

DAGANATOS SEJTPOPULÁCIÓ NÖVEKEDÉSÉNEK TANULMÁNYOZÁSA

III. Kemoterápiás szerek hatásának vizsgálata eltérő növekedési ütemű NK/Ly ascites tumoron

KOPPER LÁSZLÓ, JENEY ANDRÁS, az orvostudományok kandidátusa és LAPIS KÁ-
RÓLY, az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1976. III. 9.

Előző vizsgálataink során kimutattuk, hogy az NK/Ly ascites *tumor növekedési sebessége* a transzplantációt követően sejtkinetikai, morfológiai és biokémiai változásoktól kísérve *fokozatosan lassul* (Lapis és Kopper 1970, Lapis és mtsai. 1973, Kopper és mtsai. 1974). Főbb jellegzetességeként a proliferáló sejtek ciklusidejének megnyúlását, a nem-proliferáló sejtek arányának mérsékelt emelkedését, a sejtek RNS és fehérje tartalmának emelkedését a macromolekulák szintézise ütemének csökkenését, valamint a sejtmagban a nukleinsavak citokémiai változását észleltük. Jenev és mtsai (1975) a DNS és a magi fehérjék vizsgálata során mutattak rá arra, hogy e jelenségek háttérében a *tumorsejtek genetikus apparátusának egyre fokozódó — de reversibilis — represszáltága* áll. Ezek a megfigyelések is feltételezik, hogy a tumorok növekedési ütemében bekövetkező változások jelentősen befolyásolhatják e növekedés gátlására irányuló törekvéseinket.

A daganatok növekedési üteme és terápiás érzékenysége közötti összefüggések tanulmányozásának fontosságát saját megfigyeléseinken túlmenően számos klinikai és kísérleti adat is alátámasztja:

1. A jelenleg rendelkezésünkre álló terápiás eszközökkel elsősorban a gyorsan növekedő human tumorokat tudjuk előnyösen befolyásolni, míg a lassan növekedő tumorok a kezelésre alig vagy nem reagálnak (Zubrod 1972).

2. A proliferáció sebessége nemcsak az egyes tumorok között (Simpson—Herren és Lloyd 1970, Charbit és mtsai 1971), hanem ugyanazon tumor különböző növekedési szakaszában (Lala és Patt 1966, Frindel és mtsai 1967, Wiebel és Baserga 1968, Tannock 1969, Peel és Fletcher 1969, Simpson—Herren és Lloyd 1970, Hofer és Hofer 1971, Lala 1972, Dombernowsky és Hartmann 1972, Lapis és mtsai 1973, Schiffer és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1974) is eltérő.

3. Bruce és mtsai (1966), majd őket követően számosan igazolták — elsősorban in vitro szinkronizált tenyészetekben —, hogy a citosztatikumok iránti érzékenység tekintetében a sejtek proliferáló, illetve nem-proliferáló jellegük, ezen belül a ciklusban adott pillanatban elfoglalt helyük alapján különböznek

(Mauro és Medoc-Jones 1970, Bhuyan és mtsai 1972, vanPutten és mtsai 1972).

4. A normál és daganatos szöveteken végzett sejtkinetikai vizsgálatok arra utalnak, hogy bár a szervezet legtöbb szövege lassabban proliferál, mint a daganat, valószínűtlen, hogy a tumor lenne a leggyorsabban proliferáló szövet. Így elsősorban a csontvelői (haemopoetikus) sejtek és a gyomorbél-rendszer nyálkahártyájának hámsajtjai újulnak meg gyorsabban a tumoros szövetnél és szerepelnek dózislimitáló tényezőként számos — elsősorban a gyorsan proliferáló sejtekre ható — szer esetében (Frindel és mtsai 1968, Young és DeVita 1970, Shirakawa és mtsai 1970, Terz és mtsai 1971, Gavosto 1974, Brown 1975).

E röviden összefoglalt megfigyelések egyértelműen jelzik, hogy az optimális kezelési program megtervezésekor ajánlatos a citosztatikus szerek proliferáció-függő hatását figyelembe venni. Ez utóbbi tanulmányozására, mint említettük, eddig elsősorban szövettenyészeteket használtak. Az NK/Ly ascites tumoron végzett előzetes vizsgálataink alapján (Lapis és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1974) arra törekedtünk, hogy olyan rendszert hozzunk létre, amellyel e kérdés *in vivo* körülmények között is megközelíthető. Jelen közleményünkben e kísérleteinkről számolunk be.

Anyag és módszer

Kísérleteinkhez mindkét nembeli, átlagosan 25 g súlyú CFLP egeret használtunk (LATI, Gödöllő). Az egereket plasztikdobozban, préselt tápon és csapvízen tartottuk. Az NK/Ly ascites tumort 5×10^6 sejt hetenkénti transzplantálásával tartottuk fenn.

A daganatgátló hatás mérésére az alábbi rendszert választottuk (*korfüggő rendszer*):

A kezeléseket a transzplantáció utáni 4. és 10. napon végeztük a szerek egyszeri dóziséval. 1 órával a kezelés után a daganatsejteket az állatok hasüregéből leszívtuk és 10^7 sejtszámmal új állatokba oltottuk. A retranszplantációt követően különböző időpontokban meghatároztuk a tumorok tömegét (jelen esetben az összsejtszámot). Néhány esetben a szerek hatását különböző kezelési tartamok (1, 6 és 24 óra) után is összehasonlítottuk.

Kísérleteink során egy-egy csoportban 4—6 állat szerepelt.

