



RESEARCH

Open Access

# A fermentált búzacsíra-kivonat (Avermar®) ígéretes citotoxikus hatásprofilja humán rákos sejtvonalakban

Thomas Mueller, Karin Jordan and Wieland Voigt\*

## Absztrakt

A fermentált búzacsíra-kivonatot (Avermar, FWGE) jelenleg speciális – gyógyászati célra szánt – tápszerként használják daganatos betegek esetében. Néhány, nemrég megjelent vizsgálati eredmény alapján az FWGE antiproliferatív, antimetasztatikus és immunológiai hatásokkal rendelkezik, amelyeket legalábbis részben két kinonnak, a 2-metoxi-benzokinon és a 2,6-dimetoxi-benzokinon összetevőknek tulajdonítanak. Ezen, aktivitással kapcsolatos eredmények alapján tovább vizsgáltuk az FWGE in vitro antiproliferatív aktivitását önmagában, és kombinációban több, széleskörűen használt citosztatikus szerrel: 5-FU-val, oxaliplattal vagy irinotekánnal humán tumoros sejtvonalak széles spektrumán. A dózis-válasz összefüggés vizsgálatához szulforodamin B assay-t alkalmaztunk, az IC<sub>50</sub> értékeket a Hill egyenlettel számoltuk ki. Az egyidejű és egymást követő gyógyszeralkalmazás által kiváltott gyógyszerkölcsonhatást Drewinko modelljével becsültük meg, míg a potenciális klinikai aktivitást a relatív tumorelles aktivitás (RTA) modellel határoztuk meg. Az apoptózist DNS gélelektroforézissel vizsgáltuk.

Az Avermar apoptózist és szignifikáns mértékű tumorelles aktivitást mutatott a 32 humán rákos sejtvonal jelentős részében. A legnagyobb aktivitást a neuroblasztóma sejtvonalban észleltük, ahol az átlag IC<sub>50</sub> érték 0,042 mg/ml volt. Emellett az IC<sub>50</sub> tartomány a nagyon keskeny, 0,3 mg/ml és 0,54 mg/ml közötti tartományba esett 8 vastagbélrák sejtvonal esetében. A kombinációs kísérletek során, az FWGE és az 5-FU, oxaliplatin vagy irinotekán szerek egyidejű alkalmazásakor additív vagy szinergista gyógyszerkölcsonhatást észleltünk a vastagbélrákos sejtvonalak esetén; a legerősebb hatást az 5-FU-val történő kombináció mutatta. Az 5-FU és az FWGE egymás utáni alkalmazásakor a szinergizmus megszűnt.

Az eredmények összefoglalásaként megállapíthatjuk, hogy az Avermar szignifikáns mértékű tumorelles aktivitást fejtett ki tumormodellünk esetében. Az FWGE 5-FU, oxaliplatin vagy irinotekán szerekkel történő egyidejű alkalmazása során additív vagy szinergista gyógyszerkölcsonhatást figyeltünk meg. Az FWGE és az 5-FU szinergista hatása vastagbélrákos sejtvonalakban az alkalmazási sorrendtől függ, amennyiben az 5-FU kezelés megelőzi az FWGE kezelést, szinergia megfigyelhető, ellenkező esetben nem szignifikáns mértékű antagonizmust tapasztaltunk.

Mindezek tovább indokolják az FWGE klinikai gyógyszer-kombinációkban történő alkalmazásának vizsgálatát.

## Bevezetés

A rákos betegek esetében jelenleg speciális – gyógyászati célra szánt – tápszerként használt FWGE (fermented wheat germ extract [fermentált búzacsíra-kivonat]) pontos kémiai összetétele nem teljesen ismert [1]. Két kinont, 2-metoxi-benzokinont és 2,6-dimetoxi-benzokinont tartalmaz, amelyeknek valószínűleg jelentős szerepük van a szer számos biológiai tulajdonságában [2]. Preklinikai in vitro és in vivo adatok szerint az FWGE antiproliferatív, antimetasztatikus és immunológiai hatással bír [1-7]. A sejtvonalakra vonatkozó vizsgálatokban az FWGE programozott sejthalált eredményezett a kaspáz-PARP útvonalon keresztül [7,8]. Az azonban még mindig nem világos, hogy e multimolekuláris készítmény pontosan milyen mechanizmuson

keresztül indítja be a sejthalált. Korábbi vizsgálatokban több csoport is kimutatta, hogy az FWGE az anaerob glikolízisben és a pentózciklusban részt vevő enzimekkel is kapcsolatba lép [2,9,10]. Ismert támadáspontjai a transzketoláz, a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, a laktát-dehidrogenáz és a hexokináz, amelyek szükségesek a DNS-szintézis prekurzorainak az összeszereléséhez. [9]. A DNS-szintézisben a ribonukleotid-reduktáz is érintett [6]. Ez az enzim számos rosszindulatú daganatban upregulációt mutat, ezért a kemoterápia szempontjából vonzó célpont. Számos elterjedt rákellenes készítmény, például a fludarabin, a citarabin és a gemcitabin citotoxikus hatásukat legalább részben a ribonukleotid-reduktáz gátlása útján fejtik ki [11]. A ribonukleotid-reduktázra gyakorolt gátló hatás az FWGE esetében is kimutatható, így az FWGE a nukleinsav-szintézist számos útvonalon befolyásolhatja [1,8,11].

\*Correspondance: wieland.voigt@medizin.uni-halle.de  
University of Halle, Department Internal Medicine, Oncology/Hematology  
and Hemostaseology, Ernst-Grube Str. 40, 06120 Halle/Saale, Germany

Az FWGE monoterápia humán tumoros sejtvonalakra és humán tumoros xenograftokra gyakorolt citotoxikus hatása mellett bizonyos adatok szinergikus gyógyszerkölsönhatásra utalnak 5-FU vagy a DTIC készítménnyel néhány sejtvonal esetében [2,6].

