

DAGANATELLENES SZEREK HATÁSA NORMÁLIS ÉS MALIGNUS

SEJTEKRE ÉS AZOK AMINÓSAV HASZNOSÍTÁSÁRA SZÜNET-

TENYÉSZÉSBEN

Irtta:

Pályi István

Diss. B 435



Tartalomjegyzék

Bevezetés	1
Daganatellenes szerek kiválogatásának módszere szövettényészetben	3
Anyag és módszer	5
Kísérleti eredmények	12
A pH befolyása a szerek sejt- károsító hatására	22
Különböző in vitro screenelési eljá- rák összehasonlítása és értékelése	33
A szövettényészetben és állatkísér- letben nyert eredmények összehason- lítása	34
A szelektív hatás és a sejt- spektrum kérdése	39
Aminósav- és purin-anyagcsere vizsgálatok normális és malignus sejtkulturákban	47
Anyag és módszer	49
Kísérleti eredmények és azok megbeszélése	57
Chemoterápiás szerek hatása normális és daganatsejtek aminosav-hasznosítására szövettényészetben	78
Anyag és módszer	80
Kísérleti eredmények	82
Az eredmények megbeszélése	98
Összefoglalás	109
Irodalom	115

Bevezetés.

Az élő sejteknek a szervezetén kívül történő tanulmányozását Roux /132/ kezdte el a múlt század utolsó évtizedeiben. A század elején Harrison /52/ tette meg a további lépéseket a mai értelemben vett szövettenyésztés módszer kialakítása felé. A klasszikus módszereket Carrel /22/ vezette be, egyrészt aseptikus körülmények megteremtésével, másrészt olyan tenyésztési táptalaj kidolgozásával, amellyel lehetővé vált a sejtek tartós fenntartása és szaporítása in vitro körülmények között.

A daganatkutatásban is korán felismerték a szövettenyésztés jelentőségét és egyre kiterjedtebben alkalmazzák a különböző problémák tanulmányozására.

Intézetünkben az az igény merült fel, hogy gyors és egyszerű in vitro eljárást dolgozzunk ki új daganatellenes szerek elővizsgálatára. A dolgozat első része az általunk kidolgozott módszerrel és az ezzel nyert eredményeinket és tapasztalatainkat ismerteti. Azt tapasztaltuk, hogy a különböző sejtféleségek egymástól eltérő érzékenységet tanúsítottak egyes szerekkel szemben. Ezért tanulmányozni

kezdjük a normális és daganatsejtek között fenn-
álló biokémiai különbségeket: Összehasonlítot-
tuk az egyes sejttípusok aminosav hasznosítását,
ismert összetételű tápfolyadékban. A továbbiak-
ban azt vizsgáltuk, hogy a különböző chemotherá-
piás szerek hogyan befolyásolják a sejtek aminó-
sav hasznosítását. Ez utóbbi vizsgálatok során
kapott eredményeinket és megfigyeléseinket a dol-
gosat második, illetve harmadik része tartalmazza.

Daganatellenes szerek kiválogatásának módszere szü-
vettenyvésselben.

A rosszindulatú daganatok chemotherápiás gyógyítása céljából világoserte folyik a kutatás új, a daganatok növekedését hatékonyan gátló anyagok felkutatására. A szerek hatásosságának lemérése átoltható állati daganatokon történik. A screenelést kevés állaton, 2-3 tumorfélésegen végzik. Amennyiben a vizsgált szerek valamelyike szemebetűnő daganatgátló tulajdonságot mutat, részletesebb vizsgálatnak vetik alá, amelyet testelés-nek neveznek. /Németh 94/ A tömeges kipróbálásra azonban nem mindig van mód állatkísérletekben, mivel az eljárás hosszadalmas és elég drága. Ezért világoserte az volt a törekvés, hogy egyszerű, gyors és olcsó módszerrel találjanak a rendelkezésre álló anyagok tömeges kipróbálására. E szempontok figyelembevételével számos in vitro eljárást dolgoztak ki, amelyekben állati sejteken kívül növényi sejteket, baktériumokat is alkalmaztak. A hatás lemérése a sejtesztődés, a fehérjesszintézis, vagy valamilyen sejtalkotórész működésének gátlásán alapozik. Példaként megemlítjük Amann és Saffernann /1/ "bagyna test" /onion test/ módszerét, DiPaolo és Rosenfield /33/ élesztőben kidolgozott eljárását,

továbbá a különböző baktériumokon /Teley és mtsai 41, 43; Bradner és Clarke 17/, algákon és protozoákon /Price és mtsai 125; Johnson és mtsai 62/ és gombákon /Reilly 127/ végzett vizsgálatokat. Rendkívül elterjedt Miyamura /90/ eljárása, az ún. "agar-plate method", amely a szereknek a dehidrogenáz enzim-rendszert bénító hatásán alapszik. Eljárását ő maga is /91/ és több szerző /5, 31, 32, 89, 134, 135/ módosította. A közelmúltban Karnofsky és Siggel /65/ készített egy új eljárást, amelyben tengerisün petéken végzik a chemotherápiás szerek kipróbálását.

A szövetskultúrákat mintegy 30 éve alkalmazzák chemotherápiás szerek okostá hatások in vitro tanulmányozására. Ormsbee és Corman /104/ 1948-ban meghatározta a szövettenyésztés helyét a chemotherápiás screenelésben. 1951-ben Biazala /6/ készítette eljárást az in vitro screenelésre. Az amerikai Cancer Chemotherapy National Service Center /CCNSC/ 1959-ben standardizálta a chemotherápiás anyagok szövettenyésztésekben történő vizsgálatát /21/.

A különböző laboratóriumok többnyire saját in vitro screenelési eljárást dolgoztak ki /Hirschberg 56/ mások tapasztalatai, valamint saját adottságaik és lehetőségeik alapján. Az említett in

vitro módszerek közül számunkra a szövettenyésztés látszott leghasznosabbnak, mivel ez közelebbi meg legjobban az in vivo viszonyokat. Lehetőség van ugyanazon sejteken végezni a vizsgálatokat, mint az állatkísérletekben, és közvetlenül megfigyelhető, hogy a szer elpusztítja-e a ráksejtet. A következőkben ismertetjük a chemotherápiás anyagok kipróbálására általunk kidolgozott eljárást /117, 118/.

Anyag és módszer.

A sejttípusok kiválasztásánál olyan szempontokat vettünk figyelembe, hogy a kísérletekben frissen explantált sejt és permanens sejttörzs, emberi és állati sejt, valamint normális, carcinoma és sarcoma sejt legyen képviselve. Mindezek alapján a következő sejtfőleségeket használtuk: frissen explantált csirkeembryó szívfibroblast, frissen explantált S-180 egér sarcoma /Crocker/ és permanens HeLa emberi epidermoid cervix carcinoma sejttörzs /Gay és társai 45/.

A 9-12 napos csirkeembryókból összeragyújtott szíveket görbe ollóval 1-2 mm³-es darabkákra

apritottuk, majd Hanks-oldattal /Hanks és Wallace 50/ kimostuk a vért és a szövettöréseket.

Az egérdaganatot 6-10 nappal a transplantáció után vágtuk ki steril körülmények között az állatból, és a florid részekből megfelelő mennyiséget gyűjtöttünk össze. A daganatszövetet összevágtuk, majd többször alaposan átmostuk, hogy a nekrotikus részeket eltávolítsuk.

A csirkeembryo kivonat készítése a következőképpen történt: a dekapitált csirkeembryókat Potter-Eivhjen /124/ üveghomogenizátorban néhány csepp Hanks-oldattal elhomogenizáltuk, majd kb. azonos mennyiségű Hanks-oldattal kevertük össze és lecentrifugáltuk. A felülussót, mint 1:1 hígításu embryo-extraktumot használtuk fel a továbbiakban.

Normál méretű peremes jénai kőcsövek belső falát egy hosszanti csíkban vékony plazma-réteggel vontuk be, Pasteur pipetta segítségével. /A plazma alakos elemektől mentes, heparint tartalmazó tyuk-, vagy kakasvér/ Ezután a csövekbe 1-2 csepp hígított embryo-extraktumot cseppentettünk, majd jól összekevertük a plazmával. Néhány másodpercen belül a plazmaréteg megolvadt.

Erre a rétegre helyeztük üvegkacs segítségével a már előkészített szövetdarabkákat. A tumorszövetek esetében a bealvástát utólag végeztük el, mert így azok kevésbé usztak le az elvadék felületéről.

A csövekbe ezután a következő összetételű tápfolyadékot mértük:

10 % inaktivált lóvérsavó

5 % csirkeembryó kivonat /1:1/

85 % Hanks-oldat

100 γ /ml streptomycin

100 NE /ml penicillin

Az antibiotikumok a bakteriális fertőzések megelőzésére szolgáltak. A fenti tápfolyadékból 1 - 1 ml-t mértünk be a fenti módon előkészített csövekbe. Ezután a csöveket kissé lejtős helyzetben 37°C-os termosztátban helyeztük el úgy, hogy a tápfolyadék ellepje a szövetdarabkákat.

A Hala sejttörzset nagyobb tenyésztőedényekben tartottuk fenn. A sejtek az üveg felületén növekedtek a következő összetételű tápfolyadéokban:

40 % human vérsavó

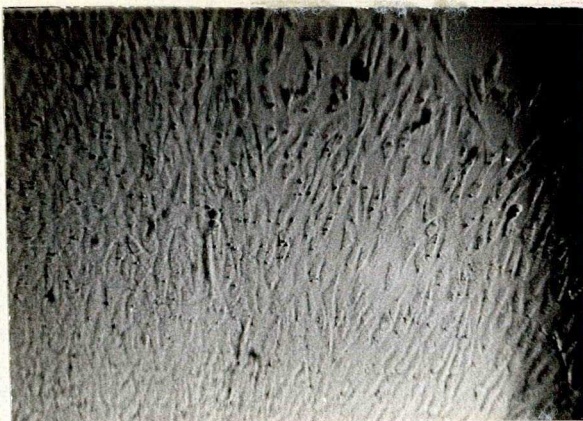
60 % Hanks-oldat

antibiotikumok /mint előbb/

A kísérletek megkezdésekor a régi tápfolyadékot lecseréltük és a sejteket Hanks-oldattal öblítettük le. Ezután új tápfolyadékot mértünk az edénybe és a sejteket üvegkaparó segítségével belekapartuk a tápfolyadékba. A sejtesoportokat pipettázással egyedi sejtekre választottuk szét, majd az így nyert sejtasuszpenzióból 1-1 ml-nyi mennyiséget steril kénecővekbe csepegtettünk szét. A cővek azután kissé lejtős helyzetben 37°C -os termosztátba kerültek.

