

(19) Országkód:

HU



MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

200093 B

(51) Int. Cl.⁵

A 61 K 31/16

A 61 K 31/415

(22) Bejelentés napja: 1983.12.20. (21) 4348/83

(40) Közzététel napja: 1986.10.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1990.04.30.

(72) (73) Feltaláló és szabadalmazó:
KOVÁCS Ádám,
Pilisborosjenő, (HU)

(54) ELJÁRÁS TUMORELLENES GYÓGYÁSZATI KÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás tumorelleses gyógyászati készítmények előállítására, amely általában sérült információjú sejtek regenerációját biztosítja.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények hatóanyagai (I) általános képletű vegyületek. A képletben

R hosszúláncú, telített, vagy legalább egy telítetlen kötést tartalmazó, 12-20 szénatomos alifás szénhidrogén-
gyökök,

R₁ hidrogénatom, vagy hosszúláncú, telített, vagy legalább egy telítetlen kötést tartalmazó, 12-20 szénatomos alifás acilgyökök,

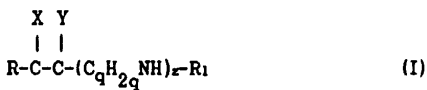
X oxigénatom, és

Y hidrogénatom, vagy

X és Y együttesen =N-CH₂-CH₂-csoportot alkot,

z értéke 1-5, és

q értéke 1-4.



A találmány tárgya eljárás tumorellenes gyógyászati készítmények előállítására, amely általában sérült információjú sejtek regenerációját biztosítja.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények hatóanyagai I általános képletű vegyületek, ahol

R, R₁, X, Y, q és z a későbbiekben megadott.

Ezen I általános képletű vegyületek az irodalomból túlnyomórészt ismertek. Így például Przlem. Chem., 46 (8), 479-481 (1967) cikke N,N'-[etilénbisz(imino-etilén)]bisz-9,11-oktadekadienoátot ismertet, mint kationos felületaktív szert. A 3 337 459 sz. USA szabadalmi leírás N,N'-[iminobisz(etilén-imino-etilén)]bisz(10-oktadecénamid kenőanyagként történő felhasználását írja le. A 929 397 sz. nagy-britanniai szabadalmi leírás N-(2-[2-(heptadecenil)-2-imidazolin-1-il]-etil)-oleamidot ismertet, poliepid-bitumen alkotórészeként. A J. Chem. Res. Synop., 1981 (3) 84-5 cikke, valamint a 2 546 180 sz. DE-OS N-[2-[2-(8-heptadecenil)-4,5-dihidro-1H-imidazol-1-il]etil]-9-oktadecénamidot ismertet, mégpedig annak reakcióit, illetve ásványfoltalásnál történő felhasználását. A 3 193 454 sz. USA szabadalmi leírás szerint az 1,1'-(imino-dietilén)-bisz[2-(8-heptadecenil)]-2-imidazolin festékbevonatok alkotórésze.

Sehol nem található azonban utalás ezen vegyületek bármely gyógyászati hatására.

Az elmúlt közel 100 év alapvető változást hozott létre az emberi környezetben, elsősorban a kemizáció rohamos térhódítása révén. Sajnos ez a fejlődés igen kedvezőtlen jelenségeket is elindított, melyek közül egyik a rákos megbetegedések számának rohamos emelkedése.

A rákkutatás jelen pillanatban egyike a legtagabb és anyagilag és szellemileg leginkább dotált kutatási területeknek. Az alapkutatások mellett természetesen számos kísérlet történt a tumoros megbetegedések bizonyos fajtáinak terápiás kezelésére. Számos esetben alkalmaznak sebészi beavatkozást, és emellett egyéb terápiás kezelést, mely lehet besugárzásos, kemoterápiás, stb. Ezen eddigi eljárások, illetve az irodalomból ismert kemoterápiás módszerek közös jellemzője, hogy bizonyos speciális tumorfajták esetén hoznak bizonyos eredményt. Ezideig általános módszert, mely általában véve tumoros sejtek regenerációjához vezet, nem sikerült találni.

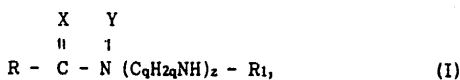
A tudomány mai állása szerint tumoros megbetegedések lényegében akkor gyógyíthatók, ha azokat egészen kezdeti stádiumban észlelik. Tekintettel a korai stádium nehéz felismerésére, a tumoros betegségek a mai napig a legnehezebben gyógyítható betegségek közé tartoznak. Általában a betegségek tüneti kezelése történik, mely esetben azonban a gyógyításra már kevés remény van. Feltétlenül szükség van ezért olyan készítményre, mely egyrészt a tumoros megbetegedések fellépésének megelőzésére is szolgál

hat, másrészt kifejezett betegség esetén is megfelelő gyógyító hatást biztosít.

Ezért a találmány célkitűzése olyan készítmény, mely mind tumoros megbetegedések fellépésének megelőzésére, mind a fellépő betegségek leküzdésére alkalmas.

A találmány alapja az a felismerés, hogy a rákos folyamatok beindulásának oka a sejtek közötti korrekt információs és/vagy anyagáramlási lánc meghibásodása. Egészséges szervezetben a sejtek között állandó kommunikáció lép fel. A szervezetben jelentkező malignus folyamatok annak eredményei, hogy a sejtek közötti kommunikációs csatornák hiánya miatt a sejtek nem vesznek tudomást egymásról, elvesztik egymással való kapcsolatukat, és saját belső információjuk szerint osztódni kezdenek. Az osztódás káros mértékű és ez vezet a sejtburjánzáshoz. A rosszindulatú folyamatok során elszaporodott sejteket nem pusztítani kell, hanem a közöttük lehetséges kapcsolatot kell visszaállítani. A tumorsejtek szövetszerkezetének nem kóros szövetszerkezetté való visszaállításának egyedüli módja, ha a sejtek egymás közötti kommunikációját helyreállítjuk. A ráksejtek falain vélhetően fehérjeburok képződik, mely leárnyékolja a sejteket és a sejtek közötti kommunikációs csatornák képtelenek a működésre. Ezért vizsgálataink során olyan anyagot kerestünk, mely megbontja a fehérjeburkot, ezáltal a sejtek közötti kommunikációs csatornák létrejönnek, és a ráksejt megszűnik transzformált sejt lenni.

A fenti célkitűzés megoldására olyan gyógyászati készítményt dolgoztunk ki, melynek hatóanyaga I általános képletű vegyület.



ahol a fenti képletben

R hosszúlancú, telített, vagy legalább egy telítetlen kötést tartalmazó 12-20 szénatomos alifás szénhidrogén-
gyök,

R₁ hidrogénatom vagy hosszúlancú telített vagy legalább egy telítetlen kötést tartalmazó 12-20 szénatomos alifás acilgyök,

X oxigénatom, és

Y hidrogénatom, vagy

X és Y együttesen =N-CH₂-CH₂-csoportot alkot,

z értéke 1-5, és

q értéke 1-4.

Mint látható, a fenti vegyületek egyesüléscsoportok polimer amino-vegyületek, illetve ezek tautomerjei, abban az esetben, ha X és Y együttesen =N-CH₂-CH₂-csoportot alkot, azaz a vegyületen belül dihidro-imidazolgyűrű jön létre.

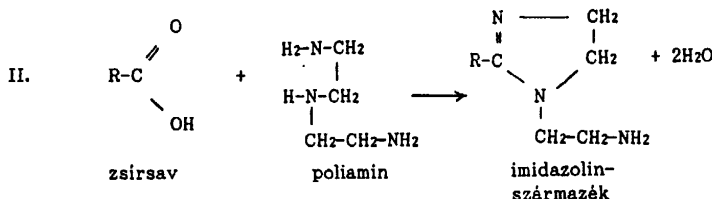
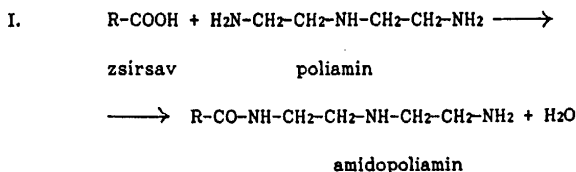
A fentiekben használt hosszúlancú alifás szénhidrogéncsoport 12-20 szénatomot és adott esetben legalább egy kettőskötést tartalmaz. A nyíltlancú vegyületekben, azaz, ahol X oxigénatom, a hosszúlancú alifás acilcsoport célszerűen a sztearinsavból, olajsavból vagy linolsavból vezethető le.

A találmány szerinti gyógyászati készítményekben bármely I általános képletű vegyület, illetve azok közül legalább kettő

vagy több elegye egyaránt alkalmazható hatóanyagként. Ugyancsak a hatóanyagok körébe tartoznak az I általános képletben külön nem feltüntetett, de a sztereokémiai megfontolásokból természetesen létező szerkezetű izomerek is.

Mint említettük, az I általános képletű vegyületek részben ismertek, vagy önmagukban ismert módszerekkel, például a következő reakciókkal állíthatók elő:

Általános reakciósémák az előállításra (példák):



Megjegyzendő, hogy vizes közegben egyensúly jön létre a nyílt lánccú és a tautomer gyűrűs forma között.

A találmány szerinti gyógyászati készítményeket a gyógyszerek formálására általánosan alkalmazott eljárásokkal állíthatjuk elő, oly módon, hogy egy vagy több I általános képletű vegyületet legalább egy gyógyászati-
40 lag elfogadott hordozóanyaggal keverünk.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények célszerűen intravénásan adagolhatók, történhet azonban a kezelés orális adagolással, vagy különösen célszerűen inhalálással
45 is. Ez utóbbi célra a találmány szerinti vegyületet vagy több vegyület keverékének, vagy ezek inhalációs készítménye alakjának gőzét lélegeztetjük be a kezelendő személy-
50 lyel. Az inhalációs kezelés esetén a gőztérben azonban adott esetben nemcsak az I általános képletű hatóanyag, illetve hatóanyagok gázfázisa van jelen, hanem bizonyos bomlástermékek is. Ezen bomlástermékek az $\text{NR}'''\text{R}'\text{R}''$ és $\text{H}_2\text{N-}[(\text{CRR}'_y\text{-NH})_x\text{-H}]$ általános képlettel rendelkeznek,
55 ahol

R''' hidrogénatom, rövidszénlancú alkilcsoport vagy $-(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$ csoport, és
60 R' és R'' hidrogénatom vagy rövidszénlancú alkilcsoport.

Ugyancsak jelen lehet bomlástermékként formaldehid is.

A fentiekből következően értelemszerűen a találmány szerinti gyógyászati készítmény elnevezés magában foglalja az olyan készítményeket is, melyekben I általános képletű vegyületek és azok bomlástermékei egyaránt hatóanyagként vannak jelen.

A találmány szerinti hatóanyagok, illetve készítmények a tumoros sejteket és egészséges sejteket egymás közötti kommunikációra készítetik, melynek következtében a sejtek újra tudomást szereznek környezetükről, a további sejtburjánzás megáll, és a szervezet immunrendszere működésbe lép, a feleslegességé vált, immár nem tumoros sejteket a szervezet különféle védekező mechanizmusai révén elpusztítja. A találmány szerinti I általános képletű hatóanyagok keveréke különösen előnyösnek bizonyult kísérleteink során a sejtek közötti információs és/vagy anyagáramlási csatornák sejtek közötti regenerálására illetve létrehozására, amely mind in vivo, mind in vitro történhet, és ennek során a találmány szerinti hatóanyagot illetve készítményt, célszerűen a fenti keveréket a véráramon, nyirokrendszeren keresztül, orálisan és/vagy inhalációs technikával adagoljuk.

A találmány szerinti I általános képletű vegyületek és azok keverékeinek tumorellenes hatását állatkísérletekben, klinikai vizsgálatokban, in vitro szövettenyészetekben, többek között leukémia vírusát termelő

ban véve alkalmasak tumoros megbetegedések
kezelésére, illetve tumoros sejtek és szövet-
tek regenerálására. E készítmények nemcsak
önmagukban alkalmasak terápiás kezelésre,
hanem igen hasznos kiegészítő más techni-
kákknak, például sebészeti beavatkozásoknak.

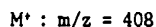
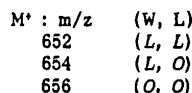
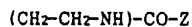
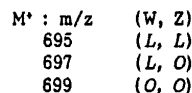
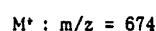
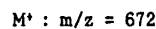
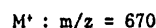
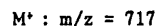
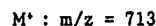
10

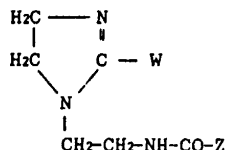
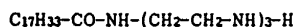
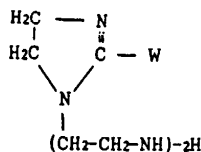
20

25

A fenti eljárással az alábbi vegyületeket állítottuk elő, és azokat tömegspektrometriás és NMR spektrometriás módszerrel azonosítottuk:

30





M ⁺ : m/z	W
390	L
392	O

M⁺ : m/z = 410

M ⁺ : m/z	(W, Z)
609	(L, L)
611	(L, O)
613	(O, O)

ahol W jelentése R, Z jelentése R₁ szénhidrogén-részének jelentésével azonos.

Az NMR (¹H, ¹³C és ¹⁵N) spektroszkópia igazolta a fenti szerkezeteket.

A fenti vegyületeket, illetve azok egyét (a továbbiakban: CDM) az alábbi biológiai vizsgálatokban teszteltük:

- az anyag biológiailag hatékony hígítás-tartományának meghatározása. Az alkalmazott dózisokat hígítási egységekben adjuk meg;

- a CDM in vitro toxicitásának és a CDM hatás reverzibilitásának vizsgálata.

A kísérletek során az alább felsorolt anyagokat és módszereket alkalmaztuk:

Sejtvonalak. Normál szöveti eredetű sejtvonalak: McCoy: synovialis eredetű humán monolayer vonal, BHK: újszülött hörcsög vese eredetű fibroblaszt típusú monolayer vonal, BHK-B és BHK-Tübingen változatokban, HAK: felnőtt hörcsög vese eredetű monolayer vonal, MRC-5: humán embrionális tüdő eredetű monolayer vonal. Tumor eredetű sejtvonalak: LLC: egérben in vivo is fenntartható humán bronchialis carcinoma eredetű monolayer vonal, 70-80% epitheloid jellegű sejtet tartalmaz, HeLa-S3: humán cervicalis carcinoma eredetű vonal klónja, K562: erythroid leukémia eredetű szuszpenziós vonal, SP2: egér myeloid leukémia eredetű szuszpenziós klón, P388: egér lymphoid leukémia eredetű szuszpenziós vonal, L-1210: egér lymphoid leukémia eredetű, ascitesben is fenntartható vonal.

