

Oncology Reports



Az eredeti publikáció magyar fordítása.

An international journal devoted to Fundamental and Applied Research in Oncology

VOLUME 21, NUMBER 3, APRIL 2009

Az Avemar, egy nem-toxikus fermentált búzacsíra kivonat, apoptózison keresztül lassítja a szenzitív és az 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 humán lymphoma sejtek növekedését*

Philipp Saiko, Maria Ozsvár-Kozma, Geraldine Graser,
Andreas Lackner, Michael Grusch, Sibylle Madlener,
Georg Krupitza, Walter Jaeger, Mate Hidvegi, Ram P. Agarwal,
Monika Fritzer-Szekeres, Thomas Szekeres

*Eredeti megjelenés: Saiko P, Ozsvár-Kozma M, Graser G, Lackner A, Grusch M, Madlener S, Krupitza G, Jaeger W, Hidvegi M, Agarwal RP, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T
Avemar, a nontoxic fermented wheat germ extract, attenuates the growth of sensitive and 5-FdUrd/Ara-C cross-resistant H9 human lymphoma cells through induction of apoptosis
ONCOLOGY REPORTS 21: 787-791, 2009

Az Avemar, egy nem-toxikus fermentált búzacsíra kivonat, apoptózison keresztül lassítja a szenzitív és az 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 humán lymphoma sejtek növekedését

PHILIPP SAIKO¹, MARIA OZSVAR-KOZMA¹, GERALDINE GRASER¹, ANDREAS LACKNER³,
MICHAEL GRUSCH³, SIBYLLE MADLENER², GEORG KRUPITZA², WALTER JAEGER⁴,
MATE HIDVEGI⁵, RAM P. AGARWAL⁶, MONIKA FRITZER-SZEKERES¹ és THOMAS SZEKERES¹

¹Orvosi és Kémiai Laboratóriumi Diagnosztikai Intézet, ²Klinikai Patológiai Intézet, Bécsi Orvostudományi Egyetem, Bécsi Általános Kórház, Waehringer Guertel 18-20; ³I. sz. Belgyógyászati Klinika, Rákkutató Részleg, Bécsi Orvostudományi Egyetem, Borschkegasse 8a; ⁴Klinikai Farmakológiai és Diagnosztikai Intézet, Élettudományi Kar, Bécsi Egyetem, Althanstrasse 14, A-1090 Bécs, Ausztria; ⁵Zsidó Egyetem, Berkocsis utca 2, H-1084 Budapest, Magyarország; ⁶Orvostudományi Tanszék, Hematológiai/Onkológiai Részleg, Miami Egyetem, 1600 N.W. 10th Avenue, Miami, FL 33136, Egyesült Államok

Közlésre érkezett: 2008. augusztus 21.; Elfogadva 2008. október 31.

DOI: 10.3892/or_00000285

Absztrakt Az Avemar (MSC) egy nem-toxikus fermentált búzacsíra kivonat, amelyről kimutatták, hogy szignifikánsan javítja a különböző daganatos betegségekben szenvedő betegek túlélését. Jelen tanulmányunkban az Avemar hatását vizsgáltuk szenzitív és 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 humán lymphoma sejteken. 48, illetve 72 órás inkubálás után az Avemar IC₅₀ értéke szenzitív H9 sejtek esetén 290 és 200 µg/ml, míg 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 sejteknél 180 és 145 µg/ml volt. A 48 órás 300 µg/ml-es koncentrációban alkalmazott MSC kezelés dóziszfüggő apoptózist indukált a szenzitív H9 sejtek 48%-ában. A keresztrezisztens H9 sejtekben a 48 órás 200 µg/ml-es Avemar inkubáció a daganatos sejtek 41%-nál vezetett apoptózishoz. A különböző koncentrációjú MSC kezelés következtében létrejövő növekedésgátlás a szenzitív H9 sejtek esetén főként a sejtciklus S fázisában történt, mely a sejtpopuláció 54%-ról 73%-ra történő növekedését, míg a G0-G1 fázisban 40%-ról 19%-ra történő sejtlepléciót eredményezett. A keresztrezisztens H9 sejtekben történő növekedésgátlás is főként az S fázisban jött létre, ez a sejtpopuláció 45%-ról 68%-ra történő növekedését, míg a G0-G1 fázisban 45%-ról 31%-ra történő sejtlepléciót okozott. Mivel az MSC kezelés során nem alakul ki 5-FdUrd/Ara-C rezisztencia, ezért további vizsgálatok szükségesek a pontos hatásmechanizmus felderítéséhez. Összegezve elmondhatjuk, hogy az Avemarnak

számos jótékony hatása van, melynek következtében felmerül az alkalmazása a humán daganatos betegségek konvencionális kemoterápiájában.