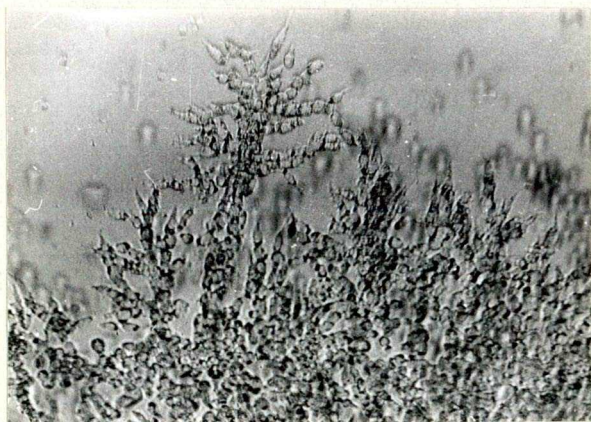
A tenyészeteknek a vizsgálandó anyagokkal történő kezelése 24 órás tenyésztés után történt. Ezalatt a fibroblastokból és sarcoma sejtekből jelentős nagyságu sejtszóna alakult ki az anyagcsoport körül /1. és 2. ábra/, a HeLa sejtek pedig letapadtak, és élénk mitózisaktivitást lehetett megfigyelni. /3. ábra/

Kezelés alkalmával a vizsgálandó anyagokat analitikai mérleggel mértük ki, steril fiziológias NaCl-oldatban oldottuk fel, majd különböző hígításokat készítettünk. /1, 10, 50, 100, 500, 1000 γ /ml/ A rosszul oldódó anyagokat melegítéssel, savanyított /HCl/ vagy lúgosított / NaHCO_3 / oldat, vagy szerves oldószerek /alkohol, etilén-glikol, stb./ segítségével próbáltuk oldatba



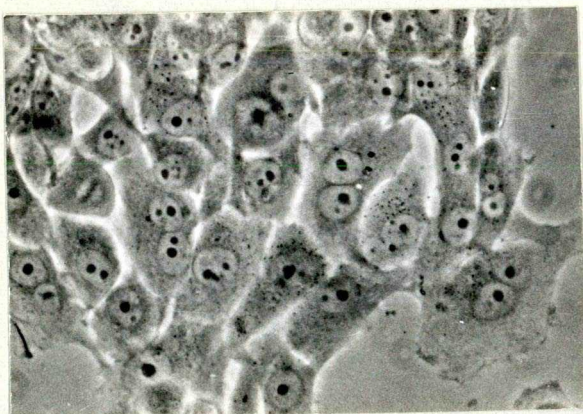
1. ábra

Csikkesembryó szívfibroblast kultúra. $\times 16$ tenyésztet kócsokban. Fénymikroszkópos felvétel, 3D kondenzorral. Kb. 60x



2. ábra

3-180 egérsarcoma kultúra. $\times 16$ tenyésztet kócsokban. Fénymikroszkópos felvétel. Kb. 60x



3. ábra

HeLa emberi carcinoma kultúra. $\times 16$ tenyésztet Rose-féle tenyésztő kamrában. Fázis-kontraszt mikroszkópos felvétel. Kb. 120x

vinni. Ha az anyag végképp oldhatatlannak bizonyult, szuszpenzióban adtuk a tenyészetekhez. A különböző növényi, gomba és egyéb extraktumokból is hígításokat készítettünk. Az oldatokból 0.1 - 0.1 ml-nyi mennyiségeket mérünk be a csövekbe, ahol a tápfolyadék révén további tízszeres hígulás történt. Egy-egy hígítást két-három csövön vizsgáltunk meg. A kontroll csövekbe az üres oldószert mérjük be. Kezelés után a tenyészeteket visszahelyeztük a termosztátba.

A kiértékelést 24 órás kezelés után végeztük el. Az élő tenyészeteket mikroszkóppal, kis nagyítással vizsgáltuk át. A kezeltékhez összehasonlítási alapul a kontroll tenyészetek szolgáltak. A károsodás mértékét a növekedési zóna állapota, megtartottsága, valamint a sejtek lekerekedettsége, szomszédosága, szétesése alapján becsültuk fel, és 0, +, ++ és +++ - fokozatokkal értékeltük. A + hatás csekély kezdeti elváltozást jelentett, pl. kisfokú citoplasma vakuolizációt, a növekedési zóna fellazulását, vagy a növekedés és mitózisban csökkenését. A +++-os fokozat a tenyészet teljes pusztulását, vagy a teljes növekedésgátlást jelölte. Azt a szerkoncentrációt, amely a tenyészeteken csekély, kezdeti elváltozást hozott létre, legkisebb

károsító dózisnak /LKD/, azt a dózist pedig, amelynél a szer éppen elérte a maximális hatását, legkisebb gátló dózisnak /LGD/ neveztük.

/Fogarat 123/

A kvantitativ kiértékelés egyik részét a fibroblast kulturák növekedésének a mérése képezte. Ezt a következőképpen végeztük: okulár mikrométerrel megmértük a növekedési zóna nagyságát, egymásra merőlegesen két tengelyben, 24 és 48 órával az explantálás után. Az első és második napi mérés különbsége mutatta meg, hogy mennyit nőttek a tenyészetek a kontroll és kezelt csövekben, a kezelés időtartama alatt. A kontroll növekedést 100 %-nak véve, annak %-ában fejeztük ki a kezelt kulturák növekedését, vagy annak gátlását.

A mitózissszám megállapítását, a citológiai vizsgálatokat festett preparátumokon végeztük. Erre a célra az anyaszöveteket 7 x 30 mm-es csillán-, vagy fedőlemez csikra explantáltuk, illetve a HeLa sejteket erre ülepítettük ki. A kísérletek befejezésekor a fedőlemez kulturákat Carnoy-fixálóban rögzítettük, s a fibroblast kulturákat Giemsa-, a daganatsejteket Harris-haematoxylin-eosin festékkel festettük meg. 1000 vagy

2000 sejtet immerziós nagyítással leszámolva megállapítottuk a mitózisok számát, az egyes osztási fázisok arányát, valamint a degenerálódó, piknotikus sejtek számát.

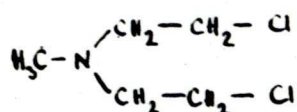
Kísérleti eredmények.

Vizsgálatainkban mintegy 250 ismert és még ki nem próbált vegyületet, 33 gomba fermentlevét, és 50 növény különböző részeinek a kivonát vizsgáltuk meg. Az első problémát egyes anyagok rossz oldódása jelentette. A szerves oldószerek alkalmazásánál arra kellett figyelemmel lenni, hogy az oldószer toxicitása ne zavarjon. Azt tapasztaltuk, hogy az alkalmazott oldószerek /etil-alkohol, etilén-glikol, propilén-glikol/ 1:200-nál nagyobb hígításban nem toxikusak. Ez a megfigyelésünk megegyezett az irodalomban közölt adatokkal /Smith és mtsai 1938/. További problémát jelentett az anyagok sterilizálása. A gomba fermentleveket steril asbeszt vattán szűrtek át. A rosszul oldódó anyagoknál azonban a sterilizálás megoldhatatlan volt, ezért az anyagokat általában nem sterilizáltuk, de a feloldást és a további hígítást steril

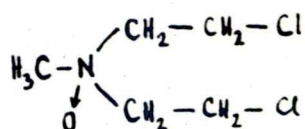
eszközökkel és oldószerekkel végeztük. Tapasztaltunk az irodalmi adatokkal megegyezően az volt, hogy egyrészt a tápfolyadékokban lévő antibiotikumok bizonyos védelmet nyújtanak a fertőzés ellen, másrészt a rövid ideig tartó kísérletekben az esetleges minimális fertőzés nem tud felerősödni, és nem befolyásolja az eredményeket.

Vizsgálataink egyik célja az anyagok toxicitásának, vagyis a legkisebb károsító és legkisebb gátló dózisnak a megállapítása volt. A vegyületek általában a következő csoportokba sorolhatók: alkyllező szerek, antimetabolitok, antibiotikumok, alkaloidák, hormonok, és egyéb, különböző típusú vegyületek. A következő oldalon ismertetjük néhány ismertebb degranatellenes vegyület szerkezeti képletét. Néhány alkyllező ágens hatásosságát a 4. ábra mutatja. A szerek a TSM kivételével az ún. mustáraszármazékok csoportjába tartoznak. A hatás kiértékelése első lépésben az élő, illetve festett tenyészetek mikroszkópos vizsgálatával történt. Az 5. ábrán $75 \gamma/\text{ml}$ Degranol hatására létrejött károsodást demonstrálunk sziv-fibroblast kulturában. A növekedési zóna sejtsíkjai tönkresztek, szétestek. Az alkyllező szerek nagyrésze 1 és $100 \gamma/\text{ml}$ koncentráció határok között

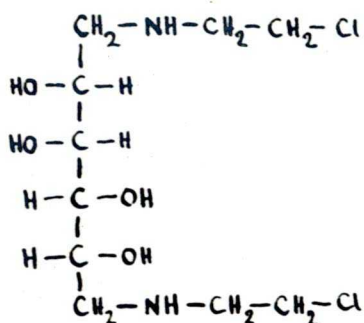
Daganatellenes szerek szerkezeti képletei:



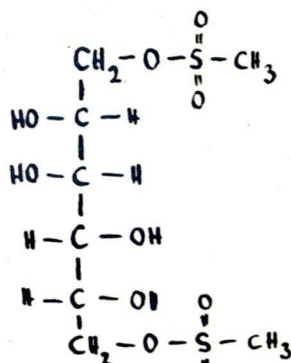
Mustárnitrogén
(HN₂)



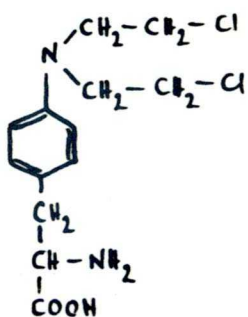
Mitomen
(HN₂O)



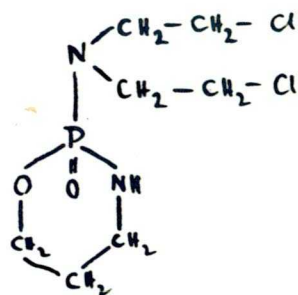
Degranol
(BCM)



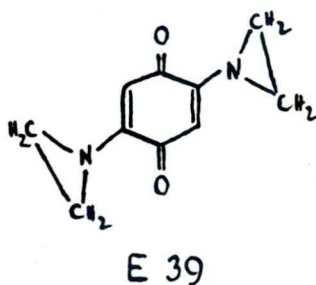
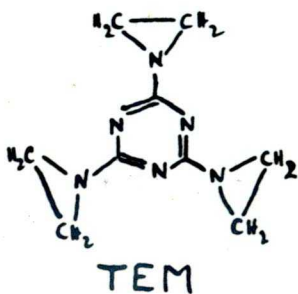
Mannitmyleran

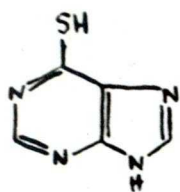


Melphalan
(Sarcolysin)



Endoxan
(Cytosan)