A kemoterápiás szerekkel történő kezelésnél a lehetőség szerint mindig a szerek LD₅₀-éhez viszonyítottan arányosan csökkentett dózisokat használtunk. A következő citosztatikus szereket vizsgáltuk:

Mannitolmustár (Degranol^R) 1,6-bis-(2-kloretilamino)-1,6-dideoxy-D-mannitol
Dibromdulcit (Mitolactol^R, DBD)

1,6-dibromo-1,6-dideoxy-D-dulcitol

Dulcitepoxid (DAD)

1,2—5,6-Dianhydrodulcitol

(Chinoín Gyógyszer és Vegyészeti Termékek Gyára)

Tetramezylamannit (Zytostop, TMM, R—52)

1,2—5,6-tetra-O-metilszulfonil-D-mannitol

Dimezyldianhydroidit (DMDAI, 13020)

1,6-dimezyl-2,3,4,5-dianhydro-L-iditol

Dimezyletilaminoeritrit (Lycurim, R—74)

1,4-di-mesyl-oxyetilamino-1,4-dideoxy-m-eritritol

(Gyógyszerkutató Intézet)

Cyclophosphamid (Endoxan, Cytosan)

2,bis-/2-kloretilaminotetrahydro-2H 1,3,2 oxazaphosphorine 2 oxid

(VEB, Jenapharm, Ankerwerk Rudolstadt, NDK)

Melphalan (L-fenilalaninmustár)

3-p-L bis-(2-chloroethyl)-aminophenylalanin Dimethylmyleran

(dr. Connors ajándéka, Chester Beatty Res. Inst., London)

Metylendimethanesulphonate (MDMS)

(dr. Fox ajándéka, Christie Hospital and Holt Radium Inst., Manchester).

5-fluorouracil (5-FU)

(Roche Products Ltd., Anglia)

BCNU

1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea

CCNU

1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea

MeCCNU

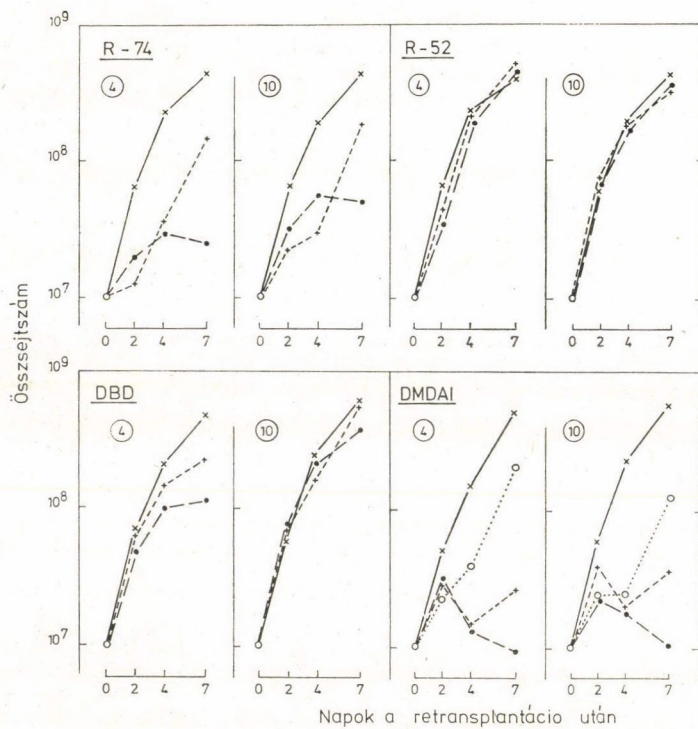
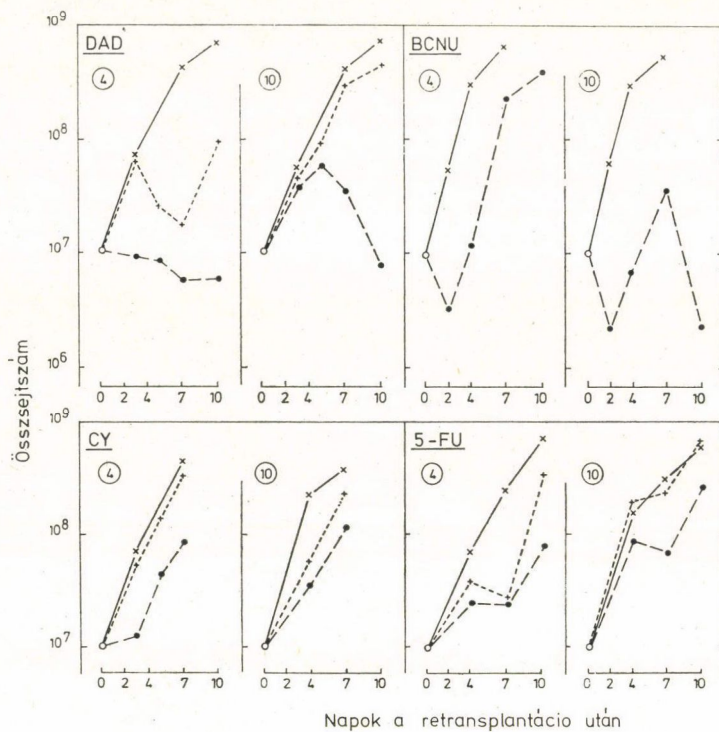
1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea

(dr. Goldin ajándéka, National Institute of Cancer, Bethesda, USA).

A szerek oldása a következőképpen történt: a DAD-t, 5-FU-t és Cyclophosphamidot fiziológiás konyhasóban oldottuk, a nitrosoureákat DMSO-5% Tween 80-ban, a többi szert 5%-os Tween 80-ban szuszpendáltuk.

Eredmények

Előzőekben ismertetett eredményeink azt mutatták, hogy az NK/Ly ascites tumor transzplantációját követően a daganat proliferációs üteme fokozatosan lassul (Lapis és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1974). Így a vizsgálatainkhoz önkényesen kiválasztott két időpontban, a 4. és 10. napon, sejtkinetikai szempontból — elsősorban a sejtciklus és fázisainak tartamában — eltérő, relatíve gyorsan, illetve lassan proliferáló tumort találunk (I. Táblázat).



I. Táblázat

NK/Ly ascites tumor sejtkinetikai paraméterei 4 és 10 nappal 5×10^6 sejttel történt transzplantáció után

Tumor kora	4. nap	10. nap
Összsejtszám ($\times 10^6$)	130,0	788,0
Sejtciklusidő (h) ⁺	30,6	56,7
G ₂ fázis (h) ⁺	2,9	8,4
S fázis (h) ⁺	19,1	30,4
G ₁ fázis (h) ⁺	8,3	16,4
Timidin index (%)	51,8	36,5
DNS-szintézis (dpm/mg DNS $\times 10^{-3}$)	11,0	1,76
Növekedési frakció	0,84—1,00	0,67—0,88

⁺ A kísérleti adatok Steel és Hanes (1971) módszerével végzett komputeres analízisének alapján nyert értékek.