Bevezetés

Az Avemar (MSC) metoxi-helyettesített benzokinonokra standardizált, fermentált búzacsíra kivonat. Erről a kivonatról, melyet Hidvégi Máté állított elő, kimutatták, hogy számos rákellenes hatása van. Szájon át történő alkalmazása gátolja a daganat metasztatikus szóródását és burjánzását (1). Az Avemar gátló hatást fejt ki a metasztázisképződésre daganatos állatokban (2-4), mely során az apoptózis mértékének növekedésével egyidejűleg a bőr graftok túlélési idejének csökkenését és csökkent sejtproliferációt eredményez. Sőt, kísérleti körülmények között az MSC együttesen alkalmazva 5-fluorouracilal (5-FU) és dakarbazinnal (DTIC) képes szinergista módon növelni azok hatását (5). Előrehaladott stádiumú colorectalis carcinomák (6,7) és magas rizikójú melanomák (8) esetén a kemoterápia, illetve műtéti kezelés mellett orálisan alkalmazott Avemar gátolja a metasztázis képződést és növeli a túlélést.

Az MSC-ről kimutatták, hogy in vitro apoptózist indukál hasnyálmirigy carcinoma sejtekben, daganatos T és B lymphocytá sejt vonalakban, leukémia és melanoma sejtekben (5,9-11). Lymphoid tumorsejtekben az apoptózis indukció szelektív módon, tirozin foszforiláció és Ca²⁺ influx útján történt (10). Továbbá az Avemarról kimutatták, hogy szelektív gátlást fejt ki a glikolízis illetve a pentóz-foszfát ciklus enzimeire és a major hisztokompatibilitási komplex I. fehérjéinek downregulációjához vezet daganatos sejtekben (9-11). Jurkat leukemia sejtek MSC-vel történő inkubációja során az IC₅₀ érték 200 µg/ml volt, melyet sub-G₁ csúcs megjelenése előzött meg a flow hisztogramokon. Pásztázó lézer citometriás vizsgálat során a propidium jodid és annexin V-festett sejtek jelezték, hogy az Avemar növekedésgátló hatása összefügg az erős apoptózist indukáló hatással.

Levelezési cím: Prof. Thomas Szekeres, Orvosi és Kémiai Laboratóriumi Diagnosztikai Intézet, Bécsi Orvostudományi Egyetem, Bécsi Általános Kórház, Waehringer Guertel 18-20, A-1090 Bécs, Ausztria

E-mail: thomas.szekeres@meduniwien.ac.at

Kulcsszavak: Avemar (MSC), szenzitív és 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 humán lymphoma sejtek, növekedésgátlás, apoptózis, sejtciklus

Korábbi tanulmányainkban vizsgáltuk az MSC hatásait HT29 humán colorectalis carcinomasejteken és HL-60 humán promyelocytás leukémia sejteken. Az Avemar apoptózist és nekrozist indukált és szignifikánsan gátolta a ribonukleotid redukáz aktivitását dCTP, dTTP és dATP-pool depléciót okozva (12,13). A HL-60 sejtekben a sejtciklus progresszió csökkenése csak magas dózisoknál volt megfigyelhető (13).

Ahhoz, hogy ezen eredményeket alátámasszuk és meghatározzuk, hogy az MSC képes-e mind az 5-FdUrd, mind az Ara-C rezisztencia kialakulását gátolni, megvizsgáltuk az Avemar hatásait a korábban leírt 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 humán lymphoma sejtvonalon összehasonlítva a szenzitív H9 sejtekkel. Az 5-fluorodeoxyuridine (5-FdUrd) aktivitása hasonló az 5-FU aktivitásához és a nagymértékű hepatikus extrakciójának köszönhetően jelentős farmakológiai előnye van hepatikus artérián keresztül alkalmazása esetén (14,15).

Meghatároztuk az Avemar hatását mindkét sejtvonal növekedésére és megvizsgáltuk az apoptózis és nekrozis indukáló hatását egy, a munkacsoportunk által kifejlesztett specifikus kettősfestéses módszerrel. FACS eljárással vizsgáltuk az MSC alkalmazásának következtében kialakuló szenzitív és 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 sejtek eloszlását a sejtciklus fázisaiban.

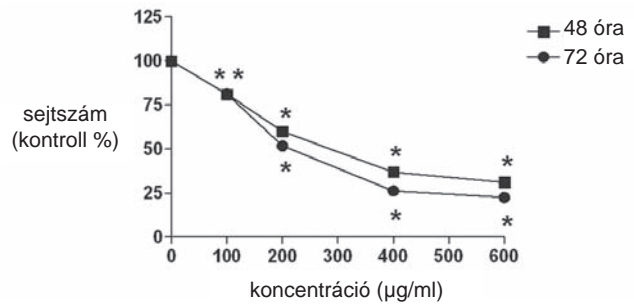
Beteganyag és Módszer

Vegyszerek, reagensek. Az Avemart a Fresenius-Kabi Inc-től (Graz, Ausztria) kaptuk ajándékba. Az összes többi általunk használt vegyszer és reagens kereskedelmi forgalomban kapható (Sigma-Aldrich, Vienna, Ausztria) és mind a legnagyobb tisztaságúak.

