

A KERINGÉSI RENDSZERBEN TALÁLHATÓ BIZONYOS KISMOLEKULÁK DAGANATELLENES HATÁSA

A PASSZÍV TUMORELLENES VÉDELMI RENDSZER MŰKÖDÉSE ÖSSZEFOGLALÓ KÖZLEMÉNY

Kulcsár Gyula dr., Czömpöly Tamás dr., Immunál Kft., Rákkutató és Termékfejlesztő Laboratórium

Összefoglalás

Az alábbi összefoglaló cikkünkben a Culevit Rákkutató és Termékfejlesztési Program alapjául szolgáló tudományos eredményeinkről számolunk be. A program keretében kifejlesztett termékcsalád Magyarországon is forgalomban van már tizenkét éve.

Szervezetünk daganatellenes védelmi rendszere magában foglalja a DNS károsodását érzékelő és kijavító rendszereket, a sejtciklust szabályozó folyamatokat, az apoptózis szabályozásában szerepet játszó molekulákat, és az immunrendszer daganatellenes hatását.

Epidemiológiai és kísérletes adatok alapján azonban arra a következtetésre jutottunk, hogy az eddig ismert immunrendszernek nincs kizárólagos szerepe a daganatkeletkezés elleni védelemben, és feltételeztük egy a nem-immunológiai és az immunológiai felügyeletől is eltérő védelmi rendszer létezését.

Kutatásaink során felismertük, hogy ezen általános hatású tumorelles védelmi rendszer hatóanyagai a keringési rendszerben található bizonyos

kismolekulák. Szervezetünk normál, egészséges sejteire jellemző, hogy bennük e kismolekulák felvétele szigorúan szabályozott, a szükségleteknek megfelelő, ugyanakkor az említett molekulák többségének a tumorsejtek általi felvétele fokozott, és csak a hozzájutás mértékétől függ. A ráksejtek által felhalmozott molekulák közül néhánynak viszont a tumorelles védelemben való részvétel a feladata és nagy mennyiségben bejutva a daganatsejtekbe, apoptózist indukálva pusztítják el azokat.

Kísérleti úton kerültek meghatározásra –a keringésben előforduló kismolekulák közül– az általunk Passzív Tumorelles Védelmi Rendszernek elnevezett védelem hatóanyagai, majd azok keverékének szelektív, általános és direkt ráksejt pusztító hatását sejt- és állatkísérletekkel igazoltuk. E védelmi rendszer hatásmechanizmusát vizsgálva kísérletekkel támasztottuk alá az apoptózis-indukciót.

A fentiek gyógyászati jelentőségét abban látjuk, hogy a védelmi rendszer hatóanyagainak tartós, egyidejű és nagy mennyiségű adásával a szervezet saját daganatellenes védelmi rendszere erősíthető.



Dr. Kulcsár Gyula



Dr. Czömpöly Tamás

Kulcsszavak

daganatellenes
hatás,
apoptózis,
kemoterápia,
sugárkezelés,
rezisztens sejtek

Keywords

Anti-tumor effect,
apoptosis,
chemotherapy,
radiation,
resistant cells

Abstract

In this review article we summarize our scientific results which provide the basis for the Culevit Cancer Research and Product Development Program. The product family which has been developed during the program is commercially available in Hungary for twelve years.

The anti-tumor defense system of the human body includes the DNA damage sensing and repair systems, the cell cycle regulatory pathways, molecules controlling apoptosis, and the anti-tumor activity of the immune system.

On the basis of epidemiological and experimental data we noted that the immune system has no exclusive role in the defense against tumors, and assumed the existence of a defense system which differs from the non-immunological and immunological surveillance mechanisms.

During our research we recognized that the active substances of this general anti-tumor defense system are certain small molecules found in the circulatory system. The normal, healthy cells of our body are characterized by a strictly controlled small molecule uptake which is in accord with the needs, while the increased uptake of the majority of these molecules is a characteristic of the tumor cells, and this uptake is only proportional with the availability. Some of the substances accumulated by the tumor cells play a role in the anti-tumor protection and by getting into the tumor cells in such large quantities they destroy the tumor cells by inducing apoptosis.

The active ingredients of defense called the Passive Anti-tumor Defense System have been identified and selected from the small molecules found in the circulatory system by experimental methods. The selective,

general and direct tumor-killing effect of the mixture of these active ingredients was verified by our cell- and animal experiments. Experiments performed for studying the mechanism of action of this defense system confirmed the induction of apoptosis.

The medical significance of the discovery lies in the possibility of strengthening the anti-tumor defense system of the body by administering the active ingredients of the defense system continuously, simultaneously, over a longer period and in high amounts.

Bevezetés

A daganatellenes védelmi rendszer számos összetevőből áll, többek között magában foglalja a DNS károsodását érzékelő és kijavító rendszereket (DNS-repair), az egyes gének kifejeződésére is hatással lévő epigenetikai tényezőket, a sejtciklust szabályozó folyamatokat, valamint az apoptózis szabályozásában szerepet játszó molekulákat.¹ Ezen együttesen nem-immunológiai „felügyelet”-nek is nevezett védelmi mechanizmus a ráksejtek keletkezését hivatott megakadályozni.

A fentiek ellenére keletkező ráksejteket a szervezet egy második védelmi vonalának, az immunrendszernek kellene elpusztítani, hogy megakadályozza a daganatok kialakulását. Paul Erlich felvetése nyomán² csaknem egy évszázada foglalkoztatja a tudományos közvéleményt az immunrendszer daganatellenes hatása.