A két különböző proliferációs rátájú tumorra gyakorolt hatás összehasonlíthatósága végettt a 4., illetve 10. napon végzett kezeléseket követően a tumorsejteket azonos sejtszámmal új állatokba oltottuk (retranszplantáltuk), és ebben az új környezetben vizsgáltuk a kezelt daganatsejtek proliferációját. Kezeletlen 4 és 10 napos tumorból azonos sejtszámot átoltva ugyanolyan növekedési görbét kaptunk, azaz a proliferációs rátában eltérés nem volt. Ennek alapján feltételezhetjük, hogy amennyiben a daganatgátló szer egyformán hat a két különböző sejttrendszerre (azaz pl. ugyanolyan arányban pusztítja a sejteket), akkor a retranszplantáció után a növekedési görbék lefutása nem tér el egymástól, míg eltérés esetén a két sejtpopuláció érzékenysége közötti különbségre gondolhatunk.

A kezelt tumorsejtek retranszplantáció utáni növekedési görbéit mutatja be az 1. és 2. ábra, amelyek a növekedésgátlás regisztrálása mellett módot nyújtanak arra is, hogy a tumor repopulálódásának alakulását kísérhessük figyelemmel.

1.—2. ábra. Citosztatikumok hatása különböző korú (4 és 10 napos) NK/Ly ascites tumorra. (A tumor növekedésének 4. és 10. napján kezeltünk, majd 1 órával később 10^7 sejttel retranszplantációt végeztünk.)

(Kontroll	× ——— ×	
	○ ○, + ——— +, ● ——— ●	
R-74	8 mg/kg	20 mg/kg
R-52	500 mg/kg	1250 mg/kg
DBD	140 mg/kg	350 mg/kg
DMDAI	140 mg/kg	350 mg/kg
DAD	3 mg/kg	7.5 mg/kg
BCNU		40 mg/kg
CY	40 mg/kg	80 mg/kg
5-FU	100 mg/kg	500 mg/kg

A vizsgált szerek közül a *DBD* az alkalmazott dózisokban (140 és 350 mg/kg) a 10 napos tumor növekedését nem befolyásolta, míg a 4. napon kezelt és retranszplantált tumor a kezdeti (2. nap) gyorsabb — a kontrollhoz hasonló ütemű — proliferáció után dózisfüggő érzékenységet mutatott. Ez utóbbi görbék lefutása arra utal, hogy a *DBD* olyan sejtkárosodásokat idézhetett elő, amelyek csak bizonyos idő — pl. egy sejtciklus lezajlása után — vezettek a sejt pusztulásához vagy proliferációjának gátlásához. A *DBD* diepoxid származéka, a *DAD* nagy dózisban (7,5 mg/kg = LD50/2) a fiatalabb tumor sejtjeinek azonnali, az idősebb tumor növekedésének pedig elhúzódottabban jelentkező gátlását okozta. Kisebb dózis esetén jól megfigyelhető a 4 napos tumor sejtjeinek fokozottabb érzékenysége, melyek csupán a transzplantáció utáni 7. napon kezdenek el ismét proliferálni. A 10 napos tumor a retranszplantáció után a kontrollhoz hasonló növekedést mutatott. E szerekhez hasonlóan az 5-FU is a gyorsabban növekvő NK/Ly ascites tumort gátolta elsősorban. Mindkét korú tumornál a retranszplantációt követően átmeneti sejtszámemelkedés után a növekedési görbe „törése” következik be, amelyet a túlélő sejtek gyors proliferációja követ. Az említett „törést” feltehetően az ebben az időszakban bekövetkező kiterjedt sejtpusztulás okozza és ez jelzi, hogy az 5-FU által előidézett sejtkárosodás nem gyorsan, hanem elhúzódóan vezet a sejtanycsere irreverzibilis változásához. Hasonlóan elhúzódó hatásról számolt be az 5-FU okozta finomszerkezeti változások vizsgálatakor Lapis és Benedeky (1966).

A különböző korú tumorok kezelésénél lényegében egyforma daganatgátló hatást mutatott a *DMDAI*. A retranszplantált sejtek növekedése a 4. napig a különböző dózisok esetében hasonlóan mutatkozott és csak ezután figyelhattuk meg a repopulálódás dózis-függő jellegét. Ugyancsak nem beszélhetünk proliferáció-függő hatásról Cyclophosphamiddal történt kezelés után sem. A növekedési görbék inkább a kezelt tumorsejtek lassabb ütemű proliferációjáról, mintsem kiterjedt pusztulásukról tanúskodnak. Hasonló jellegű növekedést figyelhattunk meg kifejezett proliferáció-függő hatás nélkül 8 mg/kg *R-74*-el történt kezelés után. Nagyobb dózis (20 mg/kg) adása esetében mindkét korú tumornál az átmeneti növekedést gátlás váltotta fel, melynek foka a 4 napos tumornál kifejezettebbnek mutatkozott.

BCNU 40 mg/kg-os dózisának hatására mind a 4, mind a 10 napos tumorból retranszplantált tumorsejtek száma a 2. napon jelentősen csökkent, azonban a repopulálódás ütemében már lényeges eltérések voltak. Míg a gyorsabban proliferáló 4 napos tumor esetében a kontrollhoz hasonló növekedési ütemet találtunk, addig a lassabban proliferáló 10 napos tumor sejtjei további proliferációra — az átmeneti összsejtszám emelkedéstől eltekintve — képtelenek voltak.

