

Inocell™ – IP6 a Inositol

Abstrakta ze 7. mezinárodní konference proti rakovině

V termínu 24. - 30. 10. 2004 se na řeckém ostrově Korfu konala 7. mezinárodní konference protinádorového výzkumu (Seventh International Conference of Anticancer Research), které se zúčastnilo na 3.000 onkologů z celého světa. Na tomto místě přinášíme výběr nejzajímavějších abstrakt, která byla zveřejněna ve sborníku Anticancer Research - International Journal of Cancer Research and Treatment, Volume 24, Number 5D, September - October 2004, ISSN: 0250-7005.

539

IP-6 A INOSITOL PROTI RAKOVINĚ PRSU: MODULACE PKC? A p27Kip1

Ivana Vucenik a AbulKalam M. Shamsuddin

Katedra lékařské a výzkumné technologie, Univerzita v Marylandu, Lékařská fakulta, 100 Penn Street, Baltimore, Maryland 21201, USA

Přirozeně se vyskytující inositol a jeho derivát inositol hexafosfát (IP-6) se hojně vyskytuje v celé řadě rostlin, zejména v obilovinách a luštěninách. Velké množství IP-6 a dalších fosforylovaných inositolů se také nachází téměř ve všech buňkách savců, kde se podílejí na vytváření drah vedoucích signály. Různé experimentální modely včetně modelu rakoviny prsu prokázaly udivující a reprodukovatelný účinek IP-6 a inositolu proti rakovině. IP-6 a inositol dokázal inhibovat chemicky indukovanou karcinogenezi, jakož i spontánně vzniklé tumory mléčné žlázy u krys. IP-6 inhibuje in vitro proliferaci rakovinových buněk v prsu u lidí, a to bez ohledu na jejich hormonální závislost, a zvyšuje buněčnou diferenciaci. IP-6 moduluje bílkoviny buněčného cyklu zapojené do přechodu buněčného cyklu G1/S. Ukázali jsme, že IP-6 aktivuje PKC β a zvyšuje expresi Cdk inhibitoru p27Kip1, takže nakonec dochází k redukci fosforylace pRb a navozuje se zastavení buněčného cyklu rakovinových buněk prsu lidí. IP-6 inhibuje u lidí metastázy rakovinových buněk prsu, protože snižuje jejich adhezi, migraci a invazi. Vzhledem k tomu, že IP-6 zvyšuje antiproliferační účinky tamoxifenu a Adriamycinu, má velký potenciál jako adjuvantní lék při klasické chemoterapii. Tyto laboratorní výsledky společně s novými klinickými daty naznačují možnost použití IP-6 + inositolu v našich strategiích prevence i léčby rakoviny. Protože preventivní strategie vyžadují, aby byl lék bezpečný po dlouhou dobu, představuje inositol + IP-6 ideální zbraň v naší strategii prevence rakoviny. U pacientů, kteří odmítají klasickou chemoterapii z důvodu její toxicity, by mohl sloužit jako účinná „alternativa“; u pacientů léčených standardně může jeho použití jako adjuvans nabídnout nejen výhody synergie, ale také zlepšení toxických vedlejších účinků chemoterapie.

125

IP6 + INOSITOL JAKO ADJUVANS PŘI CHEMOTERAPII RAKOVINY TLUSTÉHO STŘEVA: NAŠE KLINICKÉ ZKUŠENOSTI

N. Druzijanic, J. Juricic, Z. Perko a D. Kraljevic
Klinika „Krizine“, Split, Chorvatsko

Účel: Vyhodnotit: a) možné pozitivní účinky kombinace IP6 + Inositol při terapii pokročilého kolorektálního karcinomu a b) snížení vedlejších účinků chemoterapie aplikované podle protokolu Mayo.

Materiály a metody: V období let 2000 - 2004 se 22 pacientů s kolorektálním karcinomem (Dukes B2, C a D) podrobilo chirurgickému zákroku a poté adjuvantní polychemoterapii - protokol Mayo a radioterapie. V průběhu chemoterapie užívali čtyřikrát denně 3 kapsle (1530 mg) IP6 + Inositol vždy 30 minut před jídlem. Po chemoterapii pokračovali po dobu jednoho roku v užívání IP6 + Inositol, a to dvakrát denně 3 kapsle. Před operací byly pacientům provedeny následující rutinní testy: krevní obraz s diferenciály, moč, glukóza, urea, kreatinin, AST, ALT, γ -GT, elektrolyty, bílkoviny, albumin, rentgen plic, CT břicha, sono břicha, CEA, CA19-9. Byly provedeny tyto chirurgické zákroky: pravá hemikolektomie u 3 pacientů, neúplná kolektomie u 3 pacientů, dolní přední resekce podle Dixona u 12 pacientů a amputace rekta u 4 pacientů. V průběhu chemoterapie a radioterapie byly u pacientů sledovány hodnoty krevního obrazu a diferenciálů, kreatinin, elektrolyty, AST, ALT, γ -GT, glukóza, CEA, CA19-9.

Výsledky: Z 22 pacientů s kolorektálním karcinomem léčeným kombinací IP6 + Inositol bylo 16 mužů ve věku 41 až 71 let (střední věk: 64) a 6 žen ve věku 54 až 70 let (střední věk: 66). Čtyři pacienti byli klasifikováni jako Dukes D, deset pacientů jako Dukes C a osm jako Dukes B2. Tři pacienti ze skupiny Dukes D zemřeli v průběhu sledování. Všichni pacienti léčení adjuvantní polychemoterapií podle protokolu Mayo a kombinací IP6 + Inositol vykazovali významně nižší vedlejší účinky chemoterapie (pokles počtu leukocytů a krevních destiček, nevolnost, zvracení, horečka, průjem a alopecie). Všechny laboratorní parametry byly po dobu terapie v normě. Oproti standardnímu režimu chemoterapie samotné, kdy se často setkáváme s nutností chemoterapii zastavit v důsledku silných vedlejších účinků, nebylo ani v jednom případě nutné přerušovat chemoterapii u pacientů na adjuvatním IP6 + Inositolu. V tomto období byly u jednoho pacienta zjištěny metastázy v játrech a u dvou pacientů metastázy v plicích.

Závěr: Na základě klinických pozorování v této nerandomizované a nekontrolované klinické zkoušce lze konstatovat, že se u pacientů po operaci kolorektálního karcinomu, kteří potřebovali adjuvantní chemoterapii, projevíly snížené vedlejší účinky chemoterapie a kvalita jejich života se podáváním IP6 + Inositolu zlepšila. Je však třeba provést další prospektivní a randomizované klinické zkoušky, aby bylo možné stanovit účinek kombinace IP6 + Inositol jako podpůrné terapie při léčení kolorektálního karcinomu a při regresi tumorů.