Sejtkultúra. A szenzitív és az 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 humán lymphoma sejteket Ram P. Agarwal (Miami Egyetem, Florida) biztosította számunkra. A sejtek tenyésztése 10% hőkezelt főtális borjúsavóval (FCS), 1% L-Glutaminnal és 1% penicillin-streptomycinnel kiegészített RPMI-1640 médiumban történt 5% CO₂-t tartalmazó párasított környezetben. A médiumokat a Life Technologies-től (Paisley, Skócia, Egyesült Királyság) szereztük be. A sejtszámok meghatározása microcellcounter CC-108-al (Sysmex, Kobe, Japán) történt. A későbbiekben leírt vizsgálatok során a sejtnövekedés logaritmusos fázisát vettük figyelembe.

Növekedésgátlási próba. A H9 sejteket (0,1x10⁶/ml) 25 cm²-es Nunc szövettenyésztő flasksba helyeztük és növekvő Avemar koncentráció mellett 37°C-on megfelelő körülmények között inkubáltuk. 48, illetve 72 óra múlva microcellcounter CC-108 segítségével meghatároztuk a sejtszámokat és az IC₅₀ értékeket. A sejtek életképességét trypan blue vítal festéssel határoztuk meg. A kapott eredmény az életképes sejtek számát jelentette.

Hoechst 33258 festék és propidium jodid kettősfestés. A Hoechst festést a munkacsoportunk által korábban kidolgozott módszer szerint végeztük (16). A H9 sejteket (0,4x10⁶/ml) 25 cm²-es Nunc szövettenyésztő flasksba helyeztük és 48 órára növekvő Avemar koncentrációnak tettük ki. A Hoechst 33258 festéket (HO, Sigma, St. Louis, MO, Egyesült Államok) és a propidium jodidot (PI, Sigma) közvetlenül a sejtekhez mértük 5 illetve 2 µg/ml végkoncentrációban. 60 perc 37°C-os inkubáció után, a sejteket Hoechst



1. ábra. Szenzitív H9 humán lymphoma sejtek növekedésének gátlása 48, illetve 72 órás Avemarral történő inkubáció után. A H9 sejteket (0,1x10⁶/ml) 25 cm²-es Nunc szövettenyésztő flasksba helyeztük és növekvő Avemar koncentráció mellett 37°C-on megfelelő körülmények között inkubáltuk. Microcellcounter CC-108 segítségével meghatároztuk a sejtszámokat és az IC₅₀ értékeket. A sejtek életképességét trypan blue vítal festéssel határoztuk meg. A kapott eredmény az életképes sejtek számát jelentette. Az értékek egy reprezentatív vizsgálat három mérésének középértékei ± standard errors. A kontrolltól szignifikánsan különböző értékeket (p<0,05) csillaggal jelöltük (*).

33258 és PI filterekkel Leica DMR XA fluoreszcens mikroszkóppal (Leica, Wetzlar, Németország) vizsgáltuk.

A módszer segítségével különbséget tudunk tenni korai és késői apoptózis, illetve nekrozis között. A sejtek osztályozása alakjuk és sejtmembránjuk integritása alapján történt, mely könnyen megítélhető propidium jodid festés után. Mikroszkóp segítségével megszámoltuk a sejteket és az apoptotikus sejtek arányát százalékos értéként határoztuk meg.

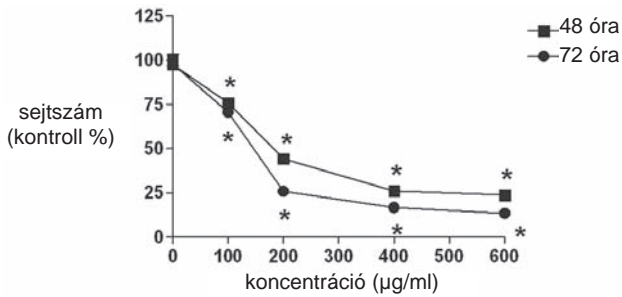
Sejtciklus eloszlás analízis. A H9 sejteket (0,4x10⁶/ml) 25 cm²-es Nunc szövettenyésztő flasksba helyeztük és növekvő Avemar koncentráció mellett megfelelő körülmények között 37°C-on inkubáltuk. 24 óra elteltével a sejteket összegyűjtöttük és 5 ml hideg foszfát pufferbe (PBS) tettük, centrifugáltuk, majd ismét a pufferbe tettük és 3 ml 70%-os hideg etanolban 4°C-on 30 percig fixáltuk. Mérés előtt kétszer hideg PBS-ben átmostuk, majd RNase A-t és propidium jodidot adtunk hozzá egyenként 50 µg/ml végkoncentrációban és 4°C-on 60 percig inkubáltuk. A sejtek vizsgálata FACSCalibur flow cytometerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, Egyesült Államok) történt és a sejtciklus eloszlást ModFit LT software (Verity Software House, Topsham, ME, Egyesült Államok) segítségével számoltuk.