A 4. és 10. napon kezelt tumorok átoltása utáni 7. napon észlelt növekedésgátlást és ezek hányadosát a II. Táblázatban tüntettük fel. Ez a hányados

II. Táblázat

Kemoterápiás szerek hatása különböző korú NK/Ly ascites tumorra

Szer	Dózis (mg/kg)	Növekedésgátlás ⁺		Kor-faktor
		4. nap	10. nap	
DBD	140	46	5	0,11
	350	72	36	0,5
5-FU	100	82	11	0,13
	500	89	68	0,76
DAD	1,5	40	0	
	3,7	95	33	0,34
	7,5	98	95	0,96
Dimetilmyleran	10	76	54	0,71
Mannitolmustár	50	92	77	0,84
R-74	8	66	58	0,88
	20	94	88	0,93
DMDAI	70	60	77	1,28
	140	94	93	1,00
	350	100	100	1,00
Cyclophosphamide	40	26	40	
	80	81	69	0,85
Melphalan	0,6	33	56	1,69
	1,2	99	98	1,00
Metildimetán-sulfonát	10	71	99	1,39
BCNU	40	64	93	1,45
R-52	500	2	29	
	1200	4	24	

$$+ \text{Növekedésgátlás} = 1 - \frac{\text{összsejtszám (kezelt)}}{\text{összsejtszám (kontroll)}} \times 100$$

$$+ \text{Kor-faktor} = \frac{\text{növekedésgátlás (10 napos tumor)}}{\text{növekedésgátlás (4 napos tumor)}}$$

— amelyet „kor-faktor”-nak is nevezhetünk — 1,0-nél nagyobb, ha a szer elsősorban a lassabban proliferáló 10 napos, és 1,0-nél kisebb, ha a gyorsabban növekedő 4 napos tumort gátolja (Jeney és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1973, Lapis 1974, Lapis és mtsai 1975). A vizsgált szerek a proliferáció-függő hatás tekintetében következőképpen viselkedtek:

— a citotoxikus hexitokok közül a DBD és DAD, valamint a DNS-szintézist gátló antimetabolit, az 5-fluorouracil jobban gátolta a 4 napos tumor proliferációját, mint a 10 naposét. Nem ilyen kifejezetten, de a gyorsabban növekvő tumort előnyösebben befolyásoló szernek mutatkozott az R-74, Dimetilmyleran és a Mannitolmustár.

— a két különböző tumor válaszreakciója azonosnak mutatkozott Cyclophosphamid és DMDAI esetében.

— a lassabban proliferáló 10 napos tumor növekedését kifejezettebben gátolta a BCNU, és hasonló de kevésbé élesen megnyilvánuló különbség mutatkozott a Metildimentánsulfonát és Melphalan esetében.

Az alkalmazott kor-függő rendszerben az R—52 az alkalmazott dózisokban és kezelési időtartam (1 óra) után gátló hatást nem mutatott.

A kor-függő hatást mutató DBD és az azt nem mutató DMDAI esetében megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a 4 napos tumor érzékenysége 1, 6 és 24 órás kezelési periódusokat alkalmazva. DMDAI két különböző dózisát adtuk, és azt tapasztaltuk, hogy az eltérő kezelési intervallumok után retranszplantált tumorsejtek azonos rátával proliferálnak. Hasonló eredményeket kaptunk DBD-vel történt kezelés után is (III. Táblázat).

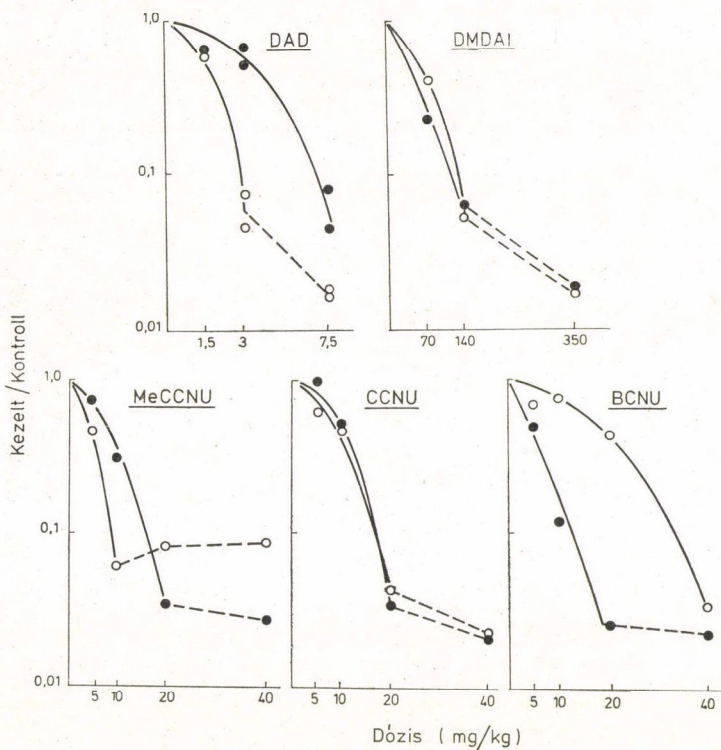
III. Táblázat

DMDAI és DBD hatása 4 napos NK/Ly ascites tumorra

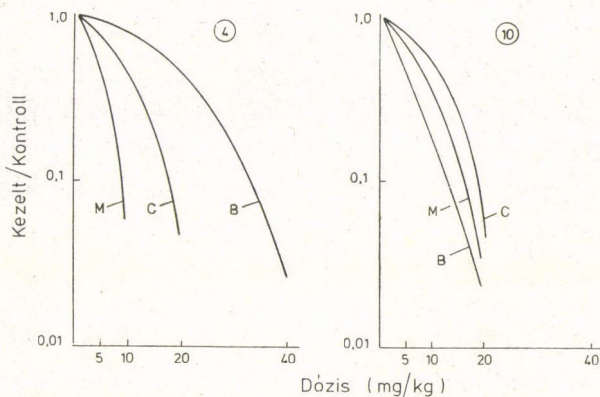
Szer	Dózis (mg/kg)	Kezelés tartama a retranszplan- táció előtt (h)	Növekedés- gátlás+
DMDAI	70	1	40,0
		6	43,0
	140	1	90,5
		6	81,0
		24	88,0
	DBD	140	1
6			36,0
24			45,0

$$+ \text{Növekedésgátlás} = 1 - \frac{\text{Összsejtszám (kezelt)}}{\text{Összsejtszám (kontroll)}} \times 100$$