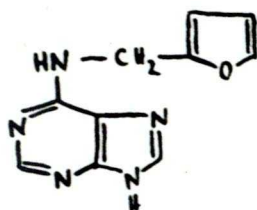




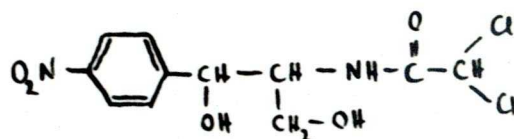
6-Mercaptopurine



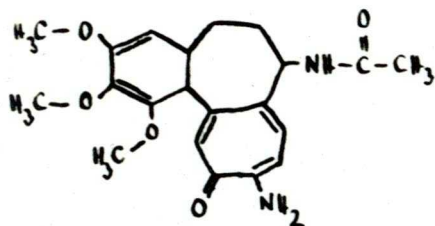
Amethopterin



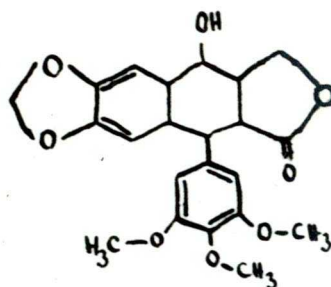
Kinetin



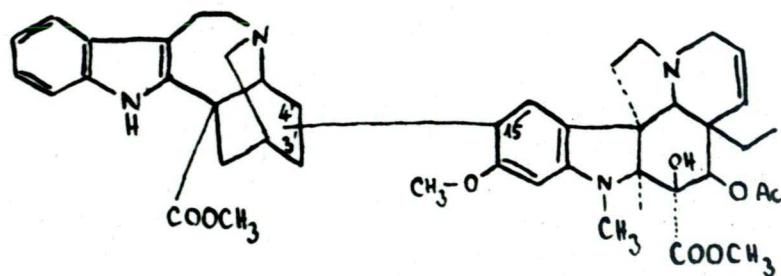
Chloramphenicol



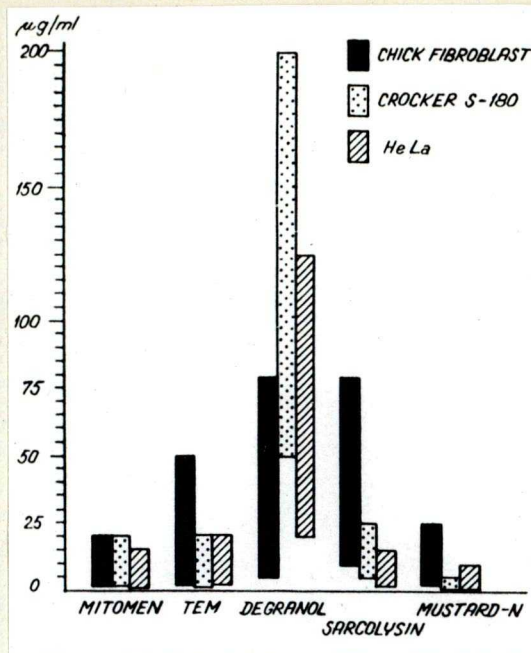
Colcemid



Podophyllotoxin

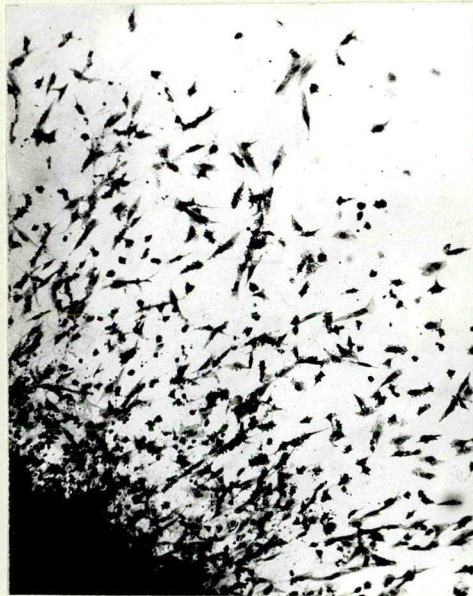
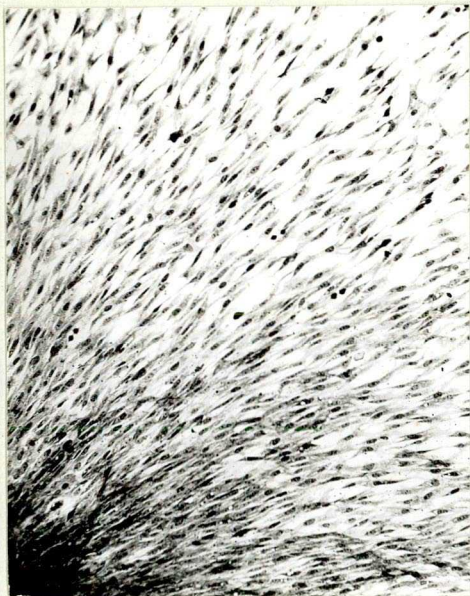


Vincalukoblastin
(VR-8)



4. ábra

Alkyláló szerek hatása normális és degenerált sejtekre. Az oszlopok alsó pontja a kezdő-dózis /LD₀/, felső pontja a maximális károsodást /növekedésgátlást, LD₅₀/ előidéző dózist jelöli.



5. ábra

48 órás csirkeembryó csivfibroblast kultúra
Giensa festés. 85x

a/ kontroll

b/ 75 µg/ml Degranol hatása. 24^h kezelés.

fejti ki hatását. Ez szembevetünk a fibroblastok növekedésére gyakorolt hatásukból is. /1. táblázat/ Egyes alkyleső szerek, mint a Myleran és Endoxan, hatástalanok voltak szövettényészetben. Ennek magyarázatáról később lesz szó. A TEM 50 γ /ml dózisa 44 %-ra csökkentette a szív-fibroblastok növekedését a kezelés 24 órás időtartama alatt. Plummer és mtsai /122/ ugyanazzal a dózissal teljes növekedésgátlást figyeltek meg emberi nyirokcsomó tenyészetekben. Hilwig /55/ 40 γ /ml TEM-mel kezelt HeLa kulturákban erős sejtkárosodást figyelt meg. A Degranol 75 γ /ml koncentrációban ugyancsak több, mint felére csökkentette a normál sejtek növekedését. Bár a morfológiai kép alapján ez a dózis már maximális károsodást idéz elő, a növekedést nem szüntette meg azonnal. Ez asszal magyarázható, hogy a hatás fokozatosan fejlődik ki, miközben a sejtek növekedése még tart. Garattini és mtsai /44/ két emberi malignus sejttörzsen tanulmányozták a Degranol in vitro hatását. Érdekes, hogy az egyik törzs növekedése már 10 γ /ml dózisban is erősen gátolva volt, 100 γ /ml pedig teljesen megszüntette a növekedést; a másik sejttörzs növekedése viszont még 100 γ /ml Degranol hatására sem szűnt meg.

1. táblázat

Chemoterápiás szerek hatása csirkeembryószió fibroblast kulturák növekedésére

Kezelés időtartama: 24 óra. Kontroll kulturák növekedése: 100 % .

A n y a g	Szerkoncentráció γ /ml.-ben										75	100	250	500	1000
	.001	.005	.01	.05	0.1	1	5	10	25	50					
Degranol							107	87	66	54	42				
Mustárnitrogén							90	85	17						
Mitomen							97	45	12	-					
Melphalan							99	104	63	59					
TEM							101	96	68	44					
Myleran						124		146		124		128			
Mannitmyleran															
pH 7.1-7.3										121		117		48	
pH 7.8										69		49		13	
R-13									29	27					
Endoxan						101		86				122			
E-39						71		74				17			
Urethan										93		90	65		
Kinetin			93			105	78	76	122	47		64		58	55
6-Mercaptopurin						145			100						
Aminopterin												32			
Actinomycin C			59	29	16										
Sarkomycin								130		149		127			
Colcemid	74	97	42		23										
Adreson								109				111			55

A legerősebb növekedésgátlást a természetes eredetű anyagok okozták, mint pl. az alkaloidák és antibiotikumok. A Colcemid, a Colchicin alkaloida egyik származéka már 0.01 γ /ml koncentrációban felére csökkentette a növekedést. Az Actinomycin C szintén rendkívül toxikusnak bizonyult. Ez a növekedésgátló hatásában is megnyilvánult: 0.05 γ /ml dózisa 71 %-os gátlást okozott. Cobb és Walker /25/ 0.0001-10 γ /ml közötti intervallumban tapasztaltak növekedésgátló hatást Actinomycin D-val.

A mitózisok számát már kis dózisok is erősen csökkentették fibroblast kultúrákban.

/2. táblázat/ 5 γ /ml TSM hatására a normál mitózisok helyét torz mitózisok foglalták el. Plummer és Russell /122/, valamint Antikainen és Russell /2/ szerint ez a dózis csirkesejtfibroblast kultúrákban teljes mitózisgátlást idézett elő.

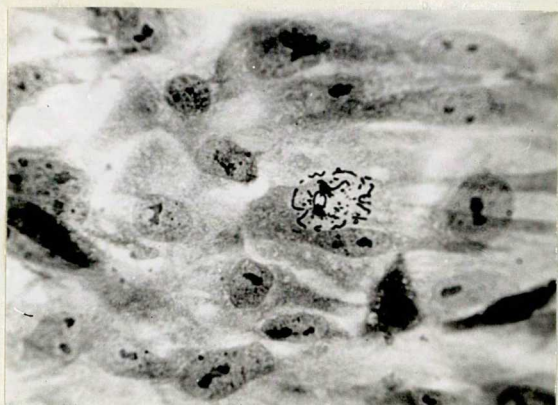
Hilwig /55/ 4 γ /ml TSM-mal kezdeti elváltozást hozott létre HeLa sejtekben. A kipróbált szerek hatására a mitózis-torzulások klasszikus jellegzetességeit figyeltük meg. 1 γ /ml Mustárnitrogén kromoszómatorziókat /6. ábra/, 250 γ /ml Mannit-myleran hídképződést, aszimmetrikus enafázist ho-

2. táblázat

Mitózis változások csirkeembryószió fibroblast kulturákban
chemoterápiás szerekkel történő kezelés után 24 órával.

A mitózis-számolás 1000-1000 sejtből történt.

A n y a g	Dó- zis: γ/ml.	Pro- f á z i s	Meta- f á z i s	Ana- f á z i s	Telo- f á z i s	Nor- mál mitózis %	Torz mitózis %	Pik- nózis %
kontroll	-	5	5	3	13	2.6	-	-
Degranol	1	3	6	5	5	1.9	1.1	-
	5	2	6	3	5	1.6	0.7	-
	10	-	1	1	1	0.3	0.3	0.1
kontroll	-	5	5	3	8	2.1	0.2	0.1
Mustárnitrogén	1	-	3	3	3	0.9	2.2	0.5
	5	-	1	-	-	0.1	0.6	0.4
Mitomen	1	-	4	1	5	1.0	2.6	0.4
	5	1	3	1	2	0.7	1.1	0.6
kontroll	-	-	9	3	6	1.8	0.6	-
Melphalan	1	-	5	4	4	1.3	1.1	0.8
	10	-	-	1	-	0.1	0.6	0.1
kontroll	-	-	7	3	9	1.9	0.2	0.1
TEM	5	-	-	-	-	-	0.8	0.2
kontroll	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 7.4	-	7	6	2	13	2.8	0.2	-
pH 7.8	-	7	21	4	13	4.5	0.2	-
Mannitmyleran	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 7.4	50	-	4	2	3	0.9	-	-
pH 7.8	50	3	5	1	1	1.0	-	-
pH 7.4	100	-	2	2	1	0.5	-	-
pH 7.8	100	1	3	-	1	0.5	-	-



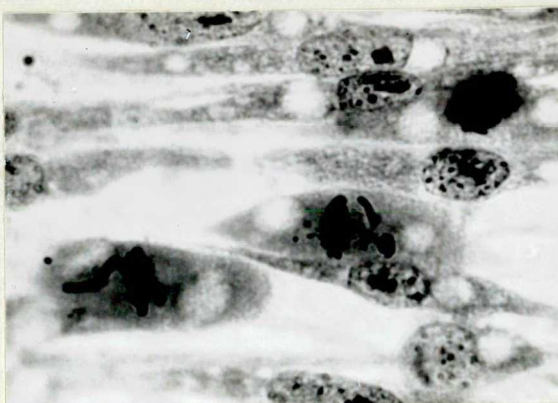
6. ábra

Csirkembryó szívfibroblast kultura. Mustárnitrogén /1 γ /ml, 24 órák kezelés/ hatására létrejött kromoszóma töredezés. Giemsa festés. 580x



7. ábra

Csirkembryó szívfibroblast kultura. Mannitmyleran /250 γ /ml, 24 órák kezelés/ hatására létrejött torz anafázis, hídképződéssel. Giemsa festés. 1630x



8. ábra

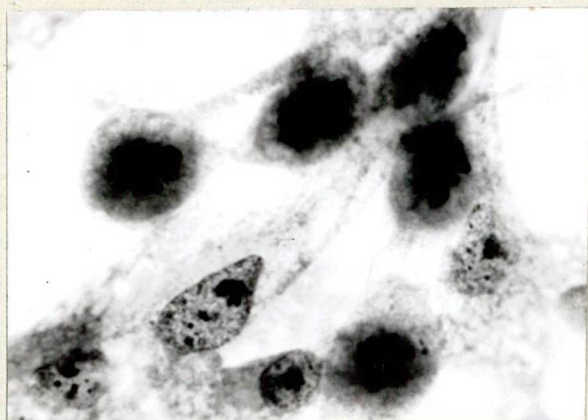
Csirkembryó szívfibroblast kultura. Papaver orientale kivonat /1:10/ hatására létrejött torz osztások / a kromoszómák szabálytalan elrendeződése metafázisban/. Giemsa festés. 1200x

sott létre /7. ábra/.