Mintegy ötven évvel ezelőtt, főként daganat transzplantációs kísérletek eredményei alapján, Sir Macfarlane Burnet és Lewis Thomas megfogalmazták hipotézisüket egy immunológiai alapon működő daganatellenes védelmi rendszerről, amely immunológiai felügyelet („immunological surveillance”) néven vált ismertté.³⁻⁶

A genetikai manipulációval létrehozott, molekuláris szinten meghatározott immundeficienciával rendelkező kísérletes állatmodelleknek köszönhetően mára nagy mennyiségű kísérletes adat gyűlt össze az immunrendszer és a malignusan transzformált sejtek kölcsönhatásáról.⁷ Ezek alapján általánosan elfogadott, hogy a veleszületett és az adaptív immunrendszer sejtjes, illetve molekuláris elemei hatékonyan képesek felismerni a vírusok (pl. EBV, HPV, HHV, HBV, HCV) által okozott, vagy a kémiai karcinogénekkal indukált daganatok többségét.

Az immunrendszer kémiai karcinogénekkal kiváltott, vagy spontán képződő daganatokra kifejtett hatását többek között a T, B, és NKT sejt hiányos RAG2 deficiens egérmoddellen⁸, INF- γ hiányos egérmoddellen, perforin hiányos egérmoddellen⁹, és nemrégiben NKG2D (egy NK sejtek által is expresszált C-típusú lektin receptor) deficiens egérmoddellen¹⁰ végzett kísérletekkel vizsgálták. Ezen állatkísérletekből kiderült, hogy az immunrendszer valamely komponensének funkcionális károsodása esetén megnövekszik bizonyos daganatok (főként lymphomák, eptiheliális carcinomák) előfordulási gyakorisága, de nem az összes daganatféleségé.

Ugyanakkor szintén általánosan elfogadott nézet, hogy a daganatellenes immunválasz szelekciós nyomást fejt ki a malignusan transzformált sejtekre. Ez ahhoz vezethet, hogy a kezdetben az immunrendszer számára felismerhető és eliminálható daganatsejtek közül azok lesznek képesek életben maradni és daganatos betegséget okozni, amelyek a daganatsejtekre jellemző genetikai instabilitás miatt folyamatosan zajló mikroevolúciós folyamat következményeként a későbbiekben már nem képezik célpontját a daganatellenes immunválasznak.

Így tulajdonképpen a daganatellenes immunválasz kiszelektálja („immunoediting”) az immunrendszer hatása elől elmenekülni („immune escape”) képes

daganatsejt klónokat, így alacsony immunogenitásával, vagy más mechanizmussal az immunválaszt elkerülni, illetve csökkenteni képessé alakítja („immunosculpting”) a kezdetben immunogén daganatsejteket.^{7, 11, 12} Az immunrendszer általános (nem csupán a potenciálisan onkogén vírusok által okozott daganatok ellen irányuló) hatását nem támasztják alá az AIDS-es betegekben és szervtranszplantáció miatt immunszuppresszív kezelésben részesülő embereken végzett epidemiológiai vizsgálatok¹³⁻¹⁵ sem.

A szakirodalomban jól ismert, hogy AIDS esetén összeomlik az immunrendszer.¹⁶⁻¹⁹ Megfigyelték, hogy egy olyan betegből, akiről a veseátültetés után kiderült, hogy AIDS-es, és ezért visszavonták a transzplantáció után szokásos immunszuppresszánsokat, nem lőködött ki a transzplantátum.²⁰ Ez azt jelenti, hogy az AIDS-esekben az immunrendszer összeomlása olyan mértékű, hogy még az idegen testet sem löki ki.

Tehát, ha az immunrendszer az egyetlen védelmi mechanizmus, ami megakadályozza a daganatok kialakulását, akkor az AIDS-es betegekben az összes fajta rákos megbetegedésnek sokkal gyakrabban kellene kialakulnia, mint a nem AIDS-es populációban.

A klinikai megfigyelések szerint azonban csak néhány tumortípus gyakorisága növekszik meg, elsősorban a Kaposi szarkómáé és a non-Hodgkin lymphomáé.^{21, 22} Nagyon lényeges, hogy az összes többi tumorfajta is kialakul, de nem gyakrabban, mint azokban az embereknél, akiknek az immunrendszere normálisan működik. Ráadásul az AIDS-es gyerekeknél nem növekszik meg a Kaposi szarkóma és a non-Hodgkin lymphoma gyakorisága sem, az AIDS-es homoszexuálisok és a kábítószeresek esetében pedig több százszoros különbség van a gyakoriságok között.^{23, 24} Ebből az következik, hogy a nagyobb gyakoriság oka a Kaposi szarkóma és a non-Hodgkin lymphoma esetében sem lehet az immunrendszer

összeomlása, hiszen akkor ugyanolyan gyakorisággal kellene kialakulniuk mindegyik populációban. Egyre több tudományos megfigyelés bizonyítja, hogy még ezek a daganatok sem az immunrendszer összeomlása miatt fejlődnek ki gyakrabban, hanem más faktorok (pl. vírusfertőzések, a HIV vírus Tat proteinje stb.) játszanak ebben szerepet.^{25,26}

Az epidemiológiai vizsgálatok¹³⁻¹⁵ alapján a virális etiológiával összefüggésbe hozható, klasszikusan AIDS-hez társuló daganatok (mint a fent említett Kaposi-szarkóma, non-Hodgkin lymphoma, cervix carcinoma) mellett, főként olyan daganatok gyakorisága mutat emelkedést, amelyek kialakulásában bizonyítottan vagy gyaníthatóan szerepet játszik valamely virális, illetve bakteriális fertőzés.

Az eddigiekből nyilvánvaló tehát, hogy az immunrendszernek elsősorban a virális eredetű daganatok elleni védekezésben van szerepe¹⁵, ráadásul a daganatsejtekre kifejtett szelekció miatt hozzá is járulhat ahhoz, hogy a malignusan transzformált sejtekből daganatos betegség alakuljon ki. Ez viszont ismételtén csak azt bizonyítja, hogy az immunrendszer nem közvetlenül a daganatok, hanem a vírusok ellen véd.