A 7. napon mért összsejtszám alapján számított növekedésgátlás, illetve kor-faktor jól jelzi, hogy a szer hatása mennyiben függ a tumorsejtpopuláció proliferációs ütemétől. További kísérleteinkben azonban olyan kiértékelési rendszert választottunk, amely még jobban tükrözi a szerek proliferáció-függő hatását. Ezeket a vizsgálatokat elsősorban a BCNU hatásának igazolására végeztük, tekintettel arra, hogy jelenleg igen kevés olyan daganatgátló szer ismeretes, amely a lassabban proliferáló tumor növekedését jobban gátolja, mint a gyorsabban proliferálóét. Annak eldöntésére, hogy ez a hatás csak a BCNU-ra vagy a nitrosoureákra általában jellegzetes-e, előbbi hatását összehasonlítottuk a CCNU és MeCCNU hatásával. A dózishatásgörbék (melyeknél a dózis függvényében a 7. napon mért növekedés-gátlást tüntettük fel a kontroll százalékában) arra utalnak, hogy e három, szerkezetileg egymáshoz igen közelálló szer, eltérő módon befolyásolja a különböző sebességgel növekedő NK/Ly ascites tumort (3. ábra). A MeCCNU mérsékelten a 4 napos, a BCNU kifejezetten a 10 napos tumort gátolta jobban, míg a CCNU ilyen megkülön-



3. ábra. Citosztatikumok hatása a 4 (○) és 10 (●) napos NK/Ly ascites tumorra. (A függőleges tengelyen a növekedés-gátlást tüntettük fel, amelyet a retranszplantáció utáni 7. napon mért összsejtszám adatokból számítottunk).



4. ábra. Nitrosoureák hatása különböző korú NK/Ly ascites tumorra. (M = MeCCNU, C = CCNU, B = BCNU)

bőztetést nem mutatott. A három szer hatásának összehasonlításakor (4. ábra) jól látható, hogy a 10 napos tumort az alkalmazott dózis-tartományban a nitrosoureák lényegében egyformán befolyásolták, ugyanakkor a 4 napos tumor esetében már jelentős eltérések voltak, mégpedig a MeCCNU mutatta a legkifejezettebb, míg a BCNU a legenyhébb hatást.

Megbeszélés

A tumorok és normál szövetek proliferációs aktivitása és hatóanyagokkal szembeni érzékenységük összefüggésének tanulmányozása, mind az újabb daganatellenes szerek előállítására, mind a már ismertek hatékonyabb — elsősorban kombinációkban történő — felhasználására szempontjából egyaránt fontosnak ítéltető meg.

Vizsgálataink során a proliferációs ütem és therápiás válasz összefüggésének tanulmányozását tűztük ki célul, testobjectumként NK/Ly ascites tumort használva. Előzőekben rámutattunk arra, hogy a tumor növekedési üteme transzplantációját követően fokozatosan lelassul, hasonlóan a solid tumorokhoz. Ellentétben azonban az utóbbiakkal, ahol a nem, vagy lassan proliferáló sejtek fokozódó aránya, illetve a sejtvészesség emelkedése felelős ezért a lassulásért, az ascites tumoroknál — így esetünkben is — a sejtciklus tartamának megnyúlása a döntő tényező (Lapis és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1974, Jeney és mtsai 1975). Természetesen nemcsak a sejtciklus átlagos tartama, hanem a ciklusidő populáción belüli ingadozása is rendkívül megnő, jelezve az egyre lassabban proliferáló sejtek mind nagyobb részvételét. Az általunk használt rendszer esetében a daganatsejtek legtöbbször tehát sejtciklusban volt, azonban a választott sejtpopulációk (4 és 10 napos tumor) mind sejtkinetikai, mind biokémiai és morfológiai téren jelentősen eltértek egymástól.

Vizsgálati rendszerünk különbözik tehát az eddig zömmel alkalmazottaktól annyiban, hogy nem a proliferáló és nem-proliferáló sejtek érzékenységének összevetésére nyújt módot, hanem ugyanazon tumor életének különböző növekedési ütemét mutató szakaszait veti össze a kemoterápiás érzékenységgel (IV. Táblázat).

E megközelítési módot előnyösnek tartjuk elsősorban azért, mert a proliferáló és nem-proliferáló sejtek elkülönítése (és így a növekedési frakció meghatározása) különösen a daganatoknál nagymértékben függ az alkalmazott módszertől és még ma sem bizonyított, hogy nem-proliferáló sejtek egyáltalán léteznek-e. Valószínűbb, hogy a daganatsejtek a proliferációs ütem tekintetében igen széles eloszlást mutatnak és az igen lassan proliferálók nyerik el a „nyugvó” sejt elnevezést. Így olyan rendszerek alkalmazása, melyben gyorsan proliferáló sejtek érzékenységét hasonlítják össze biztosan nyugvó sejtekével (csontvelői stem-sejtek, G1-ben blokkolt sejtek, szövettényészetek plateau-

IV. Táblázat

Daganatgátló szerek proliferáció-függő hatásának vizsgálatához használt rendszerek

Szerző(k)	Proliferáló (gyorsan proliferáló)	Nem, vagy lassan proliferáló	Kezelés tartama	Kiértékelés módja
Bruce és mtsai (1966)	transzplantálható lymphoma	normál csontvelő	24 óra	CFU
Wilcoff és mtsai (1971)	L 1210 leukemia (in vitro) expo- nentialis fázis	L 1210 leukemia (in vitro) plateau fázis	különböző ideig	in vivo bioas- say (túlélés)
Valeriotte és Tolen (1972)	transzplantálható lymphoma	normál csontvelő	24 óra	CFU
van Putten és mtsai (1972)	normál csontvelő stimulálva sugár- depletioval	normál csontvelő	16 óra	CFU
Lin (1973)	B lymphocyta sti- mulálva birkavö- rösvértesttel	B lymphocyta	4 nap	PFU
Hagemann és mtsai (1973)	P 815×2 masto- cytoma (in vitro) expo- nenciális fázis (ascites) 2—5—10. nap (solid) 6—10—18. nap	P 815×2 masto- cytoma plateu fázis	15 perc	in vitro colonia
Barranco és mtsai (1973)	Chinese hamster ovarium (CHO) HA 1 sejtek	CHO HA 1 sejtek	1 óra	in vitro colonia
Hahn és mtsai (1974)	exponenciális fá- zis	plateu fázis		
Tobey és mtsai (1975)	Chinese hamster sejtek complette F10 mediumban	CHO isoleucin-deficiens mediumban	2 óra	in vitro colonia
Kopper és mtsai	NK/Ly ascites tu- mor 4. nap	NK/Ly ascites tu- mor 10. nap	1 óra	in vivo bioas- say (összsejt- szám)

fázisa) feltehetően kevésbé tükrözik a tumorszövetben jelenlevő valódi vi-
szonyokat, mint olyan rendszer, amelyben a sejtek proliferációs aktivitása
eltérő ugyan, de nem az előbb említett szélsőséges módon.