Egyes növények extraktumai igen jellegzetes citológiai elváltozásokat idéstek elő. Az egyik *Papaver*-féleség az osztódó sejt kromoszómáinak szabálytalan elrendeződését /8. ábra/, a *Calycanthus* és *Symphytum* mitózis-blokkot, /9, 10. ábra/, a *Cnicus* kivonat a kromoszómáknak a *Podophyllin* hatásához hasonló szétszóródását idézte elő /11. ábra/.

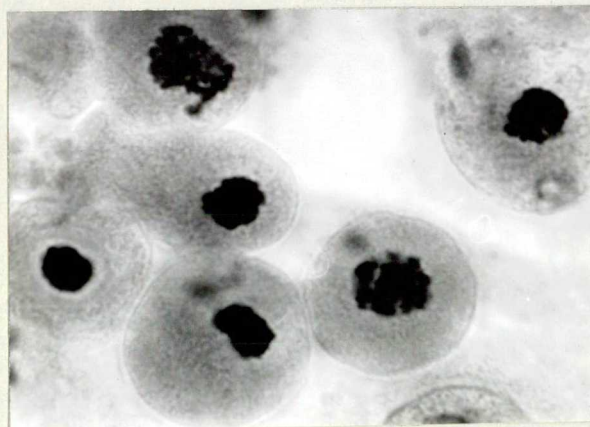
A pH befolyása a szer sejtkárosító hatására.

A milió pH-jának jelentőségére a szerhatással kapcsolatban a Mannitaylerannal/a továbbiakban MM/ végzett kísérleteink során figyeltünk fel. A szer nem bizonyult toxikusnak sem állatkísérletben /Kellner és Németh 68/, sem szövettanilag. A kiértékeléskor a tápfolyadék pH-ja erősen savas karakterű volt, amelyet a szer hatásának tulajdonítottuk. A MM oldata Vargha és Fuszmann /146/ szerint a szer feloldása után gyorsan savassá válik, a metánszulfonsav lehazsáása következtében:



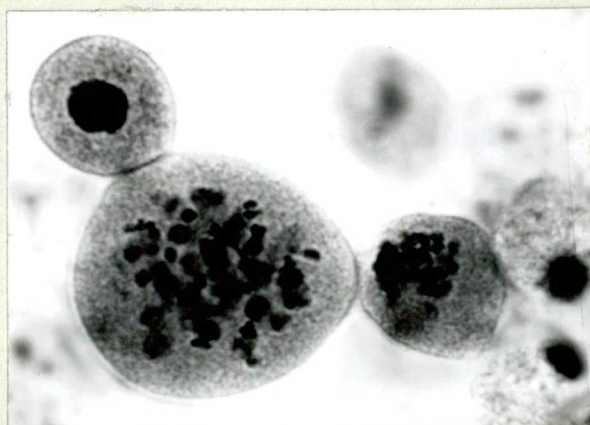
9. ábra

Csirkébenbryó szivfibroblast kultúra. *Calycanthus floridus* kivonat /1:10/ hatására létrejött mitózisgátlás erősen tömörült kromoszómákkal. Giemsa festés. 1200x



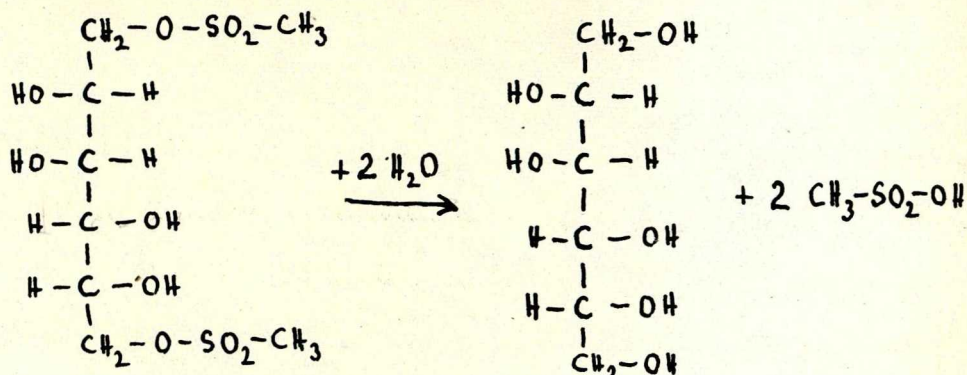
10. ábra

HeLa kultúra. *Symphytum* off. kivonat /1:100/ hatására létrejött mitózisgátlás. A kromoszómák piknotikus masszává csapódtak össze. May-Grünwald-Giemsa festés. 1200x



11. ábra

HeLa kultúra. *Oniscus benedictus* kivonat /1:10/ hatására létrejött torz mitózisok. A nagy sejtben szabálytalanul szétszóródott kromoszómák megrövidültek, összezsongorodtak. Harris haematoxylin-eosin festés. 1200x



Erőzt a továbbiakban lúgos oldószertben /NaHCO₃/ oldottuk fel, hogy az erős pH-csökkenést elkerüljük. Ily módon az eredetileg megfigyelt 3-5000 γ/ml helyett már 1000 γ/ml MM is erős sejtkárosító hatást fejtett ki. Ezután párhuzamosan vizsgáltuk savas és lúgos miliókban a MM-nak a fibroblastok növekedésére, valamint a mitózisok gyakoriságára kifejtett hatását. A fibroblastok növekedését 500 γ/ml MM alacsonyabb pH-nál [] /pH 7,2 körül/ közepesen, lúgosabb miliókban /pH 7,8/ erősen gátolta. /1. táblázat/

A fibroblast kultúrákban 50 és 100 γ/ml MM erősen csökkentette a mitózisok gyakoriságát. /2. táblázat/ Hogy eltérést ugyan nem tapasztaltunk a különböző pH-ju miliókban nyert eredmények között, azonban figyelembe kell venni, hogy kontroll kultúrákban a lúgosabb környezet hatására

több, mint másfélszeresére emelkedett a mitózis-szám és alacsonyabb pH-ju kulturákhoz képest. Ily módon viszonylag nagyobb volt a hatás a magasabb pH-nál.

Hela kulturákban a lugos miliő ugyancsak szenkentőleg hatott a mitózisok gyakoriságára, azonban főleg a torz oszlások száma emelkedett. 500 γ /ml MM pH 7.4-nél gyakorlatilag teljesen megszüntette a mitózisaktivitást, míg savas miliőben ugyanezen dózis mellett még számos mitózist lehetett találni. /5. táblázat/

A morfológiai hatást vizsgálva megállapítható volt, hogy a savas és lugos miliő önmagában nem károsította a sejteket /12., 14. és 16. ábrák/.

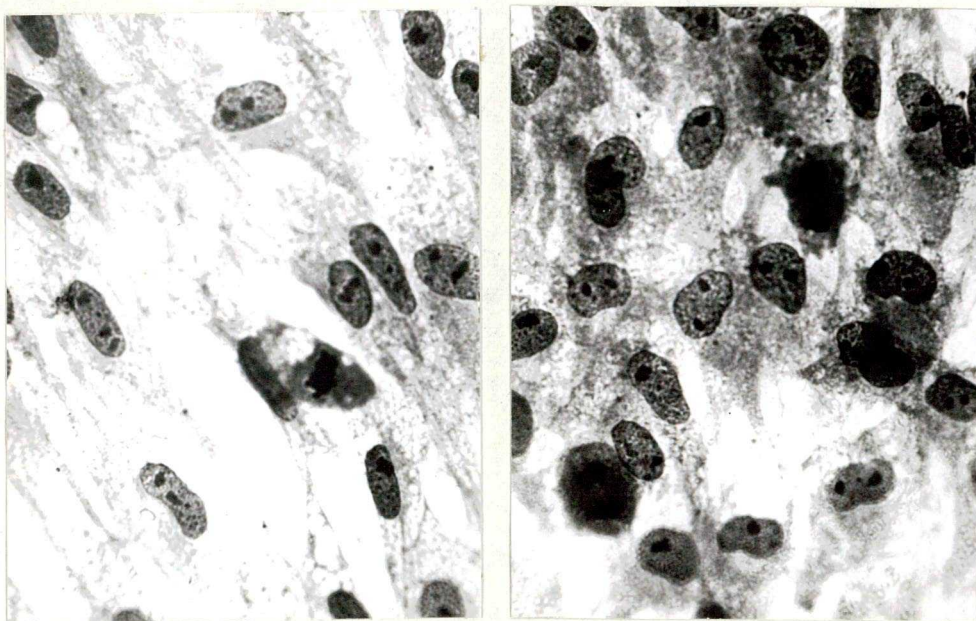
500 γ /ml MM alacsonyabb pH-ju miliőben erős citoplasma vakuolisációt, valamint a citoplasmának a sejtnag közelében való tömörülését hozta létre fibroblast kulturákban /13/a ábra/. A többi sejtféleségen nem jött létre károsodás alacsonyabb pH-ju tápfolyadékokban /15/a és 17/a ábrák/, míg ugyanez a dózis lugosabb környezetben sejtpusztulást, sejtszátozást okozott. /13/b, 15/b, és 17/b ábrák/.

A pH és a MM hatása közötti összefüggés tanulmányozására további vizsgálatokat végeztünk. Mődszert dolgoztunk ki a MM papirkromatográfiás

3. táblázat

Mitózis változások HeLa kulturákban chemotherápiás szerekkel történő kezelés után 24 órával.
A mitózis-számolás 1000-1000 sejtből történt.