A preklinikai adatokon felül néhány publikált klinikai vizsgálat is az FWGE humán rákkezelésben gyakorolt jótékony hatására utal. A legfontosabb, ilyen adat a Demidov és munkatársai által végzett, randomizált, II. fázisú vizsgálatából származik; a vizsgálat a progressziómentes túlélés és a teljes túlélés szignifikáns javulását mutatta a DTIC-FWGE kombinált kezelés esetében a DTIC monoterápiához képest melanómában szenvedő betegeknek [12]. A Jakab és munkatársai által, kolorektális rákban szenvedő betegek esetében végzett vizsgálat hosszabb túlélést és csökkent metasztázisképződést mutatott a kemoterápiával kombinált FWGE kezelés esetében az önmagában alkalmazott kemoterápiában részesülő csoporthoz képest. A vizsgálat többváltozós elemzésében csak a tumor stádiuma és az FWGE kezelés voltak a túlélés szignifikáns előrejelzői [13]. Ezen adatot azonban óvatosan szükséges értelmeznünk, mivel a vizsgálat elrendezése szerint nem volt randomizált, és a betegcsoportok kiegyensúlyozatlanok voltak [1,13]. Hasonlóan fontos, hogy számos vizsgálat, beleértve a fentieket is, az életminőség javulását mutatta ki az egyidejűleg alkalmazott FWGE kezelésnek köszönhetően [14].

Összességében a rendelkezésre álló, korlátozott preklinikai és klinikai adatok arra utalnak, hogy az FWGE hatásprofilja ígéretes lehet a daganatos betegek esetében alkalmazott speciális tápszerként, de potenciális rákellenes készítményként is.

Jelen, széleskörű, *in vitro* vizsgálatban célunk az FWGE monoterápia hatásának, valamint a szokásosan használt 5-FU, oxaliplatin és irinotekán készítményekkel való kölcsönhatásának vizsgálata volt különböző tumorokból származó humán rákos sejtvonalak nagy paneljén. Ezen adatok értékesek lehetnek az FWGE különböző daganatos betegségekben való továbbfejlesztése tekintetében, illetve az FWGE kombinációban való alkalmazására vonatkozó további fejlesztések tekintetében a potenciális gyógyszerpárok kiválasztásához is.

## Anyagok és módszerek

### Gyógyszerek és vegyi anyagok

Az Avemar a Biopharma Kft. (Kunfehértó, Magyarország) nagylelkű ajándéka volt. Az FWGE-t felhasználásig szárított por formájában, 4 °C-on tárolták. A kísérlethez az FWGE-t frissen, steril vízhez adva, 100 mg/ml végkoncentrációban készítették el. A feloldást követően az FWGE-t 150 g érték mellett centrifugálták a nem oldódó anyag eltávolítása céljából. Az 5-FU, az irinotekán, az oxaliplatin és a szulforodamin B készítmények beszerzése a Sigma Chemical Company (Németország) társaságtól történt. Az RPMI 1640 és a penicillin/sztreptomycin készítmények a PAA-tól (Pasching, Ausztria) érkeztek, míg a főtális borjú szérumot (FBS) a Biochrom AG vállalatától (Berlin, Németország) vásároltuk.

### Sejtvonalak és tenyésztés

A kísérlethez az alábbi, humán rákos sejtvonalakat használtuk: hererák (H12.1, 2102EP, 1411HP, 1777NRpmet), vastagbélrák (HCT-8, HCT-15, HCT-116, HT-29, DLD-1, SW480, COLO205, COLO320DM), nem kisjeles tüdőrák (A549, A427, H322, H358), fej-nyakrák (FADU, A253), méhnyakrák epidermoid karcinóma (A431), emlő adenokarcinóma (MCF-7, BT474), ovárium adenokarcinóma (A2780), gyomorrák (M2), anaplasztikus pajzsmirigyrák (8505C, SW1736), papilláris pajzsmirigyrák (BCPAP), follikuláris pajzsmirigyrák (FTC133), melanóma (518A2), hepatóma (HepG2), glioblasztóma (U87MG), neuroblasztóma (SHSY5Y, SIMA). Minden sejtvonalat egyrétegű sejtenyésztésként, 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett, párasított levegőn, legfeljebb 80%-os egybefolyásig, 10%-os FBS-sel és 1%-os penicillin/sztreptomocinnal kiegészített RPMI 1640 tápközegben tenyésztettük.

### Növekedésgátló kísérletek

Az antiproliferatív hatás értékelése teljes fehérje szulforodamin B (SRB) próbával történt az előzőekben leírtak szerint [15]. Összefoglalva, a sejtek 96 lyukú lemezbe kerültek a sejtvonalra specifikus sűrűségben, a próba teljes időtartama alatt fennálló exponenciális növekedés biztosítása érdekében. A sejszámot előzetesen, a sejtnövekedés kinetikájával határoztuk meg. 24 óra elteltével az exponenciálisan növekedő sejteket az egyes készítmények vagy azok kombinációi hígítási sorozatának tettük ki a megadott ideig, folyamatos módon. A gyógyszerek ütemezésével összefüggő hatások vizsgálata céljából az A gyógyszert a sejtek ráoltását követően 24 órával adtuk hozzá, a B gyógyszert pedig még 24 órával később, vagy fordítva. Ezzel párhuzamosan történt az egyetlen készítményt tartalmazó kontroll-lemezek kezelése.

A próba teljes időtartamát képező 120 óra elteltével a közeget eltávolítottuk, és a sejteket 10%-os triklór-ecetsavval (TCA) fixáltuk, majd a publikált SRB próba protokoll szerint dolgoztuk fel [15]. Az abszorbanciát 570 nm-en mértük 96 lyukú lemezolvasóval (Rainbow, SLT, Németország).