A daganatgátló szerek proliferáció-függő hatásának vizsgálatakor nyert
adatok összehasonlíthatóságának egyik fő problémája, hogy a különböző szerzők
eltérő rendszereket és rendszerint változó kezelési időtaramokat alkalmaznak
(IV. Táblázat), amely magyarázhatja azt, hogy egyes szerek a különböző
csoportosításokban nem mindig azonos elbírálás alá esnek hatásuk proliferáció-
függősége tekintetében. A kezelési időtartam szerepét tekintve Hahn és mtsai
(1973) pl. kimutatták, hogy 2 órás cyclophosphamid, 5-FU és Bleomycin
kezelés után a sejtpusztító hatás lényegesen nagyobb, mint 24 órás kezelést
követően. Kísérleteinkben 1, 6 és 24 órás kezelés után vizsgáltuk a DBD és

DMDAI hatását, azonban e szereknél kezelési időtartamtól való függőséget nem észleltünk. Vizsgálataink során 1 órás kezelési időt választottunk elsősorban azért mert el akartuk kerülni, ill. csökkenteni a retranszplantáció előtti időszakban a repair-mechanizmusok működését. E rövid kezelés jogosságát támasztotta alá egyik korábbi megfigyelésünk is, mely szerint jelzett DBD és DAD már 10 perccel a kezelés után maximális beépülést mutatott az ascites tumorsejtekben (Kopper és mtsai 1975).

A citotoxikus hexitolok közül vizsgálati rendszerünkben az *R-52* növekedést gátló hatást nem mutatott. Előzőekben kimutattuk, hogy ez a szer képes az NK/Ly és *S₃₇*-ascites tumorok növekedését lassítani, a tumorsejtek átlagos ciklusidejét megnyújtani (Lapis és Kopper 1971). Elképzelhető, hogy a hosszan tartó kezeléssel szemben 1 órás kezelést követően csak kismértékű sejtpusztulás vagy sejtkárosodás jött létre, amely a retranszplantáció után a repopulálódás, illetve reparáció során gyorsan kompenzálódott. Az *R-74* az alkalmazott dózisokban gátolta mindkét, de valamivel jobban a 4 napos tumor proliferációját. A gyorsabban növekedő tumorra kifejtett preferenciális hatás még jobban érvényesült a *DBD*-vel történt kezelés után. E proliferáció-függő hatással kapcsolatban érdemes megemlíteni, hogy a *DBD* a biokémiai vizsgálatok szerint erőteljesen kötődik a sejtosztódás szabályozásában feltehetően kulcs-szerepet játszó savanyú magi fehérjékhez (E. Institoris és mtsai 1974, Jeney és mtsai 1975). Ugyanakkor az is kimutatást nyert, hogy az NK/Ly ascites tumor növekedése során az egyes chromatin frakciók preferenciális jelölődésében különbségek mutathatók ki (Jeney és mtsai 1975). A *DBD*-hez hasonló hatást mutatott a savanyú magi fehérjékhez még erősebben kötődő *DAD*. A mind mezil-csoportokat, mind epoxid struktúrákat egyaránt tartalmazó *DMDAI* proliferáció-függő hatást nem mutatott, bár az alkalmazott dózisokban jelentősen gátolta a tumorsejtek növekedését. Hatásmechanizmusa nem ismert még pontosan. Csányi és Halász (1973) Yoshida s.c. sarcomában a DNS-szintézis gyors csökkenését észlelték a kezelést követően, míg Lapis és mtsai (1975) NK/Ly ascites tumorban a kezelés utáni korai időpontokban a jelölődési index és a mitózis index csökkenése mellett mind a DNS, mind az RNS szintézisének rátájában gátlást figyeltek meg.

A nem hazai előállítású szerek közül az *5-FU* lényegesen jobban gátolta a gyorsabban proliferáló 4 napos tumort, mint a 10 napost. Ez a hatás várható volt, tekintettel arra, hogy az *5-FU* a timidilát-szintetáze enzim gátlása révén a DNS szintézist, az S-fázisban levő sejteket blokkolja és mind a DNS-szintézis üteme, mind a jelölődési index a 4 napos tumorban magasabb, mint a 10 naposban. — A *Cyclophosphamid* lényegében egyformán befolyásolta a különböző korban kezelt tumorokat, ellentétben más megfigyelésekkel, melyek szerint a gyorsabban proliferáló tumorok érzékenyebbek e szerrel szemben, mint a lassabban növekvők (Bruce és mtsai 1966). A *Cyclophosphamid* hatása utóbbi esetben oly módon érvényesül, hogy elsősorban a proliferáló sejteket

gátolja, míg a nem-proliferálókat kevésbé vagy egyáltalán nem, és így terápiás effektusa a magas növekedési frakciójú tumoroknál a legkedvezőbb. Esetünkben az ascites tumorsejtek zöme proliferált, a növekedési frakcióban a 4 és 10 napos tumor között csak kis eltérés mutatkozott, ezért a Cyclophosphamid — pusztán sejtkinetikai megfontolásokból — jogosan mutatott hasonló gátló hatást a két különböző korú tumorban.