Statisztikai számítások. Dózis-válasz görbéket számítottunk Prism 4.03 software csomag (GraphPad, San Diego, CA, Egyesült Államok) segítségével, a statisztikai szignifikanciát kétmintás (unpaired) t-próbával határoztuk meg.

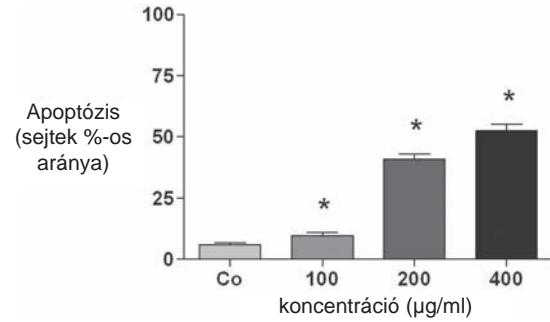
Eredmények

Az Avemar hatása a szenzitív H9 sejtek növekedésére. 48, illetve 72 óra inkubálás után az Avemar gátolta a 0,1x10⁶/ml koncentrációjú logaritmikus növekvő szenzitív H9 sejtek növekedését, az IC₅₀ érték 290 illetve 200 µg/ml volt. Az eredmények az 1. ábrán láthatók.

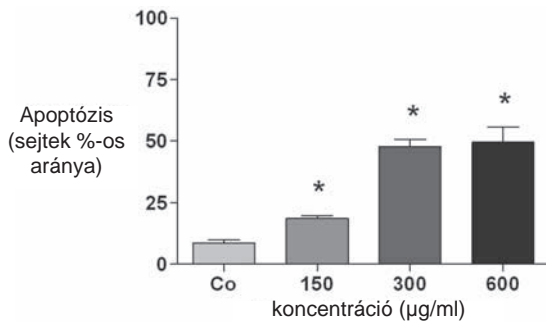
Az Avemar hatása az 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 sejtek növekedésére. 48, illetve 72 óra inkubálás után az Avemar gátolta a 0,1x10⁶/ml koncentrációjú logaritmikus növekvő



2. ábra. 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 humán lymphoma sejtek növekedésének gátlása 48, illetve 72 órás Avemarral történő inkubáció után. A H9 sejteket ($0,1 \times 10^6$ /ml) 25 cm^2 -es Nunc szövettenyésztő flaskskába helyeztük és növekvő Avemar koncentráció mellett 37°C -on megfelelő körülmények között inkubáltuk. Microcellcounter CC-108 segítségével meghatároztuk a sejtszámokat és az IC_{50} értékeket. A sejtek életképességét trypan blue vítal festéssel határoztuk meg. A kapott eredmény az életképes sejtek számát jelentette. Az értékek egy reprezentatív vizsgálat három mérésének középértékei \pm standard errors. A kontrolltól szignifikánsan különböző értékeket ($p < 0,05$) csillaggal jelöltük (*).



4. ábra Apoptózis indukció 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 humán lymphoma sejteken 48 órás Avemarral történő inkubáció után. A H9 sejteket ($0,4 \times 10^6$ /ml) 25 cm^2 -es Nunc szövettenyésztő flaskskába helyeztük és 48 órán keresztül növekvő Avemar koncentráció mellett inkubáltuk. A Hoechst 33258 festéket (HO, Sigma) és a propidium jodidot (PI, Sigma) közvetlenül a sejtekhez mértük 5 illetve 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ végkoncentrációban. 60 perc 37°C -os inkubáció után a sejteket fluoreszcens mikroszkóp segítségével megszámloltuk és az apoptotikus sejtek arányát százalékos értéként határoztuk meg. Az értékek egy reprezentatív vizsgálat három mérésének középértékei \pm standard errors. A kontrolltól szignifikánsan különböző értékeket ($p < 0,05$) csillaggal jelöltük (*).