A fentiekben kifejtett tények alapján levonható az a következtetés, hogy az eddig ismert immunrendszernek nincs kizárólagos szerepe a daganatkezelés elleni védelemben. Ez összhangban van azon megfigyelésekkel, miszerint a spontán tumorok és így a klinikailag gyakori tumorok többsége, ahogy az fent említettük, valószínűleg az immunválasz szelekciós nyomásának következményeképpen nem immunogén.^{27,28}

Természetesen a fenti következtetést nagyon sok egyéb megfigyelés és kísérleti eredmény is alátámasztja, de ezek részletezésére terjedelmi okok miatt itt nincs lehetőség, viszont minden nem részletezett állítás és logikai gondolatmenet, valamint az ezeket

alátámasztó irodalmi hivatkozások és kísérleti eredmények megtalálhatóak az ezzel kapcsolatos korábbi közleményeinkben.^{29,30}

Az immunrendszer alacsony tumorelles hatása arra ösztönözte a kutatókat, hogy egyrészt azt vizsgálják, hogyan tudnak a ráksejtek elmenekülni az immunrendszer hatása elől („immune escape” kutatások), másrészt arra, hogy találjanak valamilyen módot az immunrendszer daganatok elleni hatásának növelésére („immune response modification”). Ugyanazokból a tényekből kiindulva, mi más irányban próbálkoztunk. Megpróbáltuk megmagyarázni, hogy mi az oka annak, hogy az immunrendszer alacsony tumorelles hatása ellenére az emberek többségében egész életük során nem alakul ki rákos megbetegedés.

Logikusan végiggondolva a lehetőségeket^{29,30}, ez csak úgy magyarázható, ha feltételezzük, hogy a szervezetben létezik egy másik, a bevezetőben említett nem-immunológiai és immunológiai felügyeletől eltérő, általános hatású, felügyeletszerűen („surveillance”) működő tumorelles védelmi rendszer.³¹

A keringési rendszerben található bizonyos kismolekulák daganatellenes hatásán alapuló lehetséges tumorelles védelmi mechanizmus

Jól ismert, hogy a keringési rendszerben sokféle kismolekula található (aminosavak, nukleobázisok, vitaminok, monoszacharidok, membrán permeabilis intermedierek stb.), amelyek bejutnak mind a normál, mind a tumorsejtekbe. Ugyanakkor nagyon sok megfigyelés és kísérleti eredmény bizonyítja, hogy normál sejtek esetén ezeknek a molekuláknak a sejtekbe való bejutása szigorúan szabályozott, a szűkségleteknek megfelelő, míg az említett molekulák többségének a tumorsejtek általi felvétele fokozott, és csak a hozzájutás mértékétől függ.³²⁻³⁶ A tumorsejteknek ezt a felhalmozó tulajdonságát felhasználják a tumor-diagnosztikában is.³⁷

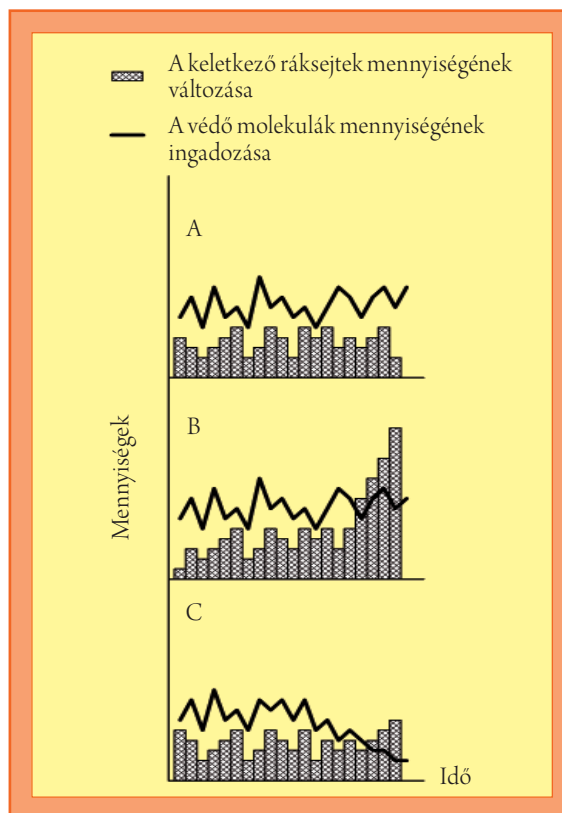
Továbbá napjainkban egyre több molekuláról válik ismertté, hogy nem egyetlen, hanem több fontos és alapvetően eltérő szerepe van az életfolyamatokban, és csak az adott körülményektől függ, hogy éppen melyikben vesz részt (pl. a glutamát a fehérjék építőköve és fontos neurotranszmitter, a glikogén szintáz kináz-3 a glikogén szintézis szabályozásában résztvevő enzim és egyben a „survival signaling pathway” tagja).

A fenti megfigyelések alapján feltételeztük, hogy a ráksejtekbe nagy mennyiségben bejutó kismolekulák között lehetnek olyanok, amelyeknek a már ismert szerepük mellett az is feladatuk, hogy adott körülmények között egy védelmi rendszer hatóanyagaiként működjenek és elpusztítsák a keletkező tumorsejteket. A ráksejteknek az említett molekulák általi elpusztítását, a veleszületett és adaptív immunrendszer komponensei által közvetített és aktiválható védelmi mechanizmustól elkülönítendő, Passzív Tumorellenes Védelmi Rendszernek (PTVR) nevezzük (angolul: Passive Antitumor Defense System (PADS)).

Hipotézisünk szerint a Passzív Tumorellenes Védelmi Rendszer működése a következőképpen foglalható össze. Egyrészt, a védelemben résztvevő kismolekulák mennyisége a keringési rendszerben az életmódtól, életkörülményektől, táplálkozástól, életkortól stb. függően bizonyos határok között ingadozik ugyan, de adott körülmények között többé kevésbé állandó (1. ábra).