A szerkezetileg igen hasonló nitrosoureák e kor-függő rendszerben igen különbözőképpen viselkedtek. E vegyületeket potenciális alkiláló szerekek tekintik, ezért feltételeztük, hogy hatásuk közel egyformán érvényesül a különböző korú tumorokban. A dózishatás-görbék adatai azt mutatják, hogy a három szer elsősorban a 4 napos tumorra kifejtett gátlás tekintetében tért el egymástól. Feltételezhetjük, hogy a különbség háttérben a szerek okozta károsodás eltérő mértékű reparációja áll. Igen fontosnak látszik a BCNU lassabban proliferáló tumorra kifejtett preferenciális hatása, mivel ez a tulajdonság egyrészt lehetővé tenné az alacsonyabb növekedésű frakciójú (azaz nem vagy igen lassan proliferáló sejteket nagy mennyiségben tartalmazó) malignus tumorok jobb befolyásolását, másrészt a legtöbb rosszindulatú daganatoknál gyorsabban proliferáló normál szövetek (csontvelő, bél) és a tumor közötti szelektívebb sejtpusztító hatás elérését. Az irodalomban igen eltérő adatokat találunk a BCNU proliferáció-függő hatásával kapcsolatban. Egyes szerzők a lassan (Barranco és mtsai 1973), mások a gyorsan szaporodó sejtpopulációk fokozottabb BCNU érzékenységét figyelték meg (vanPutten és mtsai 1972), míg Thacher és Walker (1968) ilyen eltérést nem találtak. Hagemann és mtsai (1973) a P815×2 mastocytoma sejtek szövettényészeti és ascites formáinál lassabban proliferáló tumor fokozott BCNU érzékenységét észlelték. Hahn és mtsai (1974) szerint in vitro viszonyok között a serumkoncentráció igen fontos tényező és pozitív irányban tolja el a terápiás hatást. Tobey és mtsai (1975) megerősítik a BCNU nyugvó sejtekre kifejtett előnyös hatását, de vitatják a Hahn és mtsai (1974) által feltételezett serumkoncentráció szerepét.

A dózishatás-görbéket analizálva feltűnik, hogy a görbéket az alacsonyabb dózisoknál megjelenő „váll” jellemzi, amely különösen kifejezett a DAD idősebb, valamint a BCNU fiatalabb sejtpopulációra gyakorolt hatásánál. Feltételezhető, hogy ez a jelenség a szerek okozta sublethalis károsodás reparációját jelenti (Elkind és Sutton 1960), azonban feltűnő, hogy ez nemcsak a lassan proliferáló sejteknél található, mint azt van Putten és Lelieveld (1970, 1971) különböző alkiláló szerrel történt kezelés után is észlelte, hanem a gyorsabban proliferálóknál is, mint ahogy azt eredményeinkhez hasonlóan Hagemann és mtsai (1973) BCNU kezelés után találták gyorsan proliferáló szövettényészeti és ascites tumor sejteknél. További vizsgálatot igényel annak eldöntése, hogy a különböző növekedési rátájú sejtpopulációk repair-mechanizmusai azonosak-e vagy különböznek egymástól.

A kor-függő rendszeren végzett kísérleteink eredményeit összefoglalva, a szerek három csoportját különíthettük el:

- proliferáció-függést nem mutatók (Cyclophosphamid, DMDAI, CCNU)
 - a gyorsabban proliferáló tumort jobban gátlók (DBD, DAD, 5-FU, MeCCNU)
 - a lassabban proliferáló tumort jobban gátlók (BCNU)
- (a többi vizsgált szerrel kapcsolatban a proliferáció-függés nem állapítható meg egyértelműen).

Vizsgálataink egyértelműen bizonyítják, hogy vannak olyan szerek, melyek hatását a sejtpopuláció aktuális növekedési sebessége lényegesen befolyásolta, míg másokét nem. Tekintettel arra, hogy emberi tumorok esetében is számolnunk kell a legkülönbözőbb proliferációs rátájú daganatokkal, ugyanazon daganaton belül különböző proliferációs aktivitású sejtpopulációkkal, a növekedési ráta spontán és mesterségesen előidézett (pl. terápiás beavatkozás) változásával, jogosan vetődik fel a szereknek a sejtproliferáció ütemétől függő hatásának fontossága.

Eredményeinkkel kapcsolatban sürgősen hangsúlyoznunk, hogy in vivo körülmények között az optimális kezelési séma, nemcsak az adott agens sejtkinetikai, hanem biokémiai, farmakológiai és toxikológiai jellegzetességeitől is függ, valamint ezeknek a normál és tumoros szövetet illető eltéréseitől. Természetesen nem várható, hogy a különböző kísérleti eredmények közvetlenül alkalmazhatók legyenek az optimális klinikai kezelés megtervezésére. Ennek egyik oka a kísérleti és human tumorok között fennálló különbség, melyek kiküszöbölésének vagy csökkentésének egyik módja lehet a human tumorok közvetlen vizsgálata. Ennek ellenére a klinikai gyakorlatban igen fontos lehet és számos esetben útmutatóul szolgálhat a kemoterápiás szerek kísérletesen meghatározott, különböző kezelési sémától és elvektől függő hatásának ismerete.

Összefoglalás

Szerzők az NK/Ly ascites tumor növekedési üteme és kemoterápiás érzékenysége közötti összefüggést vizsgálják in vivo körülmények között ún. „kor-függő” rendszeren. A citosztatikus szerekkel történő kezelést 4 és 10 napos tumoron végezték, melyekről előzetesen kimutatták, hogy sejtkinetikai, biokémiai és morfológiai jellegzetességeik alapján egymáshoz viszonyítva relatíve gyorsan, illetve lassan proliferáló sejtpopulációknak felelnek meg. 1 órás kezelési időtartam után a sejteket új állatokba 10^7 sejtszámmal retranszplantálták és az újránövekedő tumorok proliferációs ütemét vizsgálták. A növekedés-gátlás meghatározására a retranszplantáció utáni 7. napon észlelt össz-sejtszám értékeket használták. Eredményeik azt mutatják, hogy a citosztatikus szerek hatása különbözőképpen függ a daganat növekedési ütemétől:

- a) elsősorban a gyorsabban proliferáló tumorra fejtette ki hatását a DBD, DAD, 5-FU, MeCCNU,
- b) elsősorban a lassabban proliferáló tumort gátló a BCNU,
- c) nem mutatott proliferáció-függő hatást a Cyclophosphamid, DMDAI, CCNU.