### DNS-gélelektroforézis

Az apoptózis DNS gélelektroforézissel történő meghatározásához az FWGE-vel IC<sub>50</sub> mellett, 48 órán át kezelt lebegő sejteket alkalmaztunk. A sejteket a PBS-sel való kétszeri átmosásukat követően lízispufferben (100 mM TRIS-HCL (pH 8,0), 20 mM EDTA, 0,8% SDS) lizáltuk. Az máz A segítségével 2 órán át, 37 °C-on, illetve proteináz K-val (Roche Molecular Biochemicals) egész éjszakán át, 50 °C-on, való kezelést követően a lizátumokat DNS töltőpufferrel kevertük. A DNS fragmensek elválasztásához a próbákat 1,5%-os agaróz gélen futtattuk, majd etídium-bromiddal festettük és desztillált vízzel öblítettük. A DNS létrákat UV fény alatt jelenítettük meg, és BioDocAnalyse műszerrel (Biometra) dokumentáltuk.

### **Adatelemzés**

A dózis-válasz görbéket Sigma Plot (Jandel Scientific, San Rafael, CA) segítségével határoztuk meg, míg az  $IC_{50}$  értékeket Hill egyenlettel számítottuk ki. A gyógyszerkölcsonhatás értékeléséhez a Drewinko-modellt használtuk [16]. Röviden összefoglalva, hipotetikus görbét számoltunk ki úgy, hogy megszoroztuk a kezelt és kezeletlen kontrollok arányát a monoterápiás görbe dózis-válasz adatpontjaival. Szinergia akkor feltételezhető, ha a hipotetikus görbe a kombinációs görbe felett fut, míg antagonizmusra az utal, ha a hipotetikus görbe a kombinációs görbe alatt marad. Additivitás esetén a két görbe fedi egymást.

A statisztikai szignifikancia próbájához kétfélegű, nem páros Student t-tesztet használtunk. Szignifikanciát akkor feltételeztünk, ha a  $p$  értéke  $<0,05$  volt.

A potenciális klinikai aktivitás becslése a plazma csúskoncentráció és az *in vitro*  $IC_{50}$  érték arányaként meghatározott, relatív daganatellenes aktivitással (relative antitumour activity, RAA) történt [17]. Az 1 feletti RAA érték potenciális klinikai aktivitást jelzett.

### **Eredmények**

#### **Az FWGE monoterápia antiproliferatív hatása humán rákos sejtvonalakban**

A 96 órás, folyamatos FWGE kezelés antiproliferatív hatását SRB próbával mértük a humán tumorsejtvonalak széles paneljén. Az  $IC_{50}$  értékeket Hill egyenlettel számítottuk ki, és a legalább három, független kísérletről kinyert adatokat átlagrafikonon összegeztük (1. ábra). Az FWGE  $IC_{50}$  értéke 0,038 mg/ml és 0,7 mg/ml között mozgott, míg a medián  $IC_{50}$  0,33 mg/ml volt.

Nevezetesen, a 9 g/nap standard FWGE dózis szájon át való bevitelét követően a becsült plazma csúskoncentráció a betegek esetében 0,5-1 mg/ml [7]. E plazma csúskoncentrációt és a sejtvonalak esetén megfigyelt  $IC_{50}$  értéket figyelembe véve, a kalkulált RAA érték legalább 1 vagy annál több, ami potenciális klinikai aktivitásra utal. A legmagasabb FWGE aktivitás a neuroblasztómás sejtvonalak esetében volt megfigyelhető, az  $IC_{50}$  átlagos értéke itt 0,042 mg/ml (RAA  $\approx$  12-24) volt. Érdemes megjegyezni, hogy az ebben a vizsgálatban szereplő, 8 vastagbélrákos sejtvonal esetében az  $IC_{50}$  tartomány nagyon szűk, 0,3 mg/ml és 0,54 mg/ml közötti volt, 1,7-3,3 közötti RAA értéket eredményezve (1. ábra).

#### **Az FWGE által előidézett sejthalál módjának kimutatása egy sejtvonal panel esetében**

Az FWGE által előidézett sejthalál módjának meghatározása céljából egy humán rákos sejtvonalakból álló, reprezentatív panelt kezeltünk FWGE-vel  $IC_{90}$  koncentrációban, 48 órán keresztül. A kezelést követően a lebegő sejteket begyűjtöttük, és DNS gélelektroforézist végeztünk. Minden kezelt sejtvonalban egyértelműen kimutatható volt a jellegzetes 180 bázispár méretű DNS-degradációs létraszerkezet, amely az apoptózis során keletkező specifikus DNS degradációra utalt (2. ábra).

#### **FWGE és 5-FU, oxaliplatin, valamint irinotekán kombinációs kezelés humán vastagbélrákos sejtvonalak esetében**

Az FWGE és 5-FU, irinotekán vagy oxaliplatin készítményeknek való párhuzamos kitétség gyógyszerhatását egy 8, vastagbélrákos sejtvonalból álló panelen vizsgáltuk. A gyógyszerkölcsonhatás módját Drewinko módszerrel elemeztük, az adatokat az 1. táblázatban foglaljuk össze. Összességében, főként szignifikáns szinergizmus volt megfigyelhető az FWGE-5-FU kombináció mellett (a 8 sejtvonalból 6 esetében), illetve kisebb mértékben az irinotekán és az oxaliplatin kombinációk esetében (8 sejtvonalból 2 esetében). A többi sejtvonal esetében a gyógyszerkölcsonhatás additív volt. Fontos, hogy a szimultán alkalmazás nem járt szignifikáns mértékű antagonizmussal. A szinergista gyógyszerkölcsonhatás egy, reprezentatív görbéje a 3. ábrán látható.

