

LÁNG ISTVÁN DR.,
 NÉKAM KRISTÓF DR.,
 GERGELY PÉTER DR.
 ÉS PETRÁNYI GYULA DR.

Tumoros betegek csökkent természetes limfocitotoxicitásának fokozása transzfer faktor kezeléssel

Semmelweis Orvostudományi Egyetem, II. Belgyógyászati Klinika
 (igazgató: Petrányi Gyula dr.)

A szerzők *in vivo* és *in vitro* transzfer faktor (TF) kezelés hatását vizsgálták emberi limfociták természetes citotoxicitására. A tumoros betegek csökkent természetes limfocitotoxicitását mind az *in vivo*, mind az *in vitro* TF-kezelés szignifikánsan fokozta, ugyanakkor az eredetileg „normális” természetes limfocitotoxicitást nem befolyásolta. A TF-kezelés emberi natural killer (NK) aktivitást fokozó hatása terápiás hatásmechanizmusának egyik tényezője lehet.

Transfer factor treatment used for the enhancement of the decreased natural lymphocytotoxicity of patients with tumors. The effect of transfer factor (TF) treatment on the natural cytotoxicity of human lymphocytes has been studied *in vivo*, and *in vitro*. While both the *in vivo* and *in vitro* TF treatment enhanced significantly the decreased natural lymphocytotoxicity of patients with tumors it failed to influence at the same time the originally „normal” natural lymphocytotoxicity. The enhancing effect on human natural killer activity (NK) of the TF treatment may be one of the factors of its therapeutic effect mechanism.

A rosszindulatú daganatok elleni szervezeti védekezésben a természetes „killer” (NK) sejtek feltételezett szerepére számos adat utal (6, 14) Bár humán tumorokban még nem sikerült *in vivo* jelenlőségüket közvetlenül bizonyítani, *in vitro* vizsgálatok szerint fontosak lehetnek a daganatsejtek elpusztításában (3).

A tumorterápiában egyre szélesebb körben próbált immunostimulánsok (2, 10, 15) némi hatásukat részben éppen az NK-aktivitás fokozása révén fejthetik ki, amint erre az interferonnal, poliribonukleotidokkal, BCG-vel és Corynebaktérium parvummal végzett kísérletek utalnak (4). A rosszindulatú daganatok kezelésében is megkísérelt immunostimuláns transzfer faktor (TF) NK aktivitásra gyakorolt hatásáról eddig nem ismertünk adatokat (16).

Vizsgálatainkban *in vivo* és *in vitro* TF-kezelés hatását tanulmányoztuk emberi limfociták NK-aktivására.

Anyag és módszer

A TF előállítás

A TF-t tartalmazó fehér véresejt dializátumot Lawrence eredeti módszere szerint állítottuk elő (8), csekély módosításokkal. Egészséges véradoktól 400 ml véna vért vettünk heparinos alvadásgátlással. A mononukleáris sejteket Ficoll (Pharmacia, Uppsala) — Uromiro (Bracco, Milano) gradiensen szeparáltuk (1), folyékony levegő és 37 °C-os vízfürdő váltogatásával fel-

tártuk, 1 mg/ml dezoxiribonukleázzal (Calbiochem, San Diego), egy órán át 37 °C-on kezeltük, majd 48 órán át 4 °C-on desztillált vízzel szemben dializáltuk, végül liofilizáltuk. A dialízis hártya 2000 dalton molekulásúlyúnál nagyobb molekulákat nem engedett át. Az anyagot pirogénmentes desztillált vízben oldottuk, 0,22 µm-es Millipore-szűrőn szűrtük és felhasználásig -30 °C-on tároltuk.

Az effektorsejtek szeparálása

A daganatos betegektől és az egészséges kontrolltól vett heparinos vérből a mononukleáris sejteket Ficoll—Uromiro-gradiensen szeparáltuk (1). A fagocitáló sejteket vasporos-mágneses kezeléssel távolítottuk el. A monociták aránya nem érte el az 1%-ot (latex fagocitózis, Dow Latex, Serva). A sejtek életképessége tripánkek próbával 90% fölötti volt.