Másrészt, a jelenleg elfogadott tudományos álláspont szerint a nem-immunológiai „felügyelet”-nek is nevezett védelmi mechanizmus ellenére mindenkiben állandóan keletkeznek ráksejtek, amelyek egy része a bevezetésben részletezetteknek megfelelően elmenekül az immunrendszer hatása elől. Ezeket a ráksejteket viszont a PTVR el tudja pusztítani minden olyan esetben, amikor a ráksejtek száma kisebb egy bizonyos

1. ábra



kritikus értéknél, mivel ilyenkor minden ráksejtbe elegendő mennyiségű kismolekula tud bejutni ahhoz, hogy elpusztítsa azokat (1/A ábra).

Hipotézisünk szerint ez történik az emberek többségében egész életük során. Vannak azonban olyan tényezők (pl. erőteljes karcinogén effektus, vírus hatás, öröklött hajlam stb.), amelyek következtében némely esetben a keletkező ráksejtek száma meghaladhatja a kritikus értéket (1/B ábra).

A PTVR a kritikus érték felett is pusztítja a tumorsejteket, de ekkor már több sejt keletkezik, mint amennyi elpusztul, és nagy valószínűséggel kialakul a rákos megbetegedés. A tumorsejtek száma akkor is átlépheti a kritikus értéket (1/C ábra), ha valakiben nem keletkezik ugyan több ráksejt, mint az azonos körülmények között élő egészséges emberekben,

viszont a védelemben résztvevő molekulák koncentrációja, tehát a PTVR hatásfoka csökken le valami miatt (pl. alultápláltság³⁸, stressz³⁹, betegségek stb.).

A hipotézis felállítása után, kísérletekkel meghatároztuk, hogy mely molekulák vesznek részt a védelemben, sejt- és állatkísérletekkel bebizonyítottuk a védelmi rendszer létezését és működését, valamint megkezdtuk annak vizsgálatát, hogy a védelemben résztvevő molekulák milyen módon pusztítják el a tumorsejteket.

Kísérleti Eredmények

A szervezet passzív tumorelles védelmében szerepet játszó molekulák azonosítása

A fentiekben felvázolt hipotézis alapján 89, a keringési rendszerben előforduló kismolekulával, illetve 10 különböző, a keringési rendszerben előforduló (fém és egyéb) ionnal végeztünk kísérleteket.^{29,30,40-42}

A kismolekulák kiválasztásához daganatsejt vonalakon alapuló in vitro kísérleti rendszert használtunk. Ennek segítségével olyan molekulákat kerestünk, amelyek egymás hatását szinergikusan fokozva képesek elpusztítani a daganatos sejteket. Így 16 olyan kismolekulát találtunk (L-Metionin, L-Hisztidin, L-Fenilalanin, L-Tirozin, L-Arginin, L-Triptofán, Adenin, L(-)Malát, d-Biotin, Piridoxin, L-Aszkorbát, Riboflavin, 2-deoxi-D-Ribóz, D(+) Mannóz, Orotát, Hippurát), amelyek részt vesznek a fent említett védelmi mechanizmusban. Az ionoknak nem volt a hipotézis szempontjából lényeges hatása.⁴²

A további vizsgálatokat a védelmi rendszer molekuláinak keverékével (a továbbiakban PTVR hatóanyag-keverék) végeztük, mivel a hipotézisünk szerint ezek a védelmi rendszer hatóanyagai, tehát a szervezetben is együtt fejtik ki a hatásukat. Minden kísérletben használtunk egy kontroll keveréket is.^{29,30,40-42} Ez ugyanolyan típusú molekulákból (aminosavból,

monoszacharidból stb.) állt, mint a PTVR hatóanyag-keverék, azonban olyanokból, amelyeket az előző kísérletekben (a vizsgált 89-ből) nem találtunk hatásosnak. A hatóanyagok száma, koncentrációja és így a keverék ozmolalitása megegyezett a PTVR hatóanyag-keverékével. Mivel a kontroll keveréknek nem volt szignifikáns hatása egyik kísérletben sem, így kizárhatjuk, hogy a PTVR hatóanyag-keveréknél tapasztalt effektusok oka ozmotikus hatás, aspecifikus tápanyag túlkínálat, aminosav „imbalance” vagy ammónium toxicitás lett volna.

A PTVR működésének sejt- és állatkísérletes bizonyítása

Amikor a kísérletek során a védelemben résztvevő molekulákat olyan mennyiségben alkalmaztuk a PTVR hatóanyag-keverékben, amelyen mennyiségben normál körülmények között a vérben fordulnak elő (ami megfelel a fiziológiás védelmi mechanizmusnak), akkor is képesek voltak elpusztítani az összes tumorsejtet minden 125 sejt/ml-nél kisebb kiindulási sejtkoncentráció esetén, miközben a nem kezelt ill. a kontroll keverékkel kezelt sejtek száma ugyanannyi idő alatt kb. fél millióra nőtt milliliterenként.³⁰ Ez azt jelenti, hogy az adott kísérleti körülmények között a milliliterenkénti 125 sejt felelt meg a hipotézis ismertetésekor említett kritikus sejtszámnak.

Lényeges, hogy hipotézisünk értelmében a PTVR védelmi szintje a szervezeten belül semmilyen jelre nem növekszik (ezért nevezzük passzív védelmi rendszernek), de kívülről növelhető, ha növeljük a keringési rendszerben a védelemben résztvevő molekulák koncentrációját.

Kimutattuk, hogy a sejtpusztulás sebessége függ a védelemben résztvevő anyagok koncentrációjától.³⁰ Ugyanakkor nyilvánvaló, hogy a daganatnövekedés sebességében egy adott daganattípus esetében fontos szerepet játszik a ráksejtek száma. Mivel a szervezetben a sejtszaporodás és a sejtpusztulás állandó

versenyben van egymással, a kettő sebességének aránya szabja meg, hogy kialakul-e a daganat vagy sem. A védelemben résztvevő molekulák rendszeres bevitelével növelhető annak a valószínűsége, hogy ez az arány kedvező maradjon, és így a daganat kialakulása megelőzhető legyen.