IRODALOM

- Barranco, S. C., Novak, J. K. és Humphrey, R. M.: Cancer Res. **33**, 691 (1973).
 Bhuyan, B. K., Scheidt, L. G. és Fraser, T. J.: Cancer Res. **32**, 398 (1972).
 Brown, J. M.: Radiology **114**, 189 (1975).
 Bruce, W. R., Meeker, B. E. és Valeriote, F. A.: J. Natl. Cancer Inst. **37**, 233 (1966).
 Charbit, A., Malaise, E. P. és Tubiana, M.: Europ. J. Cancer **7**, 307 (1971).
 Csányi, E. és Halász, M.: Arzneim.-Forsch. **23**, 961 (1973).
 Dombernowsky, P. és Hartmann, N. R.: Cancer Res. **32**, 2452 (1972).
 Elkind, M. M. és Sutton, H.: Radiat. Res. **13**, 556 (1960).
 Frindel, E., Malaise, E. P., Alpen, E. és Tubiana, M.: Cancer Res. **27**, 1122 (1967).
 Frindel, E., Malaise, E. és Tubiana, M.: Cancer **22**, 611 (1968).
 Gavosto, F.: Cell Tissue Kinet. **7**, 151 (1974).
 Hagemann, R. F., Schenken, L. L. és Leshner, A.: J. Natl. Cancer Inst. **50**, 467 (1973).
 Hahn, G. M., Gordon, L. F. és Kurkijan, S. D.: Cancer Res. **34**, 2373 (1974).
 Hahn, G. M., Ray, G. R., Gordon, C. F. és Kallman, R. F.: J. Natl. Cancer Inst. **50**, 529 (1973).
 Institoris, E., Holcinger, L. és Bánfi, D.: Z. Krebsforsch. **82**, 101 (1974).
 Jeney, A., Kopper, L., Lapis, K., Benedecsky, I. és Walkó, É.: The mode of action of cytotoxic hexitols on NK/Ly ascites tumour with different proliferative activities. 8th Internat. Congress of Chemotherapy, Athén (1973) Abstracts B-183.
 Jeney, A., Dzurillay, É., Lapis, K. és Institoris, L.: The role of nuclear proteins in the chemotherapeutic effect of Dibromodulcitol. 9th Internat. Congress of Chemotherapy, London (1975). Abstracts C-45.
 Jeney, A., Dzurillay, É., Kopper, L., Lapis, K.: Daganatos sejtpopuláció növekedésének tanulmányozása. II. Magi fehérjék vizsgálata gyorsan és lassan proliferáló NK/Ly ascites tumor sejtpopulációiban. Orvostudomány **27** (1976).
 Kopper, L., Jeney, A. és Lapis, K.: Effect of cytotoxic hexitols on ascites tumour with different growth rate. II. Meeting of EACR, Heidelberg (1973).
 Kopper, L., Jeney, A., Benedecsky, I., Lapis, K. és Takács, J.: Orvostudomány **25**, 19 (1974).
 Kopper, L., Lapis, K. és Institoris, L.: Incorporation of ³H-Dibromodulcitol and ³H-Dianhydrolulcitol into ascites tumor cells. Autoradiographic study. Neoplasma (megjelenés alatt).
 Lin, H.: Cancer Res. **33**, 1716 (1973).
 Lala, P. K. és Patt, H. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. US. **56**, 1735 (1966).
 Lapis, K. és Benedecsky, I.: Acta Biol. Hung. **17**, 199 (1966).
 Lapis, K. és Kopper, L.: Morph. Ig. Orv. Szemle **10**, 171 (1970).
 Lapis, K. és Kopper, L.: Studies on the mechanism of action of R-52 (1,2-5,6-tetra-O-methylsulphonyl-D-mannitol). Fortschritte der Krebsforschung in den sozialistischen Ländern, Verlag Theodor Steinkopff, Dresden, 173–186. (1971).
 Lapis, K., Jeney, A., Kopper, L., Szende, B. és Benedecsky, I.: Arch. Geschwulstforsch. **42**, 229 (1973).
 Lapis, K.: The effect of cytotoxic hexitols on the growth characteristic and cellular kinetics of tumour cell populations. XI. Internat. Cancer Congress. Firenze, Vol. 5. 288–293. (1974).
 Lapis, K., Jeney, A., Kopper, L., Szende, B. és Takács, J.: Theoretical basis for designing combination therapy with Dibromodulcitol (DBD). 9th Internat. Congress of Chemotherapy. London (1975). Abstracts C-16.
 Lapis, K., Kopper, L. és Benedecsky, I.: Magyar Onkológia **19**, 162 (1975).
 Mauro, F. és Medoc-Jones, H.: Cancer Res. **30**, 1397 (1970).
 Peel, S. és Fletcher, P. A.: Europ. J. Cancer **5**, 581 (1969).
 Schiffer, L. M., Nelson, J. S. R., Dilettoso, B., Migliorato, D. és Randolph, W.: Cell Tissue Kinet. **6**, 165 (1973).

- Shirakawa, S., Luce, J. K. és Tannock, I. F.*: J. Clin. Invest. **49**, 1188 (1970).
Simpson-Herren, L. és Lloyd, H. H.: Cancer Chemother. Rep. **54**, 143 (1970).
Steel, G. G. és Hanes, S.: Cell Tissue Kinet. **4**, 93 (1971).
Tannock, I. F.: Cancer Res. **29**, 1527 (1969).
Terz, J. J., Curutchet, P. és Lawrence, W. Jr.: Cancer **28**, 1100 (1971).
Thatcher, C. J. és Walker, I. G.: J. Natl. Cancer Inst. **28**, 363 (1969).
Tobey, R. A. és Crissman, H. A.: Cancer Res. **35**, 460 (1975).
Valeriote, F. A. és Tolen, S. J.: Cancer Res. **32**, 470 (1972).
van Putten, L. M. és Lelieveld, P.: Europ. J. Cancer **6**, 313 (1970).
van Putten, L. M. és Lelieveld, P.: Europ. J. Cancer **7**, 11 (1971).
van Putten, L. M., Lelieveld, P. és Kram-Idsenga, L. K. J.: Cancer Chemother. Rep. **56**, 691 (1972).
Wiebel, F. és Baserga, R.: Cell Tissue Kinet. **1**, 273 (1968).
Wilcoff, L. J., Lloyd, H. H. és Dumadge, E. A.: Chemotherapy **16**, 44 (1971).
Young, R. C. és deVita, V. T.: Cell Tissue Kinet. **3**, 285 (1970).
Zubrod, C. G.: Cancer **30**, 1474 (1972).