559

INHIBICE CHRONICKÉ VŘEDOVITÉ KOLITIDY SPOJENÉ SE VZNIKEM ADENOKARCINOMU POMOCÍ SLOUČENIN INOSITOLU V NOVÉM MYŠÍM MODELU ZÁNĚTLIVÉHO KARCINOMU

Guang-Yu Yang, Jie Liao a Darren N. Seril

Laboratoř pro výzkum rakoviny Susan L. Cullman, Fakulta farmakologie Ernesta Maria, Rutgersova univerzita, 164 Frelinghuysen Road, Piscataway, NJ 08854-8020, USA

Pacienti s dlouhodobou vředovitou kolitidou mají zvýšené riziko vzniku kolorektálního karcinomu. Aby bylo možné vyvinout strategii prevence vředovité kolitidy spojené s karcinogenezí, testovali jsme účinky sloučenin inositolu (inositol a hexafosfát inositol) na vznik adenokarcinomu spojeného s vředovitou kolitidou v novém myším modelu

zánětlivého karcinomu, jež byl v naší laboratoři vytvořen. Samicím myším C57BL/6 byl dlouhodobě podáván cyklický dextran síran sodný (DSS). Krmeny byly stravou obohacenou o dvojmocné železo. Sloučeniny inositolu byly pokusným zvířatům podávány ve vodě. V pozitivní kontrolní skupině DSS plus dvojmocné železo byla po 15 cyklech podávání DSS (1 cyklus DSS = 7 dnů podávání DSS s následnou desetidenní přestávkou na regeneraci) incidence kolorektálního karcinomu 70,6 % (24/34 myší). Multiplicita nádorů byla $1,26 \pm 1,05$ a objem nádorů činil $21,4 \pm 5,2$ mm³. Při podávání 1% inositolu nebo hexafosfátu inositolu se incidence tumorů významně snížila (42 %, 9 z 21 myší ve skupině tumor plus inositol; a 50 %, 12 z 24 myší ve skupině tumor plus hexafosfát inositol), stejně jako se snížila multiplicita tumorů ($0,5 \pm 0,7$ ve skupině inositol a $0,8 \pm 0,9$ ve skupině hexafosfát inositol). Také objem tumorů se významně zmenšil ($4,2 \pm 1,9$ mm³ ve skupině inositol a $12,3 \pm 4,1$ mm³ ve skupině hexafosfát inositol). Další mechanické studie ukázaly, že inhibice karcinogeneze spojené s vředovitou kolitidou pomocí sloučenin inositolu může mít souvislost s jejich funkcí modulování zánětlivé reakce, nitro-oxidačního stresu, buněčného množení a apoptózy při procesu zánětu a karcinogeneze. Tato studie ukazuje, že sloučeniny inositolu by mohly sloužit jako prevence vzniku zánětu a karcinogeneze.

466

MODULACE ATP-ZÁVISLÝCH CHROMATIN-REMOTULUJÍCÍCH KOMPLEXŮ POMOCÍ INOSITOL POLYFOSFÁTU

Xuetong Shen

Oddělení karcinogeneze, UTMDACC, Smithville, TX, USA

Eukaryoty používají adenosin trifosfát (ATP)-závislé chromatin-remotulující komplexy na regulování genové exprese. Ukázali jsme, že inositol polyfosfát dokáže modulovat činnost několika chromatin-remotulujících komplexů in vitro. Inositol hexakifosfát (IP6) inhibuje pomocí komplexů NURF, ISW2 a INO80 mobilizaci nukleozomů. Naproti tomu je mobilizace nukleozomů kvasinkovým komplexem SWI/SNF stimulována inositol tetrakifosfátem (IP4) a inositol pentakifosfátem (IP5). Prokázali jsme, že mutace genů kódujících inositol polyfosfátové kinázy, které produkují IP4, IP5 a IP6, narušují transkripci in vivo. Tyto výsledky představují spojení mezi inositol polyfosfáty, remodelováním chromatinu a genovou expresí.

133

FARMAKOKINETIKA A TKÁŇOVÁ DISTRIBUCE IP6 U MYŠÍ SCID C.B-17 NESOUCÍCH XENOGENNÍ ŠTĚPY LIDSKÉ RAKOVINY PRSU

Julie L. Eiseman, Jing Lan, Jainxia Guo, Erin Joseph a Ivana Vucenik

Univerzita v Pittsburghu, Institut pro výzkum rakoviny, Pittsburgh, PA 15213; Katedra lékařské a výzkumné technologie, Univerzita v Marylandu, Baltimore, MD 21201, USA

Inositol hexafosfát (IP6) a inositol se běžně vyskytuje v rostlinách a jeho vysoké koncentrace lze nalézt v rýži, kukuřici, fazolích, celozrnné mouce a ořích. IP6 je přítomen v buňkách a tkáních savců v koncentracích od 0,01 do 1 mM. Podávání IP6 zvířatům je účinné při prevenci rakoviny a chemoterapii. Zde uváděné studie popisují farmakokinetiku, tkáňovou distribuci a metabolismus IP6 po podání i.v. nebo p.o. myším.

Materiály a metody: Myším C.B-17 SCID nesoucím xenogenní štěpy MDA-MB-231 byl podáván IP6 v dávce 20 mg/kg (obsahující 3 μ Ci/myš [14C]- rovnoměrně kruhově označený

IP6). Myši byly usmrceny 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 360, 960 a 1380 minut po podání IP6 nebo 5 min po podání vehikula. V hodině 0-8 a 8-24 byla odebrána moč a stolice. Tkáňové vzorky byly homogenizovány, extrahovány a analyzovány na [14C]-IP6 a jeho metabolity, nižší inositol fosfáty (IPS) metodou gradientní HPLC s detekcí radioaktivity.