NK-aktivitás

Az NK-aktivitást Jondal és Pross módszerével mértük (5). Röviden 2×10^4 ^{51}Cr izotóppal jelzett K—562 célsejtet 4 órán át 37 °C-on inkubáltuk az effektorsejtekkel 10%-os dekomplementált borjúsavót tartalmazó TC 199 tápfolyadékban. Az effektorsejt:célsejt arány 50:1, 25:1 és 12,5:1 volt. A reakciót hideg tápfolyadékkal állítottuk le és a csöveket 5 percig 1500-as fordulatszámmal centrifugáltuk. Az üledék és a felülúszó radioaktivitását automata gamma-számlálóval mértük. A célsejtek pusztulását (citotoxicitás) a tesztsövegekben mért izotópfelszabadulás és a spontán izotópfelszabadulás különbségeként fejeztük ki. A spontán izotópfelszabadulást a célsejtekből az effektorsejtek hozzáadása nélkül mértük, értéke 8—15% volt.

Betegek

Szövetteni vizsgálattal bizonyítottan rosszindulatú daganatban szenvedő 12 beteg (5 férfi, 7 nő, átlag élet-

1. táblázat. **Transzfer faktor kezelés hatása rosszindulatú daganatban szenvedő betegek természetes limfocitotoxicitására**

Be- teg	Élet- kor (év)	Nem	Kórisme	TERMÉSZETES LIMFOCITOXICITÁS %								
				Transzfer faktor kezelés előtt			Transzfer faktor kezelés után					
				50:1*	25:1	12,5:1	50:1		25:1		12,5:1	
			a)	b)	a)	b)	a)	b)				
1.	56	nő	májrák	16,1	11,8	4,3	29,9	27,9	27,3	15,8	16,3	9,8
2.	64	ffi	hasnyálmirigy-rák	15,3	10,0	4,8	41,3	35,4	20,9	18,2	12,2	10,8
3.	68	ffi	hasnyálmirigy-rák	16,5	11,2	4,6	25,3	24,5	19,6	20,0	8,9	9,3
4.	50	ffi	végbélrák	6,1	5,0	2,5	41,0	36,2	14,9	12,5	10,3	9,4
5.	61	nő	végbélrák	10,5	6,8	3,7	24,5	23,5	10,2	11,6	7,9	8,2
6.	52	nő	vastagbélrák	14,6	8,3	5,0	28,2	22,6	17,3	14,8	9,6	8,7
7.	60	nő	vastagbélrák	13,2	7,0	3,0	25,6	29,1	20,1	17,3	8,1	7,9
átlag ±SE (1—7)	±58,7 ±6,4	3 ffi 4 nő		e/ 13,2 ±1,4	e/ 8,6 ±1,0	e/ 4,0 ±0,4	c) 30,8 ±2,8	c) 28,4 ±2,1	d) 17,0 ±1,4	d) 15,9 ±1,3	d) 9,5 ±0,6	d) 9,0 ±0,4
8.	48	nő	mellrák	35,9	26,2	12,0	33,3	34,2	23,9	23,4	11,6	11,0
9.	55	nő	mellrák	32,3	19,6	10,5	34,2	30,1	20,8	18,1	10,3	10,1
10.	62	nő	mellrák	31,1	22,4	11,4	32,3	29,4	23,3	20,7	12,0	11,8
11.	52	ffi	malignus melanoma	34,4	23,1	11,8	33,9	32,6	22,5	21,8	11,2	10,7
12.	57	ffi	malignus melanoma	36,3	20,9	10,9	35,1	33,5	21,6	22,6	10,4	10,3
átlag ±SE (8—12)	±54,8 ±5,3	2 ffi 3 nő		f) 34,0 ±1,1	f) 22,4 ±1,2	f) 11,3 ±0,3	c) 33,8 ±0,5	c) 32,0 ±1,0	d) 22,4 ±0,6	d) 21,3 ±0,8	d) 11,1 ±0,4	d) 10,8 ±0,3
Egészséges kontroll	±57,2 ±6,2	4 ffi 6 nő	(n=10, átlag ±SE)	33,6 ±2,6	20,1 ±1,8	11,2 ±1,2	—	31,9 ±2,3	—	19,5 ±1,7	—	10,1 ±0,9