2. ábra. 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 humán lymphoma sejtek növekedésének gátlása 48, illetve 72 órás Avemarral történő inkubáció után. A H9 sejteket ($0,1 \times 10^6$ /ml) 25 cm^2 -es Nunc szövettenyésztő flaskskába helyeztük és növekvő Avemar koncentráció mellett 37°C -on megfelelő körülmények között inkubáltuk. Microcellcounter CC-108 segítségével meghatároztuk a sejtszámokat és az IC_{50} értékeket. A sejtek életképességét trypan blue vítal festéssel határoztuk meg. A kapott eredmény az életképes sejtek számát jelentette. Az értékek egy reprezentatív vizsgálat három mérésének középértékei \pm standard errors. A kontrolltól szignifikánsan különböző értékeket ($p < 0,05$) csillaggal jelöltük (*).

5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 sejtek növekedését, az IC_{50} érték 180 illetve 145 $\mu\text{g}/\text{ml}$ volt. Az eredményeket a 2. ábrán mutatjuk be.

Apoptózis indukció szenzitív H9 sejtek Avemarral történő kezelése után. Logaritmikusan növekvő sejteket inkubáltunk 48 órán át 150, 300, illetve 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Avemarral. Ezt követően a sejteket a 'Beteganyag és Módszer' című részben leírt kettősfestés módszerrel festettük Hoechst 33258 festékkel és propidium jodiddal. Az inkubálás után a sejteket alakjuk és sejtmembránjuk integritása szerint osztályoztuk. Egyaránt megfigyelhetőek voltak a korai apoptózis jelei (sejtmag kondenzáció és fragmentáció), illetve a késői apoptózis jelei, mint például a sejtmembrán károsodás és a propidium jodid inkorporációja. Az Avemarral történő kezelés dózisfüggően növelte az apoptotikus sejtek arányát, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentrációjú Avemar kezelés esetén a sejtek 48%-ánál voltak megfigyelhetőek az apoptózis jelei. Eredményeinket a 3. ábra tartalmazza.

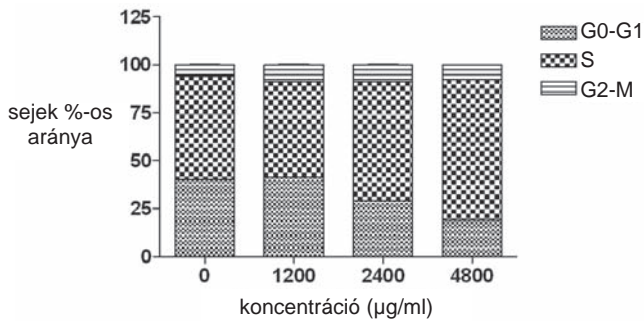
Apoptózis indukció 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 sejtek Avemarral történő kezelése után. Logaritmikusan növekvő sejteket inkubáltunk 48 órán át 100, 200, illetve 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Avemarral. Ezt követően a sejteket a 'Beteganyag és Módszer' című részben leírt kettősfestés módszerrel festettük Hoechst 33258 festékkel és propidium jodiddal. Az inkubálás után a sejteket alakjuk és sejtmembránjuk integritása szerint osztályoztuk. Egyaránt megfigyelhetőek voltak a korai apoptózis jelei (sejtmag kondenzáció és fragmentáció), illetve a késői apoptózis jelei, mint például a sejtmembrán károsodás és a propidium jodid inkorporációja. Az Avemarral történő kezelés dózisfüggően növelte az apoptotikus sejtek arányát, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentrációjú Avemar kezelés esetén a sejtek 41%-ánál voltak megfigyelhetőek az apoptózis jelei. Eredményeinket a 4. ábrán láthatók.

Sejtciklus eloszlás szenzitív H9 sejtek Avemarral történő kezelése után. A 'Beteganyag és Módszer' című részben leírtak szerint készítettünk elő és növekvő Avemar koncentrációval inkubáltunk szenzitív H9 sejteket 24 órán át. Az MSC kezelés következtében létrejövő növekedésgátlás főként a sejtciklus S fázisában történt, mely a sejt populáció 54%-ról 73%-ra történő növekedését, illetve a G0-G1 fázisban 40%-ról 19%-ra történő sejtdepléciót eredményezett. Eredményeinket az 5. ábrán foglaltuk össze.

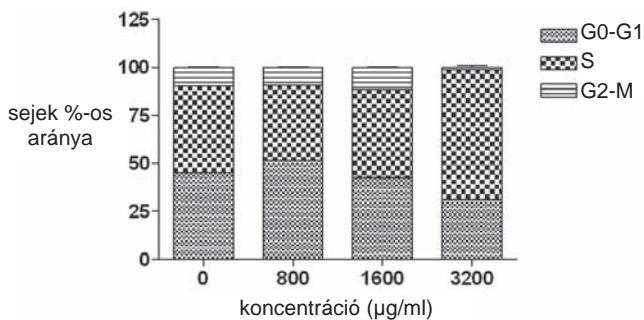
Sejtciklus eloszlás 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 sejtek Avemarral történő kezelése után. A 'Beteganyag és Módszer' című részben leírtak szerint készítettünk elő és növekvő Avemar koncentrációval inkubáltunk keresztrezisztens H9 sejteket 24 órán át. Az MSC kezelés következtében létrejövő növekedésgátlás főként az S fázisban történt, mely a sejt populáció 45%-ról 68%-ra történő növekedését, illetve a G0-G1 fázisban 45%-ról 31%-ra történő sejtdepléciót eredményezett. Eredményeinket a 6. ábrán foglaltuk össze.