Sejtenyészetek. A sejtvonalakat Minimum Essential Mediumban (MEM) tartottuk fenn 10% magzati borjúsavó (fetal calf serum = FCS) jelenlétében (Flow Laboratories Ltd). A bakteriális fertőzések elkerülésére 50 µg/ml mennyiségű gentamycint alkalmaztunk (SERVA). A tenyészetek fenntartását 25 cm²-es Falcon típusú műanyag szövettenyésztő

edényekben végeztük (NUNC v. Greiner v. Costar) 10 ml térfogatban. A monolayer kultúrákat 0,05% tripszinnel passzáltuk, a szuszpenziós kultúrákat hígítással. A CDM teszteléséhez 24-edényes szövettenyésztő „multiplate”-eket használtunk 1 ml/well (= 2 cm²) mediummal. A tenyészeteket 37 °C-on növesztettük 5% CO₂ tartalmú atmoszférában, melynek vízgőzzel való telítéséről folyamatosan gondoskodtunk (rel. humiditás: 75-80%). A logfázisú sejteket a kontakt gátlást (v. növekedési platót) mutató kultúrák tizszeres hígításával nyertük. A kontakt gátlás állapotát monolayer kultúrák esetén a mikroszkópos megfigyelés szerinti konfluens állapot kialakulását követő napra tettük, ezeket használtuk fel B-típusú kísérleteinkhez.

A CDM hígítása: A CDM-et szérumentes MEM-ben hígítottuk a kívánt mennyiségre, 1000-szeresen hígított törzsoldatból kiindulva. Az emulzió finom diszperzítását hosszás, intenzív kevertetéssel biztosítottuk Vortex mixer segítségével. Az adott hígítású emulziókat a sejtenyészeteken való alkalmazás előtt újra gondosan homogenizáltuk.

Sejtszám meghatározást Bürker-féle sejtszámoló kamrában végeztünk, valamint a citofluorimetriás mérések esetén automatikusan a Cytofluorograph mérési értékeit fogadtuk el.

Flow - mikrofluorimetriás mérések: A sejteket tripszinizálást követően centrifugáltuk, majd 50 µg/ml propidium-jodidot tartalmazó izotóniás trinátrium-citrát-oldatban jég között 30 percig festettük. A sejtek mérését Cytofluorograph-ban végeztük (Bio/Physics Inc.) 488 nm-en működötetett Ar ion gázlézerrel. A propidium-jodid-DNS komplex fluoreszcenciáját 600 nm felett detektáltuk. A készülékbe épített elektronikus differenciál diszkriminátor segítségével nem vettük tekintetbe azokat a sejteket, melyek DNS tartalma a „diploid” DNS tartalomnál alacsonyabbat mu-

tatott, mivel ezen sejtek feltehetően már hosszú idővel a mérés megkezdése előtt elpusztultak.

Viabilitás meghatározás: A sejteket tripszinizálás után 0,05% trypan kék festéket tartalmazó MEM-be tettük, és 5 perccel a festés megkezdése után fénymikroszkópban számoltuk az élő (a trypan kék kizáró) és az elpusztult (megkékülő) sejteket.

Reverzibilitás meghatározás: A kiültetett sejteket 24 órán keresztül kezeltük CDM-mel. Ekkor a párhuzamosok egy részét eltávolítottuk, analizáltuk, míg más részét tovább növesztettük friss, CDM-met nem tartalmazó komplett médiumban. A sejteket további 24 óra elteltével eltávolítottuk és analizáltuk.

EREDMÉNYEK, ÉRTÉKELÉS

A CDM vizsgálatát először log-fázisban levő tenyészeteken végeztük. Széles hígítási tartományban kerestük meg a további vizsgálatokhoz használható optimális dózistartományt SP2 sejtvonalon történt méréssel (1. ábra). Az itt szerzett tapasztalatok alapján az 5×10^4 - 10^7 -szeres hígítási tartományban dolgoztunk a továbbiakban.

A felvett növekedési görbék módosulásai alapján tesztrendszeink több csoportba sorolhatók:

- a CDM 15×10^4 -szeres hígításban a teszt 24. órájára elpusztítja a rendszer sejtjeit (K-562, MRC-5, BHK-B, McCoy, HAK; Sp2).

- A CDM 15×10^4 -szeres hígításban a rendszer sejtjeit a teszt 48. órájára pusztítja el (P-388, L-1210, BHK-Tüb).

- Toxikus hatás a vizsgált tartományban nem tapasztalható (HeLa, LLC). Ez utóbbi két sejtvonal esetében a CDM bizonyos koncentrációi a log-fázisú populációk sejtszaporodását serkentették.

A CDM kontakt gátlás állapotában levő kultúrákra kifejtett hatását két szériában mértük. Ezek alapján megállapítható, hogy a CDM 10^5 feletti hígítások alkalmazása esetén revertálható hatású, míg 10^4 alatti hígításokat alkalmazva gátlása irreverzibilisnek tűnik.

A tenyészetek 72. órájában felvett dózis-hatás görbék alapján a görbék egy része folytonos lefutást mutat (BHK-B, BHK-Tüb., HAK, L-1210), míg más részük lokális minimum helyvel rendelkezik (SP2, McCoy, LLC, HeLa, MRC-5, P-388). A fenti lokális minimum helyek többsége a 10^5 - 10^6 -szoros hígítási tartományba esik.

Viabilitás vizsgálatokat négy sejtvonalon végeztünk (LLC, McCoy, HeLa, BHK-Tüb) az 5×10^4 - 10^6 hígítási tartományban. 10^4 -szeres és ennél kisebb hígításokban a CDM 100%-os toxicitást mutat. Az in vitro mért LD₅₀-érték a 10^4 és 5×10^4 -szeres hígítások közé esik.

További in vitro kísérletekben leukémia vírus termelő QL transzformált sejtvonalat választottuk a CDM hatásának vizsgálatára. [Nagy, K.: Chester Beatty Seminars (London), 1983.]

Az erősen lúgos kémhatású CDM anyagot nem közvetlenül adagoltuk, hanem először dimetil-szulfoxidban (DMSO, Reanal) oldottuk, majd ennek hígításait alkalmaztuk.

Sejtkultúra: QL transzformált fűrj-fibroblaszt sejtvonal (1. ábra), amely permanensen termeli a fokozottan onkogén MC29/L leukémiai vírus variánst. A sejteket Falcon típusú műanyag tenyésztőedényekben tartottuk fenn, és szaporítottuk. Tápfolyadékunk 10% triptó-z-foszfáttal, 5% fetal borjú szérummal, 1% csirke szérummal kiegészített Parker 199 médiumot használtunk. A tenyésztőedényeket 37 °C-on inkubáltuk 5% CO₂ atmoszféra mellett. A sejtkultúrákat általában kétnaponként tripszinizálással passzáltuk.

Sejtszám-meghatározás:

A tenyésztőedényekben levő teljes sejtmennyiségből tripszinnel sejtszuspenziót készítettünk, majd a sejtkoncentrációt Laborscal (Labor MIM) elektromos sejtszámlálóval, esetenként Buerker-kamrával határoztuk meg.

Viabilitás: A sejtszám meghatározásánál csak a biológiailag ép, élő sejteket vettük figyelembe, ezek arányát a tripán-kék kizorítás alapján állapítottuk meg.

3H-timidin beépülés meghatározása:

A sejtek DNS szintézise intenzitásának megállapításához a sejtkultúrákhoz (10^6 sejt/edény) a CDM kezelést követően 50 μ Ci (0,2 ml) radioaktív timidin nukleozidot adtunk (Thymidine (6-³H, Chemopol., Csehszlovákia). A feltüntetett időpontokban a sejtszuspenziót tápfolyadékban mostuk, és centrifugálás után (2000 rpm, 5 min., +4 °C) 5 ml hideg 5%-os triklór-ecetsavval precipitáltuk és Millipore filterre gyűjtöttük. A minták radioaktivitását scintillációs számlálóval (Packard Tricarb) mértük.

Reverz transzkriptáz assay:

A QL sejtek tápfolyadékában az MC 29/L vírus jelenlétét és relatív titerét a csak az RNS tartalmú daganatvírusokra jellemző enzim aktivitásának mérésével határoztuk meg. A tápfolyadékot centrifugálással (10 000 g, 30 min, +4 °C) tisztítottuk meg a sejttörmelétől, majd a vírusokat ultracentrifugálással (100 000 g, 90 min, +4 °C) koncentráltuk (MSE 65 Super Speed, U.K.) Az üledéket 0,01 M Trisz-HCl pH = 7,5, 0,1 M NaCl és 0,001 M EDTA pufferben reszuszpéndáltuk. A reakciót az Acta Microbiol. 25, 142 (1978) cikkében le-

irtak (7) szerint végeztük el. Röviden: a TKD puffert, $MnCl_2$ -t, Triton-x100-at és timidin trifoszfátot tartalmazó reakcióelegyet poli-(rA)(dT)₁₂ templát primerrel inkubáltuk a vírus jelenlétében. A szűrőkorongra TCA-val kicsapott szintetizálódott DNS radioaktivitását scintillációs számlálóval határoztuk meg.

Immunfluoreszcencia: A sejtek vázát - a citoskeletont - felépítő actin filamentumok épségét, ill. megváltozását a normális, a transzformált és a CDM-mel kezelt sejtekben indirekt immunfluoreszcenciával mutattuk ki. A sejteket vékony, kör alakú fedőlemezre növesztettük, majd anti-aktin nyúl szérummal inkubáltuk 37 °C-on, 40 percig. Alapos mosás után a minták egy részét második antitestként fluoreszcenciával, más részét rodaminnal konjugált anti-nyúl kecskeszérummal inkubáltuk az előzőkhöz hasonló módon. A második antitest konjugáció után a mintákat fluoreszcens mikroszkóppal ultraibolya fényben vizsgáltuk.

Toxicitási vizsgálat:

Tenyésztőedényben lévő 10^6 számú, két-napos QL fibroblaszt sejtkultúrákat kezeltünk egyidőben DMSO-ban oldott CDM különböző koncentrációival. Az egyes edényekhez 1 ml térfogatban adtuk hozzá a vegyület hígításait. 48 óra múlva sejtszámolást végeztünk, ill. megállapítottuk a sejtek viabilitását. A toxicitási vizsgálat (2. ábra) azt mutatja, hogy a CDM 10^3 , 10^4 és 10^5 hígításai erősen toxikusak, mivel jelentősen csökkentették az élő QL sejtek számát, ill. viabilitásukat. Még a 10^6 hígítás alkalmazása után is sejtszám csökkenést kaptunk, habár ez nem volt jelentős. Lényegesen nem csökkent a sejtszám és a viabilitás 10^7 és e feletti hígításoknál, tehát ezek tekinthetők a biztosan nem toxikus dózisoknak QL sejtek esetében.

Proliferáció-gátlás

Vizsgáltuk a CDM hatását a gyorsan proliferálódó, transzformált QL sejtek szaporodási kinetikájára. A kezeletlen sejtek száma másodnaponként megkétszereződött. A CDM különböző koncentrációi erősen befolyásolták a sejtszaporodást. A 10^7 hígítás a szaporodás-kinetikai görbe jellegét nem változtatta meg, de a kezeletlen sejtekhez képest azonos sejtszám csak későbbi időben keletkezett. Érdekes a 10^6 hígítás hatása. A sejtek lényegesen lassabban kezdtek osztódni, de ez az intenzitás állandó volt, a 6. naptól kezdve pedig fokozódott, és a 8. napon megközelítette az előző hígításnál kapott értéket. Ehhez képest teljesen ellenkező hatást váltott ki a 10^5 hígítás adagolása. Itt is előbb lassú szaporodás indult meg, de ez már a 4. napon megtorpant és a sejtszám ettől kezdve csökkent. A 10^4 hígításnál az előbbi jelenség már a második napon bekövetkezett.

8

A DNS szintézis intenzitása

A DNS szintézis intenzitását a kezeletlen és kezelt sejtekben egy radioaktív nukleozidnak, a timidinnak - az osztódó sejtekbe való beépülésével mértük. Egyre fokozódó beépülést tapasztaltunk a kezeletlen sejteknél. A beépülés intenzitásának növekedése csak az 5-6. napon mérséklődött. A 10^7 hígításnál változó mértékű, hol növekedő, hol csökkenő beépülést észleltünk, ami azonban végeredményben lassú növekedést mutatott. A 10^6 hígítás a DNS szintézis intenzitását kisebb mértékben, a 10^5 hígítás igen jelentős mértékben csökkentette a QL sejtekben.

Reverz transzkriptáz assay

A CDM-nek a sejtszótódásra, a DNS szintézis intenzitására való hatása mellett azt is vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a vegyület a QL sejtek által termelt daganatvírusok szaporodását. A megjelölt napokon a sejtkultúrák tápfolyadékaiból mintákat vettünk és a daganatvírusokra jellemző reverz transzkriptáz enzim aktivitását mértük. A CDM 10^7 hígítása csökkentette ugyan az enzimaktivitással arányos víruskoncentrációt a kezeletlen sejtekhez képest, de az adott időpontokban mért értékek emelkedő tendenciát mutattak. Alacsony kezdeti szintről a 10^6 hígítás esetében is növekedés indult meg, de ez a 6. napon (a 3. mérési sorozatban) visszaesett, a erősen csökkent víruskoncentrációt eredményezett. A 10^5 hígítás a vírusszaporodást teljesen meggátolta, a 6., 8. napokon nem kaptunk enzimaktivitást.

A citoskeleton aktin filamentumainak változása

A magasabbrendű sejtek váza a citoskeleton, amely a sejtek citoplazmájában lévő fehérjefonalak komplex hálózata. Fő alkotó elemeik az actin-filamentumok, ezek jelenlétét, ill. változásait vizsgáltuk normális és daganatvírussal transzformált, ill. CDM-mel kezelt fibroblaszt sejtekben. A normális fibroblasztokban erőteljes, rendezett kötegeket alkotó, a citoplazma teljes egészére kiterjedő határozott aktin kötegeket figyelhetünk meg. A daganatvírussal transzformált sejtek egész morfológiai megjelenése különbözik a normálstól. Bennük az aktin filamentumok felrostozódtak, csomókban, rendszertelenül, irányultság nélkül helyezkednek el, a citoplazma egy részén található, vagy sok helyen nem is ismerhetők fel. A CDM kezelés után a sejtek ismét határozott morfológiai megjelenésűek, nyúlványokkal rendelkeznek, és a korábban csomókká töredezett aktin részecskék filamentummokká rendeződnek. Ezek irányultsága azonban még nem olyan erőteljes, mint a normális sejtekben. Lényegében hasonló folyamat figyelhető meg, ha fluoreszcenciát

lyett rhodaminnal festettük meg a citoszkeleton filamentumait a teljesebb demonstrálhatóság kedvéért.