*/ Effektorsejt: célsejt a/ in vivo kezelés b/ in vitro kezelés
 c/ $p < 0,05$ (Wilcoxon próba, a TF kezelés előtti értékhez képest)
 d/ $p < 0,01$ (Wilcoxon próba, a TF kezelés előtti értékhez képest)
 e/ $p < 0,01$ (Wilcoxon próba, az egészséges kontroll csoport átlagához képest)
 f/ nem szignifikáns (Wilcoxon próba, az egészséges kontroll csoport átlagához képest)

kor 57 ± 6 év) limfocitáinak az NK aktivitását vizsgáltuk TF kezelés előtt és után. Diagnózisukat az 1. táblázatban tüntettük fel. A betegek nagy része korábban műtéti, sugár és/vagy citosztatikus kezelésben részesült, de az NK-vizsgálatot megelőző legalább egy hónap alatt az immunrendszert befolyásoló kezelést nem kaptak. Valamennyiüket részletesen tájékoztattuk a tervezett TF kezeléssel, melyhez előzetesen hozzájárultak. A betegeknek egyszeri adagként 2×10^8 limfocita ekvivalens TF-t fecskendeztünk be bőr alá. Az NK-aktivitást közvetlenül az injekciót megelőzően és egy nappal azt követően mértük, így minden beteg önmaga kontrollja volt. Előzetesen megállapítottuk, hogy a betegek TF-kezelés előtt mért természetes limfocitotoxicitása ismételt vizsgálatok során lényegesen nem változott. A TF kezelés során mellékhatást nem észleltünk és a betegek általános klinikai állapota sem változott. Valamennyi beteg a TF injekciót követően legalább egy hónapon át ellenőriztünk.

Az *in vitro* TF-kezelés hatását tanulmányozó vizsgálatokban ugyanezen betegek TF-injekció előtt vett véréből szeparált limfocitáit inkubáltuk *in vitro* TF-ral a négyórás citotoxicitási tesztben. A TF *in vitro* végkoncentrációja 10:1 volt, azaz a limfocitákat az effektorsejtek számát tízszeresen meghaladó mennyiségű limfocitából előállított TF-ral inkubáltuk. Az *in vitro* TF kezelés hatását 10 nemből és korban megfelelő egészséges kontroll limfocitáin is tanulmányoztuk.

Eredmények

Az *in vivo* TF-kezelés hatása rosszindulatú daganatban szenvedő betegek NK-aktivitására

Az egészséges kontroll csoport átlagos NK-aktivitáshoz viszonyítva a tumoros betegek két csoportba voltak sorolhatók: Hét beteg természetes

limfocitotoxicitása az *in vivo* TF-kezelést megelőzően valamennyi vizsgált effektorsejt:célsejt arányban legalább 50%-kal kisebb volt az egészséges kontroll csoport átlagánál, míg öt beteg limfocitotoxicitása ettől nem tért el szignifikánsan (1. táblázat). Az előző csoportban a kezelést megelőzően az átlagos (\pm SE) citotoxicitás 50:1 effektorsejt:célsejt aránynál $13,2 \pm 1,4\%$ volt. Huszonnégy órával a TF-injekciót követően ez az érték $30,8 \pm 2,8\%$ -ra emelkedett ($p < 0,05$, Wilcoxon-próba). A második csoportban az eleve „normális” NK-aktivitás nem változott a TF-kezelés után. Mindkét csoportban a 25:1 és 12,5:1 effektorsejt:célsejt arányoknál is az 50:1 aránnyal kapotthoz hasonló változást észleltünk; a citotoxicitás az alacsony NK-aktivitású csoportban szignifikánsan fokozódott, míg az eleve „normális” NK-aktivitású csoportban értékelhetően nem változott TF-kezelés után.

Az *in vitro* TF-kezelés hatása az NK aktivitásra

Az *in vitro* TF-kezelés NK-aktivitásra gyakorolt hatását rosszindulatú daganatos betegek és egészséges véradók limfocitáin tanulmányoztuk. A tumoros betegek az eredmények lényegében megegyeztek az *in vivo* kezeléssel kapott eredményekkel; az eredetileg csökkent NK-aktivitású betegek limfocitotoxicitása szignifikánsan fokozódott az *in vitro* inkubálás hatására, míg a már eredetileg is „normális” NK-aktivitású betegek limfocitotoxicitása nem változott (1. táblázat). Az eredetileg csökkent

2. táblázat. **TF különböző in vitro koncentrációinak a hatása egészségesek és tumoros betegek természetes limfocitotoxicitására**

Beteg	Különböző TF koncentrációknál mért természetes limfocitotoxicitás %				
	—	1:1	5:1	10:1	15:1
1.	16,1 ^{b)}	15,7	19,4	27,3	nt c/
3.	16,5	17,0	20,1	24,5	26,3
4.	6,1	8,9	11,5	36,2	nt
7.	13,2	12,9	17,1	29,1	31,4
Egészséges n=6 kontroll átlag ±SE	32,4±2,4	33,1±2,4	34,2±2,0	31,2±3,3	30,4±3,1

a) A TF koncentráció magyarázatát lásd a szövegben (Betegek alfejezet)

b) Effektorsejt: célsejt=50:1

c) nt: nem történt vizsgálat

kent NK-aktivitású betegek limfocitotoxicitását az *in vitro* TF-kezelés dózis-dependens módon fokozta (2. táblázat). Az egészséges kontroll NK-aktivitását az *in vitro* TF-kezelés nem befolyásolta (1. és 2. táblázat).

