formy karcinomu ATE 7. den po inokulaci myším NMRI v přítomnosti L-rhamnosy. Koncentrace buněk: $1,5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Aktivita ¹⁴C: 12,6 kBq. ml⁻¹. Vzorčky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

c _{L-rhamnosy} (mmol.l ⁻¹)	A	B	A/B	v ₀	rel. sm. odch. (%)
0	0,001358	0,0092	0,148	0,637	3,23
0	0,001292	0,0081	0,160	0,596	
0	0,001347	0,0087	0,155	0,645	
0,3125	0,00125	0,0077	0,162	0,576	1,59
0,3125	0,001146	0,0074	0,155	0,554	
1,25	0,001207	0,0078	0,155	0,550	3,40
1,25	0,001176	0,0075	0,157	0,559	
5	0,001226	0,0085	0,144	0,577	3,18
5	0,001178	0,0072	0,164	0,534	
20	0,001251	0,0079	0,158	0,548	5,31
20	0,001436	0,0089	0,161	0,596	

Tab. P32. Účinek L-rhamnosy na proteosyntézu v ATE. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v₀) [s⁻¹] inkorporace [U-¹⁴C]aminokyselínové směsi do buněk ascitické formy karcinomu ATE, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti L-rhamnosy. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

$c_{L\text{-rhamnosy}}$ (mmol.l ⁻¹)	čas						I_{\max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	334	13058	19213	20367	20043	20369	44896
0	248	22203	34921	35872	39905	38787	41327
0	358	15741	26142	29006	29577	27906	43841
0,3125	360	9588	15008	15206	15583	16161	45424
0,3125	441	14285	21468	21657	22417	21554	44190
1,25	467	17101	26992	29115	30545	29775	44591
1,25	496	20804	31689	33404	36581	37212	45466
5	456	19596	31446	35865	36836	38997	46894
5	273	18566	29228	35381	35445	39145	45463
20	370	17995	31284	36861	37481	43264	39624
20	375	19775	35826	42886	42991	48047	42184

Tab. P33. Účinek L-rhamnosy na syntézu DNA v MC29. Průběh inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu MC29, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti L-rhamnosy. Koncentrace buněk: 1,5 10⁶.ml⁻¹. Aktivita ³H: 68,6 kBq.ml⁻¹. Vzorčky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

$c_{L\text{-rhamnosy}}$ (mmol.l ⁻¹)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,01248	0,0099	0,0374	9,34	28,0
0	0,02289	0,0088	0,0687	15,8	
0	0,01581	0,0087	0,0474	11,6	
0,3125	0,00894	0,0093	0,0268	6,77	22,9
0,3125	0,01404	0,0101	0,0421	10,3	
1,25	0,01632	0,0088	0,0490	12,1	11,3
1,25	0,01878	0,0086	0,0563	14,2	
5	0,01722	0,0078	0,0517	13,5	8,07
5	0,01653	0,0074	0,0496	12,5	
20	0,01833	0,0065	0,0550	12,1	7,49
20	0,01941	0,0064	0,0582	13,7	

Tab. P34. Účinek L-rhamnosy na syntézu DNA v MC29. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s⁻¹] inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk ascitické formy karcinomu MC29, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti L-rhamnosy. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

$c_{L\text{-rha,mnosy}}$ (mmol.l ⁻¹)	čas						I_{max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	282	559	692	716	745	684	14671
0	269	614	575	585	674	646	12846
0	281	510	602	680	721	733	14307
0,3125	267	575	658	684	662	669	14861
0,3125	296	580	692	729	763	688	14098
1,25	313	534	640	682	700	715	14469
5	324	554	679	674	830	736	15286
5	288	606	706	704	933	750	15125
20	313	490	584	737	862	699	13421
20	278	522	620	701	824	783	14067

Tab. P35. Účinek L-rhamnosy na proteosyntézu v MC29. Průběh inkorporace [U-¹⁴C]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu MC29 7. den po inokulaci myším NMRI v přítomnosti L-rhamnosy. Koncentrace buněk: $1,5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Aktivita ¹⁴C: 5,3 kBq. ml⁻¹. Vzorčky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