Megbeszélés

A megnövekedett mértékű sejtproliferáció és a csökkent mértékű sejthalál (apoptózis révén) a két fő folyamat, amely a tumorsejtek növekedéséhez vezet. Az apoptózis indukció felmerült,



5. ábra Sejtciklus eloszlás szenzitív H9 humán lymphoma sejteken 24 órás Avemarral történő inkubáció után. A H9 sejteket ($0,4 \times 10^6$ /ml) 25 cm²-es Nunc szövettenyésztő flasksba helyeztük és növekvő Avemar koncentráció mellett megfelelő körülmények között 37°C-on inkubáltuk. A sejtek vizsgálata FACSCalibur flow cytometerrel történt és a sejtciklus eloszlást ModFit LT software segítségével számítottuk. Az értékek egy reprezentatív vizsgálat három mérések középértékei \pm standard errors.



6. ábra Sejtciklus eloszlás 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 humán lymphoma sejteken 24 órás Avemarral történő inkubáció után. A H9 sejteket ($0,4 \times 10^6$ /ml) 25 cm²-es Nunc szövettenyésztő flasksba helyeztük és növekvő Avemar koncentráció mellett megfelelő körülmények között 37°C-on inkubáltuk. A sejtek vizsgálata FACSCalibur flow cytometerrel történt és a sejtciklus eloszlást ModFit LT software segítségével számítottuk. Az értékek egy reprezentatív vizsgálat három mérések középértékei \pm standard errors.

mint jelentős terápiás elv a hatékony tumorsejt eliminációban (17, 18). A kemoterápiás érzékenységnél döntő fontosságú az apoptózisra való hajlam, mely ezáltal farmakológiai moduláció célpontja (19, 20).

Ebben a tanulmányban az Avemar (MSC), egy nem-toxikus fermentált búzacsíra kivonat hatását vizsgáltuk szenzitív és 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 humán lymphoma sejteken.

Daganatos betegeknél az Avemar az első speciális tápszerként alkalmazott fermentált és koncentrált búzacsíra kivonat. Korábban kimutatták, hogy az Avemar kezelés következtében nő az apoptózis mértéke különböző daganatos (például emlő, vastagbél, gyomor és hasnyálmirigy) sejtekben, továbbá azt, hogy semmilyen káros kölcsönhatás nem lép fel a klinikai gyakorlatban széles körben használt cytostatikus szerekekkel való együttes alkalmazása során (21). Korábban szintén kimutatták, hogy az Avemar csökkentette a daganatos betegségekben szenvedő gyermekeknél a febrilis neutropénia kialakulásának gyakoriságát (22).

Az Avemar apoptózist indukál a lymphoid tumorsejtekben, de az egészséges nyugvó mononuclearis sejtekben nem (11), mely arra ösztönzött minket, hogy megvizsgáljuk az Avemar

apoptózis indukáló hatását szenzitív és 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 lymphoma sejtekben. Az 5-fluorodeoxyuridine (5-FdUrd) aktivitása összehasonlítható az 5-fluorouracil (5-FU) aktivitásával és a nagymértékű hepatikus extrakciójának köszönhetően jelentős farmakológiai előnye van hepatikus artérián keresztül alkalmazása esetén (14,15). Az 5-FU pirimidin analóg, képes gátolni a pirimidin nukleotidok bioszintézisét. Gyors sejtbé történő transzportja után riboziláció és foszforiláció útján a szer jelentős része három fő metabolitá alakul, melyek közül kettő, a fluorouridin-trifoszfát (5-FUTP) és a fluorodeoxyuridin-monofoszfát (5-FdUMP) aktív. Az 5-FUTP és az 5-FdUMP tovább metabolizálódnak és gátolják az RNS és a DNS szintézisét. Azonban a kialakuló gyógyszer rezisztencia a daganatellenes kemoterápia egyik fő problémája marad. Számos mechanizmust feltételeztek a tumorsejtekben kialakuló 5-FU rezisztencia hátterében, mint például az aktíváló kulcsenzim aktivitásának csökkenése vagy megszűnése, timidilát-szintáz megnövekedett clearance vagy túltermelés génamplifikáción, overexpresszió vagy mutáción keresztül (szerzett rezisztencia) (23). A daganatos sejtek 5-FU rezisztenciájának gátlása érdekében számos modulátort, beleértve a leukovorint és az eniluracilt alkalmaztak, hogy ezáltal növeljék a gyógyszer daganatellenes hatását (24). Következésképpen az 5-FU/5-FdUrd rezisztencia legyőzése fontos célja a daganatellenes gyógyszerek kifejlesztésének és klinikai alkalmazásban való meghonosodásának.