A CDM gyógyászati hatását Németh-Kellner lymphoma (NKL) tízszeres hígítási sorozatával fertőzött svájci fehéregereken vizsgáltuk. Az egereket az NKL hígításával és ezzel egyidejűleg a CDM-mel oltottuk be. Az állatokat a kísérlet folyamán még további öt alkalommal kezeltük a CDM anyaggal. A kontrollcsoport az NKL hígítási sorát kapta, azonban más kezelést nem végeztünk.

A CDM-mel kezelt, és kontrollállatok átlagsúlyát a kísérlet során 6 alkalommal hasonlítottuk össze. A CDM-mel kezelt állatok átlagsúlya a 16. napon a kontrollokénál 8-27%-kal volt alacsonyabb.

A 18. napon az állatokat leöltük és felboncoltuk. A hígítatlan NKL-lel (50 millió sejt/állat) kezelt egereknél a CDM nem gátolta a tumorképződést. Az 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , illetve kevesebb sejttel inokulált csoportoknál a CDM sorrendben 20, 80, illetve 100%-os védelmet nyújtott.

A CDM Kalmodulin antagonistá hatása

A kalmodulin sokfunkciós fehérje, számos alapvető folyamatot szabályoz, központi szerepe van a sejten belüli kalciumszint, mint intracelluláris „második messenger” működésében. Így meghatározó a szerepe a sejttanyagcserében, a hormon-hatások továbbításában, a normál, valamint a malignusan transzformált sejtek osztódásának és a sejt-sejt kapcsolatok (gap-junction) szabályozásában, valamint a tumorprevencióban.

M. L. Veigl és munkatársai, *Biochimica et Biophysica Acta*, 738, 21-48. (1984.)

Klee, C. B. és munkatársai, *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 489-515. (1980).

Cheung, W. Y., *Science*, 207, 19-27. (1980).

Wattersson, D. M. és munkatársai, *Ann. N. Y. Acad. Sci. Vol.*, 356 (1980).

Sarkadi, B. és munkatársai, *Haematológia*, 14, 121-136. (1981).

Criss, W. E. és munkatársai, *Fed. Proc.*, 41, 2289-2291. (1982).

Currah és munkatársai, *Int. Cancer Congr. Bp.* 1986. No. 3001.

Hiroshi Ito, *Cancer Letters*, 19, 215-220. (1983).

Wai Yiu Cheung, *Science*, 207, 4 (1980).

Trosko és munkatársai, *Calmodulin antagonist Anal. Cellular Physiology*, Acad. Press. Inc., 100-115. (1985).

Whitfield, J. F. és munkatársai, 97-130., Dowden,

Hutchingen and Ross., Inc., Stroudsburg (1976).

Tupper, J. T. és munkatársai, *J. Cell. Phys.*, 104, 97-103. (1980).

Lichtman, A. H. és munkatársai, *Blood*, 61, 413-422. (1983).

Klee, C. B. és munkatársai, *Adv. Protein Chem.*, 35, 213-321. (1982).

Lee, Jae Seung és munkatársai, *IRCS Med. Sci.*, 13, 1241-1242. (1985).

5 Kaba Keizo M. D. és munkatársai, *J. Neurosurg.*, 63, 905-911. (1985).

Reznik, M. Vivian és munkatársai, *IRCS Med. Sci.*, 14, 209-210. (1986).

10 Lönn Ulf és munkatársai, *Int. J. Cancer*, 39, 638-642. (1987).

A kalmodulin-függő, illetve -független kalcium transzport komponensek mérésével megbecsülhető a kalmodulinra ható vegyületek specificitása illetve toxicitása is.

15 Ezen vizsgálatra igen jól alkalmazható kísérleti rendszer az ún. kifordított vörösvérsejt-membrán vezikula (inside-out vesicle, IOV) preparátum, ahol a vezikulák ATP + Mg^{2+} -függő kalcium felvételt mutatnak, amelynek sebességét kalmodulin hozzáadása jelentősen fokozza; lásd

20 Gopinath, R. M., Vincenzi, F. F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 1203-1209. (1977).

25 Sarkadi, B., MacIntyre, J. D., Gardos, G., *FEBS Letters*, 89, 78-82. (1987).

Scarff, O., Foder, B., *Biochim. Biophys. Acta*, 509, 67-77. (1978).

Az ismert kalmodulin antagonistá vegyületek ezt a kalmodulin-függő kalcium felvételt gátolják, a kalmodulinnal inaktív komplexet képezve felfüggesztik annak hatását; lásd

Vincenzi, F. F., *Cell Calcium*, 2, 387-409. (1981).

35 Roufogalis, B. D., „Calcium and Cell Physiology”, Marme, D. ed., Springer Verlag, Berlin, 148-169. (1985).

Sarkadi, B., Enyedi, A., Nyers, A., Gardos, G., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 402, 329-348. (1982).

A CDM kalmodulin antagonistá hatását a következőképpen vizsgáltuk:

Módszerek

1. Kifordított vörösvérsejt-membrán vezikulák (IOV-k) preparálása

A vezikulákat frissen vett emberi vörösvérsejtekből Sarkadi és munkatársai szerint [*Biochim. Biophys. Acta*, 598, 326-338. (1980)] készítettük.

2. Aktív kalcium transzport mérése

55 A vezikulák aktív kalcium felvételét ^{45}Ca izotópos módszerrel követtük [Sarkadi és munkatársai, *Biochim. Biophys. Acta*, 598, 326-338. (1980)]. A vezikulákat 40-50 μg fehérje/ml koncentrációban 37 °C-on 120 mM KCl-t, 20 mM HEPES-t (pH = 7,0), 0,5 mM ATP-t, 1 mM MgCl_2 -t és 50 μM CaCl_2 -t (benne nyomjelző mennyiségű ^{45}Ca izotópot) tartalmazó médiumban inkubáltuk. A médiumhoz 65 kalmodulint, CDM-t, illetve kalmodulin anta-

gonistát adtunk. 2 perc és 5 perc után a vezikula szuszpenzióból vett mintákat Sartorius membrán filterre (0,65 μ pórusméret) vittük, és vákuum alatt hideg, 0,16 M KCl-oldattal kétszer mostuk. A filter a vezikulákat visszatartja, így a filteren maradó ^{45}Ca radioaktivitásból a kalciumfelvétel kiszámítható. A ^{45}Ca izotóp aktivitásának mérését folyadék szcintillációs módszerrel, Beckman LS-7500 műszerrel végeztük [részletesen lásd Sarkadi és munkatársai (1980)].

3. A kísérletekben használt kalmodulin preparátum a T30 275/3857/81 számú magyar nyilvánossághozzatali irat szerint készült.

4. A vizsgálatok értékelésénél a kalciumfelvétel sebességét a lineáris tartományban vizsgáltuk [Sarkadi és munkatársai (1980)], és nmol Ca x mg IOV fehérje $^{-1}$ x perc $^{-1}$ -ben adtuk meg a kalcium transzport sebességét.

Kísérleti eredmények

CDM hatása IOV-k kalmodulin-függő kalcium felvételére: Az IOV-k gyors kalciumfelvételt mutatnak, amely kalmodulin hatására jelentősen fokozódik. 60 nmol/l kalmodulin közel maximális transzport aktivitást eredményez. CDM hozzáadása a kalmodulin hatását koncentráció-függő módon gátolja, míg a kalmodulin-független (bazális) kalcium transzport sebességet alig befolyásolja. A kalmodulin hatást fél-maximálisan gátló CDM koncentráció (K_i kalmod.) az adott rendszerben $5,5 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$ -nek adódott. A bazális kalcium transzportot felére csökkentő CDM koncentráció 200 $\mu\text{mol/l}$ -nél nagyobbak adódtak.

A CDM gátló hatása függ az alkalmazott kalmodulin koncentrációtól. A gátlás jelentősen lecsökken magasabb kalmodulin koncentrációk jelenlétében.

CDM hatása proteolitikusan aktivált kalcium pumpára

Az IOV-k aktív kalciumfelvétele részleges proteolitikus emésztéssel aktiválható, és egyben kalmodulin-érzékletlenné válik [Sarkadi és munkatársai, Ann. N. Y. Acad. Sci., 402, 329-348. (1982)].

Eredmény

A kalmodulin aktivált kalcium pumpát a CDM $5,5 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$ -es K_i értékkel gátolta, míg a proteolitikusan aktivált enzim esetében a K_i értéke magasabb mint 50 $\mu\text{mol/l}$.

A CDM és ismert kalmodulin-antagonista vegyületek hatásának összehasonlítása

A CDM hatását vinblasztinnal [Vinblasztin. H_2SO_4 -molt. tömeg: 911,4 (SERVA)], klórpromazinnal [(Klórpromazin.HCl) -molt. tömeg:

335 (SIGMA)], trifluoperazinnal [(Trifluoperazin. 2HCl -molt. tömeg: 336,45 (SIGMA)) és kalmidazoliummal [(R-24571) -molt. tömeg: 850 (SIGMA)] hasonlítottuk össze. A CDM az ismert leghatékonyabb kalmodulin antagonisták közé tartozik.

A CDM hatása a vörösvérsejt-membrán Na, K-ATP-áz aktivitására

Minthogy a CDM hatékonyan gátolja a vörösvérsejt-membrán vezikulák kalmodulin-függő kalcium transzportját megvizsgáltuk, hogy ez a hatás mennyire szelektív, illetve mennyire jár együtt más ATP-t használó transzport folyamatok, így a Na,K-ATP-áz aktivitásának gátlásával.

Módszer

Az IOV-k Na-K-ATP-áz aktivitását anorganikus foszfor felszabadulása révén mértük. [Sarkadi és munkatársai, Biochim. Biophys. Acta, 464, 93-107. (1977)].

Eredmény

A CDM Mg-függő ATP-áz aktivitást nem, a Na,K-függő ATP-áz pedig csak magas koncentrációkban és kismértékben gátolta. A 200 μM CDM koncentrációnál észlelt mintegy 30%-os gátlás éles ellentétben áll a kalmodulin-függő transzport aktivitás esetében talált $5,5 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$ -os K_i értékkel.

CDM hatása trombociták és limfociták térfogat szabályozására

Trombociták és limfociták hipoozmotikus mediumba helyezve kezdeti gyors duzzadást, majd regulációs térfogatsökkenést mutatnak [Grinstein, S., Am. J. Physiol., 246, C204-C215 (1984)].

E térfogatszabályozás alapja kalcium-függő K-csatornák és független Cl csatornák megnyílása, majd az ezt követő KCl és víz kiáramlása. A folyamat mind limfociták, mind trombociták [Sarkadi és munkatársai, Am. J. Physiol., 248, C480-C487 (1985)] esetében hatékonyan gátolható kalmodulin antagonistákkal.

Módszer

Az emberi trombociták és limfociták térfogatszabályozását az elektronikus térfogattér-mérés módszerét alkalmazó Laborscale (Medicor) műszerrel vizsgáltuk [Sarkadi és munkatársai (1985)].

Eredmény

A trombociták hipoozmotikus mediumban gyors duzzadást mutatnak, majd a kontrollsejtek 10 percen belül közel teljes mérték-

ben visszanyerik eredeti térfogatukat. Ez utóbbi regulációs folyamatot mind az R24571, mind a CDM mikromolós koncentrációkban teljesen felfüggeszti. A CDM fél-maximális gátlást kiváltó koncentrációja 1-2 $\mu\text{mol/l}$ közöttinek adódott, az R24571-re ez az érték 0,5-1,0 $\mu\text{mol/l}$ közötti volt (a kísérleteket fehérjementes puffer-oldatban végeztük, ez magyarázza az alacsony K_i értéket). A fenti kísérleteket frissen szeparált perifériás vér limfocitákkal is elvégeztük, és teljes mértékben hasonló eredményeket kaptunk.

A térfogat-szabályozás gátlását demonstráló eredmények ismét hangsúlyozzák a CDM kalmodulin-antagonista, illetve kalcium-függő folyamatokat gátló hatását.

Az eredmények összefoglalása

A CDM kifejezett anti-kalmodulin hatással rendelkezik. Az adott kísérleti rendszerben, a vörösvérsejt-membrán kalmodulin-függő kalcium pumpájánál, a fél-maximális gátláshoz szükséges CDM koncentrációja $5,5 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$, míg a bazális kalcium transzport gátlása csak 100 $\mu\text{mol/l}$ felett jelentkezik. Ismert kalmodulin antagonistákkal összehasonlítva a CDM igen hatékonynak mutatkozott. A CDM kalmodulin-gátló hatása specifikus, hiszen a proteolitikusan aktivált kalcium pumpát csak jóval magasabb koncentrációban gátolta, mint a kalmodulin-aktívált rendszert.

A CDM kalmodulint gátló hatása nagyobb mennyiségű kalmodulin adásával visszaszorítható, ennek alapján feltételezhető, hogy a CDM hatása a kalmodulinnal alkotott inaktív komplex képződésén alapul. A CDM hatását szérum albumin jelenléte nem befolyásolja, viszont egyéb szérumfehérjék hatását csökkentik.

A CDM gátolja a trombociták és limfociták hipoozmotikus térfogat-szabályozását. A CDM a Mg-függő ATP-áz aktivitást nem, a Na,K-függő ATP-áz pedig csak magas koncentrációban (200 $\mu\text{mol/l}$) és kismértékben gátolja.

A CDM kalmodulin antagonistáhatásának a jelentősége

A kalmodulin antagonistáhatás nemcsak a műveleg előállított IOV-ken észlelhető, hanem intakt, élő sejteken (limfociták, trombociták) is, mely közvetve a kalmodulin-függő térfogat-szabályozást gátló effektussal igazolható.

A fentiekben idézett irodalmi adatok utalnak mind az intracelluláris Ca^{2+} szint, mind a kalmodulin szerepére a sejtosztódás regulációjában. Számos adat van arra vonatkozóan, hogy a malignusan transzformálódott sejtekben a kalmodulin mennyisége és ezáltal a kalmodulin dependens fehérje-foszforiláció

is megnövekedett, mely a sejtosztódás regulációjának a zavarát eredményezi.