Výsledky: Po i.v. aplikaci IP6 dosáhly plazmatické koncentrace IP6 vrcholu v 5. minutě ($6,62 \pm 0,38$ nmol/ml) a byly zjistiitelné v 45. minutě ($0,14 \pm 0,24$ nmol/ml). Koncentrace IP6 v játrech byly více než desetkrát vyšší než koncentrace v plazmě, přičemž vrcholu dosáhly v 10. minutě ($130,11 \pm 2,35$ nmol/g) a byly zjistiitelné ještě po 6 hodinách. Koncentrace IP6 v ledvinách, plicích, slezině, tuku a GI traktu dosáhly vrcholu v 10. minutě. V tumoru byl detekován inositol, nikoli však IP6. V plazmě byly vrcholové koncentrace IPS pozorovány takto: IP5 v 5. minutě, IP4 a IP3 v 10. minutě, IP2 a IP1 v 15. minutě. Inositol byl detekován ve 45. minutě, vrcholu dosáhl ve 240. minutě a byl zjistiitelný ještě po 34 hodinách. Hlavním metabolitem ve tkáních byl inositol a jeho koncentrace vrcholily mezi 240. a 360. minutou pi i.v. podání IP6. Po p.o. podání IP6 nebyl v plazmě zjištěn žádný IP6, avšak v 10. minutě byl přítomen inositol. IP6 byl detekován v játrech v 5. a 10. minutě po p.o. podání. V ostatních tkáních včetně tumoru byl po p.o. aplikaci IP6 zjištěn pouze inositol. Většinu radioaktivity vyloučené močí nesl inositol.

Závěry: Po i.v. podání se IP6 rychle defosforyloval na metabolity a inositol v plazmě a tkáních byl zjištěn ještě po 24 hodinách. Po p.o. podání nebyl v tkáních s výjimkou jater ani v plazmě zjištěn žádný IP6. Inositol byl hlavním metabolitem a vylučoval se v moči. Z těchto studií nebylo možné stanovit, jak změnilo podávání IP6 endogenní IPS. Není jasné, jak mění IP6 růst tumorů, když se podává orální cestou.

90

INOSITOLOVÉ LIPIDY A TRANSDUKCE SIGNÁLŮ DO JÁDRA

Lucio Cocco, Alberto M. Martelli a Francesco A. Manzoli

Laboratoř pro výzkum buněčných signálů, Katedra anatomie, Bolognská univerzita, Itálie

Jádro je vybaveno inositid-specifickými fosfolipázami C (PI-PLC), kinázami na inositolové lipidy a inositolové fosfáty a fosfatázami. Izofomy PI-PLC, které mají sídlit v jádře, se liší nejen podle zkoumaných buněčných linií či tkání, ale také v závislosti na metabolickém stavu. Ačkoli představuje β rodina PI-PLC častěji zastoupenou rodinu izozymů v jádru několika buněčných typů, lze zde nalézt i jiné PI-PLC, jako je γ 1, γ 4 a γ 1, přičemž posledně uvedený se účastní především přenosů mezi cytoplazmou a jádrem. Bylo prokázáno, že jaderný PI-PLC β 1 se přímo účastní řízení buněčného cyklu a že má přímý vliv na signálovou aktivitu při progresi G1. Co se týká regulování jaderné aktivity PI-PLC, neodpovídá možnost, že by bílkovina s vazbou na GTP mohla být zodpovědná za aktivaci jaderného PI-PLC- β 1, doposud shromážděným údajům. Získali jsme experimentální důkazy, že ve třech systémech, v nichž byly dány klidovým buňkám, tj. přirozeným zabíječům (NK buňky) stimulovaným interleukinem-2 (IL-2), NIH 3T3 fibroplastům stimulovaným inzulínem a švýcarským 3T3 fibroplastům stimulovaným IGF-1, mitogenní stimuly, prochází jaderný PI-PLC β 1 fosforylací v serinovém residuu (982) vyvolanou aktivovaným MAPK, který se translokuje do jádra. Dále jsme ukázali přítomnost negativního zpětnovazebného řídicího mechanismu zahrnujícího PKC γ , který je přitahován do jádra DAG generovaným jaderným PI-PLC β 1, jež znečitlivuje cyklus inositolových lipidů v jádru. Chromozomální lokalizace nabízí pro roli jaderného PI-PLC β 1 i jiné možnosti. Krysí gen kódující PI-PLC β 1 se spojuje v chromozomu 3q35-36, tedy

oblasti, která se u krysích tumorů indukovaných chemickou karcinogenezí často přeskupuje. Také jsme naklonovali lidský gen a s jeho pomocí zmapovali lidský gen PI-PLC β 1 na chromozomu 20p12, což je oblast, která se v několika pevných lidských tumorech amplifikuje a/nebo deletuje. Navíc jsme nedávno objevili delecí genu PI-PLC β 1 při myelodysplastickém syndromu progredujícím do akutní myeloidní leukémie. To naznačuje, že lidský gen PI-PLC β 1 se může přímo účastnit geneze tumorů.

352

NOVÝ MECHANIZMUS PŮSOBENÍ MBT-0206

*Christoph Brunner, Michael Clemens, Karsten Rodwelski a Kurt Naujoks
Munich Biotech AG, Neuried; Mutterhaus Universität Trier; Klinikum Magdeburg, Německo*

Terapeutická látka MBT-0206 představuje nový lék ve vývoji. Kationtové lipozomální nanočástice zapouzdřující Paclitaxel jako toxickou látku se intravenózně aplikují v několika cyklech. Inherentní rys kationtových lipozomů, totiž jejich schopnost vázat se na aktivované endotelové buňky (McDonald et al.), umožňuje předpokládat, že MBT-0206 dokáže zničit cévy nově vzniklého tumoru a narušit tak jeho růst (Dellian et al.).

Aby se usnadnily klinické studie, bylo zkoumáno několik tkáňových kultur a zvířecích modelů a byl hodnocen mechanismus působení tohoto nového možného léku. Dále byl proveden kompletní program studií ADMET. MBT-0206 se podával jak ve zvířecích modelech, tak při klinických zkouškách buď samostatně, nebo v kombinaci s jinými cytotoxickými léky, jako je Gemcitabine, Carbplatin nebo 5FU. Při zkoumání celkového výsledku několika klinických studií s více než 150 pacienty byly zjištěny udivující rozdíly oproti klasické chemoterapii. Taxol se typicky aplikuje každé tři týdny šest až osmkrát. Po této léčbě obvykle vedlejší účinky, jako je neuropatie, převažují nad přínosem léku a léčení musí být zastaveno. Narušení růstu tumoru je obecně pozorováno již po první či druhé aplikaci.

Ve studiích MBT-0206 spočívaly první známky reakce na lék ve zmírnění bolestí a zlepšení nálady, čímž se u terminálně nemocných pacientů obnovil pravidelný příjem potravy. Po 2 až 4 měsících terapie bylo pozorováno zpomalení růstu nebo dokonce i zmenšení tumorů. Reakce tumorové tkáně na MBT-0206 se v průběhu léčení dokonce zvyšovala. Kvalita života zůstala po dobu léčby vysoká. Deset pacientů bylo léčeno déle než rok, aniž by se u nich objevily známky rezistence na léčbu. Nejlepší reakce byly pozorovány u pacientů s nádory a metastázami v prsu, žaludku či plicích - tedy s typickými indikacemi pro Taxane. U kolorektálních tumorů došlo pouze ke zmírnění bolestí a jen 10 % pacientů reagovalo stabilizováním choroby.