#### **Az FWGE és az 5-FU egymást követő alkalmazása a HT29 és a HCT-8 humán vastagbélrákos sejtvonalak esetében**

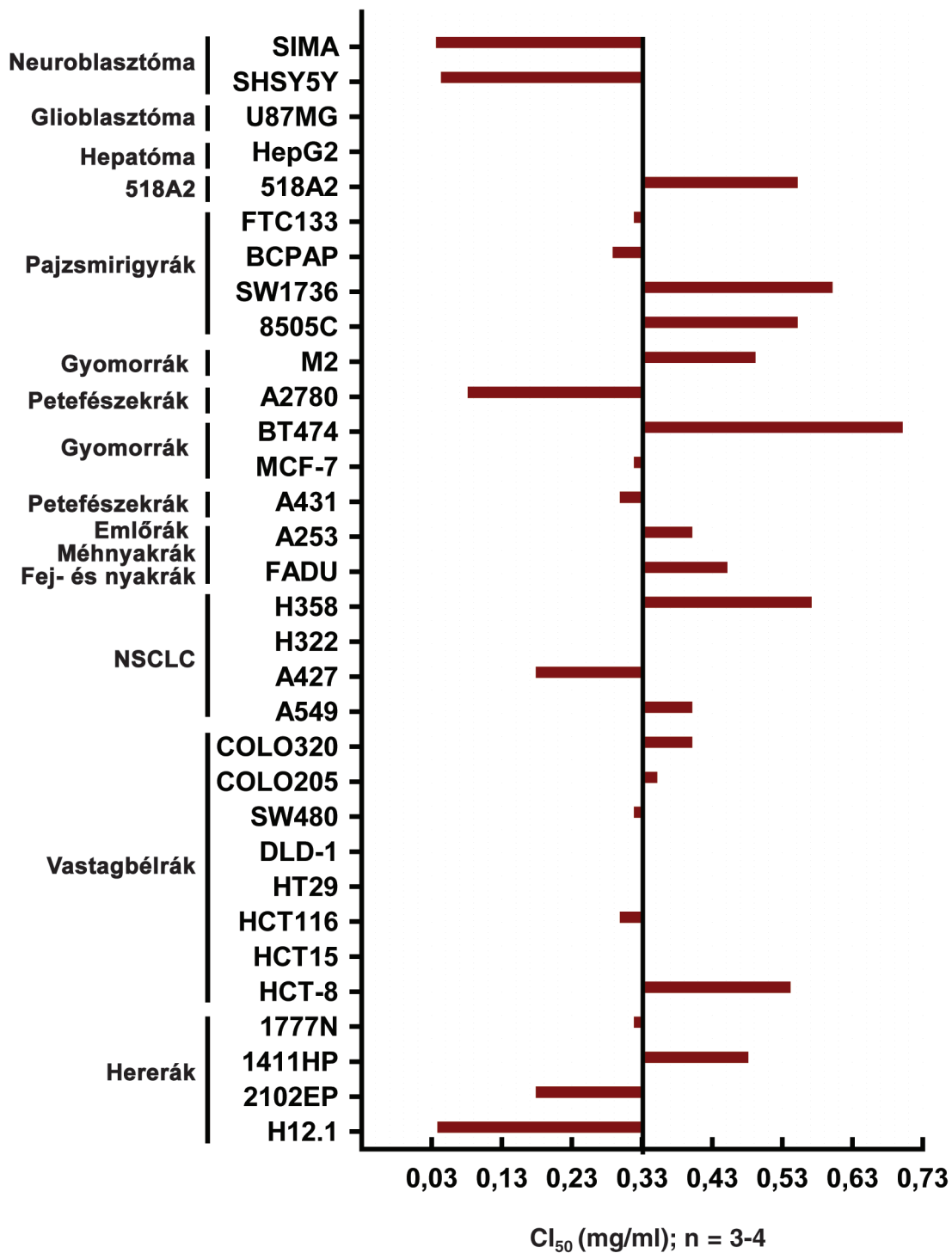
A gyógyszerütemezés hatásának értékelése céljából a sejtek ráoltását követően 24 órával az exponenciálisan növekedő sejteket FWGE  $IC_{30}$  kezelésben, majd további 24 óra múlva sorozatos 5-FU hígításokkal kezeltük, vagy fordítva. A sejtek fixálására összesen 120 órát követően került sor; a feldolgozás az SRB protokoll szerint történt. Az  $IC_{50}$  értékeket Hill egyenlettel számoltuk ki Sigma plot segítségével, az adatok összefoglalása a 2. táblázatban látható. Mindkét sejtvonalban, ha az 5-FU kezelést a FWGE követte, akkor additív gyógyszerkölcsonhatás volt megfigyelhető. Másrészt, ha az FWGE alkalmazása 24 órával megelőzte az 5-FU-t, mindkét sejtvonal esetében az antagonizmus irányába mutató tendencia alakult ki. Ezen antagonista hatás azonban nem volt statisztikailag szignifikáns mértékű. Összesíten ezeket az eredményeket arra utalnak, hogy az 5-FU és az FWGE közötti kölcsönhatás függ a szerek alkalmazásának ütemezésétől. Kerülendő tehát az FWGE 5-FU előtti alkalmazása.

### **Diskusszió**

Az Avemar a speciális – gyógyászati célra szánt – tápszerek daganatos betegek számára csoportba tartozik. Ajánlott dózisban jól tolerálható, és terápiás ablaka tág [2]. A rákos betegek tüneteit enyhítő kiegészítő készítményként való alkalmazása mellett többszörösen bizonyított, hogy az Avemar rákellenes tulajdonságokat is kifejtethet [1-3]. Eddig azonban e tumorellenes hatást csak szórványosan vizsgálták.