Mindezek alapján a CDM in vitro és in vivo észlelt sejtosztódás-gátló hatása részben a kalmodulin-antagonista effektusával is magyarázható.

A CDM trombocita aggregáció gátló hatása

A metasztázis létrejöttének feltételei közé tartozik, hogy a keringésbe jutott tumor sejteket ne pusztítsa el az immunrendszer, valamint az, hogy a tumorsejtek képesek legyenek megtapadni a különböző szövetekben.

Ezen folyamatokat elősegíti a tumorsejtek felszínén levő fibrin, vagy egyéb alvadási faktorok, melyhez trombociták és egyéb alakos elemek csatlakoznak. Az így kialakult tumorembolus a keringésben védelmet nyújt az immunrendszer sejtjei ellen.

A trombocita aggregációt gátló anyagok, pl. a prosztaciklinek így módon a metasztázis képződést gátolhatják.

Honn K. V. és munkatársai, Biochem. Pharmacol. 32, 1-11. (1983).
14th Int. Cancer. Congr., Budapest, 1986.
Lipton, A. No. 2236; Muszbek, L. No. 2231; Gastpar, H. No. 2232; Zacharski, L. R. No. 2234;
Kwaan, H. C. No. 2235.

Vizsgálati módszer

Az emberi trombociták in vitro aggregációját és ATP kiválasztását Chrono-Log lumi-aggregométerrel vizsgáltuk (Model 460, PICA). A 200.000 sejt/ μl saját plazmában szuszpendált trombocitákat (PRP) 37 °C-on inkubáltuk folyamatos keverés mellett, majd az aggregációt különböző ágensekkel: 10 μM ADP-vel; 0,1 U/ml trombinnal (SIGMA); 2 $\mu\text{g/ml}$ kollagénnel; 200 nM forbol-mirisztát-ace-táttal (PMA); illetve 10^{-6} M végkoncentrációjú A23187 kalcium ionofórral váltottuk ki. Az aggregációt jelző abszorbancia-csökkenés maximális értékét és sebességét egyaránt értékeltük. Az ATP kiválasztást luciferin-luciferáz (SIGMA) enzimrendszer lumineszcenciája révén mértük. A mintákhoz 1 mg/ml luciferin-luciferázt adtunk, amelynek ATP-specifikus lumineszcenciáját kalibrációs görbével határoztuk meg. Az aggregációs és ATP kiválasztási görbéket párhuzamosan, azonos mintából, kétirőfejes rekorderrel rögzítettük. A CDM hatását 2 perces előinkubálást követően vizsgáltuk puffer-oldatban (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES -pH 7,4-, 5,5 mM glükóz).

Eredmény

Frissen levett vérből izolált, saját plazma-mediumban a CDM önmagában trombocita aggregációt nem okoz, ugyanakkor jelentősen

gátolja számos aggregáló ágens hatását. A CDM erősen csökkenti az aggregáció sebességét és a kialakuló maximális aggregáció mértékét, ugyanakkor nem befolyásolja a kezdeti gyors szakaszt, amely a trombociták alakváltozásával korrelál.

Az aggregáció maximális értékét 50%-ra csökkentő drog koncentrációkat három különböző aggregálószerezrel végzett kísérlet alapján állapítottuk meg. Trombint, ADP-t, vagy kollagént alkalmazva aggregáló ágensként a CDM saját plazma médiumban 50-100 $\mu\text{mol/l}$, míg plazma fehérjementes pufferben 5-15 $\mu\text{mol/l}$ koncentráció-tartományban okozott félmaximális aggregáció-gátlást. A fehérjementes közegben kifejtett hatás mértéke jól egyezik a kalmmodulin-antagonista hatás $5,5 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$ K_i -értékével.

Két ismert kalmmodulin-antagonista hatású vegyület aggregáció-gátló hatékonyságát hasonlítottuk össze a CDM-mel.

A Kalmidazolium R24571 (SIGMA) a CDM-nél hatékonyabb, míg a Trifluoperazin (TFP, SIGMA) a CDM-mel közel azonos gátló hatást fejt ki.

Fehérjementes pufferban a CDM magas koncentrációi - 200 $\mu\text{mol/l}$ felett - önmagukban is aggregáló hatással rendelkeznek.

A trombocita aggregációval párhuzamosan az ATP kiáramlást is vizsgáltuk. Normál körülmények között a trombociták aggregációját ADP, ATP, szerotonin és egyéb tárolt anyagok kiáramlása követi, amelynek fiziológiai jelentősége elsősorban a trombocita aggregáció és a vérárvadás folyamatára gyakorolt pozitív visszacsatolás jellegű hatásban van; és újabb trombociták aggregációját indítja el. Kísérleteinkben ATP-érzékeny lumineszcens enzimrendszerrel, a luciferin-luciferáz komplex reakciójával követtük az ATP kiáramlást. 100 $\mu\text{mol/l}$ CDM mind az aggregáció, mind az ATP kiáramlást teljes mértékben gátolta. A CDM, az R24571 és trifluoperazin (TFP) hasonló koncentrációkban eredményezte az ATP kiáramlás gátlását, mint az aggregáció gátlását.

Összefoglalva, a CDM hatékonyan gátolja a trombocita aggregáció és az ATP kiáramlás folyamatát.

Ez a gátló hatás csökkenti a tumorsejt embolusok kialakulásának a lehetőségét, így kisebb a metasztatizálás képződés valószínűsége.

A CDM protein kináz C és sejtmembrán lipidek anyagcseréjének gátló hatása

A sejtosztódást illetve differenciálódást kiváltó különböző faktorok a sejtmembrán receptorain keresztül fejtik ki hatásukat. A folyamatok egyik lehetséges útja a protein kináz C aktiválódása és ezzel együtt a sejten belüli Ca^{2+} szintváltoztatása. Ezen történetekben jelentős szerepet játszanak a sejtmembránban levő foszfoinozitidek. A foszfatidil inozitol monofoszfát (PIP)-ból képződő

foszfatidil-inozitol 4,5 bifoszfát (PIP₂) a specifikus receptor hatásra elbomlik inozitol 1,4,5-trifoszfáttá (IP₃) - mely közvetlenül váltja ki a Ca^{2+} szignált - és diacil-glicerollá (DAG) - mely a protein kináz C aktivátora.

A malignus transzformáció során kimutatható a foszfoinozitidek anyagcseréjének aktiválódása.

Ezen anyagcsere-folyamatok gátlása az osztódás gátlásához és egyben a differenciálódás elősegítéséhez vezetnek.

Nishizuka, Y., Nature, 308, 693-697. (1984).

Nishizuka, Y., J. Natl. Cancer Inst., 76, 363-370. (1986).

15 Berridge, M. J., Biochem. J., 220, 345-360. (1984).

Nishizuka Y., Science, 233, 305-312. (1986).

20 Berridge, M. J. és Irvine, R. F., Nature, 312, 315-321. (1984).

1.) A CDM protein kináz C gátló hatása a trombocitákban

Módszer: lásd a „Trombocita aggregáció-gátlásnál”

Eredmény

A CDM különösen hatékonyan gátolja a tumorképződést elősegítő forbolésterrel (Forbol-mirisztát-acetát (PMA) kiváltott trombocita aggregációt.

A PMA-ról ismert, hogy a Ca^{2+} és lipid függő protein kináz C aktiválásán keresztül fejt ki hatását. (Nishizuka, Y., Nature, 308, 693-698. (1984).

A PMA hatására egy 47-48 kDA molekulatömegű fehérje foszforilációja fokozódik - ez trombocita membrán esetén a protein kináz C ismert szubsztrátja (Kaibuchi, J. Biol. Chem., 258, 6701-6704 (1983).

Ezt a foszforilációt a CDM erősen gátolja, ami a CDM protein kináz C aktivitást gátló hatását bizonyítja.

2.) A CDM proteinkináz C gátló hatása részlegesen tisztított enzimén

Protein kináz C tisztítása

Az enzimet frissen leölt nyúl agyának kivonatából részlegesen tisztítottuk DEAE cellulóz kromatográfia segítségével, a korábban publikált módon (ref. 1.). Az intakt protein kináz C megőrzésére fenilmetilszulfonil fluorid és leupeptin proteáz-gátlókat használtunk.

A CAMP dependens protein kináz disszociált katalitikus alegységének tisztítása

A disszociált katalitikus alegységet nyúl vázizmából tisztítottuk részlegesen, egymást követő DEAE-cellulóz és foszfo-cellulóz kroma-

tográfiai segítségével. A tisztítás a korábban publikált módon (ref. 2.) történt.

A protein kináz C aktivitásának mérése

A protein kináz C katalitikus aktivitását az általunk kidolgozott rendszerben (ref. 1,3,4.) mértük.

Az enzimaktivitás mérésének alapja a protein kináz C azon képessége, hogy az ATP gamma-helyzetű foszfát-csoportját átviszi egy specifikus szubsztrátjának tekinthető nonapeptid, az Ala-Ala-Ala-Ser-Phe-Lys-Lys-amid szerin oldalláncára. (A nonapeptidet mi szintetizáltuk.) A mérés lényege a (^{32}P)ATP-ből a protein kináz C hatására a nonapeptidbe épülő ^{32}P radioaktivitásának mérése.

A reakcióelegy összetétele (400 μl végtérfo-

50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
10 mM MgCl_2
0,01 mM (^{32}P)ATP (kb. 300000 cpm per reakcióelegy)
0,7 mg/ml nonapeptid
1,25 mM CaCl_2
20 $\mu\text{g/ml}$ foszfatidilserin
25 ng/ml forbol 12-mirisztát 13-acetát

az alkalmazott protein kináz C preparátum aktivitása 70-100 pmol transzferált foszfát/perc.

A CDM hígítási sorokat abszolút alkoholban készítettük, az enzimek inkubációs elegybe (400 μl) 10 μl térfogatú alkoholos CDM oldatot vittünk és a CDM nélküli kontroll inkubációs elegyeket 10 μl abszolút alkohollal egészítettük ki.

Az inkubáció 37 °C-on 10 percig folyt, a reakciót jégecettel leállítottuk, a foszforilált nonapeptidet szeparáltuk és a nonapeptidbe épült radioaktivitás mennyiségét Cserenkov effektus alapján mértük. A kapott eredmény mindig 2-2 párhuzamos inkubáció során kapott érték átlagát jelenti.

A CAMP-dependens protein kináz aktivitásának mérése

A mérés alapjául a (^{32}P)ATP-ből H2b hisztonba épülő ^{32}P radioaktivitásának mérése szolgált. (A H2b hiszton borjú timuszból preparáltuk.)

A reakcióelegy összetétele (400 μl végtérfo-

50 mM Tris HCl (pH 7,5)
10 mM MgCl_2
0,5 mg/ml H2b hiszton
0,01 M (^{32}P)ATP (kb. 300000 cpm reakcióelegy)
a disszociált katalitikus alegység aktivitása 60-100 pmol transzferált foszfát/perc volt.

Eredmények

A CDM 10-50 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció tartományban a protein kináz C gátlószereinek bizonyult. Tekintve, hogy a gátlás nem szabályos telítési görbének megfelelő koncentráció-függést mutatott, az 50%-os gátlást okozó CDM koncentrációt csak becsülni lehet, ez az érték 20-25 $\mu\text{g/ml}$ körül volt. 50 $\mu\text{g/ml}$ -nél nagyobb CDM koncentrációk gyakorlatilag teljes gátlást idéztek elő.

A CAMP-dependens protein kináz disszociált katalitikus alegységének a katalitikus aktivitását ebben a koncentráció-tartományban a CDM nem gátolta észrevehetően. Ennek az enzimnek az aktivitását csak nagyobb koncentrációban gátolta. Az 50%-os gátlás 160 $\mu\text{g/ml}$ CDM koncentráció körül volt.

1)
20 Romhányi, T., Seprődi, J., Antoni, F., Mészáros G., Buday, L. and Faragó, A. (1986). Biochim. Biophys. Acta 888, 325-331.

2)
Mészáros, Gy., Enyedi, A., Bánhegyi, G., Mandl, J., Antoni F. and Faragó, A. (1987). Acta Biochim. Biophys. Hung. 22, 7-16.

3)
Romhányi, T., Seprődi, J., Antoni, F., Mészáros, G. and Faragó, A. (1985). Biochim. Biophys. Acta 827, 144-149.

4)
Buday, L., Seprődi, J., Farkas, Gy., Mészáros, Gy., Romhányi, T., Bánhegyi, G., Mandl, J., Antoni F. and Faragó, A. (1987). FEBS Letters 223, 15-19.

3.) A CDM hatása trombocita membránfehérjék-lipidek foszforilációjára

Módszer

A membrán komponensek foszforilációját trombocita és vörösvérsejt-membrán szeparátumokban Sarkadi és munkatársai, valamint Enyedi és munkatársai szerint mértük. (Sarkadi és munkatársai, FEBS Letters, 152, 195-198. (1983). Enyedi és munkatársai FEBS Letterv, 161, 158-162. (1983). A membránt ^{32}P -ATP jelenlétében inkubáltuk, majd a reakciót triklór-ecetsavval leállítottuk. A kicsapott fehérjéket ATP és P_i tartalmú triklór-ecetsavval háromszor mostuk. A foszforilált fehérjék vizsgálatához az üledéket pufferban vettük fel, majd Laemmli (Nature, 227, 680-685. (1970) típusú gélelektroforézist végeztünk. A foszforilált lipidek vizsgálatához az üledéket kloroform: metanol: sósav-oldatban vettük fel, majd a lipideket a szerves fázisba átráztuk. A jelzett lipideket vékonyréteg-kromatográfián azonosítottuk. A jelzett lipideket illetve fehérjéket autoradiográffal vizsgáltuk.

Eredmény

A foszforilált lipideket vékonyréteg-kromatográfiával azonosítva megállapítottuk, hogy a CDM 40 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban erősen gátolja a foszfatidil-inozitol-monofoszfát (PIP/-difoszfát PIP₂) átalakulást, míg a PIP foszforilációját serkenti. Ezen lipidek anyagcseréje igen fontos szerepet játszik a sejt-működés szabályozásában. [Vance, Biochemistry of Lipids and Membranes, Benjamin-Cummings, Menlo Park (1985)].

A párhuzamosan vizsgált többi kalmodulin antagonistának (R24571 és TFP) nem volt ilyen jellegű hatása a lipid-foszforilációra.

A hatások jelentősége

A CDM protein kináz C és membrán lipid foszforiláció (PIP₂) gátló, a kalmodulin antagonistája hatása következtében a sejtosztódás szabályozását befolyásolja.