A n y a g	Dózis: γ/ml.	Pro- f á z i s m e g o s z l á s a	Meta- f á z i s	Ana- f á z i s	Telo- f á z i s	Normál m i t ó z i s %	Torz m i t ó z i s %	Piknózis %
Kontroll pH 6.6-6.8	-	4	14	1	1	2.0	0.6	0.1
" " 7.2-7.4	-	-	14	-	-	1.4	12.2	-
Mannitmyleran pH 6.8	250	-	1	-	-	0.1	0.4	-
pH 7.2	250	-	4	-	-	0.4	2.0	-
pH 6.6	500	1	8	-	-	0.9	0.6	0.3
pH 7.4	500	-	-	-	-	-	0.1	0.2
Kontroll	-	3	27	5	1	3.6	1.7	0.3
Degranol	5	-	4	-	1	0.5	0.8	1.0
	10	-	-	-	1	0.1	0.3	1.7
	25	-	-	-	-	-	-	16.3

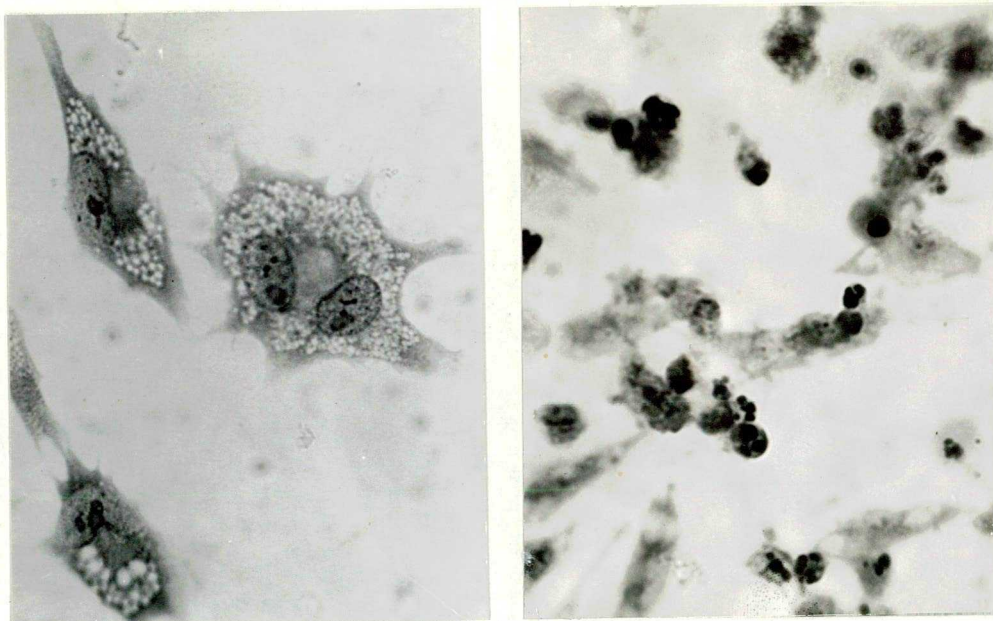


12. ábra

Csirkéembrió szivfibroblast kultúra. Kontroll.
Giemsa festés, 670x

a/ pH 6.9

b/ pH 7.8

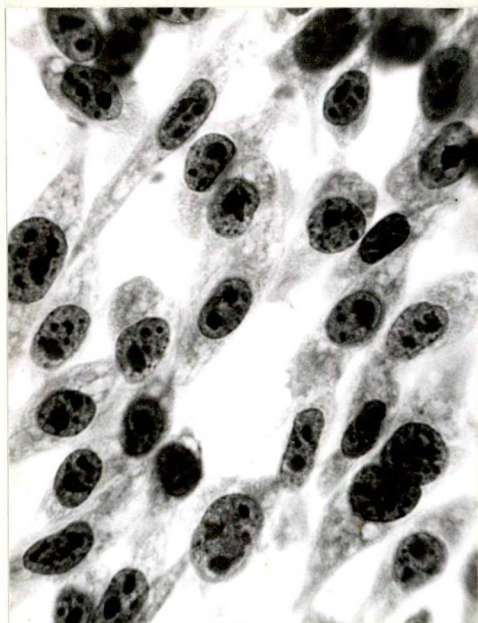


13. ábra

Csirkéembrió szivfibroblast kultúra. 24 órák kezelés
500 γ /ml Mannitmylerannal. Giemsa festés, 670x

a/ pH 7.3

b/ pH 7.7

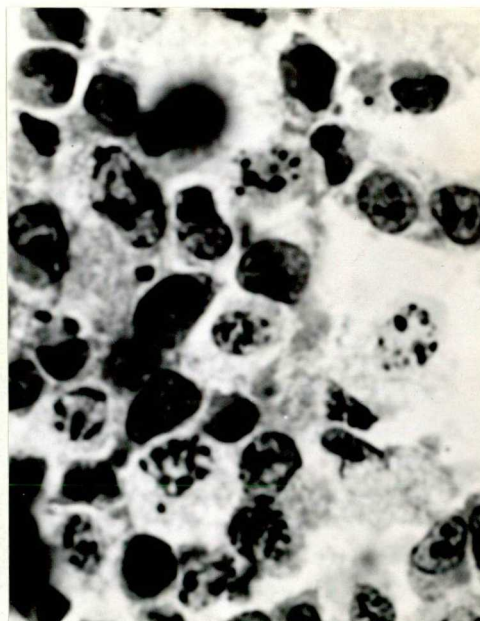
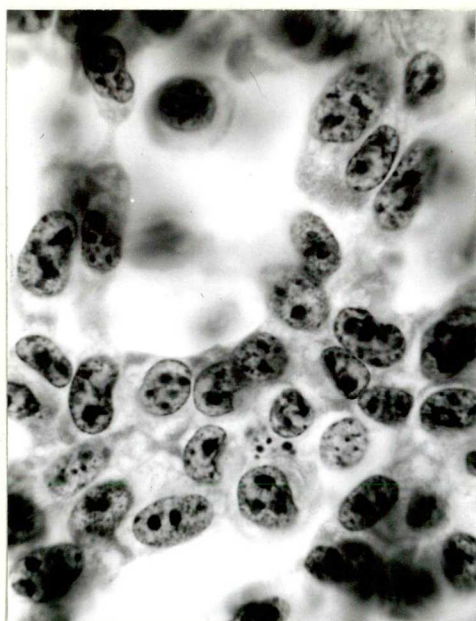


14. ábra

S-180 egérsarcoma kultura. Kontroll. Harris haematoxylin-eosin festés. 670x

a/ pH 7.3

b/ pH 7.9

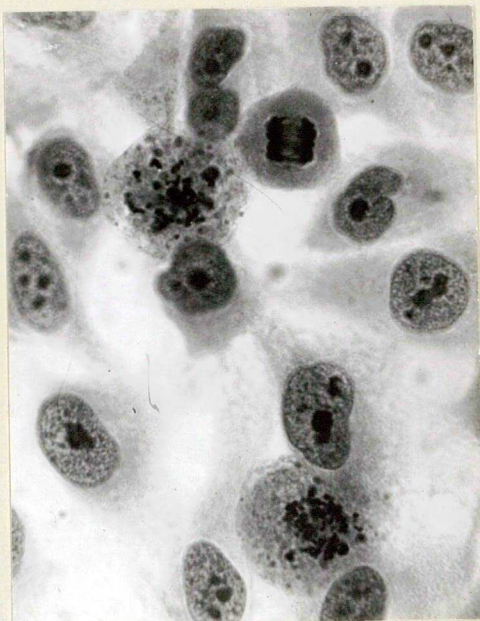


15. ábra

S-180 egérsarcoma kultura. 24 órák kezelés 500 r /ml Hannitaylerannal. Harris haematoxylin-eosin festés.

a/ pH 7.2
670x

b/ pH 7.7
720x



16. ábra

HeLa kultura. Kontroll. Harris haematoxylin-eosin festés. 670x

a/ pH 6.8

b/ pH 7.4



17. ábra

HeLa kultura. 24 órák kezelés 500 γ /ml Mannitmylerennal. Harris haematoxylin-eosin festés. 670x

a/ pH 6.6

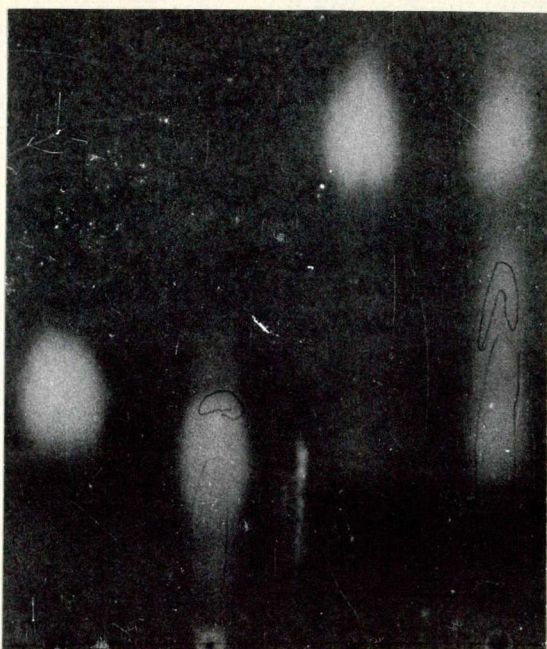
b/ pH 7.4

kimutatására vizes oldatban. /Pálvi, 113/ /18. ábra/ Kiderült, hogy az oldat pH-ja feloldás után gyorsan csökkent /pH 3.0/, és 24 óra múlva 1.8-es értéket ért el. Ezzel párhuzamosan megindult a MM bomlása is, amely jól követhető volt a kromatogramokon. /19. ábra/ A MM teljes lebomlásához 2-3 hét volt szükséges, míg az első két nap alatt a bomlás csakély mértékű volt.

A MM-nal kapcsolatban tett megfigyeléseinket a következőkben összegestük:

- 1./ Lugos milió nem késlelteti a MM bomlását.
- 2./ A MM bomlása lassabb folyamat, mint a pH csökkenése.
- 3./ A milió pH-ja befolyással van a sejtek élettévékenységeire, aktivitására.

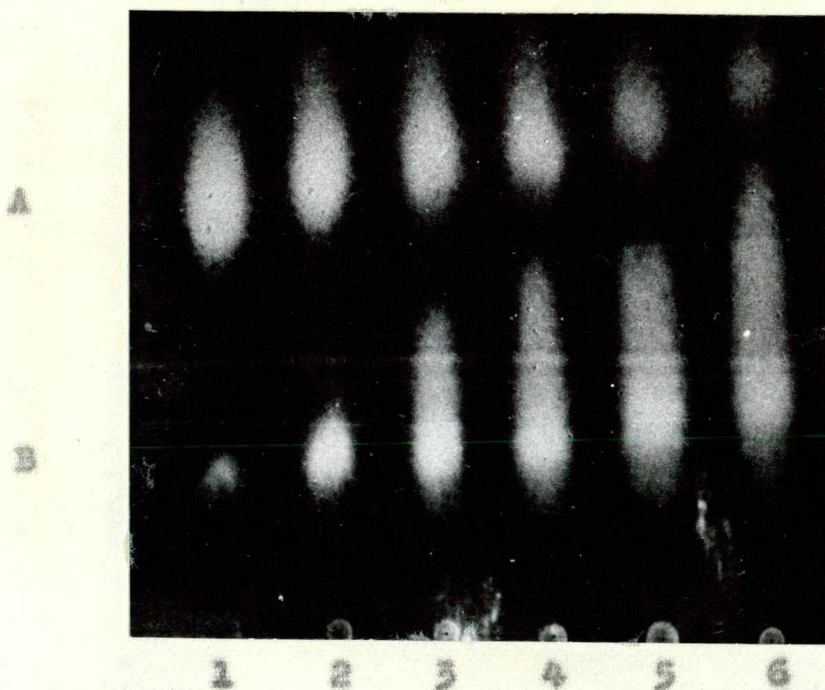
Mind ezekből arra következtettünk, hogy a pH nem a MM bomlására volt befolyással, hanem a sejteknek a szerek iránt tanusított érzékenységre. /Pálvi és Grószai 119/ A lugosabb miliónek a sejttévékenységet fokozó hatását több adat bizonyítja. Megfigyeltük, hogy az aminósavak felvétele intenzívebb volt magasabb pH-nál /Pálvi 115/. Mackenzie és Grószai /79/ azt találták, hogy pH 7,4 és 7,9 között



18. ábra

1 2 3 4

Deganatellenes mannit-származékok kromatogramja. Futató elegy: n-butanol-etanol-víz/4:1:5/. Előhívó: fenolvörös reagens. Felálló rendszer. 1 = mannit; 2 = Degranol; 3 = Mannitayleran; 4 = Mannitayleran, 6 napos oldat. Felvitt mennyiség: 200 γ .