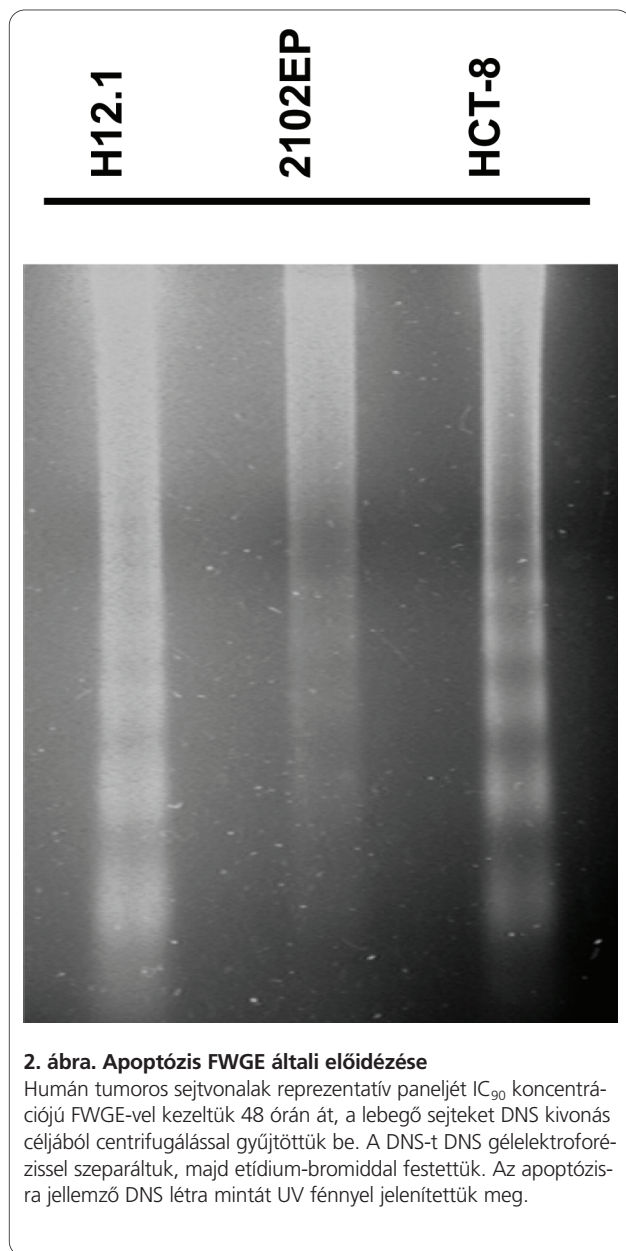
Ezért az önmagában, illetve az 5-FU, oxaliplatin vagy irinotekán szokásos citosztatikumokkal kombinációban alkalmazott FWGE preklínikai citotoxikus aktivitását vizsgáltuk humán tumoros sejtvonalak széles paneljén, a szer potenciális tumorellenes tulajdonságainak értékelése céljából.

A humán tumoros sejtvonalak vagy humán tumoros xenograftok általában a preklínikai gyógyszervizsgálatok modelljeként szolgálnak. Ennek ellenére körültekintően kell eljárni az eredmények értelmezésekor, mivel pozitív prediktív értékük csak körülbelül 60-70%-os [18,19]. A preklínikai, citotoxikus-ságra vonatkozó adatok prediktív értékét erősítheti a relatív daganatellenes aktivitás modellje, amelynek segítségével megbecsülhető az adott gyógyszer potenciális aktivitása az adott



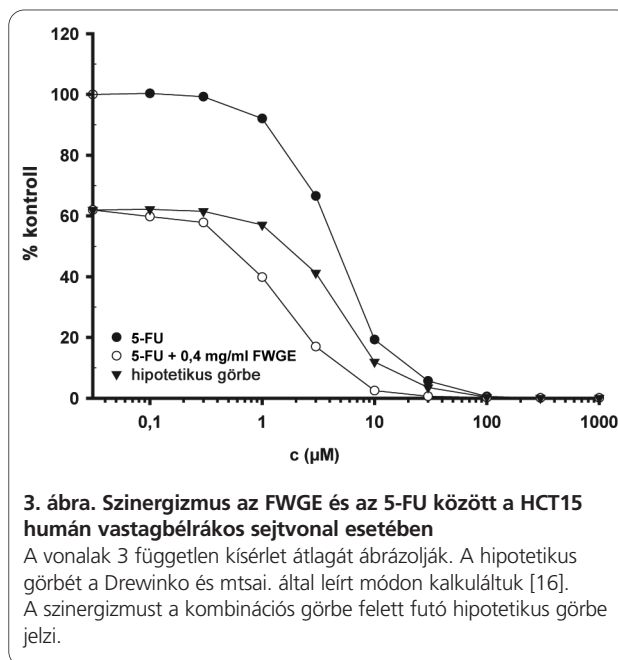
**1. ábra. Az FWGE IC<sub>50</sub> átlaggrafikonként való ábrázolása**

A sejtvonalanként legalább 3, független kísérletből származó IC<sub>50</sub> értékelt átlagoltuk, és átlaggrafikonon összegeztük az eltérő aktivitások jobb összehasonlíthatósága érdekében. Az IC<sub>50</sub> átlaga 0,33 mg/ml. Az FWGE aktivitása a neuroblasztómás és a petefészekrákos sejtvonalak esetében volt a legnagyobb. Érdekes eredmény, hogy a vizsgált 8, humán kolorektális sejtvonal IC<sub>50</sub> értékeinek tartománya az átlag IC<sub>50</sub> érték körül.