Tyto vynikající výsledky by mohly být vysvětleny ve světle různých preklinických studií. Petzelbauer et al. a Dellian et al. prokázali histologicky i funkčním MRI významnou destrukci krevních cév po léčení látkou MBT-0206. Před léčením se částice MBT-0206 omezují na krevní oddíl a obvykle neprosakují fenestrací cév v játrech či tumorech. Perforace tumorových cév indukovaná látkou MBT0206 poté umožňuje obohacení částic obsahujících cytotoxické sloučeniny v tumorové trámčině. Udržení rezistence na více léků vyžaduje energii. V nepřítomnosti specifického selekčního tlaku ztrácejí buněčné kultury rezistentní na Taxol časem svou rezistenci. Je možné, že léčba pomocí MBT-0206 dostává tumor do stavu energetického nedostatku indukujícího - stejně jako v tkáňové kultuře - ztrátu energeticky náročné rezistence na více léků. Při tomto působení lze MBT-0206 považovat

za významně odlišný a lepší než jiné antiangiogenní léky. Předkládáme data, jež tuto hypotézu podporují.

191

FARMAKOKINETIKA IP-6. OD KRYS K LIDEM

F. Grases

Laboratoř pro výzkum renální litiázy, Fakultní ústav lékařský (IUNICS), Univerzita Baleárských ostrovů, Španělsko

Přítomnost InsP6 ve tkáních a biologických tekutinách savců je dobře známou skutečností. Také byla stanovena existence intracelulárního InsP6 v buňkách savců, přestože je obtížné určit jeho přesnou subcelulární lokalizaci. Role InsP6 uvnitř buněk savců je komplexní záležitost, která i přes nedávný pokrok vyžaduje další objasnění. Byla však zjištěna významná extracelulární funkce jako krystalizačního inhibitoru patologické kalcifikace a jako antioxidantu. Z těchto vlastností lze vyvodit důležité přínosy pro zdraví, např. při prevenci vzniku ledvinových kalciových kamenů nebo některých rakovinových procesů. InsP6 je v hojné míře přítomen v semenech rostlin. Proto lze jeho velké množství nalézt v celých obilovinách a dalších jedlých rostlinných semenech, jako jsou luštěniny a oříšky, které představují důležitou součást stravy savců. Je zde diskutován vztah mezi požitím InsP6 a jeho distribucí v různých savčích tkáních.

Studie na zvířatech: InsP6 byl nalezen v krvi, moči, intersticiálních a intracelulárních tekutinách savců, přičemž hladiny nalezené v moči, krvi a tkáních krys byly jasně závislé na jeho příjmu v potravě. Když byl InsP6 z potravy eliminován, došlo ke znatelnému snížení jeho hladiny v tekutinách (krvi a moči) i orgánech. Léčba maligních buněk pomocí InsP6 však nepřinesla významný rozdíl v intracelulární koncentraci InsP6, ale došlo k významnému zvýšení koncentrace InsP6. Studie lokálního podávání InsP6 formou zvlhčujícího krému prokázala významnou absorpci InsP6 přes kůži způsobující vysoké hladiny v moči, které při orálním podávání nebylo možné dosáhnout (zhruba desetinásobek maximálního množství dosaženého při orálním podávání). To ukazuje, že by bylo možné navrhnout lokální aplikaci jako novou cestu podávání InsP6.

Studie na lidech: Podobně jako u krys strava bez fyátů významně snížila hladiny InsP6 v moči a plazmě. Maximální hladiny InsP6 v plazmě po požití jedné dávky 1400 mg InsP6 (jako soli dodecasodia) byly dosaženy po 4 hodinách. Stejně jako u krys existuje zřejmě optimální množství pro příjem, přičemž vyšší dávky již nezvyšují absorpci. Bylo zjištěno, že je to 20,9 mg.kg-1.den-1 u zvířat, což extrapolováno na člověka o váze 70 kg znamená, že minimální příjem zajišťující maximální absorpci činí 1463 mg InsP6 denně, a to nezávisle na typu konzumované soli InsP6. Studie různých stavů žaludku před podáním InsP6 (nalačno, nalačno s alkalizující látkou a po jídle) prokázala, že po 8 hodinách nedošlo u těchto tří stavů k žádným rozdílům mezi profily exkrece, což naznačuje, že celková absorpce InsP6 probíhá nezávisle na stavu žaludku (po jídle nebo nalačno). Absorpce InsP6 tedy zřejmě probíhá při průchodu trávicím ústrojím. Závěry: Většina extracelulárního InsP6, který se nachází v orgánech, tkáních a biologických tekutinách savců, má dietní původ a není důsledkem endogenní syntézy, zatímco intracelulární InsP6 zřejmě vzniká v buňkách. Absorpce InsP6 ze stravy probíhá v celém gastrointestinálním traktu v nízkém procentu a k depleci extracelulárního InsP6 dochází rychleji, když je konzumována strava s nízkým obsahem

InsP6. Z těchto výsledků lze usoudit, že zdravotní přínosy spojené s extracelulárním InsP6 musí souviset s příjmem InsP6 v potravě.

355

ZVÝŠENÉ ZÁSOBOVÁNÍ KYSLÍKEM ČERVENÝMI KRVINKAMI OBSAHUJÍCÍMI INOSITOL TRIPYROFOSFÁT (ITPP): ZÁKLAD TERAPIE RAKOVINY?

Claude Nicolau, Jean-Marie Lehn, Konstantina Fylaktakidou, Ruth Greferath, Claudine Kieda a Marc Aprahamian

Friedmanovo středisko pro výzkum stravy, Tuftova univerzita, Boston, MA 02115, USA; Institut de Recherche contre les Cancers de l'Appareil Digestif, Place de L'Hopital, 67091 Strasbourg; ISIS-Université Louis Pasteur, 67083 Strasbourg; Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, 45071 Orléans, Francie

Kyslíková homeostáza je základním kamenem fyziologických i intermediárních metabolických systémů. V mnoha případech je tkáňová hypoxie důsledkem neadekvátního přísunu kyslíku, což narušuje biologické funkce. Například u tumorů je hypoxie primárně patofyziologickým důsledkem strukturálně a funkčně narušené mikrocirkulace a zhoršení difúzních podmínek. Aby bylo obnoveno normální okysličování tkání, zavádíme při narušeném průtoku krve inositol hexafosfát (IHP), silný alosterický efektor hemoglobinu do červených krvinek, a to pomocí celé řady fyzikálních ex vivo metod s velice významnými fyziologickými důsledky. Nedávno jsme vyvinuli nový alosterický efektor hemoglobinu, inositol tripyrofosfát (ITPP)6, který dokáže přejít plazmatickou membránu červených krvinek a posunout hodnotu P50 RBC-hemoglobinu in vitro i in vivo.