19. ábra

1 2 3 4 5 6

Mannitayleran bomlása vizes oldatban. Futató elegy: n-butanol-etanol-víz/4:1:5/. Előhívó: fenolvörös reagens. Felálló rendszer. A=Mannitayleran; B=Mannitayleran bomlásterméke. 1-friss oldat; 2 - 6 = 1, 2, 4, 7 és 9 napos oldatok. Felvitt mennyiség: 200 γ .

volt legintenzívebb a HeLa sejtek szaporodása és fehérje szintézise. Broda és utai /19/ csirkemagbúrából kócsagsejti kultúrákban 7.5 pH-ja tápfolyadékban kapták a legmagasabb sejtszámot.

Jól ismert az a tény, hogy a citotoxikus szerek elsősorban az aktív anyagcserét folytató, gyorsan szaporodó sejtekre hatnak. Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy magasabb pH-ban a sejtek érzékenyebbek a MM hatására, mivel abban fokosottabb az anyagcseréjük, élettevékenységük. E feltételezésen kívül az is lehetséges, hogy savas környezetben kedvezőtlenebbek a viszonyok a szerek a sejtfalon keresztül történő bejutására. A jelenséget nem tartjuk a MM-re specifikusnak, mivel későbbi megfigyeléseink szerint a sejtek a Degranol iránt is érzékenyebbek magasabb tápfolyadékban, mint alacsonyabb pH-nál.

Egyes szerzők a pH csökkentéséből következtetnek a szer hatásosságára. Ha a sejtek elpusztulnak, megszűnik a savas jellegű anyagcsere termékek keletkezése, s ennek következtében a tápfolyadékban lévő fenolvörös indikátor színe is változatlan marad. Erre alapozták McAllister és utai /81/ az általuk kidolgozott módszert /"Cytotoxic

"Metabolic Inhibition Test"/ chemotherápiás vizsgálatokra. Toplin /142/ viszont a szereket két csoportba sorolta be aszerint, hogy befolyással vannak-e a pH-ra, vagy sem. Ennek alapján pH-aktív és pH-inaktív anyagokat különböztetett meg. Véleményünk szerint a csak pH-változáson alapuló kiértékelés sok hibalehetőséget rejt magában. Ezt bizonyítja a MM-nal kapcsolatos megfigyelésünk is. Ezért igen helyesen állapítja meg Toplin, hogy a főszlyt a morfológiai megfigyelésre kell helyezni.

Különböző in vitro screenelési eljárások összehason-
lítása és értékelése.

A mikrobiológiai objektumokon való screeneléssel kapcsolatban csak egy-két adatot szeretnénk kiegészíteni. Foley és mtsai /41/ összehasonlító vizsgálataikban azt tapasztalták, hogy egyes anyagok, pl. a Colchicin és a Strophantin K, amelyek a "tumoraktív" anyagok közé vannak besorolva, negatív eredményt adtak baktérius-, gomba- és protozoa teszteken. A Colchicin támadáspontja az orsóképződés folyamata metafázisban, amely értéhetővé teszi a fenti negatív eredményt, mivel e

sejtekben ez a mechanizmus hiányzik. De egyben arra is figyelmeztet, hogy az említett objektumok nem alkalmazhatók az ilyen hatású anyagok vizsgálataira.

Az agar-diffúziós technikák egyik hátránya viszont az, hogy egyetlen enzirendszerben mérik le a legkülönbözőbb típusú vegyületek aktivitását.

Herrmann és Gablik /53/ az ún. "virus plaque" agar-diffúziós módszerükkel a Degranolt gyenge hatásának találták csirkeembrió sejtekre, míg olyan hatásos szerek, mint az Aninopterin, Azaserin, és Mustárnitrogén, hatástalanok voltak a módszerrel. DiPaolo és Moore /31/ a Colchicint találta negatívnak agar-módszerrel.

E technikának másik hátránya fizikokémiai jellegű. A kémiaiilag különböző szerkezetű vegyületek eltérő módon diffundálnak az agar-lencsében, s így az in vivo hasonló hatású anyagok igen eltérő eredményeket adhatnak. /4. táblázat/

A szövettényészetben és állatkísérletben nyert eredmények összehasonlítása.

A szövettényészetekben nyert eredmények elsősorban a vegyület toxicitásáról tájékoztatnak.

4. táblázat

Daganatellenes szerek, növényi kivonatok, és gomba ferment-
levek hatása különböző állati daganatokra és in vitro rend-
szerekre

A n y a g o k	In vitro módszerek		E g é r - t u m o r o k			P a t k á n y - t u m o r o k				Nyul- tu.
	Szövet- kultúra	Miya- mura	Grocker /S-180/	Ehrlich	NK/Ly	Guerin	Walker	Yoshida	Shay	Brown- Pearce
Degranol	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+
Mustárnitrogén	+++	++	+	++	++	+	+	+++	+	
Mitomén	+++	-	+++	++		++	+++	+++		
Sarcolysin	+++	+	+	+++	+++	++	+++	+++	+++	+
TEM	+++	+	++	++	++	++	+++	++		
Endoxan	-	-	-	++	++	++	+++	+++	+++	
Myleran	-	-	-	+		+	+++	+		+
Mannitmyleran	++		+	-	+	++	++	++	+++	
E-39	+++	+	+	+	++	++	+++			+
6-Mercaptopurin	-	-	+++	++		+	+			+
Colcemid	+++	+	-	+	+	-		+	+	+
Podophyllin	+++					-			-	
VR-8 /Vinca alk./	+++		+	+++	++	+	+	++	+	
Cnicus	+++				++					
Inula	++				+					
Symphytum	++				+					
Calendula	+				+					
Sedum	-				-					
Beta	+				-					
Conium	-				+					
Cytisus	+++				-					
"1038"	+++	++		+						
"1047"	+++			+++						
"1211"	+	++		+						
"1320"	++	++	+++	-						
"1145"	+	-		+						
"1536"	++	-		+						
"1786"	++	-		+						
"1005"	-	-		-						
"1140"	-	-		-						
"1187"	-	+++		-						
"1066"	++	+++		-						
"1310"	+++	+++		-						
"1812"	+++	+++		-						

- = nincs hatás
+ = csekély hatás

+ = közepes hatás
++ = erős hatás
+++ = igen erős hatás

■ Dózisok: állatkísérletekben: MTD; in vitro: 100 μ /ml

Az esetek többségében párhuzamot figyeltünk meg az in vivo és in vitro eredmények között. Így pl. a Degranol letális dózisa $/LD_{100}/$ kontroll egereken 200 mg/kg /Kellner és Németh 67/. S-150 egérdaganatsejt kulturákon 150-200 μ g/ml koncentrációban figyeltük meg a sejtek teljes pusztulását. A MM-nal ugyancsak megfigyelhető volt bizonyos párhuzam. A minimális efficiens dózis /MED/ a vérkép alapján 50 mg/kg in vivo /68/, és hasonló dózisban figyeltünk meg kezdeti elváltozásokat szövetkultúrákban /pl. mitózisszám csökkenés/. A Degranol egyik újabban előállított származéka állatkísérletben is, szövettenyésztésben is 2 1/2 - 3-szor csökkentebb toxicitást mutat, mint a Degranol.

A daganatellenes hatást már kevésbé lehet ilyen egyértelműen megállapítani az in vitro eredményekből. Eagle és Foley /38/ nagyobb száma hatásos és hatástalan vegyület in vitro aktivitását vizsgálta meg. Az in vivo hatásos vegyületek 79 %-a bizonyult in vitro pozitívnak, 100 μ g/ml koncentrációt véve alapul. /E kiértékelési módszerrel később lesz szó./ Tehát a fals negatív szerek aránya 21 %. A "tumornegatív" vegyületek közül 21 % volt hatásos - fals pozitív - in vitro. Így mind a fals pozitív, mind a fals negatív cso-

port az összes vizsgált vegyületnek mintegy $1/5$ - $1/5$ -ét tette ki. A fals negatív esetek legjellemzőbb példája az Endoxán. Ez a vegyület eredeti formájában hatástalan, a szervezet vagy a daganat enzimelei alakítják át hatásos vegyületté. Szövettenyésztésben még $2500 \gamma/\text{ml}$ dózisban is hatástalannak találtuk. Foley és mtsai /42/ Endoxán-nal kezelt pathányok vérsavójával és májkivonatával citotoxikus hatást mutattak ki. Az említett szerszökkal kb. egyidőben 3 hasonló kísérlet-sorozatot állítottunk be, azonban sejtkárosító hatást szövetkulturákon nem tapasztaltunk. Az in vitro negatív eredmények magyarázata az, hogy a sejtkulturákban nincsenek jelen megfelelő mennyiségben azok az enzimek /foszfatáz, foszfamidáz/, amelyek a szervezetben a szerek hatásos formába való alakítását elvégzik. A Myleron ugyancsak hatástalan volt in vitro, részint oldhatatlansága miatt, részint azért, mert a szervezetben átalakulva fejti ki hatását. Biesele /11/ szerint a szövettenyésztés feladata elsősorban nem a tömeges screenelés, hanem az, hogy egyes szereknek a normális és malignus sejtekre gyakorolt hatását tanulmányozza, a szervezet módosító befolyása nélkül. E megállapítás összefüggésben van azszal, hogy ő elsősorban a tumorsejtre szelektíve ható anyagokat vizsgálta.

Wright és Ntsai /153/ a klinikai és szövettanészetben nyert eredményeket hasonlította össze oly módon, hogy ugyanazon páciens daganatát kezelte in vivo és in vitro. 40 esetből 26-ban /65 %/ jó, 4-ben /10 %/ közepes összefüggés volt, 10 esetben nem volt korreláció. A közelmúltban /154/ 131 esetre vonatkozó megfigyeléseiket közölték, amelyből 66-nál jó, 29-nél közepes összefüggést találtak, a többinél nem észleltek párhuzamot. Véleményünk szerint a módszer alkalmas arra, hogy adott páciens adott tumorjának kezelésére a leghatásosabb gyógyszert válasszák ki. Ugy véljük, hogy a fenti eljárás főleg azon esetekben válhat értékesé, amikor egy bizonyos gyógyszerre rezisztenssé vált daganat ellen egy másik, hatékonyabb szert kell keresnünk, rövid idő alatt. Erre a direkt "klinikai" daganatkutatásra céloztak Dixon és Ntsai /54/, amikor az in vivo és in vitro eredmények közötti összefüggést tárgyalva azt mondták, hogy nem lehet biztosan fals pozitívnek tekinteni egy in vitro hatásos anyagot, ha limitált állattumor-spektrumon, vagy egy klinikai tumorfeleségen hatástalannak bizonyul, mivel ezek a tumorok igen sokféleképpen reagálnak az egyes szerekre. Hasonló gondolatot vetett fel Issokuwa /59/ is, aki szerint az állatkísérletben hatástalan

anyagok között előfordulhatnak olyanok is, amelyek emberi rákra erősen hatékonyak. Véleménye szerint "beteg embereken kell a rák experimentális terápiáját kidolgozni". Wright-ék kísérletei tulajdonképpen ilyen jellegű törekvést jelentenek.

A 4. táblázatban összehasonlítottuk a szövetskultúrákkal nyert eredményeket a Miyamura teszt /Debreceni Orvostudományi Egyetem Gyógyszer-tani Intézete/ és az intézetünkben végzett állatkísérletek eredményeivel /Németh/. Az adatokból kitűnik, hogy a szövettenyészetek eredményei jobban megközelítik az állatkísérleteket, mint az agar-diffúziós módszeré. Másrészt az is látható, hogy egyes hatásos szerekre nem egyformán érzékenyek a különböző daganatfélések.