**2. ábra. Apoptózis FWGE általi előidézése**

Humán tumoros sejtvonalak reprezentatív paneljét IC<sub>90</sub> koncentrációjú FWGE-vel kezeltük 48 órán át, a lebegő sejteket DNS kivonás céljából centrifugálással gyűjtöttük be. A DNS-t DNS gélelektroforézissel szeparáltuk, majd etidium-bromiddal festettük. Az apoptózisra jellemző DNS létra mintát UV fényel jelenítettük meg.



**3. ábra. Szinergizmus az FWGE és az 5-FU között a HCT15 humán vastagbélrákos sejtvonal esetében**

A vonalak 3 független kísérlet átlagát ábrázolják. A hipotetikus görbét a Drewinko és mtsai. által leírt módon kalkuláltuk [16]. A szinergizmust a kombinációs görbe felett futó hipotetikus görbe jelzi.

tumortípus esetében, a preklinikai IC<sub>50</sub> érték és a klinikailag elérhető plazma csúcskoncentráció figyelembe vételével [20]. Potenciális klinikai aktivitás kizárólag akkor feltételezhető, ha a preklinikai IC<sub>50</sub> érték egyértelműen a beteg esetében elérhető plazmakoncentráció alatti.

A jelen vizsgálatban az FWGE szignifikáns mértékű antiproliferatív aktivitását figyeltük a más vizsgálok által jelentett tartományhoz hasonló IC<sub>50</sub> koncentrációk mellett [7,8,21]. A hozzávetőlegesen 1 és 24 közötti RAA értékek alapján úgy tűnt, hogy az FWGE potenciális klinikai aktivitással rendelkezik a sejtvonalvizsgálatunkban alkalmazott tumortípusok széles spektrumának esetében. A legnagyobb aktivitás a neuroblasztómás és a petefészekrákos sejtvonalak esetében volt megfigyelhető. A további klinikai fejlesztések szempontjából különösen érdekes lehet, hogy a vizsgálatban alkalmazott nyolc, vastagbélrákos sejtvonal viszonylag homogén érzékenységet mutatott, 0,3-0,54 mg/ml IC<sub>50</sub> értékekkel. Ez arra ösztönzött bennünket, hogy a vastagbélrákos modellben kombinált kísérletet végezzünk

**1. táblázat. Gyógyszerkombinációk összefoglalása**

Sejtvonal	IC <sub>50</sub> (μM)									
	Oxaliplatin ± FWGE		p-érték	5-FU ± FWGE		p-érték	CPT-11 ± FWGE		p-érték	
	-	+		-	+		-	+		
HCT-8	0,43 ± 0,03	0,45 ± 0,03	0,52	2,65 ± 0,35	1,2 ± 0,6	0,023*	2,0 ± 0,46	1,8 ± 0,32	0,63	
HCT-15	0,95 ± 0,19	0,57 ± 0,25	0,05	4,45 ± 0,72	1,45 ± 0,61	0,0001*	4,5 ± 0,3	3,4 ± 0,31	0,001*	
HCT116	0,39 ± 0,06	0,19 ± 0,09	0,01*	4,6 ± 0,38	2,9 ± 0,9	0,01*	1,2 ± 0,1	0,96 ± 0,11	0,01*	
HT29	0,32 ± 0,09	0,35 ± 0,05	0,53	0,99 ± 0,31	1,3 ± 0,6	0,39	3,5 ± 0,3	4,1 ± 0,23	0,05	
DLD-1	2,47 ± 0,17	2,2 ± 0,8	0,61	3,2 ± 0,21	1,6 ± 0,7	0,02*	6,6 ± 0,6	6,1 ± 0,85	0,43	
Colo205	0,45 ± 0,05	0,24 ± 0,05	0,001*	0,54 ± 0,12	0,44 ± 0,1	0,26	1,2 ± 0,19	1,1 ± 0,19	0,24	
Colo320	1,1 ± 0,34	0,84 ± 0,13	0,33	1,35 ± 0,133	0,57 ± 0,03	0,001*	8,5 ± 3,4	8,7 ± 3,1	0,92	
SW48	0,13 ± 0,02	0,1 ± 0,02	0,09	3,4 ± 0,2	2,2 ± 0,2	0,002*	2,4 ± 0,35	2,1 ± 0,29	0,18	
SW480	0,57 ± 0,11	0,37 ± 0,12	0,06	2,7 ± 0,17	2,9 ± 1,5	0,83	6,4 ± 1,2	6,9 ± 2,3	0,72	

n ≥ 3, a csillag a szignifikáns szinergista gyógyszerkölsönhatást jelöl

## 2. táblázat. Az FWGE és az 5-FU alkalmazási sorrendjének hatása

Sejtvonal	IC <sub>50</sub> (μM)			IC <sub>50</sub> (μM)		p-érték
	5-FU	5-FU → FWGE	p-érték	5-FU	FWGE → 5-FU	
HCT-8	1,52	1,57	> 0.05	1,74	2,20	> 0.05
HT29	1,10	1,06	> 0.05	1,77	2,23	> 0.05

n ≥ 3, a sejteket lemezre helyezés után 24 órával 5-FU kezelésben, majd újabb 24 óra elteltével FWGE kezelésben részesítettük, vagy fordítva, összesen legfeljebb 120 óra időtartamig