Ukázali jsme, že zvýšená schopnost lidského ITPP-RBC uvolňovat O₂ (např. P50 = 43,1 vs. 31,4 Torr při kontrolním RBC) při hypoxii inhibuje v lidských liniích endotelových buněk v kultuře za přítomnosti těchto červených krvinek angiogenezi, expresi VEGF a HIF-1?. Inkubovali jsme plnou lidskou krev po dobu jedné hodiny s ITPP (30 mM) v pufru bis-tris při pH=7, pokojové teplotě a osmolaritě ~300 mOsm. Poté jsme změřili hodnotu P50 a porovnali ji s hodnotou kontrolní krve. Pozorovali jsme „pravý posun“ oxy-hemoglobinové disociační křivky ve výši 37 %. Kultivovali jsme několik linií lidských mikrovaskulárních endotelových buněk za přítomnosti RBC s obsahem ITPP (P50 = 31,4 Torr), abychom zkontrolovali, zda vyšší uvolňování O₂ vyvolané ITPP-RBC bude inhibovat angiogenezi. Rostoucí endotelové buňky v přítomnosti volného ITPP angiogenezi nijak neinhibovaly. Při hypoxii byla exprese VEGF v kultuře za přítomnosti ITPP-RBCs silně redukována; exprese HIF-1? byla zcela potlačena.

131

ANTIANGIOGENNÍ ÚČINEK INOSITOL HEXAFOSFÁTU (IP6)

I. Vucenik, A. Passaniti¹, M.I. Vitolo, K. Tantivejkul, P. Eggleton a A.M. Shamsudin
Univerzita v Exeteru, Velká Británie; Katedra patologie, Univerzita v Marylandu; Lékařská fakulta Baltimore, MD, USA

Z celé řady rakovinových modelů byl hlášen významný protirakovinový účinek přirozeně se vyskytujícího sacharidu inositol hexafosfátu (IP6). Protože tumory potřebují pro svůj růst a metastázy angiogenezi, domníváme se, že IP6 redukuje růst tumorů tím, že angiogenezi inhibuje. Protože angiogeneze závisí na interakci mezi endotelovými a nádorovými buňkami, zkoumali jsme účinek IP6 na obojí. IP6 inhiboval proliferaci a indukoval diferenciaci

endotelových buněk in vitro; růst bovinních endotelových buněk (BAEC) hodnocený podle analýzy proliferace MTT byl inhibován v závislosti na dávce ($IC_{50} = 0,74$ mM). Kombinace IP6 a vazostatinu, fragmentu kalretikulínu s antiangiogenním účinkem, byla synergicky lepší při inhibici růstu než obě sloučeniny samostatně. Na rekonstituované extracelulární matrix, Matrigelu, inhiboval IP6 vznik lidských endotelových žilních buněk (HUVEC) (kapilární diference in vitro) a narušoval již vytvořené trubice.

212

APOPTÓZA TUMOROVÝCH BUNĚK ZPŮSOBENÁ IP6: POTENCIACE HISTONEM

Masato Hirata, Miho Matsuda, Ferry Sandra a Nori-aki Matsuki

Fakulta dentálních věd, Univerzita v Kyushu, Fukuoka 812-8552, Japonsko

Inositol hexafosfát (IP6) je látka přirozeně se vyskytující v rostlinných semenech a buňkách savců. Protirakovinové účinky IP6 se studují na nejrůznějších modelech karcinogeneze. Informace o mechanismu, jakým IP6 účinkuje proti rakovině, jsou však stále nedostatečné, a protože tento účinek vyžaduje relativně vysokou koncentraci látky, znesnadňuje to využívání IP6 jako léku proti rakovině. V této studii jsme zkoumali mechanismus, jakým IP6 působí jako protirakovinová látka, a zkoušeli jsme snížit účinnou koncentraci IP6. Aplikace IP6 do buněk HeLa v dávce 1 mM indukovala podle stanovení buněčného počtu a barvení metodou podle Hoechst a TUNEL apoptózu. Je to pravděpodobně způsobeno intracelulárním IP6 samotným a/nebo defosforylovanými formami metabolizovaného IP6, protože inkubace buněk HeLa s $[3H]IP6$ produkuje defosforylované formy, jako je IP4 a IP5. Analýzy extraktů z buněk inkubovaných s $[3H]IP6$ po dobu 6 hodin pomocí kolony s aniontovou výměnou ukázaly, že hlavními metabolity v buňkách HeLa byly $I(1,2,3,4/6)P4$ a $I(1,2,3,4/6)P5$. Indukci apoptózy pomocí IP6 jsme zkoumali dvěma způsoby: inhibicí signálů přežití buňky a přímou indukcí apoptózy. Aplikace TNF nebo inzulinu do buněk HeLa stimulovala dráhu Akt-NFKB, tedy signál přežití buňky, což zahrnuje fosforylaci Akt a IKB, jadernou translokaci NFKB a transkripční aktivitu NFKB-luciferázy. IP6 všechny tyto buněčné procesy blokoval, ale aktivita PI3K nebyla ovlivněna. IP6 nejen inhiboval dráhu Akt-NFKB, ale vyvolával také mitochondriální permeabilizaci, po níž následovalo uvolnění cytochromu c, ten zase aktivoval apoptický proces, kaspázy 9,3 a poly (ADP-ribózu) polymerázu. Když byl IP6 aplikován společně s histonem, byla buněčná akumulace metabolitů $[3H]IP6$ zvláště vysoká a účinná koncentrace indukující apoptózu byla zhruba desetkrát nižší. Tyto výsledky ukázaly, že extracelulárně aplikovaný InsP6 přímo aktivuje apoptický proces a inhibuje signály přežívání buňky zřejmě intracelulárním přenosem, po němž následuje defosforylace.