A CDM DIFFERENCIÁLÓDÁST ELŐSEGÍTŐ

HATÁSA

(morfológiai, biokémiai változások)

A differenciálódás genetikusan determinált folyamatának lezajlásához specifikus induktorok, inhibitorok és meghatározott környezeti tényezők szükségesek.

A malignusan transzformált sejtekre jellemző a környezetüktől izolálódás, elszakadás, csökkent adhézió, fokozott sejtmobilitás.

Hayashi, H. és munkatársai, Int. Rev. Cytol., 70, 139-215. (1981).

Rohrschneider, L. és munkatársai, valamint Sefton B. és munkatársai, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 46, 939-965. (1982).

14th Int. Cancer Congr. Bp. (1986). Carr, I. és munkatársai, No. 54., valamint Okabe, H. és munkatársai, No. 306. Gorbsky, G.: The Cell Surface in Development and Cancer., Vol. 3., Plenum Press, N. Y. (1986), 129-156. Jagidar, J. és munkatársai, Cancer., 56, (7), 1643-1648. (1985).

Puricelli, L. és munkatársai, Cancer Letters, 29, 189-195. (1985),

Raynor R. és munkatársai, Oncology, 41, 420-426. (1984.).

A malignusan transzformálódott sejtek állandóan osztódnak s emiatt nem képesek a differenciálódásra. Hiszen a differenciálódás és sejtosztódás egyidőben nem történhet. Ezért célszerű lenne olyan anyagok alkalmazása a daganatterápiában, amelyek a differenciálódást elősegítik, s így esetleg az osztódási ciklust megnyújtva a korlátlan sejt-szaporodást megakadályozzák.

14th Int. Cancer Congr. Bp. (1986), Hozumi, M. és munkatársai, No. 1868., valamint Heby, O., No. 1873.

A CDM kezelés hatására in vitro normál embrionális és tumoros eredetű sejtenyésze-

teken a differenciálódás morfológiai és biokémiai jelei észlelhetők.

Továbbá nemcsak a differenciálódási folyamat elősegítése tapasztalható, hanem bipotens (egér mielocitás leukémia) őssejtek esetén a CDM a differenciálódás irányára (monocita-makrofág jellegű sejtek aránya növekszik) is befolyást gyakorol.

IN VITRO VIZSGÁLATOK

1.) Patkány embriók hipotalamusz szövettan-nyészete

17-18 napos patkány embriók hipotalamusz szövetét (ncl. paraventr., ncl. dorso et ventromed., és nucl. arcuatus) egy hétig tenyésztettük, majd különböző koncentrációjú CDM-mel (4 illetve 10 $\mu\text{mol/l}$) 2 óra illetve 24 óra hosszat kezeltük a sejteket párhuzamos kísérleti elrendezéssel, 6-6 elemszámot alkalmazva. A differenciálódás morfológiai jeleit fénymikroszkóppal (Giemsa festés), illetve transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Eredmények

Fénymikroszkópos vizsgálatok: a kontrollhoz hasonlítva a differenciálódás a következő morfológiai jelekben nyilvánul meg:

- fokozott arborizációban;
- az idegsejtnyúlványokon levő apró megvastagodások megjelenésében.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok: a CDM-mel kezelt tenyészetek citoplazmájában közel a sejtmembránhoz igen sűrű, párhuzamosan elhelyezkedő rostrendszer alakult ki. Ezen rostok a membrán közelében gyakran hosszban kinyúlnak a sejtekből, és azok között hálózatot hoznak létre.

Biokémiai érés jele: A DOPA dekarboxiláz enzimaktivitás növekedése: HPLC vizsgálati módszerrel megállapítottuk (Saller, C. F. és munkatársa, J. Chromatography, 309, 287-298. (1984), hogy a CDM kezelés után a sejtenyészetek dopamin-tartalma 25-30%-os emelkedést mutatott. (L-DOPA-val inkubált $\mu\text{g/mg}$ fehérjére számított érték). A morfológiai változások arra utalnak, hogy elősegíti a differenciálódást a CDM.

2.) Átoltatható neuroblastoma sejtvonal (N18) CDM kezelése (a fentiekkel megegyező körülmények között)

A fénymikroszkópos vizsgálatokkal nem volt kimutatható morfológiai változás.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok során a rostos elrendeződés a citoplazmában csak elvétve volt megfigyelhető, mennyisége a primer embrionális hipotalamusz sejtekéhez

képest kevesebb volt. Ezzel szemben észlelhető a sejtmembrán aktiv tevékenységére utaló mikrobolyhok kialakulása, valamint a citoplazmában elektrodenz testecskék megjelenése, amelyek katekolamin szemcséknek felelnek meg.

A biokémiai vizsgálatok a DOPA dekarboxiláz enzimaktivitás érték kifejezett növekedését mutatták, a kontrollhoz képest 65-70%-os növekedés volt észlelhető.

A vizsgált rendszerekben CDM kezelés mind az embrionális hipotalamusz, mind az N18-as sejtenyészetek esetében 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban és 24 órás inkubációs idő során fejtette ki a maximális hatást a differenciálódásra.

3.) Humán embrionális fibroblaszt szövete-nyészet

Normál humán embrionális fibroblaszt sejtvonalon vizsgáltuk a különböző inkubációs idejű és koncentrációjú CDM morfológiai hatását.

Módszerek

Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) rutin vizsgálat, speciális „orientált” metszési technikával (metszés a vizsgált szubsztrátum síkjára merőlegesen), valamint scanning elektronmikroszkópos vizsgálat. Egy és 20 órás inkubálási időt alkalmazva, a CDM koncentrációja 6,6-16 $\mu\text{mol/l}$ volt.

Eredmények

A legkifejezettebb morfológiai változásokat 20 órás inkubáció után 16 $\mu\text{mol/l}$ CDM koncentráció jelenlétében észleltük.

A scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok eredménye:

- az osztódás szakaszában levő „single sejtek” esetében jelentős sejtnyúlvány-képződés látható, valamint a nyúlványok széli része elsimult „rafflingok” hiánya, melyek szubsztrát adhézióra a sejtek erőteljes rögzítettségére utalnak.

- A sejtek közötti határok elmosódottak-ká válnak a sejtfelszín felett, mely a sejtek által termelt sejtközötti állomány fokozottabb termelésére utal.

A transzmissziós elektromikroszkópos vizsgálatok eredménye:

- a durva endoplazmatikus retikulum vezikulái kitágulnak;
- erőteljes citoplazmatikus vakuolizáció jelentkezik.

4.) A CDM hatása MC29/L avian myelocytomatosis vírussal transzformált fibroblaszt sejtvonalra

5 A citoszkeleton aktin filamentumainak változása:

A magasabbrendű sejtek váza a citoszkeleton, amely a sejtek citoplazmájában levő fehérje fonalak komplex hálózata. Fő alkotó elemeik az aktin-filamentumok, ezek jelenlétét, illetve változásait vizsgáltuk normális és daganatvírussal transzformált, illetve CDM-mel kezelt fibroblaszt sejtekben. A normális fibroblasztokban erőteljes, rendezett kötegeket alkotó, a citoplazma teljes egészére kiterjedő határozott aktin kötegeket figyelhetünk meg. A daganatvírussal transzformált sejtek egész morfológiai megjelenése különbözik a normálistól. Bennük az aktin filamentumok felrostozódnak, csomókban, rendszertelenül, irányultság nélkül helyezkednek el, a citoplazma egy részén találhatók, vagy sok helyen nem is ismerhetők fel.

25

Módszer:

Immunfluoreszcencia: a sejtek vázát - a citoszkeleton - felépítő aktin filamentumok épségét, illetve megváltozását a normális, a transzformált és a CDM-mel kezelt sejtekben indirekt immunfluoreszcenciával mutattuk ki. A sejteket vékony, kör alakú fedőlemezre növesztettük, majd anti-aktin nyúlszerűmmal inkubáltuk 37 °C-on, 40 percig. Alapos mosás után a minták egy részét második antitestként fluoreszcenciával, más részét rodaminnal konjugált anti-nyúl kecskeszerűmmal inkubáltuk az előzőekhez hasonló módon. A második antitest konjugáció után a mintákat fluoreszcens mikroszkóppal ultraibolya fényben vizsgáltuk.

Eredmény:

A CDM kezelés után a sejtek ismét határozott morfológiai megjelenésűek, nyúlványokkal rendelkeznek, és a korábban csomókká töredezett aktin részecskék filamentummokká rendeződnek. Ezek irányultsága azonban még nem olyan erőteljes, mint a normális sejtekben. Lényegében hasonló folyamat figyelhető meg, ha fluoreszcein helyett rodaminnal festettük meg a citoszkeleton filamentumait a teljesebb demonstrálhatóság kedvéért.

A vizsgálatok azt mutatják, hogy a CDM a vírus által transzformált sejtek citoszkeletonális rendszerét reorganizálja.

*In vivo vizsgálatok*1) *Ehrlich ascites tumorsejtek:*

CDM-mel kezelt és kezeletlen (kontroll) egerekből nyert Ehrlich ascites tumorsejtek felszínén található fibronektin (FN) mennyiségének a vizsgálata:

Módszer:

A CDM kezelés 500 µg/kg dózisu CDM intraperitoneális adagolásával történt 1 héti, naponta. A kontrollegerek a CDM-mel azonos mennyiségű fiziológiai só-oldatot kaptak. Metanollal tárgylemezre fixált tumorsejteket primer antitestként 1:100 hígítású, nyúlban termeltetett anti FN immunglobulinnal inkubáltuk egy éjszakán át, majd a mintákat Na-foszfát-puffert tartalmazó, fiziológiai só-oldattal többször átmostuk. Szekunder antitestként 1:100 hígítású, peroxidázzal jelzett anti-nyúl immunglobulint kötünk a primer antitestre. A peroxidáz reakció előhívása di-amino-benzidin-tetrahidro-kloriddal történt. A reakció előhívása után a sejtek felszínén található FN mennyiséget fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

Eredmény:

A CDM kezelést követően nyert Ehrlich ascites tumorsejtek felszínén 2-3-szor vastagabb FN réteg képződött a kezeletlen kontrollokhoz viszonyítva.

2) *Limfocitás choriomeningitis vírusfertőzés*

A CDM hatása a limfocitás choriomeningitis vírusfertőzés lefolyására egerekben. Felnőtt egerekben a vírusfertőzést követő meningitis lefolyását nem befolyásolja. Ezzel szemben szopós egerek T-dependens immunológiai reakcióját fokozza, mely az ontogenetikai fejlődés gyorsítását jelenti (immunológiai érés, differenciálódás).

- Részletesen lásd később, az immunológiai vizsgálatoknál.

A differenciálódási folyamat irányának a befolyásolása:

Módszerek:

A mielocitás leukémiából származó egér csontvelő sejtek differenciálódásának in vitro rendszerben történő vizsgálatát lóvérből nyert ún. „plasma cloth”-on végeztük, McCoy mediumban, 20% plazma jelenlétében. [Potten, C. S., Stem. Cells. Churchill Livingstone, London (1983)].

Petri-csészénként egyenlő számú primer sejtet szélesztve (500 sejt/ml) vizsgáltuk a kolóniaképződésre gyakorolt CDM hatást. A CDM-et 0,05-15 µmol/l koncentráció-határok

között változtattuk nagyságrendes hígítással. A kolóniák számát, illetve azok differenciáltságát a szélesztést követő hatodik napon határoztuk meg. Vizsgáltuk a sejtek egy specifikus induktor (WEHI) hozzáadását követő differenciálódásának jellegét és mértékét a CDM különböző koncentrációinál.

Az inkubálási időt követően kialakuló kolóniákból a sejtek leukocitákká illetve monocita makrofággá differenciálódnak.

Eredmények

Minimálisan bipotencialitásukat megőrzött csontvelősejtek kolóniáinak differenciálódásakor a CDM kezelés hatására eltolódás tapasztalható a keletkező sejttípusok arányában. Míg a kontroll esetében nagyobb arányban mielociták, addig a kezelt kultúrákban nagyobb mennyiségben monocita makrofág jellegű sejtek jelennek meg. A CDM maximális hatását 5 µmol/l koncentrációban észleltük.

A hatás jelentősége

A CDM differenciálódást elősegítő hatása feltételezésünk szerint a következő biokémiai mechanizmusokkal magyarázható:

- A CDM gátolja a foszfatidil - inozitol - monofoszfát (PIP₁) bifoszfáttá (PIP₂) való átalakulását.
- A CDM szelektív kalmodulin antagonist.
- A CDM protein kináz C gátló.

Ezen biokémiai folyamatok gátlása nem vezet a sejtek pusztulásához, hanem lehetővé válik, hogy a sejtek kikerüljenek az állandó osztódási ciklusból, és a differenciálódás irányába álljanak át a sejttanyagcsere folyamatok.

A tetanusz toxin adása:

Az immunizálástól számított 21. napon kellő mennyiségű LD₅₀-tartalmú tetanusz toxinnal mérgezve a kísérleti állatokat, megfigyeltük a csoportokban bekövetkező túlélési/elhullási arányokat.

Kaerber-Spearman módszerével meghatároztuk az 50%-os védettséget okozó antigénmennyiségeket csoportonként, majd azok értékét a kontroll standardokhoz viszonyítva relatív hatásokban fejeztük ki.

Eredmények:

- az adszorbeált tetanusz toxoid csökkenő adagjaival immunizált kísérleti állatok tetanusz toxinnal szembeni védettségének mértékét a CDM adagtól és az alkalmazásnak a teszt-antigénhez viszonyított időzítésének a függvényében befolyásolja.
- A CDM optimális adagolás (100-150 µg/kg) esetében a leghatásosabb ad-

- júváns" hatást az antigénnel egyidejűleg adva, illetve az antigén beadását közvetlenül megelőző vagy követő időszakban adva fejt ki. Ez arra utal, hogy a CDM elsődlegesen a makrofágokon, illetve ezt követően a T sejtek szintjén fejt ki immunmoduláló hatását.
- A.B-sejtek produktivitását csakis a T sejtek közvetítésével fokozza, és a már beállott ellenanyag-választ nem befolyásolja.
- Réthy, L., Ann. Immunol. Hung. Suppl. I, 429. (1984),
 Réthy, L., Ann. Immunol. Hung. 26, 185. (1986).