Megbeszélés

A rosszindulatú daganatos betegségek immunostimulációs kezelésének az az elméleti alapja, hogy az immunostimulánsok a beteg tumorelles immunreakcióit serkentik. Az immunostimulációt ma már széles körben alkalmazzák malignus tumorkok kezelésére (2, 5, 10), bár eredményei bizonytalanok. Tekintettel arra, hogy a természetes citotoxicitás a daganat elleni védekezés egyik eszköze (3), az NK-aktivitás fokozása előnyös lehet az emberi daganatok kezelésére. Az ismertebb immunostimulánsok közül eddig az interferon, egyes poliribonukleotidok és a *Corynebacterium parvum* NK-aktivitást fokozó hatását írták le (4). A különböző immunreakciókat (8, 16), így például a direkt (9) és az antitest-dependens celluláris citotoxicitást (7, 11) emberben jelentősen fokozó TF-nak az NK-aktivitást stimuláló hatásáról eddig nem közöltek adatokat.

Vizsgálataink szerint mind az *in vivo*, mind az *in vitro* TF-kezelés szelektív módon hat az emberi limfociták NK-aktivitására: egyes malignus tumoros betegek eredetileg csökkent limfocitotoxicitását szignifikánsan fokozza, de az eredetileg „normális” NK-aktivitást sem egészségesekben, sem tumoros betegekben nem változtatja meg. E tekintetben az NK-aktivitásra gyakorolt hatása hasonló az antitest-dependens citotoxicitásra (ADCC) gyakorolt hatásához, amint erről korábbi közleményeinkben beszámoltunk (7, 11).

Az NK-aktivitás TF-kezelést követő fokozódása feltehetőleg nem csupán interferon hatás. A TF előállításához általunk használt dialízis hártya ugyanis 2000 daltonnál nagyobb molekulásúlyú anyagokat nem engedett át, így a legkevesebb 18 000 dalton molekulásúlyú interferon nem juthatott át rajta. Az *in vitro* TF-kezelés kísérletek rövid inkubációs ideje miatt interferon-indukáló anyagok hatása is valószínűtlen. Mindezek ellenére alacsony molekulásúlyú interferonszerű anyagok vagy interferon-indukálók esetleges szerepe nem zárható ki biztonsággal.

A TF-kezelés NK-aktivitásra gyakorolt hatásának a szelektív jellegét betegeink diagnózisainak a különböző volta nem magyarázhatja önmagában. Az általunk eddig vizsgált mellrákos és malignus melanomás betegek limfocitái „normális” NK-aktivitásúak voltak. Mindazonáltal a tumor típusának és a TF-kezelés NK-aktivitásra gyakorolt hatásának az esetleges összefüggéseit csak nagyobb beteganyagon végzett további vizsgálatok tisztázhatják egyértelműen.

Az *in vitro* TF-kezeléssel kapott eredmények arra utalnak, hogy a TF inkább az NK-sejtek aktivitását és nem a számukat növeli. A különböző effektorsejt:célsejt arányokkal TF-os inkubálással és anélkül kapott citotoxicitási értékek (1. táblázat) ugyanis párhuzamos görbét adnának, ha grafikusán ábrázolnánk őket. Ez azt jelenti, hogy a kezeletlen limfociták NK-aktivitása még nagy effektorsejt:célsejt arányok mellett sem érné el a TF-ral inkubált sejtek aktivitását, ami arra utal, hogy a TF-kezelés nem az effektorsejtek számának a fokozásával növeli a citotoxicitást. Ez a rövid *in vitro* inkubációs idő miatt egyébként is valószínűtlen lenne.