514

IP6 REGULUJE FOSFORYLACI BÍLKOVIN

Andrew B. Tobin

Katedra buněčné fyziologie a farmakologie, Hodgkin Building, Univerzita v Leicesteru, Leicester, LE1 9HN, Velká Británie

Savčí buňky mají schopnost produkovat celou řadu inositol fosfátů (možná až 60). Nejznámější z nich je 1,4,5-trifosfát, který působí jako druhý přenašeč (second messenger) na G-protein vázané receptory mobilizující intracelulární vápník a spouštějící takové fyziologické procesy, jako je kontrakce hladkých svalů a sekrece. Naproti tomu je biologická

funkce „vyšších“ inositol fosfátů spíše neznámá. Z těchto inositolů je nejzáhadnější inositol hexafosfát (IP6). Tato látka je v mikromolárním množství přítomna ve všech eukaryotických buňkách, ale fyziologická a biochemická role IP6 není zdaleka známá. Pokusili jsme se prozkoumat nové signální dráhy vyšších inositol fosfátů, a proto jsme testovali možnost, že inositol fosfáty mohou přímo aktivovat fosforylaci bílkovin. Naše první studie prokázaly existenci bílkovinné kinázy částečně purifikované z vepřových mozků, kterou bylo možné aktivovat pomocí IP6. Byl to první důkaz toho, že IP6 by mohl přímo aktivovat fosforylaci bílkovin. Poté jsme tyto studie rozšířili a identifikovali jsme IP6- regulovanou kinázu jako všudypřítomnou serin/threonin kinázu, kasein kinázu 2 (CK2). Byl to velice překvapující výsledek vzhledem ke skutečnosti, že CK2 je považováno za konstitutivně aktivní kinázu bez fyziologických regulátorů. Naše studie stanovily, že CK2 nejen zdaleka není konstitutivně aktivní, ale může existovat i ve stavu nízké bazální aktivity. Za těchto podmínek lze aktivitu CK2 dramaticky stimulovat pomocí IP4, IP5 a IP6. Budou zde diskutovány důsledky těchto zjištění pro signalizaci a fosforylaci bílkovin.

145

INHIBICE DRÁHY PI 3-K/AKT INOSITOL PENTAKIFOSFÁTEM MÁ PROAPOPTICKÉ A ANTIANGIOGENNÍ ÚČINKY IN VITRO I IN VIVO

Marco Falasca

Sacklerův institut, Katedra lékařství, Londýnská univerzita, 5, University Street, Londýn WC1E 6JJ, Velká Británie

Do buněčného přežívání, proliferace, invaze a metastáz je zapojena aktivace Akt v kaskádě PI 3-K. Nedávno jsme zjistili, že inositol pentakifosfát (Ins(1,3,4,5,6)P5) inhibuje aktivitu Akt a přes dráhu PI 3-K/Akt indukuje buněčnou apoptózu v několika liniích rakovinových buněk. Bylo dostatečně stanoveno, že aktivace dráhy PI 3-K/Akt je hlavním krokem v alespoň některých procesech vedoucích k angiogenezi. Cílem této studie bylo prozkoumat potenciální antiangiogenní účinky Ins-1,3,4,5,6-P5. Zde ukazujeme, že hlavním krokem při bFGF-mediovaném přežití a hybnosti lidských endotelových buněk z pupečnickové žíly (HUVEC) je (b-FGF)-indukovaná Akt fosforylace základního fibroplastového růstového faktoru. Při zkoumání účinků Ins-1,3,4,5,6-P5 na signalizaci bFGF jsme zjistili, že Ins-1,3,4,5,6-P5 inhibuje bFGF-mediovanou Akt fosforylaci a přežití v buňkách HUVEC. Kromě toho Ins-1,3,4,5,6-P5 blokuje bFGF-mediovanou migraci. Ve všech těchto analýzách byly ostatní testované inositol polyfosfáty neaktivní. V souhrnu tato data ukazují, že inhibice Akt pomocí Ins-1,3,4,5,6-P5 může mít antiangiogenní účinky. Abychom tuto hypotézu zkontrolovali, provedli jsme analýzy in vitro a in vivo a zjistili jsme, že Ins-1,3,4,5,6-P5 specificky inhibuje bFGF-mediovaných vznik kapilárových trubiček buněk HUVEC nanesených na matrigelu. Když jsme injekčně aplikovali bFGF společně s matrigelem nebo matrigel obsahující různé inositol polyfosfáty myším Balb-c, pozorovali jsme, že v přítomnosti Ins-1,3,4,5,6-P5 byla bFGF-indukovaná angiogenní reakce zcela potlačena. Tato data definitivně identifikují Akt inhibitor Ins-1,3,4,5,6-P5 jako specifický proapoptický a antiangiogenní faktor.

4

PREVENCE RAKOVINY PROSTATY POMOCÍ IP6: ZAMĚŘENÍ NA REGULACI BUNĚČNÉHO CYKLU

Rajesh Agarwal

Oddělení farmaceutických věd, Katedra farmakologie, Lékařská fakulta univerzity v Coloradu, Denver, CO 80262, USA

Narušení regulace postupu buněčného cyklu je základní kauzální příčinou růstu a rozvoje všech forem rakoviny včetně rakoviny prostaty (PCA), která je u západní mužské populace nejčastěji diagnostikovanou malignitou a druhou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu. Vzhledem k tomu, že je velká většina starších mužů považována za „populaci s vysokým rizikem“ a protože progres rakoviny prostaty koreluje s narůstajícím věkem, mohly by potravinové doplňky využívající chemoprevence představovat lepší způsob zvládnání této smrtelné zhoubné nemoci. Prevence rakoviny prostaty je velmi důležitá také proto, že žádný z dostupných léků nedokáže rakovinu prostaty zcela vyléčit.