2) *Limfocitás choriomeningitis (LCM) vírusfertőzés lefolyásának módosítása egerekben*

Ép, kifejlett immunrendszerrel bíró felnőtt egerekben az LCM vírusfertőzésre adott celluláris immunválasz következményeként limfocitás choriomeningitis jön létre, és a vírusfertőzés utáni 6-8. napon az állatok 100%-ban elhullanak. A celluláris immunválasz-képességet csökkentő kezelésekkel és beavatkozásokkal felnőtt egerekben a betegség kivédhető, az állatok idegrendszeri tüneteket nem mutatnak, és életben maradnak.

Földes, P. és munkatársai, Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 11, 277. (1964/65),
 Anderlik, P. és munkatársai, Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 22, 27. (1975),
 Szeri, I. és munkatársai, Acta Microbiol. Acad. Sci., Hung., 23, 231. (1976),
 Hori, R. és munkatársa, Jph. J. Microbiol., 20, 249. (1976).

A celluláris immunválasz-képességet fokozó kezelések, így pl. a limfoid rendszer proliferációját okozó fitohemagglutinin (PHA) kezelés viszont elősegíti az i. cer. LCM vírusfertőzés halálos kimenetelű meningitis formájában történő lefolyását, azaz fokozza a vírusfertőzésre kialakuló celluláris immunreakciót.

Bános, Zs. és munkatársai, Experientia, 29, 1137. (1973),
 Bános, Zs. és munkatársai, Kísérletes Orvostudomány, 27, 327. (1975).

Szopós egerekben az elhullás aránya és időpontja attól függ, hogy az állatok milyen korúak a fertőzés időpontjában. A fertőzést virushordozó állapotban túlélő szopós egerek aránya az újszülött kortól a felnőtt kor felé haladva, az immunrendszer érésevel párhuzamosan csökken, és az idősebb egerek a fertőzést követően korábban hullanak el, mint a fiatalabbak. Szopós egerekben az immunrendszer működését serkentő, stimuláló hatások elősegítik az i. cer. LCM vírusfertőzés meningitis formájában történő lezajlását.

Bános, Zs. és munkatársai, Acta Microbiol. Acad. Sci., hung., 26, 29. (1979),

Bános, Zs. és munkatársai, Acta Microbiol. Acad. Sci., hung., 26, 127. (1979),
 Bános, Zs. és munkatársai, Acta Microbiol. Acad. Sci., hung., 29, 99. (1982),

LCM vírusfertőzés

Kísérleteinkben a W. E. törzset használtuk, amelyet egerekben végzett sorozatos agypaszázásokban tartunk fenn, és -70 °C-on tárolunk. Az agyszuszpenziók és vírus-hígítások elkészítéséhez minden esetben PBS oldatot használtunk. Az agyszuszpenziók elkészítéséhez az agyakat steril körülmények között eltávolítottuk, kvarchomokkal eldörzsöltük, 1:10 arányban hígítottuk és üleptettük. A vírus titrálását minden alkalommal úgy végeztük, hogy az LCM vírus tízes lépéskű hígításainak 0,03 ml mennyiségével hatetes felnőtt egereket oltottunk i. cer.-an.

A vírus LD₅₀-értékét Reed és Muench módszer szerint számítottuk ki [Am. J. Hyg., 27, 403. (1938)]. A kísérleti állatokat az előzetesen titrált vírus 100 LD₅₀ mennyiségével (0,03 ml volumenben) oltottuk i. cer.-an. A kontrollként szolgáló egereket a vírusfertőzéssel azonos módon normál agyszuszpenzióval oltottuk. A kísérletek folyamán naponta kétszer ellenőriztük a limfocitás-choriomeningitisre jellemző idegrendszeri tünetek (remegés, görcsök) kialakulását, és regisztráltuk az állatok elhullását.

LCM vírusreizolálás

A vírusfertőzést 21 nappal túlélte egerekből a steril feltételek mellett eltávolított agyakat egyedileg kvarchomokkal eldörzsöltük, 1:10 arányban hígítottuk, és az így nyert szuszpenziók spontán ülepedés utáni felülúszójával oltottunk egércsoportokat i. cer.-an. A LCM vírus visszanyerését az egerekben a jellemző idegrendszeri tünetek és elhullás alapján állapítottuk meg.

Eredmények

Felnőtt egerekben 100-2000 µg/kg közötti dózisokkal végzett egyszeri intraperitoneális előkezelés nem befolyásolta az LCM vírusfertőzés lefolyását. Szopós egerekben 100-1000 µg/kg között vizsgáltuk a hatást. A nagyobb dózisú előkezelések (500 és 1000 µg/kg CDM) 19%-kal emelték a limfocitás choriomeningitisben való elhullást. A vizsgált rendszerben tehát a CDM immunmoduláns hatást mutat, vagyis a celluláris immunválasz-képesség fokozását eredményezi. Mivel ezen hatás csak a szopós egereknél jelentkezett, ez egyben azt jelenti, hogy a CDM szopós egereknél elősegíti az immunrendszer érési folyamatát.

3.) A CDM hatása az egér lépsejtek blasztos transzformációjára

Anyagok és módszerek

CBA/CA (LATI, Gődöllő) him egereknek 20, 50 és 100 µg/kg CDM-et adtunk intraperitoneálisan. Két óra múlva az állatokat leöltük. Lépsejteket eltávolítottuk, a lépsejteket Ficoll-Uromiro gradiensen szeparáltuk, majd Greiner (NSZK) tenyésztőlemezekre 200 ezer sejtet tenyésztettünk 5-5 párhuzamost használva. Röviden: az RPMI 1640 tápfolyadék (GIBCO, USA) 10% hővel inaktivált fetális borjúsvét (Phylaxia, Budapest), 2 mM L-glutamint (SERVA, NSZK), 100 NE Penicillint, 100 µg/ml gentamycint és 7,5 µg/ml amphotericin B-t (SIGMA, USA) tartalmazott. A mitogének koncentrációja: fitohemagglutinin (PHA, Leucoagglutinin, Pharmacia, Svédország) 1, ill. 10 µg/ml, Conavalin A (Con A, Pharmacia, Svédország), 1, 5 ill. 10 µg/ml pokeweed mitogen (PWM, Sigma, USA), 10 µg/ml. A mintákat 37 °C-on 72 órán át inkubáltuk 5% CO₂-t tartalmazó atmoszférában. Nyolc órával a leállítás előtt 0,4 uCi ³H-timidint (UVVVR, Csehszlovákia) adtunk a tenyészetekhez. A fagyasztással leállított mintákat Dynatech (NSZK) automata készülékkel dolgoztuk fel, a radioaktivitást szcintillációs számlálóban határoztuk meg, és c.p.m.-ben adtuk meg.

A CDM hatása egér lépsejtek blasztosodására

A CDM önmagában és mitogénekkel együtt dózis dependensen fokozta a spontán timidin inkorporációt.

A maximális hatást a 20 és 50 µg/kg dózisú CDM adásával értük el. Ezen dózisok alkalmazását követően a timidin inkorporáció átlagosan a kétszeresére növekedett. Különösen kifejezett volt a hatás, ha szuboptimális dózisú (1 µg/ml) Con-A-val stimuláltuk a sejteket. A vizsgálatok jól egyeznek a Winn assay (lásd előbb) során kapott eredményekkel, melyek szerint a CDM-mel előkezelt állatok lépsejtjeinek fokozódik a tumorigén hatása.

Boyum, A., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21, 97. (1968),
Láng, I. és munkatársai, Scand. J. Immunol., 13, 361. (1981),
Onody, C. és munkatársai, Thymus, 1, 205. (1980),
Láng, I. és munkatársai, Scand. J. Immunol., 14, 573. (1981),
Waldmann, T. A. és munkatársa, Adv. Immunol., 32, 1. (1983).

4.) A CDM fagocitózis fokozó hatása

A szervezet daganat elleni küzdelmében a makrofágok igen jelentős szerepet játszanak. Minél nagyobb a makrofág aktivitás

mértéke, annál sikeresebb a szervezet védekezőképessége a tumorokkal szemben. In vitro kísérletek azt igazolják, hogy az aktivált makrofágok képesek elpusztítani a tumorsejteket.

Martin, D. E. és munkatársai, Cancer Invest., 2 (5), 339-345. (1984),
Raynor, R. és munkatársai, Oncology, 41, 420-426. (1984).

Módszerek:

Fagocitosis vizsgálata NBT-redukcióval:

A vizsgálati módszer lényege az, hogy a fagocitózis során a makrofágokba bekebelezett anyagok az oxidatív anyagcsere fokozása útján szuperoxid-anion-képződést indukálnak, amely a tetrazólium (NBT: nitroblue-tetrazolium) festéket formozná redukálva. A redukció színváltozással jár, így a fagocitózis mértéke spektrofotometriásan meghatározható, és az 520 nm-nél mért extinkció értékével jellemezhető.

Ferdinandy, K., Orvosi hetilap, 122, 46, 2825-2831. (1981).

A redukció kivitelezése:

300 µl sejtuszuspenzióhoz 100 µl szérumot és 100 µl 2 nM-os NBT-oldatot adunk. Az elegyet 1 órán át inkubáljuk 37 °C-on. Néhány µl szuszpenzióból kenetet készítünk viabilitás vizsgálatához, majd a redukciót 100 µl 0,1 n HCl-oldattal leállítjuk. A sejteket háromszor mossuk Na-foszfát-pufferral, majd a sejtekből kivonjuk a formazánt 2 ml dioxánal, 70 °C-os vízfürdőn. A szuszpenziót centrifugáljuk, és a szupernatáns extinkcióját 520 nm-en megmérjük.

A CDM HATÁSA A SEJTMEMBRÁNRA

A daganatsejtek egyik jellemző sajátossága a heterogenitás, ez megnyilvánul abban, hogy a tumorok mind genotípusosan, mind fenotípusosan különböző populációkból állnak.

A fenotípusos különbségek közül legjellemzőbb a daganatsejtekre a sejtfelszíni összetevők variabilitása. Ez azáltal válik lehetővé, hogy a sejtmembránban levő cukor polimerek szerkezetükből adódóan igen nagy strukturális különbségségi potenciállal rendelkeznek. A leginkább vizsgált, s jellegzetes változások a különböző daganatsejtek sejtfelszíni paramétereit közül a glükoproteinek, a glükolipidek, és a glükózamino-glikánok (ezen molekulastruktúrákba tartoznak a különböző antigének is).

A sejtfelszín mintegy „kapcsoló organelumnak” tekinthető, mely biztosítja a kölcsönhatást a mikrokönyezettel. A sejtfelszíni cukorpolimereknek elsődleges szerepe van a sejtek közötti felismerési folyamatokban.

A malignus transzformáció során bekövetkező sejtfelszíni molekuláris változások többek között a sejtmembrán elektromos töltésének a változásában is megnyilvánulnak, mely a sejtek elektroforetikus mobilitásával jól mérhető. A sejtmembrán eredő töltését a sejtfelszínen levő szabad poláros csoportok határozzák meg, melyek közül különös jelentőséggel bír a szialsav, ugyanis a sejtfelszíni szialsav-tartalom és az eredő negatív töltés között szoros összefüggés van.

Általában a daganatsejtek felszíni negatív töltése nagyobb mint a normál sejteké, továbbá a kifejezettebben malignus illetve megnövekedett metasztatizáló képességű tumorsejtek negatív töltése is arányosan nagyobb. Rendszerint ezzel párhuzamosan nő a sejtmembrán szialsav-tartalma is. Tehát a metasztatizáló képesség és a szialsav-tartalom között egyenes arányú összefüggés van. A különböző sejtfelszíni cukor polimerek, lektinkötő receptorok szializációja befolyásolja a daganatsejtek szervspecifitását, és protektív szerepet játszik a tumorsejt elleni host faktorokkal szemben. Ugyanis a sejtfelszín szializációja megváltoztatja a tumorantigéneket, azokat mintegy lefedve felismerhetetlenné teszi a tumorsejteket az immunrendszer számára.

Atkinson, P. A. és munkatársai, New York, Plenum Publishing Corp., 191-293. (1980),
Bosmann, H. B. és munkatársai, Nature (London), 246, 487. (1972),
Buck, C. A. és munkatársai, Biochemistry, 9, 4567-4576. (1970),
Burczak, J. D. J. of Lipid Res., 25, 1541-1547. (1984),
Dóbróssy, L. és munkatársai, Cancer Res., 41, 2262. (1981),
Davidson, E. A., 14th Int. Cancer Congr., Budapest (1986), No. 3029,
Fűrész, J. és munkatársai, Neoplasma, 32, 689-694. (1986),
Hakomori, S. I., Annu. Rev. Biochem., 50, 733-764. (1981),
Irimura, T. és munkatársai, Cancer Res., 41, 3411-3418. (1981),
Kopper, L. - Lapis, K.: A daganatok áttét-képződése - Medicina (1985),
Nicolson, G. L., Biochim. Biophys. Acta, 458, 1-72. (1976),
Nicolson, G. L. és munkatársai, INCI, 76, 511-519. (1986),
Pena, S. D. J. és munkatársai, Nature (London), 276, 80-83. (1978),
Poste, G. és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 399-403. (1980),
Riebe, M. és munkatársai, Int. J. Cancer, 33, 765-770. (1984),
Ripka, J. és munkatársai, Mol. and Cell. Biology, 6, 1268-1275. (1986),
Rosenstein, Y. és munkatársai, INCI, 74, 609-616. (1985),
Schirmmacher, V. P. és munkatársai, Invasion and Metastasis, 2, 313-360. (1982),

Walker, N. E. és munkatársai, J. Nat. Cancer Res., 69, 371-380. (1982),
Waters, H. Handbook Cancer Immunology (1978),

- 5 Yamashita, K. és munkatársai, J. Biol. Chem., 259, 10834-10840. (1984),
Yogeeswaran, G. és munkatársai, Biochem. Biophys. Res. Comm., 95, 1452-1460. (1980),
Yogeeswaran, G. és munkatársai, Science, 212, 1514-1516. (1981).

1) A CDM hatása a sejtmembrán eredő negatív töltésére:

15 Módszer:

Normál (vörösvérsejtek, trombociták) és tumoros eredetű (Bis melanoma, Lewis lung, Ehrlich ascites) sejteket inkubáltunk különböző koncentrációjú (100-2 $\mu\text{mol/l}$) CDM-mel 5 és 60 perc közötti időtartamig. A sejtek elektroforetikus mobilitását (EFM) cytopherométerrel [Fűrész, J., Budavári, I.: Kísérletes Orv. Tud., 36, 614-621. (1981)] vizsgáltuk.