Kiindulási hipotézisünk értelmében, mivel a kis-molekulák sejten belüli felhalmozása a daganatsejtekre általánosan jellemző tulajdonság, míg normál sejtek esetében ez a folyamat szigorúan szabályozott, a PTVR hatóanyag-keverék hatása széleskörű és szelektív. Ennek vizsgálatára különféle daganatos és normál sejtvonalakkal végeztünk kísérleteket.

A PTVR hatóanyag-keverék, ellentétben a kontroll keverékkel, erőteljesen toxikus volt a K562 humán erythroleukemia, a Hep-2 humán gége epidermoid carcinoma, a HeLa cervix epitelioid carcinoma, a Caco-2 colon adenocarcinoma, az EL4 egér lymphoma, a Jurkat humán akut T sejt leukémia, az A20 egér B sejt lymphoma, a Hep G2 humán hepatocellularis carcinoma és az MCF7 humán emlő adenocarcinoma sejtvonalak esetében, ugyanakkor nem volt toxikus a Vero afrikai zöldmájom vese, az MDCK kutya vese és az LLC-MK2 rhesus májóm vese normál sejtvonalak esetében.^{29,41,42}

Nagyon lényeges eredmény, hogy a PTVR hatóanyag-keverék el tudta pusztítani a vizsgált „multidrug” rezisztens MCF7/ADR humán emlő adenocarcinoma és AT3B-1 patkány prosztata carcinoma sejteket is.^{42,43} Ezek a kísérletek egyértelműen bizonyították a PTVR hatóanyag-keverék általános és szelektív hatását.

Az utóbbi években megvizsgáltuk, hogy a PTVR hatóanyag-keverék miként befolyásolja bizonyos citosztatikumok hatását. Azt találtuk, hogy minden esetben additív módon fokozta

a vizsgált citosztatikumok (Doxorubicin, Etoposid, Mitoxantron, Fluorouracil, Vinblastin, Mitomycin és Cytarabin) hatását a különböző tumorsejtvonalak (MCF7, K562, Jurkat, Sp2/0-Ag14, A20, HeLa) ellen, ugyanakkor a normál sejtvonalak (LLC-MK2, MDCK) esetében bizonyos citosztatikumoknál (Doxorubicin, Fluorouracil, Cisplatin, stb.) kifejezett védőhatás volt megfigyelhető.⁴³

A PTVR hatóanyag-keverék ugyancsak szignifikánsan megnövelte a sugárkezelés tumorsejteket (A20, Jurkat, K562, Sp2/0-Ag14, HeLa, HEP 2) pusztító hatását, ugyanakkor a normál sejteknél (LLC MK2, MDCK) bizonyos mértékű védőhatás volt megfigyelhető a PTVR hatóanyag-keverék jelenlétében.⁴³

Kezdeti állatkísérletes vizsgálataink során BALB/c egerekben Sp2/0-Ag14 myeloma sejtek intraperitoneális (i.p.) oltásával kialakított túlélési modellt alkalmaztunk. Az állatokat (10 állat/csoport) 10 napon keresztül i.p. kezeltük a PTVR hatóanyag-keverékkel (kezelt csoport), vagy PBS-el (kontroll csoport).

A kezelt csoport átlagos túlélési ideje szignifikánsan megnövekedett a kontroll csoporthoz viszonyítva (kezelt: $18,9 \pm 0,5$ nap; kontroll: $12,9 \pm 0,6$ nap, $P < 0,001$). Az átlagos túlélés T/C értéke (kezelt/kontroll arány) 146,5 % volt.^{29,41}

A túlélési kísérletek mellett, a tumornövekedés vizsgálata céljából BALB/c nude egerekbe szubkután oltott HeLa sejtekkel végeztünk kísérleteket. A PTVR hatóanyag-keverékkel 10 napig i.p. végzett kezelés a PBS-el kezelt kontroll csoporthoz képest szignifikánsan lelassította a tumornövekedést, az átlagos relatív tumortérfogat minden mérési pontban szignifikánsan alacsonyabb volt a PTVR hatóanyag-keverékkel kezelt csoportban (a T/C érték minden mérésnél kisebb volt, mint 42 %. $P < 0,05$).^{29,41}

Az Országos Onkológiai Intézetrel együttműködésben végzett legfrissebb, ez idáig még nem közölt, állatkísérletes vizsgálataink során a PTVR-hatóanyag-keveréket i.p. injekció formájában alkalmazva, a kezelés szignifikánsan lelassította az állati daganatok növekedését minden vizsgált daganattípus (P-388, S-180, B-16, MXT, Colon-26, He/De, Ne/De) esetében. A T/C érték a fenti daganatok esetében 36,7 %, 31,7 %, 44,0 %, 37,6 %, 45,9 %, 37,1 %, 41,5 % volt.

A vizsgált citosztatikumokkal (5-FU, Cisplatin) összehasonlítva a PTVR-hatóanyag-keverék, a fent említett sejtvonalakon in vitro végzett kísérletekhez hasonlóan, szignifikánsan fokozta a citosztatikumok Colon 26 daganatra kifejtett hatását (T/C értékek: 5-FU 53 %, PTVR-hatóanyag-keverék 43,5 %, együtt 34,8 %; Cisplatin 59,2 %, PTVR-hatóanyag-keverék 39,6 %, együtt 11,7 %).

Különösen érdekes, hogy az 5-FU-ra rezisztens B16 melanóma esetén, a PTVR-hatóanyag-keverékkel történő kezelés után az egyébként hatástalan 5-FU-val is kezelve az állatokat szignifikánsan tovább csökkent a daganatok mérete (T/C értékek: 5 FU 112 %, PTVR-hatóanyag-keverék 38,3 %, együtt 29,1 %).