$c_{L\text{-rhamnosy}}$ (mmol.l ⁻¹)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,000851	0,0102	0,0834	0,208	7,23
0	0,000977	0,0115	0,0849	0,209	
0	0,000625	0,0075	0,0834	0,149	
0,3125	0,0009	0,0112	0,0804	0,223	4,66
0,3125	0,000896	0,0103	0,0870	0,210	
1,25	0,000634	0,0085	0,0746	0,153	-
5	0,000616	0,008	0,0770	0,157	5,01
5	0,000844	0,0091	0,0927	0,213	
20	0,000526	0,0055	0,0956	0,118	5,30
20	0,000654	0,0066	0,0991	0,153	

Tab. P36. Účinek L-rhamnosy na proteosyntézu v MC29. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s⁻¹] inkorporace [U-¹⁴C]aminokyselinové směsi do buněk ascitické formy karcinomu MC29, získaného z ascitu myši NMRI sedmý den po inokulaci, v přítomnosti L-rhamnosy. Dále je uvedena relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%).

$c_{L\text{-rhamnosy}}$ (mmol.l ⁻¹)	čas						I_{\max}
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	
0	543	6170	11840	16192	20200	25138	44851
0	451	6023	11482	19323	22244	25093	46345
0	576	6220	12078	16449	22600	25299	45848
0,3125	629	5905	12443	17209	23092	27093	46380
0,3125	561	5457	12448	17825	22375	26217	43959
1,25	560	5632	12386	17641	21397	26542	43368
1,25	505	5584	11121	16213	21986	25806	37761
5	531	6118	11963	17330	21171	24261	45921
5	583	5760	11904	17079	22754	26555	46003
20	396	5727	12034	16835	22904	26303	44947
20	572	5767	11953	17309	22832	27034	43323

Tab. P37. Účinek L-rhamnosy na syntézu DNA v HL-60. Průběh inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk HL-60 v přítomnosti L-rhamnosy. Koncentrace buněk: 1,5 10⁶.ml⁻¹. Aktivita ³H: 93,5 kBq.ml⁻¹. Vzorky byly inkubovány vždy v dupletech pro každou koncentraci inhibitoru. Aktivity jsou uvedeny v DPM/0,075 ml inkubované směsi. Měření po 24 h do dosažení 2% chyby (max. 5 min) scintil. roztok TRITON. Aktivity kontrol bez buněk nejsou uvedeny.

$c_{L\text{-rhamnosy}}$ (mmol.l ⁻¹)	A	B	A/B	v_0	rel. sm. odch. (%)
0	0,00441	0,0014	3,15	3,30	5,50
0	0,00429	0,0009	4,77	3,32	
0	0,00432	0,001	4,32	3,30	
0,3125	0,00402	0,0001	40,2	3,11	3,45
0,3125	0,00411	0,0002	20,5	3,01	
1,25	0,00426	0,0003	14,2	3,08	4,23
1,25	0,00459	0,0001	45,9	2,89	
5	0,00441	0,0014	3,15	3,38	3,95
5	0,00393	0,00005	78,9	3,02	
20	0,00417	0,0003	13,9	3,13	5,13
20	0,00417	0,00005	83,7	3,02	

Tab. P38. Účinek L-rhamnosy na syntézu DNA v HL-60. Hodnoty empirických konstant A a B ze vztahu /6/, poměru A/B a počátečních rychlostí (v_0) [s⁻¹] inkorporace [6-³H]-thymidinu do buněk HL-60, v přítomnosti L-rhamnosy. Dále jsou uvedeny koeficient determinace (R^2) lineární regrese podle vztahu /6/ a relativní směrodatná odchylka aktivit dupletů vzorků (%)

10. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

Originální práce *in extenso*:

Tomsik, P., Sispera, L., Rezacova, M., Niang, M., Stoklasova, A., Cerman, J., Knizek, J., Brackova, E., Cermanova, J., Micuda, 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., Knížek, 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.

ERRATA

Vážený čtenáři,

omlouvám se za několik tiskových chyb, které vznikly při konečné úpravě práce pro oboustranný tisk.

Str. 6; poslední řádek - *Chybí text: ... zvířaty. Zavedení vhodných metod testování účinnosti protinádorových látek je pro to nezbytným předpokladem.*

Str. 8; řádek 9 shora – zalomený řádek

Str. 11; řádek 11 shora – zalomený řádek

Str. 13; řádek 14 shora – zalomený řádek

Str. 23; řádek 4 zdola – zalomený řádek

Str. 34; řádek 12 zdola – zalomený řádek

Děkuji za pochopení

MUDr. Pavel Tomšík