A szelektív hatás és a sejtspektrum kérdése.

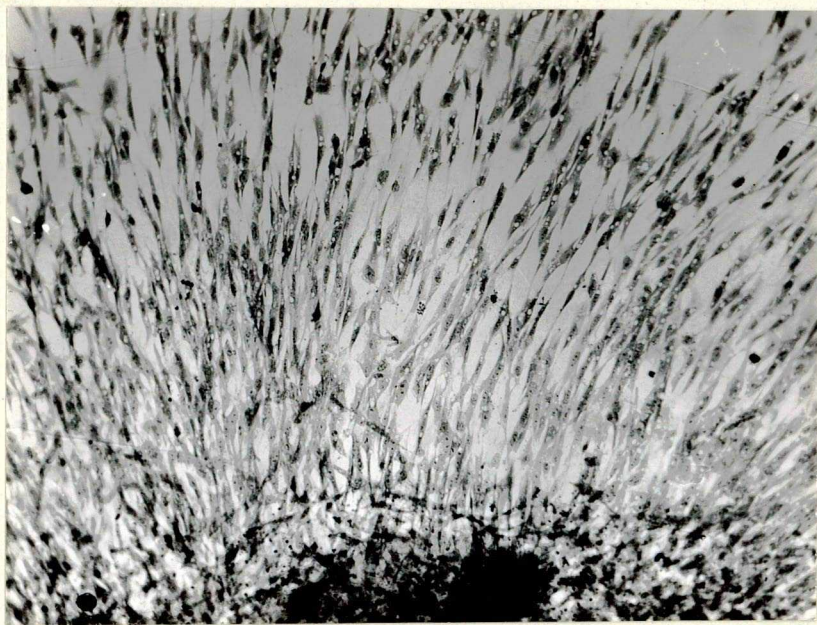
A leggyakrabban felvetődött kérdés a nem szövettenyészési területén dolgozók részéről az szokott lenni, hogy a daganatgátló anyagok csak a tumorsejteket károsítják-e in vitro körülmények között. Az eddigiekből nyilvánvalóvá vált,

hogy a válasz: nem. Mégis, az első chemotherápiás vizsgálatok szövettényészetekben ebből a kézenfekvő alapgondolatból indultak ki. Sőt, a kísérleti megfigyelések is támogatták ezt a feltevést. A legkorábbi megfigyelések Cornman-tól /27,28/ származtak, aki nyers penicillin-oldattal szelektíve el tudta pusztítani a patkánysarcoma sejteket, a normál kötőszöveti sejtek károsodása nélkül. 2-3-szor magasabb dózis azonban a normális sejteket is elpusztította. Cornman kísérleteit a későbbiek folyamán nem tudta megismételni, mivel a nyers penicillin kivonat akkor már nem volt hozzáférhető. Később Cornman és Ormsbee /29/ a Mustárnitrogén szelektív hatásáról számolt be. Biesecke-nek /10/ a szelektív toxicitásra vonatkozó széleskörű vizsgálatai Cornman munkáin alapultak. Ő elsősorban purin- /12, 13/ és triazin- /9/ származékok differenciál toxicitását tanulmányozta. Egyes szereknél a szelektivitás igen szembetűnő volt. Iettre és utai /74/ a purinnak különböző vegyületekkel /histamin, tryptamin, 6-phenyl-alkylaminok stb./ képezett származékait vizsgálták szövetkulturákban; a purylhistamin igen szelektíve károsította a Yoshida patkánysarcoma sejteket in vitro, a normál kötősz-

voti sejtek károsítása nélkül. E vegyületet, valamint néhány újabb szintetizált származékát /puryl-lysin, puryl-arginin/ kérésükre /Bellweg/ mi is megvizsgáltuk. A puryl-histamin iránt a HeLa sejtek nagyobb érzékenységet tanúsítottak, mint a szívfibroblastok. E vegyületek azonban in vivo hatástalannak bizonyultak /Bellweg /3/. Ugy véljük, hogy a vegyületek a szervezetben enzimátikus bomlást szenvedtek, és esáltal váltak hatástalanná.

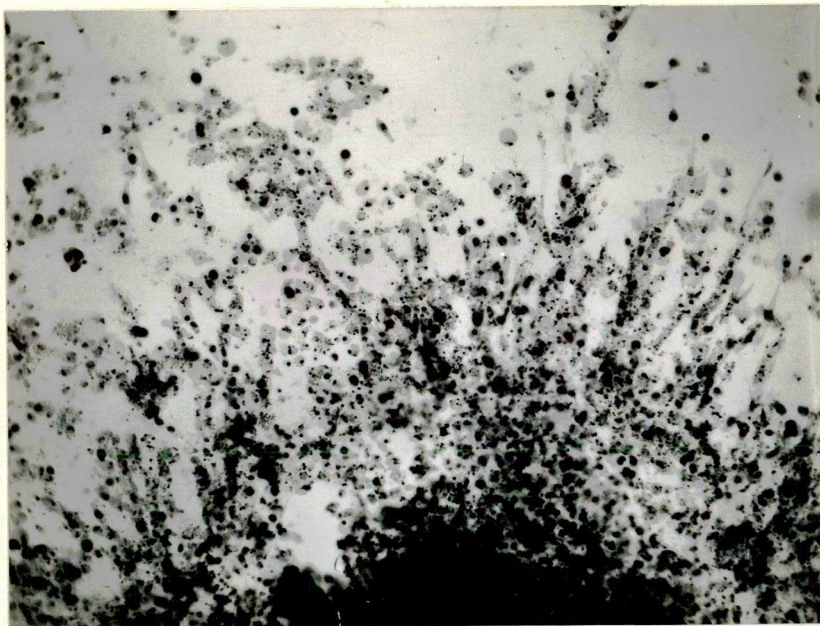
Corman és Orneses /29/ vizsgálataival megegyezően azt tapasztaltuk, hogy az S-180 egér-daganatsejtek érzékenyebbek a Mustárnitrogén iránt, mint a normális sejtek. A TEM 25 γ /ml dózisban nem károsította jelentős mértékben a szívfibroblastokat /20. ábra/, míg az S-180 kultúrák már 20 γ /ml TEM hatására teljesen elpusztultak /21. ábra/. Bieseke /9/ a TEM esetében nem tapasztalt szelektív hatást. A Melphalanra vonatkozólag ugyancsak vannak ilyen irányú megfigyelések. Stubblefield és Hau /140/ szerint a HeLa sejtek fokozottabban érzékenyek a Melphalan iránt, mint a nem malignus sejtek. Saját vizsgálatainkban e megfigyelést megerősítettük. /4. ábra/.

Az említett adatokkal kapcsolatban az a véleményünk, hogy ezek az in vitro megfigyelt "szelektív" hatások elsősorban elméleti jelentősé-



20. ábra

25 γ /ml TMM-nel 24 óráig kezelt csirkeembryó sziv-
fibroblast kultúra. Minimális károsodás.
Giemsa festés. 105x



21. ábra

20 γ /ml TMM-nel 24 óráig kezelt S-180 egérsarcoma
kultúra. A sejtek nagyrésze teljesen elpusztult.
Harris haematoxylin-eosin festés. 105x

gúlek, mivel a szervezetben az anyagok többsége átalakul, és így az in vitro igen szelektív hatású anyagok sem váltják be a hozzájuk fűzött reményeket a klinikumban, vagy az állatkísérletek során /pl. puryl-histamin, 2,6-diaminopurin/.
Másképp a szelektív hatás többnyire csak szűk koncentráció intervallumban érvényes /4. ábra/ /erre Cornagan is utalt, 27, 28/, és csak ritkán fordul elő, hogy a nagy dózisban alkalmazott anyag csak a tumorsejteket károsítsa /pl. puryl-histamin; Lettré és mtsai 74/. A szelektivitás problémája egy másik, szintén gyakran és sokat vitatott kérdéshez vezetett: szükséges-e több sejtféleségen vizsgálni a vegyületek hatását, hasonlóan az állatkísérletek "tumorsepektrum"-ához? Hilwig /54/ 7 sejtféleséget alkalmazott vizsgálataihoz. Kérdés, hogy arányban van-e a befektetett munka a várható eredményekkel. Szövet-tenyészetben egyrészt direkt citotoxikus hatást vizsgálunk /Bieseke 11/, másrészt - mint láttuk - az in vitro szelektív hatás nem bír különösebb gyakorlati jelentőséggel. Ezek alapján az a véleményünk alakult ki, hogy a több sejtféleség alkalmazása a tömeges vizsgálatokhoz, előkísérletekhez felesleges. Ezzel az a kérdés is eldőlt, hogy csak friss

explantátumon érdemes-e a kísérleteket végezni, mivel a sejtek a tartós tenyésztés folyamán megváltoznak /transzformálódnak, malignizálódnak, stb./, és így eredeti jellegük, valamint a szer iránt mutatott reakciójuk is megváltozik. E kérdést Foley és Eagle /40/ tanulmányozta, különböző frissen explantált és permanens normál és malignus sejtféleségen. Vizsgálataikból kiderült, hogy az összes sejtféleség megközelítőleg azonos érzékenységet tanúsított a kipróbált 19 vegyülettel szemben. Mindezek alapján egyetlen sejtféleség is elegendőnek látszik a chemotherápiás screenelési vizsgálatokhoz. Toplin /142/, valamint Hitta /98 - 101/ csak HeLa törzsen végzik kísérleteiket. Az amerikai CCNC 1959-ben ugyancsak egyetlen sejttörzset írt elő in vitro screeneléshez /21/. Ez utóbbi eljárás esetében, amelyet Eagle és Foley /37/ dolgozott ki, a sejtek fehérjesszintézisének gátlása alapján méri le a szerek hatásosságát. ID_{50} -nel /"inhibition dose 50"/ jelölik azt a szerkoncentrációt, amelynél a kezelt kulturák fehérjesszintézise 50 %-kal csökkent a kontrolléhoz képest. E módszerrel értékelve, azokat a szereket sorolják a "pozitív" csoportba, amelyek ID_{50} -je 100 γ /ml, vagy az alatt van.

Dixon és munkatársai /54/ szerint 10 γ /ml Deg-raxol 33 K-os fehérjesszintézis-gátlást idézett elő KB-sejtkultúrákban. Leiter és utasai /73/ 1962-ben 1400 vegyület in vitro screenelési eredményéről számoltak be.

Az utóbbi 10 évben rátertek az egyetlen sejtféleségen történő vizsgálatra /Hela/. Jelenleg szintetikus gyári preparátumok, valamint növényi hatóanyagok sejthárosító, citológiai hatását tanulmányozzuk. A növényi kivonatok daganatellenes hatásának a tanulmányozása világszerte egyre inkább az érdeklődés homlokterébe került /51, 72, 85-88, 141/. Intézetünkben az in vitro vizsgálatokkal párhuzamosan folyik a növényi extraktumoknak állatkísérletekben történő kipróbálása /96/.

Eddigi tapasztalataink alapján az az álláspontunk alakult ki, hogy a szövettenyésztő módszer legeredményesebben a természetes eredetű anyagok /növényi kivonatok, antibiotikumok/ kipróbálása folyamán használható fel. Az elmúlt években új daganatellenes antibiotikumok kutatása során /60/ a hatóanyagok frakcionálása a szövettenyésztéseken kapott eredmények alapján történt. A hatóanyagok izolálása folyamán kapott számos

frakció kipróbálása állatkísérletben szinte lehetetlen. A szövetszövetekkel történő vizsgálatokban 24 óra belül értékeltük ki a hatást, és a hatásos frakcióval szinte idővesztés nélkül lehetett tovább dolgozni. Ily módon egyre hatékonyabb és tisztább preparátumhoz jutottunk. Időnként egy-egy állatkísérleti kipróbálással történt a hatóanyagot egyre koncentráltabban tartalmazó frakció ellenőrzése. A szövettényező vizsgálatok jól kiegészítették az állatkísérleteket, és segítségével rövidebb idő alatt lehetett eredményhez jutni.