25 Eredmények:

- a) A CDM inkubáció hatására (100-2 $\mu\text{mol/l}$ koncentráció között; max. hatás 10 $\mu\text{mol/l}$) a sejtek eredő negatív töltése, vagyis az EFM dózis és idő dependensen csökkent.
- b) A csökkenés mértéke arányos a sejtmembrán szializáltsági fokával, például tumorsejtek esetében (Bis melanoma, Lewis lung) az erősebben metasztatizáló sejtvonalak kifejezettebb EFM csökkenést mutatnak. Ez a jelenség a normál sejtek esetében is észlelhető a vörösvérsejtek kifejezett EFM csökkenést mutatnak, míg a trombocitáknál nem je-
- 40 lentkezik szignifikáns hatás.
- c) A Neuraminidaze [Cl. Perfringens IV. tip. NAN-ase (Sigma)] kezelést követő CDM inkubáció az EFM-t már a továbbiakban nem csökkenti.
- 45 Ezáltal igazolható, hogy a CDM az EFM-t csökkentő hatását a sejtmembrán felszínén levő terminális helyzetű szialsav közömbösítésén keresztül fejti ki.

50 2) A CDM hatása a sejtmembrán kationizált kötésére:

Módszer:

- 55 Kationizált ferritin kötést Danon, D. és munkatársai [J. Ultrastructure Research, 38, 500-510. (1972)] módszere szerint végeztünk.

Eredmény:

- 60 A CDM 16-6 $\mu\text{mol/l}$ közötti koncentrációban 1 és 48 órás inkubációs idő alatt csökkenti a sejtmembrán kationizált ferritin kötését, valamint inhomogénné teszi a töltéelosz-
- 65 lást. A vizsgált rendszerben a maximális

csökkenés a 16 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációnál és a 48 órás inkubációs időnél észlelhető.

A hatás jelentősége:

A sejtmembrán szialsav-tartalmának csökkenése következtében a tumorsejtek felszíni antigénjei kifejezettebbé válnak, amelyek következtében immunogenitásuk fokozódik. Részben ezen hatása alapján magyarázható az a kísérleti eredményünk, amelynek során kimutattuk, hogy az Ehrlich tumorsejtek konkomitáló immunitása fokozódott (lásd imm. fejezet). Továbbá az irodalmi adatok szerint (Edelman G. M. Science 219, 450-457. (1983).

A szialsav-tartalom csökkenése a differenciálódást segíti elő. (lásd differenciálódás fejezet).

A CDM KÖZVETETT TUMORELLENES IMMUNOLÓGIAI HATÁSA

1.) A CDM daganat megeredését gátló immunmoduláns hatásának állatkísérletes bizonyítása:
(A CDM-et előkezelés formájában alkalmaztuk).

1.) Winn Assay:

Módszer:

Tumorvonal: Ehrlich tumorsejteket (EAT) intraperitoneális transzplantációval tartottuk fenn 5×10^6 sejt/egér koncentrációban oltva. A kísérletek során a tumorsejteket 1×10^7 sejtszámmal szubkután oltottuk.

CDM kezelés: 25 ill. 50 $\mu\text{g/kg}$ CDM-mel előkezeltek a CFLP egereket 8, 6, 5 és 2 nappal a transzplantáció előtt.

Lépsejt izolálás: A lép tokjának felmetésze után a lépsejteket RPMI oldat segítségével kinyertük, viabilitásukat 1%-os trypan-kék oldattal határoztuk meg.

A Winassay kivitelezése: Az előkezelt, ill. kontrollállatokból nyert lépsejteket EAT-sejtekkel 37°C -os CO_2 atmoszférájú termosztátban 30 percig inkubáltuk RPMI tápoldatban, az effektor/target arány 7:1 ill. 10:1 volt. Az inkubációt követően a sejteket szubkután oltottuk az állatokba.

Eredmény: A CDM-mel előkezelt egerek lépsejtjeinek tumorcid aktivitása a kontroll-egerek lépsejtjeihez képest szignifikánsan megnőtt. Különösen kifejezett tumorgátlást észleltünk az 50 $\mu\text{g/kg}$ dózisú CDM előkezelés esetében.

Havelar, J. J. és munkatársai, Oncology, 42, 179-186. (1985).

Lafreniete Z. és munkatársa, Cancer Res. 45, 3785-3741. (1985).

Planga R. Int. J. Immunotherapy, 11, 19-21, (1986).

2.) Konkomitáló immunitás:

Tumorvonal: Ehrlich tumorsejteket (EAT) intraperitoneális transzplantációval tartottuk fenn 5×10^6 sejt/egér koncentrációban oltva. A kísérletek során a tumorsejteket 2×10^7 sejtszámmal szubkután oltottuk.

A vizsgálat kivitelezése: az EAT sejteket 2×10^7 sejtszámmal szubkután transzplantáltuk az állatok jobb oldalára, majd ezt követően a 6. illetve 7. napon az állatok bal oldalára szubkután transzplantáltunk azonos számú EAT sejteket. A kísérlet során mértük az első és második tumor térfogatát az idő függvényében.

CDM kezelés: a második tumoroltást követő első napon kezdtük a CDM kezelést, melyet háromnaponként adtunk 50 ill. 500 $\mu\text{g/kg}$ dózisban szubkután.

Eredmény: A CDM kezelésben nem részesülő kontrollállatokhoz képest a második tumor növekedése az 50 $\mu\text{g/kg}$ dózisú CDM kezelés esetében csak kismértékben (nem szignifikánsan) gátlódott, míg az 500 $\mu\text{g/kg}$ dózisban történt CDM kezelés hatására jelentős mértékű (szignifikáns) gátlás volt észlelhető a második tumor kifejlődési idejében és méretében.

Gorelik, E. és munkatársai, Int. J. Cancer, 21, 617-625. (1978),

Tofaletti, D. L. és munkatársai, J. Immunol., 130, 2982-2986. (1983),

Gorelik, E. és munkatársai, Int. J. Cancer, 27, 847-856. (1981).

3.) A CDM előkezelés hatása az Ehrlich és Walker típusú ascites tumorok megeredésére:

a.) Ehrlich ascites tumor (EAT):

Tumorvonal: EAT sejteket intraperitoneális transzplantációval tartottuk fenn 5×10^6 sejt/egér koncentrációban oltva. A kísérletek során a tumorsejteket különböző sejtszámmal ($5 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^7$) intraperitoneálisan oltottuk.

CDM előkezelés: a tumormentes állatoknak a tumoroltást megelőzően egy alkalommal a 9. vagy 5. vagy 2. napon adtuk a CDM-et 25 $\mu\text{g/kg}$ dózisban i.v.

Eredmény: A 9. és 5. napon előkezelésben részesült állatok élettartama a kontroll kezeletlen állatokéhoz képest átlagosan 5-szöröseire növekedett, valamint a tumormentes állatok száma nem szignifikánsan növekedett.

b.) Walker típusú ascites tumor:

Tumorvonal: Wistar patkányokban intraperitoneális transzplantációval tartottuk fenn a Walker tumort 1×10^7 sejt/patkány koncentrációban oltva.

CDM előkezelés: a tumormentes állatoknak a tumoroltást megelőzően egy alkalommal

a 9. vagy 5. vagy 2. napon ill. három alkalommal a 9., 5. és 2. napokon adtuk a CDM-et 25 µg/kg dózisban i.v.

Eredmény: A 9. és 5. napon előkezelésben részesült állatok élettartama a kontroll kezeletlen állatokéhoz képest átlagosan 4-szeresére növekedett, valamint a tumormentes állatok száma szignifikánsan növekedett.

II.) A CDM immunmoduláns hatásai, melyek közvetett módon hozzájárulhatnak a CDM daganatellenes hatásához:

In vivo vizsgálatok:

1.) Antitoxinogén antigén (tetanusz toxoid) immuneffektusának modulálása CDM-mel

Módszer: Tetanusz toxoid antigént adszorbeáltunk fém-kolloid anyagra, majd kellő számú egércsoportot kialakítva az antigénből 2-es alapú logaritmusú hígítás-sorozatokat készítve, immunizáltuk a kísérleti állatcsoportokat (tesztcsoportok). Egyidejűleg „nemzetközi vagy nemzeti standard” preparátummal is elvégeztük az immunizálást (kontrollcsoport).

A CDM alkalmazása:

a.) Dózis: 25-50-100-200 µg/kg.
b.) Az alkalmazás időpontja: az immunizálás időpontjához (0 pont) viszonyítva a -3., 0., +3., +6., +18. napokon egyszeri kezelésként, ill. -3., 0., vagy -3., +3., vagy 0., +3., vagy 0., +18., vagy +6., +18. napokon két alkalommal adtuk a CDM különböző dózisait.

A CDM kezelés

500 µg/kg dózisú CDM intraperitoneális adagolásával történt egy hétig, naponta. A kontroll egerek a CDM-mel azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot kaptak.

A kísérlet során CDM-kezelt és -kezeletlen (kontroll) egerek intraperitoneumából kimosott makrofágok fagocitózisát vizsgáltuk.

Makrofágok nyérése

Az intraperitoneumból MEM-H 870807/1 tápfolyadékkal kimosott sejteket 10 percig 1000 fordulatszámon centrifugáljuk, majd tápfolyadékkal 7x10⁶/ml sejtszámot állítunk be.

Eredmény

A kísérleti állatokból nyert peritoneális makrofágok fagocitáló képessége (NBT redukcióval vizsgálva) a CDM előkezelés hatására

(6 napig 500 µg/kg/nap) jelentősen fokozódott. A fagocitózis mértékét jellemző extinkciós érték az előkezelt állatok esetében a kontrollokhoz képest szignifikánsan (több mint kétszeresére) növekedett.

In vitro vizsgálat

A CDM humán mononukleáris sejtek mitogén indukált sejtosztódásra kifejtett hatása

Alkalmazott sejtek:

Egészséges emberek kristályos heparinnal (100 µg/ml vér) alvadásgátolt vénás vérből Boyum módszere szerint [Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21, 97. (1968)] Ficoll-Uromiro gradiensen elkülönített mononukleáris sejtjein végeztük.

Vizsgálati módszer:

A CDM sejtosztódásra gyakorolt hatását mitogén stimulációval timidin beépülés alapján vizsgáltuk, 96 lyukú, U-fenekű szövettenyésztő tálcákban, 100 µl-es végtérfogatokban, 2-4 párhuzamos tenyésztéssel. Möller, G. és munkatársai, Transplant. Rev., 11, 3. (1972), Waldmann, T. A. és munkatársa, Adv. Immunol., 32, 1. (1983), Onody, C. és munkatársai, Thymus, 1, 205 (1980), Görög, Gy. és munkatársai, Cell, Immunol., 96, 184. (1985).

A drogkezelés nélküli kontrolltenyészetek párhuzamosainak száma ötszöröse volt az egyes drogonkoncentrációkkal képzett tenyészetekének, hogy a kontroll szórásstartományát kísérletenként is meg tudjuk határozni. - A fentiekben leírt vizsgálatokban az inkubáció minden esetben 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú páratelt levegőben történt. Az inkubációs idő letelte után valamennyi tenyészethez 1 uCi 3H-timidint adtunk, majd további 6 óra inkubáció után a tenyészeteket szűrőpapírra szűrtük, szárítottuk, és a beépült timidinre jellemző cpm értéket folyadék-szintillációs módszerrel β-számlálón mértük.

Alkalmazott mitogének

Fitoheماغglutinin (PHA; Wellcome), Con-cavalin-A (Con-A, Calbiochem) és Poke Weed Mitogen (PWM, Gibco). Azonos sejtek timidin-beépülését vizsgáltuk 3, illetve 5 napos tenyésztési idő után.

- Valamennyi vizsgálatnál a sejtek és a drog összemérését közvetlenül követte a mitogén stimuláció. -

A CDM inkubáció

A vizsgálatok nyugvó limfocitákon történtek, a CDM felező hígítási sorával (100-0,75 $\mu\text{mol/l}$).

Tripánkék festéssel határoztuk meg a pusztult sejtek arányát, melyet a kontrollszuszpenziókban találtakhoz viszonyítottunk. Az értékelt koncentráció-tartományokban a CDM toxikus hatása kizárható.

Eredmények

A CDM nem albumin szérumfehérjékhez kötődik, ami befolyásolja (csökkenti) a limfocitákra kifejtett hatását. A CDM 100-3 $\mu\text{mol/l}$ koncentráció-tartományban - albumin-tartalmú tápoldatban - a dózis növekedésével arányosan gátolja a mitogén indukált sejtosztódást anélkül, hogy sejtpusztulást okozna. A gátlás a háromnapos tenyésztési idő esetében (T sejtre jellemző) kifejezettebb volt, mint az ötnapos tenyésztési idő során.

A GÁTLÁS MÉRTÉKE %-BAN MEGADVA

Tenyésztési idő	CDM koncentráció $\mu\text{mol/l}$ -ben		
	25	12	6
3 nap	85%	62%	40%
5 nap	75%	40%	10%

A gátlás %-os értékét a kontrollhoz (100%) viszonyított H^3 -timidin beépülés mértékéből számítottuk.

A CDM 3 $\mu\text{mol/l}$ koncentráció alatt egészséges emberek véréből származó mononukleáris sejtek mitogén indukált sejtosztódásának a mértékét nem befolyásolta.

Exogén IL2 hatása a CDM okozta osztódás-gátlásra

Módszerek

A CDM-mel kezelt sejtszuspenziókat tartalmazó lemezek egy párhuzamos példányán a stimulációt követően a kultúrákra olyan, előkísérletekben meghatározott IL2 dózist mértünk, mely a Ciclosporin A osztódás-gátló hatását jelentősen mérsékelte. A vizsgálatot háromnapos tenyésztési idővel végeztük.

Eredmények

Exogén IL2 a CDM osztódást gátló hatását jelentősen mérsékli; sőt, nem gátló koncentrációjú CDM alkalmazása mellett (1,5-0,75 $\mu\text{mol/l}$) proliferáció-fokozó hatású. Az észlelt hatás az IL2 és CDM együttes jelenlétének tulajdonítható, minthogy az exogén IL2-vel kapott 130% illetve 150%-os H^3 -timidin beépü-

lést az ugyancsak exogén IL2-t tartalmazó (100%-os) kontrollhoz viszonyítottuk.

A CDM immunológiai hatásának a jelentősége

A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a CDM kezelés (in vivo) fokozza a makrofágok, valamint a lépsejtek aktivitását (lásd: tetanusz toxoid immunreaktusának módosítását, NBT redukciós vizsgálatot, egér lépsejtek blasztosodását), továbbá elősegíti az immunrendszer érését (lásd: limfocitás choriomeningitis fertőzés lefolyásának módosítása szopos egerekben).