A PTVR-hatóanyag-keverék orális hatását igazolandó, az állatokat különböző koncentrációjú oldatokkal itatva az i.p. kezelésekkal összemérhető eredményeket kaptunk (az ezen kísérletek eredményeit összefoglaló kézirat jelenleg szerkesztés alatt áll).

A sejt- és állatkísérletek eredményei, amellet, hogy gyakorlati szempontból lényegesek, egyben újabb bizonyítékai a védelmi rendszer létezésének is, hiszen a védelem hatóanyagait tartalmazó PTVR hatóanyag-keveréknek nem lett volna szignifikáns daganatellenes hatása a kísérletek során, ha a bennük lévő molekuláknak nem lenne eleve ilyen hatásuk és szerepük fiziológiás körülmények között is.

A PTVR hatásmechanizmusának vizsgálata

Sikerült kimutatni, hogy a PTVR hatóanyag-keverék hatására tumorsejtvonalakban (Sp2/0-Ag14, K562) az apoptózisra jellemző DNS fragmentáció következik be, ellentétben a nem kezelt és a kontroll keverékkel kezelt sejtekkel.^{30,40,41} A vizsgált sejtvonalak közül azért a K562-t választottuk, mert relatíve rezisztens a különféle apoptotikus stimulusokkal (diphtheria toxin, etoposide stb.) szemben⁴⁴⁻⁴⁶, a PTVR molekulái azonban ezen sejtek apoptózisát is kiváltották.

Ezzel ellentétben a normál sejtvonalon nem történt apoptózis a PTVR hatóanyag-keverék hatására, holott a kísérleteink során alkalmazott Vero normál sejtvonal esetében könnyen kiváltható a sejtek apoptózisa ill. a DNS fragmentáció.⁴⁷

Ezek az eredmények is erőteljesen alátámasztják a szelektív hatást, ami természetesen el is várható a szervezet saját védelmi rendszere esetében. Az áramlási citométerrel kapott, az apoptotikus sejtekre jellemző ún. „sub-G1 peak” megerősítette, hogy az előző eredményeink nem detektálási hiba következményei voltak.^{40,41}

A PTVR hatóanyag-keverék sejttanyagcserére kifejtett hatásainak vizsgálata céljából HeLa sejtekhez univerzálisan jelzett ¹³C-glükózt adtunk, majd NMR-el vizsgáltuk, hogy a PTVR hatóanyag-keverék a nem kezelt HeLa sejtekhez képest milyen metabolikus változásokat okoz. A ¹³C NMR spektrum alapján egyrészt megállapítható volt, hogy a HeLa sejtek valóban felhalmozzák a PTVR hatóanyag-keverék molekuláit, másrészt kimutattuk, hogy a sejtek aerob glikolízissel termelték az energiát, és a kezelés hatására a kontrollhoz képest szignifikánsan csökkent a laktát keletkezése.

A ³¹P NMR spektrum szerint a kezelt sejtekben megnövekedett a fruktóz-1,6-biszfoszfát, a dihidroxi-aceton-foszfát és a gliceraldehid-3-foszfát koncentrációja, ami arra engedett következtetni, hogy a PTVR hatóanyag-keverék hatására a gliceraldehid-3-foszfát

dehidrogenáz által katalizált lépésnél gátlódik a glikolízis. A gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz enzim a glikolízisben betöltött közismert szerepe mellett, számos más folyamatban, többek között az apoptózisban is részt vesz^{48,49}, ezért feltételezzük, hogy szerepet játszhat PTVR hatóanyag-keverék hatásmechanizmusában. A metabolikus hatások további vizsgálata, valamint az apoptózis részleteinek tisztázása részben saját laboratóriumunkban, részben más intézetekkel együttműködésben folyamatban van.

Megbeszélés

A fentiekben összefoglalt, illetve a terjedelmi okokból itt nem ismertett kísérletek eredményei mind azt bizonyítják, hogy a szervezet passzív tumorelles védelmében résztvevő molekulák, amelyek normál körülmények között együtt fordulnak elő a keringési rendszerben, valóban képesek az élő szervezetben elpusztítani bizonyos mennyiségű tumorsejtet, és védeni a szervezetet a daganatok kialakulása ellen.

Ahogy azt kiindulási hipotézisünkben feltételeztük, a védelemben résztvevő molekulák mennyisége bizonyos mértékig ingadozik a keringési rendszerben a körülményektől függően, de a védelem hatása az endogén források miatt soha nem csökkenhet nullára, csak bizonyos körülmények között, bizonyos ideig és bizonyos mértékig elmaradhat az optimálisról. Ebből az következik, hogy a daganatok megelőzésében a helyes táplálkozás (pl. zöldség- és gyümölcsfogyasztás) pozitív hatása nagyobb, mint az elégtelen táplálkozás negatív hatása.

Ezért az utóbbi csak akkor figyelhető meg, ha nagy populációkat hosszú ideig vizsgálunk. Így elméletünk szempontjából különösen értékes az a megfigyelés, amely szerint Közép-Ázsia alultáplált népességeiben megnövekedett a daganatok gyakorisága, holott nem

voltak kivéve erőteljesebb karcinogén hatásoknak, mint más populációk.⁵⁰ A hiányos táplálkozás természetesen negatívan befolyásolja az eddig ismert immunrendszer működését is^{51,52}, de miután a klinikailag észlelhető humán daganatok többsége nem immunogén^{27,28} a fenti megfigyelés a PTVR létezését támasztja alá.