A TF-kezelés NK-aktivitásra gyakorolt hatásának a szelektív jellege feltehetőleg azzal magyarázható, hogy a TF nem közvetlenül hat az NK-sejtekre, hanem közvetett szabályozó mechanizmus útján. Egyes *in vitro* rendszerekben, így például a leukocita-migráció gátlásos tesztben a TF közvetlenül gátolja az egészséges fehér vérszöveteket is (17, 18). Egészséges limfociták tripszinezett birka-vörösvérsejt receptorainak a reszintézisét mind emberi (12), mind szarvasmarha eredetű (13) TF serkenti. Emberi limfociták ADCC aktivitását viszont csak akkor fokozza a TF-kezelés, ha az (pl. tumoros betegekben) eleve csökkent (7, 11). E tekintetben tehát a TF NK és ADCC aktivitásra gyakorolt hatása hasonló jellegű.

Az *in vivo* és *in vitro* TF-kezelés emberi NK-aktivitást fokozó hatására utaló kezdeti eredményeink újabb adatot szolgáltathatnak a TF terápiás hatásmechanizmusához. Sajnos, a TF-ral kezelt tumoros betegek klinikai állapotának a lényeges javulását még nem sikerült meggyőzően bizonyítani. A jövőben talán nagyobb mennyiségű vagy jobban standardizált TF-készítmények alkalmazása hozhatná meg az e téren már régóta remélt előrelépést.

IRODALOM: 1. *Böyum, A.*: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968, 21, Suppl. 97, 1. — 2. *Fudenberg, H. H. és mtsai*: in: Thymus, Thymic Hormonos and T lymphocytes 1980, (A. F. Aiuti). Ed. p. 391, Academic Press, New York. — 3. *Herberman, R. B.*: in: Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors, 1980, (R. B. Herberman, Ed.), p. 1141. Academic Press, New York. — 4. *Herberman R. B.*: in: Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors, 1980, (R. B. Herberman, Ed.), p. 707. Academic Press, New York. — 5. *Jondal, M., Pross, H.*: Int. J. Cancer 1975, 15, 596. — 6. *Láng, I. és mtsai*: Acta Med. Acad. Sci. Hung. 1977, 34, 123. — 7. *Láng I. és mtsai*: Orv. Hetil. 1970, 120, 1491. — 8. *Lawrence, H. S.*: The Harvey Lectures, 1974, 68, 139. — 9. *Levin, A. S. és*

mtsai: J. Clin. Invest. 1975, 55, 497. — 10. *MacLennan, I. C. M.*: Proc. roy. Soc. Med. 1975, 68, 216. — 11. *Nékám, K. és mtsai*: Clin. Immunol. Immunopathol. 1979, 13, 407. — 12. *Nékám, K. és mtsai*: Immunopharmacology, 1981, 3, 31. — 13. *Newell, R. T. és mtsai*: J. Clin. Lab. Immunol. 1979, 2, 261. — 14. *Petrányi, G. Gy. és mtsai*: Orv. Hetil. 1974, 115, 613. — 15. *Vetto, R. M. és mtsai*: Cancer 1976, 37, 90. — 16. *Waksman, B. H.*: Springer Semin. Immunopathol. 1979, 2, 5. — 17. *Wilson, G. B., Fudenberg, H. H., Horsmanheimo, M.*: J. Lab. Clin. Med. 1979, 93, 800. — 18. *Wilson, G. B., Fudenberg, H. H.*: in: Lymphokines (E. Pick, Ed.) 1981, vol. 4, Academic Press, New York.

SALVUS

nátrium-karbonátos természetes gyógyvíz

Javasolt:

1. soksavas gyomorhurutnál kezdetleges gyomor- vagy nyombélfekélynél.

Adagolás: naponta kétszer 2 dl étkezés előtt 1 órával 4 héten át. Ajánlatos évente kétszer megismételni.

2. cukorbeteg – enyhe esetekben, mely diétával, esetleg kisadagú gyógyszerrel egyensúlyban tartható.

Adagolás: naponta háromszor 1–2 dl – rendszeresen, amennyiben kellemetlen tüneteket (hasmenés) nem okoz.

3. vesekőképződésnél húgysavas kő esetén.

Adagolás: naponta háromszor 2 dl hónapokon át.
4. köszvénynél.

Adagolás: kétszer fél liter vagy egyszerre 1 liter 2–3 hétig naponta.

5. légúti hurutos megbetegedéseknél.

Adagolás: naponta ötször 1–2 evőkanállal. Ajánlatos a gyógyvizet használat előtt vízfürdőben 38–40 °C-ra felmelegíteni és melegen 3–4 perc alatt kortyonként fogyasztani.