Növekedésgátlási próbákat alkalmazva, a korábban leírt kettősfestés módszerrel és flow citometria segítségével képesek voltunk számos celluláris válaszmechanizmust tanulmányozni, mint például a sejtnövekedés gátlás, apoptózis, nekrosis és a sejtciklus progresszió csökkenése.

A Hoechst 33258 festékkel és propidium jodiddal történő kettősfestés utáni morfológiai elemzés kimutatta, hogy az alacsonyabb koncentrációjú Avemarral történő kezelés főként korai apoptotikus, míg a magasabb dózissal történő inkubáció késői apoptotikus, illetve nekrotikus elváltozásokat is eredményezett. Az apoptotikus sejtek százalékos aránya korrelált a növekedésgátlási próbák IC₅₀ értékeivel, jelezve, hogy valószínűleg az apoptózis indukció a fő mechanizmus, melyen keresztül az Avemar kifejti daganatellenes hatását. Habár 300 µg/ml koncentrációnál az apoptotikus sejtek százalékos aránya elérte a 48%-ot, a magasabb dózis (600 µg/ml) szignifikánsan nem növelte az apoptotikus sejtek arányát. Ez lehet a magyarázata annak, hogy számos tanulmányban az Avemarral történő kezelés során nem mutatkoztak toxicitás jelei (25), míg sokkal erősebb daganatellenes szerek embereken történő alkalmazása során számos dózislimitáló toxikus mellékhatást tapasztaltak.

Mindemellett az Avemar mind a szenzitív, mind az 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztens H9 sejtek esetén S fázisban megállította a sejtciklust a G0-G1 fázis sejteinek deplécióját eredményezve. Azonban jelentős mértékű sejtciklus zavar csak 3000 µg/ml-nél nagyobb koncentrációban történő alkalmazás során volt tapasztalható, jelezve, hogy az Avemar a szenzitív vagy keresztrezisztens H9 sejteken elsősorban nem a sejtciklus befolyásolása révén fejti ki hatását. Ez alátámasztja a HL-60 humán promyelocytás leukémia sejtek hatásának vizsgálata során tapasztaltakat (13).

Az eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az Avemar képes legyőzni az 5-FdUrd/Ara-C keresztrezisztenciát H9 humán lymphoma sejtekben és dózisfüggő apoptózist indukál. Mindemellett ez egy nem-toxikus fermentált búzacsíra kivonat, mely citotoxicitását mind szenzitív, mind keresztrezisz-

tens H9 sejtek esetén jelentős sejtcikluszavar nélkül fejt ki. Eredményeink alapján további állatkísérletek és klinikai vizsgálatok szükségesek a hematológiai daganatok terén.