Inositol hexafosfát (IP6), látka nacházející se v potravě, prokázal slibnou účinnost proti různým druhům rakoviny, u rakoviny prostaty jsou však klinické zkušenosti s IP6 jen velmi omezené. V posledních letech jsme zaměřili pozornost na stanovení účinnosti IP6 v modelech rakoviny prostaty a na definování mechanismu působení na buněčný cyklus a regulaci apoptózy. Protože růst rakoviny prostaty závisí v počátečních fázích na androgenech a po androgen-ablativní terapii se stává nezávislým, provedli jsme studie s použitím buněk LNCaP i DU145, které představují androgen-dependentní model, respektive androgen-nedependentní model rakoviny prostaty. Studie, které jsme provedli, ukazují, že IP6 indukuje v lidských buňkách PCA LNCaP a DU145 inhibitor cyklin-dependentní kinázy (CDKI) Kip1/p27 a Cip1/p21 a že tato indukce vyvolává jejich zvýšenou interakci s cyklin-dependentními kinázami (CDK) a cykliny vyvolávajícími téměř úplné snížení kinázové aktivity CDK a cyklinů. Tyto účinky IP6 vedou nakonec k poklesu hyperfosforylované (a současně nárůstu hypofosforylované) formy retinoblastomu (Rb) nebo Rb-příbuzných bílkovin v lidských buňkách PCA, jež působí jejich zvýšenou interakci s E2F a následně sníženou regulaci E2F-regulovaných genů zapojených do postupu buněčného cyklu a růstu PCA. Výsledný biologický efekt těchto změn regulátorů buněčného cyklu spočíval v zastavení G1 a inhibici buněčného růstu lidských buněk PCA LNCaP i DU145. V jiných studiích vyvolával IP6 apoptózu buněk LNCaP v závislosti na dávce a čase a snížení hladin Bcl2, což mělo za následek velké zvýšení poměru Bax versus Bcl2 a inhibici konstitutivně aktivní fosforylace AKT. V buňkách DU145 vyvolala aplikace IP6 apoptózu neboli buněčnou smrt aktivací kaspáz. V preklinických studiích prevence PCA potlačoval IP6 v pitné vodě růst hormon-refrakterního lidského tumoru prostaty, aniž by v průběhu celé studie měl nežádoucí účinky na přírůstek tělesné hmotnosti či spotřebu jídla a pití. Přestože je třeba u těchto tumorových tkání teprve stanovit základní molekulární procesy související s regulací buněčného cyklu a apoptózou, již provedené studie ukazují, že xenogenní štěpy ošetřené IP6 vykazují významné snížení PCNA-positivních buněk (tj. jedna z E2F cílených molekul), ale vyšší populaci apoptických buněk. Na základě těchto provedených studií doporučujeme provést další preklinické studie účinnosti IP6 na PCA v takových modelech, jako je TRAMP. Předpokládáme, že pozitivní výsledky nových studií společně s našimi studiemi by mohly tvořit dostatečný základ pro klinické zkoušky IP6 u pacientů s rakovinou prostaty.

POTLAČENÍ ONKOGENEZE POMOCÍ INHIBITORŮ PŘENOSU SIGNÁLŮ*Edith Oláh**Oddělení molekulární genetiky, Národní ústav onkologie, H-1525 Budapešť 114, Pf 21
Maďarsko*

Rakovinu můžeme považovat za důsledek dynamických změn genomu, k nimž dochází v důsledku genetických procesů přebírajících kontrolu nad fyziologickou funkcí normální buňky. Tyto genetické procesy zprostředkovávají patologické účinky buď aktivací onkogenů, nebo deaktivací genů potlačujících tumory. Předkládáme důkazy, že chybná regulace malého počtu klíčových drah přenosu signálů způsobená těmito rakovinovými geny je charakteristickým rysem mnoha běžných forem rakoviny. Poškození těchto rakovinových genů potencuje přežívání buněk, jejich množení a hlavní prvky v progresi tumoru. Cílená deaktivace neboli oprava těchto poškozených genových produktů může působit proti vlivu genetických procesů způsobujících tumorigenezi a mohla by představovat účinnou terapii rakoviny. Onkogeny jsou ideálním cílem pro terapie, které potlačují expresi genů. Metody efektivní změny exprese genů in vivo však až doposud selhávaly. V nedávné době se podařilo dosáhnout úspěchu s inhibitory onkoproteinové funkce malých molekul. Stále však potřebujeme strategie účinného potlačení onkogenů. V tomto příspěvku jsou shrnuty nejnovější zjištění z odborné literatury, které identifikují a charakterizují některé cílové geny ve vztahu ke klíčovým drahám signálů u rakovinových buněk včetně dráhy signálu fosfoinozitud 3-kinázy. Dále budeme prezentovat výsledky našich souvisejících pokusů. Tyto studie jsou založeny na hypotéze, že pochopení, jak inaktivace onkogenů dokáže zvrátit či inhibovat rakovinu, je důležité jednak pro definování molekulární patogeneze rakoviny, jednak pro vývoj nových způsobů léčení na molekulární bázi.

CHEMOPREVENCE RAKOVINY KŮŽE POMOCÍ IP-6 PROSTŘEDNICTVÍM DRAH BUNĚČNÝCH SIGNÁLŮ*Zigang Dong**Hormelův institut, Univerzita v Minnesotě, 801 16th Avenue NE, Austin, MN 55912, USA*

Inositol hexafosfát (InsP6) má v řadě experimentálních modelů včetně modelů myší kůže efektivní protirakovinové účinky. Předpokládáme, že ultrafialové záření (UVB) má karcinogenní účinky související s expozicí slunečnímu záření, přičemž změna přenosu signálů indukovaná UVB souvisí s UVB-indukovanou karcinogenezí. Zjistili jsme, že účinky InsP6 na UVB-indukovaný přenos signálů silně blokují transkripční aktivity UVB-indukovaného aktivátoru protein-1 (AP-1) a jaderného faktoru KB (NF-KB), a to v závislosti na dávce. InsP6 dále potlačoval UVB-indukované vazebné aktivity AP-1 NF-KB na DNA a inhiboval UVB-indukovanou fosforylaci extracelulárních signálem regulovaných protein kináz (Erk) a terminálních kináz c-Jun NH2 (JNK). Fosforylace kináz p38 nebyla ovlivněna. InsP6 blokoval UVB-indukovanou fosforylaci IKB- β , o němž je známo, že inhibuje transkripční aktivity NF-KB. InsP6 také blokoval kinázovou aktivitu TPA nebo EGF-indukovaného fosfatidylinositolu-3 (PI-3). Protože jsou AP-1 a NF-KB důležitými jadernými transkripčními faktory, jež souvisejí s rozvojem tumorů, naše práce naznačuje, že InsP6 brání karcinogenezi kůže inhibicí transkripčních aktivit AP-1 a NF-KB.