FWGE és kemoterápia alkalmazásával. Összességében az additív-tól a szinergizmusig terjedő gyógyszerkölsönhatást mutattunk ki az FWGE irinotekánnal, oxaliplatinnal és 5-FU-val való alkalmazása esetén. Ezen adatok összhangban állnak a Jakab és munkatársai által közölt, korábbi klinikai jelentés adataival. Vastagbélrákban szenvedő betegekkel végzett vizsgálatuk megemelkedett túlélési arányt és csökkent áttétképződést mutatott ki az FWGE és 5-FU-alapú, kombinációs protokollok esetében [13]. Klinikai vizsgálatuk azonban módszertani korlátozásokkal teli, így az abból származó adatok jelentősége is limitált [1]. Az 5-FU és a folinsav oxaliplatinnal vagy irinotekánnal való kombinációi képezik jelenleg a kolorektális rák esetében alkalmazott adjuváns és/vagy palliatív kezelés alapját [22]. Emiatt a megfigyelt additív-szinergista hatás, és főként az antagonista gyógyszerkölsönhatás kizárása vastagbélrák modellünkben különösen fontos eredmény, és indokolja az FWGE-irinotekán vagy FWGE-oxaliplatin alapú kezelési protokollok potenciális alkalmazását megfelelő elrendezésű, randomizált klinikai vizsgálatokban.

A gyógyszerkombinációk hatékonysága gyakran szekvenciafüggő. Sejtvonalrendszerünkben additív-szinergista gyógyszerkölsönhatást figyeltünk meg a párhuzamos 5-FU és FWGE gyógyszerkombinációk esetében. Ezen adatok alátámasztják Szende és munkatársai eredményeit, akik nem figyeltek meg csökkenést az 5-FU, a doxorubicin vagy a navelbin antiproliferatív aktivitásában nem toxikus FWGE koncentrációknak való egyidejű kitétség mellett [23].

A gyógyszer sorrendre vonatkozó kísérletekben az additív-szinergista hatás sorrendfüggő módon eltűnt, additív vagy antagonista tendenciájú hatást eredményezve (2. táblázat). Ismert, hogy az FWGE kölsönhatásba lép a ribonukleotid-reduktázzal, ami katalizálja a ribonukleotidok megfelelő dezoxiribonukleotidokká való átalakulását [11].

Mivel ezek a DNS replikáció építőelemei, a sejtek FWGE-vel való előkezelése csökkenti a DNS-szintézist, ami gátolhatja az 5-FU antimetabolit aktivitását. E hipotézissel összhangban, a közelmúltban HT29 és HL-60 sejtekben kimutatták, hogy a sejtek FWGE-vel való előkezelése szignifikánsan csökkentette a dezoxiribonukleotid-trifoszfát készleteket és a 14C-citidin beépülését a DNS-be [3,8]. Ha a DNS-szintézis sérül, az 5-FU egyik célmolekulája elveszhet, ami legalább részben magyarázza a modellrendszerünkben az FWGE az 5-FU előtt 24 órával való alkalmazásakor észlelt antagonista tendenciát. Mindezek alapján az FWGE-t tartalmazó gyógyszerkombinációk továbbfejlesztése szempontjából nem csak a kombinációs szer, de az alkalmazott gyógyszer sorrend is kritikus fontosságú, ezért megválasztása körültekintést igényel.

A dokumentált preklinikai aktivitásprofil és gyógyszer-hatásmechanizmus alapján az FWGE a gyógyszeres kezelés jó kombinációs partnerének mutatkozott, különösen, mint a gyógyszerhatás modulátora és a gyógyszer toxicitás csillapítója.

Összegezve, az Avemar jelentős antiproliferatív hatást mutatott a tumoros sejtvonalak széles spektrumának esetében. Az FWGE és az 5-FU, oxaliplatin vagy irinotekán egyidejű alkalmazása nem csökkentette e citosztatikumok citotoxikus aktivitását vastagbélrákos modellünkben. Eredményeink arra utalnak, hogy az 5-FU és az FWGE additív-szinergista gyógyszerkölsönhatást előidéző, egyidejű alkalmazása hatékonyabb a szerek egymást követő alkalmazásánál. Míg az 5-FU utáni FWGE alkalmazás megfelelő lehet, a fordított sorrend kerülendő.

Összességében, a preklinikai aktivitásprofil és a rendelkezésre álló klinikai adatok alapján az FWGE (Avemar) és a hagyományos citosztatikumok kombinációinak további vizsgálata biztonságosnak és indokoltnak tűnik.

### Rövidítések

FWGE (Fermented wheat germ extract): fermentált búzacsíra-kivonat; FBS (Fetal bovine serum): főtális borjú szérum; SRB (Sulforhodamine B): szulforodamin B; RAA (Relative antitumor activity): relatív daganatellenes aktivitás; TCA (Trichloroacetic acid): triklór-ecetsav; FDA (Food and Drug Administration): az Amerikai Egyesült Államok élelmiszer- és gyógyszerbiztonsági hatósága; 5-FU (5-fluorouracil): 5-fluorouracil; DTIC (Dacarbazine): dakarbazin; CPT-11 (Irinotecan): irinotekán; PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase): Poli(ADP-ribóz) polimeráz

### Köszönetnyilvánítás és finanszírozás

Szeretnénk megköszönni a Franziska Reipsch és Katrin Nerger által nyújtott kiváló műszaki támogatást.

A vizsgálatot az FWGE (Avemar) készletet is biztosító Biopharma Kft. (Kunfehértó, Magyarország) finanszírozta.

### A szerzők részvétele

TM a sejtvonalakra vonatkozó vizsgálatokat végezte, és jelentősen hozzájárult a vizsgálat elrendezésének kialakításához. KJ elemezte az adatokat, és készítette az ábrákat. WV részt vett a vizsgálat elrendezésének kialakításában és az adatelemzésben. Ő készítette el továbbá a kéziratot, és szerezte a támogatást.

A végleges kéziratot a szerzők mindegyike elolvasta és jóváhagyta.

### Konkurens érdekeltség

A szerzők kijelentik, hogy esetükben nem áll fenn konkurens érdekeltség.

Beérkezés dátuma: 2011. január 4.