Jól ismert, hogy az öregedés során mind a természetes, mind az adaptív immunrendszer funkcionális kapacitása csökken.^{53,54} Az AIDS-es betegekkel ellentétben azonban az idős emberekben nemcsak néhány, hanem az összes tumorfajta gyakorisága megnövekszik.^{55,56} Ez a különbség csak azzal magyarázható, ha feltételezzük, hogy idős korban tartósan lecsökken a PTVR hatása is (vagyis a védelemben résztvevő molekulák koncentrációja). Ezt a feltételezést a szakirodalmi adatok messzemenően alátámasztják. Idős korban csökken a táplálékok^{57,58}, többek között az aminosavak felszívódása⁵⁹, és ennek megfelelően ugyanolyan mennyiségű aminosavbevitel alacsonyabb szérumszintet eredményezett idősokban, mint fiatalokban.⁵⁷

Ráadásul a fiatalokhoz viszonyítva az idősek esetében még éhezéskor, tehát felszívódástól függetlenül is szignifikánsan alacsonyabb az aminosavak szérumszintje.⁶⁰ Idős korban relatíve gyakran előfordul alultápláltság⁶¹, valamint a védelemben résztvevő riboflavin, piridoxin⁵⁸ és aszkorbinsav^{57,58} alacsony szintje a szérumban. Az AIDS-es betegek és az idősek közti különbség a tumor gyakoriságban véleményünk szerint a PTVR létezésével és az idős emberekben fennálló csökkent hatásával magyarázható, ezért ez egyben a PTVR működésének és általános szerepének közvetett bizonyítéka is.

Természetesen nagyon sok más epidemiológiai megfigyelés is alátámasztja a PTVR létezését. Sajnos terjedelmi okok miatt ezek részletezésétől el kell

tekintenünk, de összegyűjtve megtalálhatóak egyik korábbi közleményünkben.³¹

A PTVR felismerésének gyógyászati jelentősége tehát az, hogy a védelmi rendszer hatóanyagainak tartós, egyidejű és nagy mennyiségű adásával a szervezet saját daganatellenes védelmi rendszerét erősítjük. Ez az alapja a Culevit Rákkutatási Programnak, amelynek keretében a PTVR hatóanyagait tartalmazó készítmények fejlesztése folyik.

Irodalomjegyzék

1. Klein G. Cancer, apoptosis, and nonimmune surveillance. *Cell Death Differ.* 2004 Jan;11(1):13-7.
2. Ehrlich P. Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1909; 5:73–290.
3. Burnet M. Cancer: a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J.* 1957 Apr 6;1(5022):779-86.
4. Burnet M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J.* 1957 Apr 13;1(5023):841-7.
5. Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance *Prog. Exp. Tumor Res.* 13, 1–27.
6. Thomas L. (1959). Discussion. In *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*, H.S. Lawrence, ed. (New York: Hoeber-Harper), pp. 529–532.
7. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004 Aug;21(2):137-48.
8. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001 Apr 26;410(6832):1107-11.
9. Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med.* 2002 Jul 1;196(1):129-34.
10. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, Knoblaugh S, Cado D, Greenberg NM, Raulet DH. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity.* 2008 Apr;28(4):571-80.
11. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):991-8.
12. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol.* 2001 Apr;2(4):293-9.
13. Frisch M, Biggar RJ, Engels EA, Goedert JJ. AIDS-Cancer Match Registry Study Group. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. *JAMA.* 2001 Apr 4;285(13):1736-45.
14. Serraino D, Piselli P, Busnach G, Burra P, Citterio F, Arbustini E, Baccarani U, De Juli E, Pozzetto U, Bellelli S, Polesel J, Pradier C, Dal Maso L, Angeletti C, Carrieri MP, Rezza G, Franceschi S. Immunosuppression and Cancer Study Group. Risk of cancer following immunosuppression in organ transplant recipients and in HIV-positive individuals in southern Europe. *Eur J Cancer.* 2007 Sep;43(14):2117-23.
15. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet.* 2007 Jul 7;370(9581):59-67.
16. Fauci AS. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science,* 1988, 239, 617-622.
17. Kalish RS., Schlossman SF. The T4 lymphocyte in AIDS. *N. Engl. J. Med.,* 1985, 313, 112-113.
18. Reif AE. Immunosurveillance reevaluated in light of AIDS. In *Lectures and symposia 14th int. cancer Congr. Budapest 1986.* Szerk.: Lapis, K., Eckhardt, S. Karger, Basel/ Akadémiai Kiadó, Budapest. 1987, 5, 321-334.
19. Zunich KM, Lane HC. Immunologic abnormalities in HIV infection. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.,* 1991, 5, 215-228
20. Gootenberg JE, Stewart CL, Vetro SW, Bellanti JA. Lack of graft rejection in a renal transplant recipient with AIDS. *Ann Allergy.* 1991 Aug;67(2 Pt 1):123-5.
21. Rabkin CS, Biggar RJ, Horm JW. Increasing incidence of cancers associated with the human immunodeficiency virus epidemic. *Int. J. Cancer,* 1991, 47, 692-696.
22. Rabkin CS, Blattner WA. HIV infection and cancers other than non-Hodgkin lymphoma and Kaposi's sarcoma. *Cancer Surv.,*

1991, 10, 151-160.

23. Mueller BU, Butler KM, Higham MC, Husson RN, Montrella KA, Pizzo PA, Feuerstein IM, Manjunath K. Smooth muscle tumors in children with human immunodeficiency virus infection. *Pediatrics*. 1992 Sep;90(3):460-3.

24. Schechter MT, Marion SA, Elmslie KD, Ricketts MN, Nault P, Archibald CP. Geographic and birth cohort associations of Kaposi's sarcoma among homosexual men in Canada. *Am J Epidemiol*. 1991 Sep 1;134(5):485-8.