InsP6 JAKO ESENCIÁLNÍ INTEGRÁTOR MEMBRÁNOVÉ VÝMĚNY

Per-Olof Berggren

Středisko pro výzkum diabetu Rolfa Lufta, Oddělení molekulární medicíny, Karolinska Institutet Stockholm, Švédsko

Inositol hexafosfát (InsP6) se tvoří po aktivaci systému fosfolipázy C přes komplexní dráhy metabolismu inositol fosfátu. Prokázali jsme, že InsP6 přímo stimuluje jak exocytózu, tak i endocytózu a že posiluje proud procházející přes napěťově dependentní kanál Ca²⁺ typu L v pankreatických β-buňkách. Přímý vliv InsP6 na exocytózu je podobný vlivu hlavního InsP5 v buňkách, INS(1,3,4,5,6) P5, a závisí zřejmě na KPC?. Vliv InsP6 na endocytózu je zprostředkován dynamimem a závisí na kalcinurina-indukované defosforylaci, aktivaci PKC, inhibici synaptojaninu a vzniku PtdIns(4,5)P2. Vliv InsP6 na kanál Ca²⁺ typu L je zprostředkován alespoň částečně inhibicí aktivity serin/threonin protein fosfatázy. Naše studie neuronů potvrdily, že účinek InsP6 se týká specificky kanálů Ca²⁺ typu L. Dále jsme zjistili, že InsP6 může aktivovat adenylát cyklázu, což je klíčový aspekt sekreci stimulujících vazeb v β-buňkách. Naše studie beta buněk navíc prokázaly, že po glukózové stimulaci dochází k malému, ale konzistentnímu přechodnému zvýšení koncentrace InsP6 a že dočasné změny InsP6 dobře korelují s počátečním vzrůstem [Ca²⁺]_i zprostředkovaným přes kanály. Malé změny koncentrace InsP6 naznačují existenci malé, metabolicky aktivní, ale fyzikálně distinktivní membránové výměny tohoto inositol polyfosfátu. Naše data tedy prokazují, že InsP6 se účastní modulace vedení signálů v pankreatických beta buňkách a hraje nezastupitelnou integrální roli v přestupu přes membránu.

2

RIBAVIRIN V LÉČBĚ HEPATITIDY C

Margit E. Abonyi a Peter L. Lakatos

1. lékařská fakulta, Univerzita Semmelweis, Koranyi Sandor str. 2/a, 1083 Budapešť, Maďarsko

Virus hepatitidy C (HVC) je hlavní příčinou chronického onemocnění jater na celém světě, přičemž infikováno je zhruba 170-200 milionů lidí. Viry HVC se přenášejí krví a krevními produkty. V současné době k takovému přenosu dochází především při injekční aplikaci drog, pohlavním styku s infikovaným partnerem nebo více partnery a při profesionální expozici. Závažnost onemocnění se liší, může jít o mírnou chronickou hepatitidu nebo až cirhózu a hepatocelulární karcinom (HCC). Referenční léčbou je v současnosti kombinovaná terapie interferonem a ribavirinem, což je inhibitor IMP dehydrogenázy a imunomodulátor. Účinnost léčby byla v našich klinických zkouškách 87 % u pacientů infikovaných genotypem HCV 2 nebo 3, zatímco u pacientů infikovaných genotypem HCV 1 byla odezva na léčení 66 %. Současné kombinované léčení má značné vedlejší účinky a je někdy velmi špatně tolerováno. Genotypy HCV 2 a 3 lze léčit nižší dávkou ribavirinu a terapie bývá kratší, jen 24 týdnů v porovnání s 48 týdny u pacientů trpících genotypem 1. Stále více se prosazuje názor, že akutní léčba infekce HCV souvisí se silnou intrahepatickou odezvou antivirových T buněk CD4+ a CD8+ a zvýšenou aktivitou T(H)1 a „přirozených zabíječů" (NK buněk). Jako klíčový determinant byl identifikován genotyp před léčením a odezva na léčení ve 12. a 24. týdnu, což je rozhodující pro rozhodnutí, zda má být v léčbě pokračováno. Zvýšené hladiny feritinu a depozice hepatického železa, jakož i hepatická steatóza a vysoké hladiny ALT s chronickou

hepatitidou C jsou rizikovými faktory pro vznik HCC. Heterozygotní charakter mutace C282Y v HFE přispívá u chronické hepatitidy C k akumulaci železa a postupu fibrózy. Ribavirin může v závislosti na dávce působit reverzibilní hemolytickou anémii, kterou lze léčit snížením dávky RBV nebo podáváním epoetin alfa v dávce 40,000 IU týdně, aniž by bylo nutné snižovat optimální dávkování RBV. U pacientů, kterým byl podáván ribavirin samotný, se sérové hladiny ALT a nekrotické a zánětlivé změny v histologii jater zlepšily, zatímco symptomy, hladiny HCV RNA a skóre hepatické fibrózy se oproti základním hodnotám výrazněji nezměnilo. U pacientů trpících současně infekcí HCV a HIV se zahajuje léčení, když je počet lymfocytů CD4 nad 350/ml, a předtím, než je nutno zahájit antiretrovirovou léčbu (ART).

547

STANOVENÍ STRATEGIE PRO CÍLENÝ PŘENOS SIGNÁLŮ V RAKOVINOVÝCH BUŇKÁCH

George Weber

Laboratoř experimentální onkologie, Univerzita v Indianě, Lékařská fakulta, Indianapolis, IN 46202-5119, USA

Zvýšená schopnost přenosu signálů dává rakovinovým buňkám selektivní výhodu a nabízí také potenciálně citlivý cíl pro léky. Návrh terapeutického cílení zvýšeného přenosu signálů v rakovinových buňkách je založen na vlastnostech tří enzymatických kroků v produkci IP3.

1. Aktivity prvního enzymu, jež se tohoto procesu účastní, PI 4-kinázy a aktivity druhého rychlost omezujícího enzymu IP-6 4,5-fosfát kinázy jsou velmi nízké, a to v rozsahu aktivit ribonukleotidové reduktázy. Aktivita fosfolipázy C (PLC) je však vysoká. Tyto vztahy naznačují, že by mohlo být užitečné zaměřit se na dvě kinázy s nízkou aktivitou. 2. Také PLC můžeme považovat za cíl, protože jeho aktivita je zcela závislá na koncentraci jeho koenzymu GTP. 3. Poločas (t_1) obou dvou kináz v různých tkáních je krátký, a to zejména v kostní dřeni, kde $t_1 = 12$ minut.

Naše studie ukázaly, že bioflavonoidy, quercetin a genistein dokážou s určitou selektivitou inhibovat kinázy. Také jsme prokázali, že tiazofurin a ribavirin selektivně snižují koncentraci GTP, která omezuje kapacitu PLC, a to inhibicí zvýšené IMP dehydrogenázové aktivity rakovinových buněk.

Vzhledem k potenciální citlivosti kináz v jejich poločase a závislosti PLC na hladinách GTP a také proto, že tiazofurin, ribavirin, quercetin, genistein a tamoxifen útočí na různé části buněčného cyklu, nabízejí kombinace některých z těchto léků citlivé chemoterapeutické strategie.