Elfogadás dátuma: 2011. április 16.

Publikálás dátuma: 2011. április 16.

## Referenciák:

1. Telekes A, Hegedus M, Chae CH, Vekey K: **Avemar (wheat germ extract) in cancer prevention and treatment.** *Nutr Cancer* 2009, **61**:891-899.
2. Johanning GL, Wang-Johanning F: **Efficacy of a medical nutriment in the treatment of cancer.** *Altern Ther Health Med* 2007, **13**:56-63, quiz 64-55.
3. Illmer C, Madlener S, Horvath Z, Saiko P, Losert A, Herbacek I, Grusch M, Krupitza G, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T: **Immunologic and biochemical effects of the fermented wheat germ extract Avemar.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2005, **230**:144-149.
4. Fajka-Boja R, Hidvegi M, Shoenfeld Y, Ion G, Demydenko D, Tomoskozi-Farkas R, Vizler C, Telekes A, Resetar A, 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* 2002, **20**:563-570.
5. Hidvegi M, Raso E, Tomoskozi-Farkas R, Paku S, Lapis K, Szende B: **Effect of Avemar and Avemar + vitamin C on tumor growth and metastasis in experimental animals.** *Anticancer Res* 1998, **18**:2353-2358.
6. Boros LG, Nichelatti M, Shoenfeld Y: **Fermented wheat germ extract (Avemar) in the treatment of cancer and autoimmune diseases.** *Ann N Y Acad Sci* 2005, **1051**:529-542.
7. Comin-Anduix B, Boros LG, Marin S, Boren J, Callol-Massot C, Centelles JJ, Torres JL, Agell N, Bassilian S, 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* 2002, **277**:46408-46414.
8. Saiko P, Ozsvar-Kozma M, Madlener S, Bernhaus A, Lackner A, Grusch M, Horvath Z, Krupitza G, Jaeger W, Ammer K, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T: **Avemar, a nontoxic fermented wheat germ extract, induces apoptosis and inhibits ribonucleotide reductase in human HL-60 promyelocytic leukemia cells.** *Cancer Lett* 2007, **250**:323-328.
9. Boros LG, Cascante M, Lee WN: **Metabolic profiling of cell growth and death in cancer: applications in drug discovery.** *Drug Discov Today* 2002, **7**:364-372.
10. Boros LG, Lapis K, Szende B, Tomoskozi-Farkas R, Balogh A, Boren J, Marin S, Cascante M, Hidvegi M: **Wheat germ extract decreases glucose uptake and RNA ribose formation but increases fatty acid synthesis in MIA pancreatic adenocarcinoma cells.** *Pancreas* 2001, **23**:141-147.
11. Shao J, Zhou B, Chu B, Yen Y: **Ribonucleotide reductase inhibitors and future drug design.** *Curr Cancer Drug Targets* 2006, **6**:409-431.
12. Demidov LV, Manziuk LV, Kharkevitch GY, Pirogova NA, Artamonova EV: **Adjuvant fermented wheat germ extract (Avemar) 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* 2008, **23**:477-482.
13. 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, Hidvegi M: **A medical nutriment has supportive value in the treatment of colorectal cancer.** *Br J Cancer* 2003, **89**:465-469.
14. Pfeiffer B, Preiß J, Unger C: **Avemar.** Onkologie integrativ, Urban & Fischer Verlag München; 2006, 226-229.
15. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR: **New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening.** *J Natl Cancer Inst* 1990, **82**:1107-1112.
16. Drewinko B, Dipasquale MA, Yang LY, Barlogie B, Trujillo JM: **The synergistic lethal interaction of cis-diamminedichloroplatinum and natural nucleosides is related to increased DNA cross-links.** *Chem Biol Interact* 1985, **55**:1-12.
17. Ohe Y, Nakagawa K, Fujiwara Y, Sasaki Y, Minato K, Bungo M, Niimi S, Horichi N, Fukuda M, Saijo N: **In vitro evaluation of the new anticancer agents KT6149, MX-2, SM5887, menogaril, and liblomycin using cisplatin- or adriamycin-resistant human cancer cell lines.** *Cancer Res* 1989, **49**:4098-4102.
18. Berger DP, Henss H, Winterhalter BR, Fiebig HH: **The clonogenic assay with human tumor xenografts: evaluation, predictive value and application for drug screening.** *Ann Oncol* 1990, **1**:333-341.
19. Schroyens W, Tueni E, Dodion P, Bodecker R, Stoessel F, Klastersky J: **Validation of clinical predictive value of in vitro colorimetric chemosensitivity assay in head and neck cancer.** *Eur J Cancer* 1990, **26**:834-838.
20. Voigt W, Bulankin A, Muller T, Schoeber C, Grothey A, Hoang-Vu C, Schmoll HJ: **Schedule-dependent antagonism of gemcitabine and cisplatin in human anaplastic thyroid cancer cell lines.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**:2087-2093.
21. Marcsek Z, Kocsis Z, Jakab M, Szende B, Tompa A: **The efficacy of tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer cells is enhanced by a medical nutriment.** *Cancer Biother Radiopharm* 2004, **19**:746-753.
22. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Brouquet A, Cervantes A: **Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up.** *Ann Oncol* 21(Suppl 5):v70-77.
23. Szende B, Marcsek Z, Kocsis Z, Tompa A: **Effect of simultaneous administration of Avemar and cytostatic drugs on viability of cell cultures, growth of experimental tumors, and survival tumor-bearing mice.** *Cancer Biother Radiopharm* 2004, **19**:343-349.

doi: 10.1186/1756-9966-30-42

**Cite this article as:** Mueller et al: Promising cytotoxic activity profile of fermented wheat germ extract (Avemar®) in human cancer cell lines. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2011 **30**:42.