Referenciák

- Boros LG, Nichelatti M and Shoenfeld Y: Fermented wheat germ extract (Avenmar) in the treatment of cancer and autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci* 1051: 529-542, 2005.
- Hidvegi M, Raso E, Tomoskozi-Farkas R, Paku S, Lapis K and Szende B: Effect of Avenmar and Avenmar + vitamin C on tumor growth and metastasis in experimental animals. *Anticancer Res* 18: 2353-2358, 1998.
- Szende B, Raso E, Hidvegi M, Tomoskozine FR, Paku S, Pronai L, Bocsi J and Lapis K: A new benzoquinone-containing antimetastatic product. *Orv Hetil* 139: 2893-2897, 1998.
- Hidvegi M, Raso E, Tomoskozi Farkas R, Lapis K and Szende B: Effect of MSC on the immune response of mice. *Immunopharmacology* 41: 183-186, 1999.
- Hidvegi M, Raso E, Tomoskozi-Farkas R, Szende B, Paku S, Pronai L, Bocsi J and Lapis K: MSC, a new benzoquinone-containing natural product with antimetastatic effect. *Cancer Biother Radiopharm* 14: 277-289, 1999.
- Jakab F, Mayer A, Hoffmann A and Hidvegi M: First clinical data of a natural immunomodulator in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 47: 393-395, 2000.
- Jakab F, Shoenfeld Y, Balogh A, Nichelatti M, Hoffmann A, Kahan Z, Lapis K, Mayer A, Sapy P, Szentpetery F, Telekes A, Thurzo L, Vagvolgyi A and Hidvegi M: A medical nutriment has supportive value in the treatment of colorectal cancer. *Br J Cancer* 89: 465-469, 2003.
- Demidov LV, Manziuk LV, Kharkevitch GY, Pirogova NA and Artamonova EV: Adjuvant fermented wheat germ extract (Avenmar) nutraceutical improves survival of high-risk skin melanoma patients. A randomized, pilot, phase II clinical study with a 7-year follow-up. *Cancer Biother Radiopharm* 23: 477-482, 2008.
- Boros LG, Lapis K, Szende B, Tomoskozi-Farkas R, Balogh A, Boren J, Marin S, Cascante M and Hidvegi M: Wheat germ extract decreases glucose uptake and RNA ribose formation but increases fatty acid synthesis in MIA pancreatic adenocarcinoma cells. *Pancreas* 23: 141-147, 2001.
- Comin-Anduix B, Boros LG, Marin S, Boren J, Callol-Massot C, Centelles JJ, Torres JL, Agell N, Bassilian S and Cascante M: Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly(ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. *J Biol Chem* 277: 46408-46414, 2002.
- Fajka-Boja R, Hidvegi M, Shoenfeld Y, Ion G, Demydenko D, Tomoskozi-Farkas R, Vizler C, Telekes A, Resetar A and Monostori E: Fermented wheat germ extract induces apoptosis and downregulation of major histocompatibility complex class I proteins in tumor T and B cell lines. *Int J Oncol* 20: 563-570, 2002.
- Illmer C, Madlener S, Horvath Z, Saiko P, Losert A, Herbacek I, Grusch M, Krupitza G, Fritzer-Szekeres M and Szekeres T: Immunologic and biochemical effects of the fermented wheat germ extract Avenmar. *Exp Biol Med (Maywood)* 230: 144-149, 2005.
- Saiko P, Ozsvar-Kozma M, Madlener S, Bernhaus A, Lackner A, Grusch M, Horvath Z, Krupitza G, Jaeger W, Ammer K, Fritzer-Szekeres M and Szekeres T: Avenmar, a nontoxic fermented wheat germ extract, induces apoptosis and inhibits ribonucleotide reductase in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett* 250: 323-328, 2007.
- Kemeny N, Conti JA, Cohen A, Campana P, Huang Y, Shi WJ, Botet J, Pulliam S and Bertino JR: Phase II study of hepatic arterial floxuridine, leucovorin, and dexamethasone for unresectable liver metastases from colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 12: 2288-2295, 1994.
- Kemeny N, Huang Y, Cohen AM, Shi W, Conti JA, Brennan MF, Bertino JR, Turnbull AD, Sullivan D, Stockman J, Blumgart LH and Fong Y: Hepatic arterial infusion of chemotherapy after resection of hepatic metastases from colorectal cancer. *N Engl J Med* 341: 2039-2048, 1999.
- Grusch M, Polgar D, Gfatter S, Leuhuber K, Huettenbrenner S, Leisser C, Fuhrmann G, Kassie F, Steinkellner H, Smid K, Peters GJ, Jayaram HN, Klepal W, Szekeres T, Knasmuller S and Krupitza G: Maintenance of ATP favours apoptosis over necrosis triggered by benzamide riboside. *Cell Death Differ* 9: 169-178, 2002.
- Carson DA and Ribeiro JM: Apoptosis and disease. *Lancet* 341: 1251-1254, 1993.
- Fisher DE: Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 78: 539-542, 1994.
- Eastman A: Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 2: 275-280, 1990.
- Hickman JA: Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* 11: 121-139, 1992.
- Szende B, Marcsek Z, Kocsis Z and Tompa A: Effect of simultaneous administration of Avenmar and cytostatic drugs on viability of cell cultures, growth of experimental tumors, and survival tumor-bearing mice. *Cancer Biother Radiopharm* 19: 343-349, 2004.
- Garami M, Schuler D, Babosa M, Borgulya G, Hauser P, Muller J, Paksy A, Szabo E, Hidvegi M and Fekete G: Fermented wheat germ extract reduces chemotherapy-induced febrile neutropenia in pediatric cancer patients. *J Pediatr Hematol Oncol* 26: 631-635, 2004.
- Kinsella AR, Smith D and Pickard M: Resistance to chemo-therapeutic antimetabolites: a function of salvage pathway involvement and cellular response to DNA damage. *Br J Cancer* 75: 935-945, 1997.
- Fischel JL, Formento P, Etienne MC, Spector T, Renee N and Milano G: Dual modulation of 5-fluorouracil cytotoxicity using folinic acid with a dihydropyrimidine dehydrogenase inhibitor. *Biochem Pharmacol* 53: 1703-1709, 1997.
- Heimbach JT, Sebestyeny G, Semjen G and Kennepohl E: Safety studies regarding a standardized extract of fermented wheat germ. *Int J Toxicol* 26: 253-259, 2007.