Ezen hatások - melyek indirekt módon erősítik a szervezet daganatellenes védekezőképességét - magyarázzák azon kísérleti eredményeinket, melyeknél in vivo direkt módon kimutatható a CDM tumorelles immunológiai hatása (Winn assay, konkommittáló immunitás, tumorsejt transzplantáció előtti CDM kezelés).

A CDM in vitro tapasztalható humán mononukleáris sejtek mitogén indukált osztódását - dózis-függően - gátló hatása nincs elmentmondásban a CDM daganatellenes immunmoduláns hatásával.

A daganatellenes immunitás döntő mozzanata az antigén felismerésén és prezentálásán keresztül az immunválasz beindítása. Ezt a folyamatot a CDM a makrofágok és lépsejtek aktivizálásával, a sejtfelszíni fibronectin-tartalom növelésével, a sejtmembrán szializálásának csökkentésével (antigén expresszió) segíti elő. Az immunválasz kifejlődése során termelődő interleukin-2 (illetve egyéb limfokinek) a CDM immunrendszert esetlegesen érintő (nem toxikus) osztódás-gátló hatását szelektíven kivédi.

A CDM ANTIOXIDÁNS HATÁSA

Számos adat bizonyítja, hogy a karcinogének jelentős része szabadgyökös mechanizmussal fejti ki hatását. Továbbá azt is, hogy antioxidánsokkal gátlható a carcinogenesis. Faber E. N., Engl. J. Med., 305 (23), 1379-1389. (1981), Wattenberg L. W. Cancers of the Environment, 111-116. (1983), Schwartz J. és munkatársai, Biochem. and Biophys. Res. Comm., 136, N. 3., 1130-1135. (1986). Ohtsuka N. és munkatársai, Cancer, 59, 1560-1565. (1987).

A malignus transzformáció során létrejövő változásokban jelentős szerepet játszik a lipid peroxidáció, valamint ennek a folyamatnak a végterméke, a malondialdehid, mely önmagában is karcinogén. Shamberger R. J., J. Natl. Canc. Inst., 53 (6), 1771-1773. (1974), Fehér J.-Vereckei A., Biotéka-Biotal Gyógyszergyár (1985). Kato H. International Cancer Congr., Bp., 1986. No. 3601. Fehér J., Csomos G., Vereckei

A., Free Radical Reactions in Medicine Springer-Verlag (1987).

Ito N. és munkatársai, *Fd. Chem. Toxic.*, 24, No 10/11. 1071-1082 (1986).

Kensler W. T. és munkatársa, *Adv. in Free Radical Biol. and Medicine*, 2, 347-387. (1986).

I. A CDM in vitro antioxidáns hatásának vizsgálata

A kísérletekhez 150-200 g-os patkányokat használtunk. A mikroszoma preparátumokat a dekapitált és kivérezetett állatok máj homogenizátumaiból készítettük ultracentrifugációs eljárással, Jordan és munkatársai [Biochem. Pharmacol., 31, 1393-1400 (1982)] módszere szerint. Az enzimatikusan indukált lipid peroxidációt Jordan és munkatársai szerint (lásd előbb) mértük, Ottolenghi tiobarbitursavas malondialdehid meghatározását felhasználva [Ottolenghi, *Arch. Biochem. Biophys.*, 79, 355-363. (1959)].

A fehérjét Gornall és munkatársai [J. Biol. Chem., 177, 711-766. (1949)] metodikája szerint mérjük. Standardnak bovin szérum albumint használtunk.

A nem enzimatikusan indukált lipid peroxidációt aszkorbinsav jelenlétében patkány agy homogenizátumon mértük. A patkányokat dekapituláltuk és a teljes agyat eltávolítottuk, majd jeges hűtés mellett, 0,15 M-os KCl-ben homogenizáltuk Potter-Elvenjen készülékben, Player és munkatársai [J. Neurochem., 37, 422-426. (1981)] szerint.

A reakcióelegy:

0,05 M trisz-maleinát puffer (pH=6,8), 1,0 nM KH_2PO_4 és különböző koncentrációjú aszkorbinsav (10^{-3} , 10^{-4} M), 1 mg/ml fehérje. A rázátás reakcióideje 15 perc 37 °C-on. A malondialdehid meghatározás Ottolenghi (lásd fent) módszere szerint történt. A fehérje meghatározás Gornall (lásd fent) módszere szerint történt.

A CDM hatását az indukált lipid peroxidációra az in vitro rendszerekben előinkubálást követően vizsgáltuk. A mikroszoma preparátumokkal különböző mennyiségű CDM-et (160-1,6 $\mu\text{mol/l}$) különböző ideig (10, 20 és 30 perc) előinkubáltuk. Ezen előinkubációt követően adtuk a rendszerekhez a NADPH-t illetve az aszkorbinsavat a megadott módszerek szerint, és még 15 percig folytattuk az inkubációt. Az adrenokrom átalakulást Sigma adrenalin készítmény enyhe melegítéskor kapott színreakció gátlásának (vörös szín eltűnése) időbeli követésével vizsgáltuk. A reakcióelegy 200 μM adrenalint és a CDM különböző (160-1,6 $\mu\text{mol/l}$) koncentrációt tartalmazta. A mérést neutrális pH-n végeztük.

Értékelés:

- A CDM gátolja a fény hatására adrenalinból képződő kromofor keletkezését (adrenalin-adrenalin ortokinon-adrenokrom-leuko-adrenokrom). A gátló hatás dózis dependensen csökken, de a vizsgált 160-1,6 $\mu\text{mol/l}$ koncentráció-tartományban észlelhető.

- A CDM 160-16 $\mu\text{mol/l}$ koncentráció-tartományban gátolja (kontrollhoz képest 50%-os gátlás 16 $\mu\text{mol/l}$); 3 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban nem befolyásolja; 1,6 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban pedig serkenti a NADPH-t + Fe^{3+} -sal enzimatikusan indukált lipid peroxidációt patkány máj mikroszómán. A gátló hatások az előinkubáció időtartamának növekedésével arányosan növekednek.

- A CDM 160-3 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban kifejezetten 3-1,6 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban gyengébben gátolja mind a spontán lipid peroxidációt, mind az aszkorbinsavval indukált lipid peroxidációt patkány agy homogenizátumon. Az indukálható lipid peroxidáció mértéke a CDM koncentrációjától és az előinkubáció időtartamától függően változott.

II. A CDM in vivo antioxidáns hatásának vizsgálata

Kísérleteinket him Wistar patkányokon végeztük. A CDM-t 10 és 100 $\mu\text{g/kg}$ napi dózisban 3 illetve 6 napig adtuk az állatoknak. A kontrollcsoport izotóniás NaCl-t kapott. Csoportonként 5-5 állaton két alkalommal végeztünk méréseket.

Az állatokat a kezelés után dekapituláltuk és kivérezettük, májukat eltávolítottuk, majd jeges hűtés mellett homogenizáltuk Potter-Elvenjen készülékben. A mikroszoma preparálást Jordan és munkatársai [Biochem. Pharmacol., 31, 1393 (1982)] módszere szerint végeztük. A lipid peroxidációért felelős enzim aktivitását a malondialdehid-tartalom mérésével határoztuk meg Ottolenghi [Arch. Biochem. Biophys., 79, 355-363 (1959)] módszere szerint. A kezelt állatok májából izolált mikroszoma homogenizátumon indukáltuk in vitro NADPH + Fe^{3+} -al a lipid peroxidációt az alábbi közegben: A reakcióelegy 20 mM Na-foszfát-puffert (pH = 7,5), 0,15 M KCl-ot, 50 μM FeCl_3 -ot, 50 mM pirofoszfátot, 10 mM glükóz-6-foszfátot (Sigma, USA), 0,6 NE glükóz-6-foszfát-dehidrogenázt (Sigma, USA), 0,5 mM NADPH-t (Sigma, USA) 1mg/ml mikroszomális proteint tartalmazott 0,5 ml végtérfigatban. A méréseket 37 °C-on rázó fürdőben történő levegőztetéssel végeztük. A fehérjetartalmat Lowry és munkatársai [J. Biol. Chem., 193, 265-275. (1951)] módszere szerint határoztuk meg.

Értékelés

A CDM kezelés hatására az indukálható lipid peroxidáció mértéke (malondialdehid végtermék) a CDM koncentrációjától és a kezelés tartamától függően változott.

Az in vivo adott CDM minden dózisban és kezelési időben csökkentette 5 és 30 perc in vitro előinkubálási idő alatt a NADPH + Fe^{3+} indukálta lipid peroxidációt. A leghatásosabbnak a 6 napos, 10 $\mu\text{g/kg}$ adag bizonyult.

A mért adatok azt bizonyítják, hogy az adott kísérleti rendszerben időfüggően kevesebb szabad gyök keletkezett a CDM kezelés hatására.

A hatás jelentősége:

A CDM mint antioxidáns in vitro és in vivo gátolja a lipid peroxidációt, illetve az ennek során keletkező malondialdehidet, mely ismert endogén carcinogén, valamint sekunder lipid peroxidációt kiváltó ágens.

Ezen hatásán keresztül gátlást fejt ki azokra az anyagcsere-folyamatokra, melyek kísérő jelenségei illetve esetleg fenntartói a malignus proliferációnak.

A CDM TUMOR NÖVEKEDÉST GÁTLÓ HATÁSA

1.) Ehrlich ascites tumor (EAT):

Tumorvonal:

Az EAT sejteket intraperitoneális (i.p.) transzplantációval ($5 \cdot 10^6$ sejt) tartottuk fenn.

A kísérleti állatoknak (inbred, CFLP egerek) esetenként i.p. $1 \cdot 10^6$ és $2 \cdot 10^6$, illetve szubkután (s.c.) $5 \cdot 10^7 - 3 \cdot 10^7$ EAT sejtet oltottunk.

Kezelés módja:

A CDM-et az i.p. transzplantáció esetében egyszer a transzplantációt követő 1., 3., 7., 9. és 10. napon alkalmaztuk. A s.c. transzplantáció során a CDM-et a transzplantációt követően három naponként adtuk, az első két alkalommal (1. és 3. napok) i.v., majd s.c. a tumor köré infiltrálva alkalmaztuk.

A CDM kezelés dózisa:

25, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/kg}$.

Eredmények:

A transzplantált tumorsejtek számától, a transzplantálás módjától, a CDM kezelés időpontjától és dózisától függően csökkent a tumor térfogata (cm^3 térfogat-meghatározás:

3,14

— x d^3 képlet alapján történt).

6

A folyamatos kezelés hatására az állatok 10-15%-ánál tumormentesség, illetve jelentős élettartam-meghosszabbodás (80-100 napos túlélési idő) figyelhető meg.

A CDM dózis optimuma a 100 $\mu\text{g/kg}$ dózisonál jelentkezett.

2.) S-180 tumor:

Tumorvonal:

Az S-180 tumorvonalat s.c. transzplantációval tartottuk fenn. A kísérleti állatok inbred Swiss egerek voltak. A kísérletekhez 0,5 cm^3 tumordarabkákat transzplantáltunk.

Kezelés módja:

15 napon keresztül 3 naponként, az első két alkalommal (1. és 3. napon a transzplantációt követően) i.v. majd s.c. (a tumor köré infiltrálva) alkalmaztuk a CDM-et.

A CDM kezelés dózisa:

25, 50, 100 $\mu\text{g/kg}$.

Eredmény:

Az 50 és 100 $\mu\text{g/kg}$ dózisú CDM alkalmazása során a 15. napon mért tumortérfogat (cm^3 , térfogat-meghatározás:

3,14

— x d^3) a kontrollcsoportéhoz képest

6

(fiziológiás só-oldattal történt a kezelés) szignifikánsan (kétmintás t próba) csökkent.

A CDM HATÁSAINAK ÖSSZEFOGLALÁSA

- szelektív kalmódulin antagónista;
- szelektív protein kináz C gátló hatású;
- gátolja a foszfatidil ihozitol monofoszfát-difoszfát átalakulást;
- gátolja az aggregáló égenségekkel kiváltott trombocita aggregáció sebességét és a kialakuló maximális aggregáció mértékét;
- csökkenti a sejtmembrán eredő negatív töltését a sejtfelszíni szíalsavval történő interakción keresztül;
- antioxidáns hatást fejt ki;

Mindezen sejanyagcserét befolyásoló hatások magyarázzák, hogy a CDM nem toxikus dózis tartományban in vitro és in vivo antiproliferatív hatást fejt ki és ugyanakkor elősegíti (indukálja) a differenciálódást. Továbbá a komplex sejtmembrán hatások eredményezik, hogy a CDM in vitro és in vivo immunmoduláns hatású, melynek minősége az adagolás mennyiségi és időbeli tényezőitől függ.

Az antiproliferatív, immunmoduláns és antiaggregációs hatások következtében a CDM az onkoterápiában, valamint az onkoprofilaxisban alkalmazható biológiai válaszolóképeséget befolyásoló anyagként jellemezhető.

5

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy ismert módon előállított



általános képletű vegyületet, ahol

R hosszúlancú, telített, vagy legalább egy telítetlen kötést tartalmazó, 12-20 szénatomos alifás szénhidrogén-
gyök,

R₁ hidrogénatom, vagy hosszúlancú, telített, vagy legalább egy telítetlen kötést tartalmazó, 12-20 szénatomos alifás acilgyök,

X oxigénatom, és

Y hidrogénatom, vagy

X és Y együttesen =N-CH₂-CH₂-csoportot alkot,

z értéke 1-5, és

q értéke 1-4,

illetve ezen vegyületek közül legalább kettő keverékét legalább egy, célszerűen intravénás illetve inhalációs adagolásra alkalmas, gyógyászatiilag elfogadható hordozóanyaggal összekeverve tumorelles hatású gyógyszerkészítményekké kikészítjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként olyan (I) általános képletű vegyületeket használunk, ahol X és Y az 1. igénypontban megadott, R jelentése 16-18 szénatomos, telített vagy telítetlen szénhidrogén-
gyök, R₁ hidrogénatom vagy 17-19 szénatomos telített, vagy telítetlen alifás acilgyök, z értéke 1-4 és q értéke 2.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként olyan (I) általános képletű vegyületeket használunk, ahol R a sztearinsav, olajsav vagy linolsav szénhidrogén-
gyöke, R₁ hidrogénatom vagy sztearil-, oleil- vagy linoleilgyök, X és Y az 1. igénypontban megadott, z értéke 1-4 és q értéke 2.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként az (I) általános képletű vegyületek keverékét használjuk.

55

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest - A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető
R 4926 - KJK

90.2856.66-13-2 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Szabó Viktor vezérigazgató