25. Levin MA. Acquired immunodeficiency syndrome malignancies. *Semin. Oncol.*, 2000, 27, 389-488.

26. Weiss RA. Viruses, cancer and aids. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1999, 26, 227-232).

27. Hewitt HB. Failure of cancer research. *J. Royal. Soc. Med.*, 1991, 84, 321.

28. Skinner KA. Antitumor vaccines: of mice and men? *Ann Surg Oncol*. 2005 Jul;12(7):511-2.

29. Kulcsár G. Inhibition of the growth of a murine and various human tumor cell lines in culture and in mice by mixture of certain substances of the circulatory system. *Cancer Biotherapy 1995*; 10: 157-176.

30. Kulcsár G. Experimental evidence for the existence of the passive antitumor defense system formed by the synergistic action of certain small substances of the circulatory system. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 2003*; 18: 949-963.

31. Kulcsár G. Theoretical and literary evidence for the existence of the passive antitumor defense system. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 1997*; 12: 281-286.

32. Cameron E, Pauling L, Leibovitz B. Ascorbic acid and cancer: A review. *Cancer Research 1979*; 39: 663-681.

33. Kubota R, Kubota K, Yamada S, Tada M, Takahashi T, Iwata R, Tamahashi N. Methionine uptake by tumor tissue: a microautoradiographic comparison with FDG. *J Nucl Med*. 1995 Mar;36(3):484-92.

34. Medina MÁ, Márquez J, Núñez de Castro I. Interchange of amino acids between tumor and host. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology 1992*; 48: 1-7.

35. Traut TW. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry 1994*; 140: 1-22.

36. Wallach DFH. Membrane permeability. In: Wallach DFH,

Schmidt Ullrich R (editors). *Membrane molecular biology of neoplastic cells*. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Co.; 1975. p. 293-343.

37. McConathy J, Goodman MM. Non-natural amino acids for tumor imaging using positron emission tomography and single photon emission computed tomography. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Dec;27(4):555-73.

38. J Bergström, P Fürst, E Vinnars, Effect of a test meal, without and with protein, on muscle and plasma free amino acids. *Clinical Sci*. 1990, 79: 331.

39. Gelfand RA, Matthews DE, Bier DM, Sherwin RS. Role of counterregulatory hormones in the catabolic response to stress. *J Clin Invest*. 1984 Dec;74(6):2238-48.

40. Kulcsár G. Apoptosis of tumor cells induced by substances of the circulatory system. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 1997*; 12: 19-26.

41. Kulcsár G. Passive Antitumor Defense System: Hypothesis and Experimental Results. PhD Dissertation, University of Pécs, Hungary, 1998.

42. Kulcsár G. Synergistic potentiating effect of d(+) mannose, orotic and hippuric acid on selective toxicity of mixture of thirteen substances of the circulatory system for various tumor cell lines in culture. *Cancer Detection and Prevention 2000*; 24: 485-495.

43. Kulcsár G. Experimental evidence for killing the resistant cells and raising the efficacy and decreasing the toxicity of cytostatics and irradiation by mixtures of the agents of the passive antitumor defense system in the case of various tumor and normal cell lines in vitro. *Cancer Biother Radiopharm*. 2009 Feb;24(1):67-80.

44. Benito A, Grillot D, Nunez G, Fernandezluna JL. Regulation and function of Bcl-2 during differentiation-induced cell death in HL-60 promyelocytic cells. *American Journal of Pathology 1995*; 146: 481-490.

45. Chang MP, Bramhall J, Graves S, Bonavida B, Wisnieski BJ. Internucleosomal DNA cleavage precedes diphtheria toxin-induced cytolysis. Evidence that cell lysis is not a simple consequence of translation inhibition. *Journal of Biological Chemistry 1989*; 264: 15261-15267.

46. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Research*

A szerzők
elérhetőségei

Cím:

Immunal Kft.,
Rákkutató és
Termékfejlesztő
Laboratórium
7630 Pécs,
Finn u. 1/1,

Tel.:

72/525-010,

Fax:

72/525-011,

E-mail:

kulcsar@
immunal.hu

1993; 53: 3976-3985.

47. Inward CD, Williams J, Chant I, Crocker J, Milford DV, Rose PE, Taylor CM. Verocytotoxin-1 induces apoptosis in vero cells. *J Infect.* 1995 May;30(3):213-8.

48. Sawa A, Khan AA, Hester LD, Snyder SH. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Oct 14;94(21):11669-74.

49. Hara MR, Thomas B, Cascio MB, Bae BI, Hester LD, Dawson VL, Dawson TM, Sawa A, Snyder SH. Neuroprotection by pharmacologic blockade of the GAPDH death cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 7;103(10):3887-9.

50. Tuyns AJ. Alcohol and cancer. An instructive association. *British Journal of Cancer* 1991; 64: 415-416.

51. Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr.* 1997 Aug;66(2):460S-463S.

52. Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Aug;56 Suppl 3:S73-6.

53. Hakim FT, Flomerfelt FA, Boyiadzis M, Gress RE. Aging, immunity and cancer. *Curr Opin Immunol.* 2004 Apr;16(2):151-6.

54. Shurin MR, Shurin GV, Chatta GS. Aging and the dendritic cell system: implications for cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007 Nov;64(2):90-105.

55. Hartwig M. Immune ageing and cancer. *European Journal of Cancer* 1992; 28A: 1939-1940.

56. Yancik R, Ries LG. Cancer in the aged. *Cancer* 1991; 68: 2502-2510.

57. Morley JE. Nutritional status of the elderly. *American Journal of Medicine* 1986; 81: 679-695.

58. Young EA. Nutrition, aging, and the aged. *Medical Clinics of North America* 1983; 67: 295-313.

59. Vinardell MP. Age influences on amino acid intestinal transport. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1992; 103A: 169-171.

60. Sarwar G, Botting HG, Collins M. A comparison of fasting serum amino acid profiles of young and elderly subjects. *Journal of American College of Nutrition* 1991; 10: 668-674.

61. Manson A, Shea S. Malnutrition in elderly ambulatory medical patients. *American Journal of Public Health* 1991; 81: 1195-1197.