Aminósav- és purin-anyagcsere vizsgálatok normális
és malignus sejtkultúrákban.

Az elméleti daganatkutatás egyik főterü-
vése a nem-malignus és malignus sejtek között
fennálló biokémiai /táplálkozásbeli, anyagcsere,
stb./ különbségek felderítése. Ez hozzásegít a
malignitás közelebbi meghatározásához, másrészt
a gyakorlat számára is segítséget nyújt. Johnson
/61/ szerint a táplálkozásbeli különbségek ismer-
ete a chemotherápis logikusabb megközelítéséhez
vezethet. Bennett és Mitsai /7/ a normális és da-
ganatsejtek között fennálló különbségeket kutat-
va, kísérleteik célját így fogalmazták meg:

"...to search for biochemical differences between
normal and neoplastic cells which might suggest
means of preferentially inhibiting growth of neo-
plastic cells." Lehetséges, hogy világosabbá vál-
nák az a kérdés is, miért tenusítanak a malignus
sejtek fokozottabb érzékenységet egyes daganatgát-
ló szerekkel szemben. A chemotherápiás vizsgálata-
ink során végzett megfigyeléseink, mint pl. a sze-
lektív hatás, a különböző típusú sejtkárosodások
stb., arra késztették bennünket, hogy összehe-
szelítő vizsgálatokban tanulmányozzuk a normális

és daganatsejtek aminosav- és purin anyagcserejét.

A szintetikus tápfolyadékok kidolgozásával lehetővé vált a különböző sejtféleségek aminosav igényének pontos meghatározása, kontrollált körülmények között /Eagle 36, Morgan 92/. A vizsgálatok többsége permanens sejttörzseken történt, amelyek részint malignus eredetű, részint normális szövetből származó, de a tartós tenyésztés folyamán transzformálódott sejtek voltak. A sejteket általában szemisintetikus tápfolyadékokban tenyésztették, amely ismert komponenseken /aminósavak, purinbázisok, stb./ kívül ismeretlen faktort, többnyire szérumot is tartalmazott. Viaszonylag kevés vizsgálat történt frissen explantált sejteken, ismert összetételű, szintetikus tápfolyadékokban. Ez utóbbiak közül Paolika és utazai /106-109/ vizsgálatait emlitem meg, akik frissen explantált csirkeembrió szív-, máj- és vesesejtek, valamint májvesesejtek aminosav anyagcserejét tanulmányozták, és hasonlították össze permanens malignus sejttörzsek anyagcserejével. Megállapították /105/, hogy a normális és neoplasztikus sejtek glutamin anyagcséréje között bizonyos

különbség mutatható ki. Frissen explantált daganatsejtek aminósav igényét McCoy és mtsai /83-84/ tanulmányozták sziniszintetikus módjában.

Az előbb ismertetendő vizsgálataink során frissen explantált normális és malignus sejtek és egy permanens, malignus eredetű sejttörzs aminósav anyagcserejét tanulmányoztuk, és hasonlítottuk össze egymással, szintetikus tápfolyadékot alkalmazva a kísérletek folyamán. E vizsgálatainkról már részben beszámoltunk, /111, 114/ másrészt az eredmények publikálása folyamatban van /115/.

Anyag és módszer.

A vizsgált sejtfölcsögek a következők voltak:

Frissen explantált normális sejtek:

- 1./ Csirkesebryó szívfibroblast,
- 2./ Csirkesebryó vázgyoblast



Frissen explantált daganatsejtek:

- 3./ S-189 /Crocker/ egérsarcoma
- 4./ ENG egérsarcoma
- 5./ Ehrlich-Lettre egércarcinoma
- 6./ HK/Ly egérlymphoma /Németh és Kellner 95/

Permanens daganatsejttörzs:

- 7./ HeLa emberi epidermoid cervix carcinoma
/Gey és mtsai 45/.

Tenyésztési metodika

1./ Csirkembryó szívfibroblastok:

A tenyésztést a Pasicka és mtsai /106, 107/ által leírt módszer alapján, de annak bizonyos módosításával végeztük. A 8-11 napos csirkembryókból származó szíveket vájt tárgylemezen gyűjtöttük össze, Hanks-oldattal lebbelítettük a vért és a rátapadt szívettrmeléket, majd görbe ollóval kb. $1-2 \text{ mm}^3$ -es darabkákká vágtuk. Ujabb öblítés után a szív- és szövetdarabkákat Pasteur-pipetta segítségével tenyésztő edényekbe osztottuk szét. Az edények "Rasotherm" üvegből készültek, alapterületük kb. 25 cm^2 . A szív- és szövetdarabkák $1/2 - 1$ óra alatt az üveg felületéhez tapadtak. Ekkor $3-3 \text{ ml}$ M-199 szintetikus tápfo-

lyadékokat /Morgan és mtsai 93/ mértünk mindegyik edénybe, amely vékony rétegben lepte el a szövetharabkákat. Ezután az edények 37°C -os termosztátba kerültek.

2./ Csirkesebryó vázgyöblasztok.

8-11 napos csirkesebryók mell- és combizsírját összegyűjtöttük, Hanks-oldattal átmostuk, és apró darabkákra vágtuk. Ezután 0.25 % tripszinoldatba vittük át a szöveteiket. A tripszinezés Erlenmeyer lombikban 37°C -on történt. A lombikot időnként rázogattuk, hogy a sejtek szétválását elősegítsük. A levált sejteket tartalmazó folyadékot 5-10 percenként lecsívtuk, és jégsezekrénybe helyeztük, a szövetharabkákra pedig ismét friss tripszin-oldatot mértünk. Az eljárás befejezésével az összegyűjtött sejteket lecentrifugáltuk, a felülussót elöntöttük, és a sejteket Hanks-oldattal mostuk, hogy a tripszint eltávolítsuk. Kétszeri mosás és centrifugálás után a sejteket M-199 tápfolyadékban reszuspendáltuk, majd tenyésztő edényekbe osztottuk szét. A kulturák egy részének a tápfolyadékába polivinylpyrrolidint /Periston-3, Bayer/ tettünk, 0.6 % véghígításban.

3./ Embriónatsejtek.

Mind a négy sejtféleség explantálása és te-

nyésztése azonos módon történt. A sejtek átoltatása után 7-8 nappal 1-2 ml ascitesnedvet szívunk le steril fecskendővel az egerek hasából, 20-30 ml Hanks-oldattal átmostuk és lecentrifugáltuk /2x ismételve/. Utána a sejteket M-199 tápfolyadékban reszuszpendáltuk, majd a sejtszuszpenziót tenyésztő edényekbe osztottuk szét és 37 °C-on inkubáltuk.

4./ Hela sejtek.

A Hela sejtterzetet nagyobb, 150-200 ml-es tenyésztő edényekben tartottuk fenn, 30-40 % embriósavót tartalmazó Hanks-oldatban. A kísérletekhez a sejteket üvegkaparó segítségével, a frissen váltott médiumba kapartuk bele az üveg felületéről, majd kisebb tenyésztő edényekbe vittük át, amelyekben néhány nap alatt összefüggő sejtréteg alakult ki. Ekkor a régi tápfolyadékot leöntöttük, a sejteket Hanks-oldattal alaposan leöblítettük, és 3-5 ml M-199 tápfolyadékot mérünk az edényekbe.

Az embrionális sejtek tápfolyadékát 4-5 naponként váltottuk. A daganatsejteket 2-3 napig tenyésztettük a tápfolyadékban, utána a kultúrát eldobtuk, mivel a sejtek hamarosan elpusztultak.

A tápfolyadékok összetételében bekövetkezett változásokat Papicka és mtsai /106/ papirkromatográfiás módszerével, annak csekély módosításával analizáltuk.

Kromatográfiás eljárások.

A tényészetekről összegyűjtött tápfolyadékokat lecentrifugáltuk, majd 2-2 ml-t órálvagon, infralámpa segítségével, levegőáramban bepároltunk. Az anyagokat 0.2 - 0.2 ml kétszer desztillált vízben vettük fel, és 10- illetve 20 μ l-nyi mennyiségeket vittünk fel Schleicher-Schüll 2043 b kromatográfiás papírra. A futtató elegy a következő módon készült: 55 ml n.-butanol-t választó telcsérben vízzel telítettünk, majd a vízréteg eltávolítása után 15 ml koncentrált ecetsavat adtunk az elegyhez. Néhány alkalommal 2-dimenziós kromatogramot is készítettünk. Ehhez másik futtatóként vízzel telített fenolt használtunk.

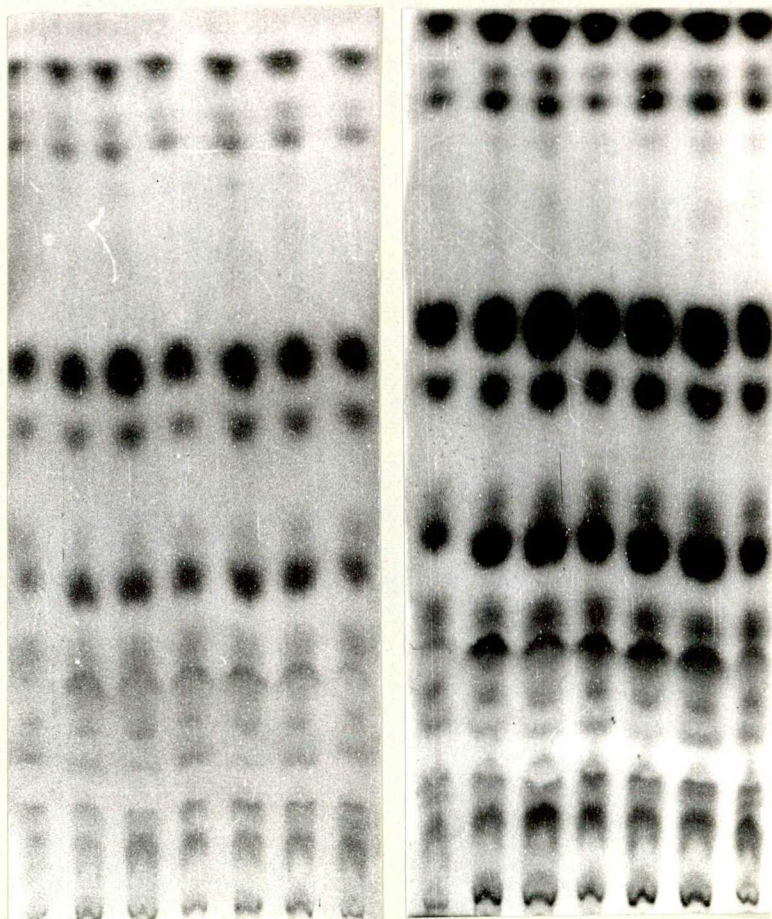
Mivel a tápfolyadék sokat is tartalmazott, amelyek zavarták a kiértékelést, különböző módszerekkel próbáltuk ezeket eltávolítani. A különböző oldatok alkalmazása /ecetsavas alkohol, ammóniás metanol, butanol, stb./ a bepárolt anyag

feloldására nem adott kielégítő eredményt. Ezért megpróbáltuk az elektrodialízis módszerrel is, amellyel sikerült a sók tekintélyes részét eltávolítani. Ezt az eljárást azonban az arginin bomlása miatt nem lehetett rendszeresen alkalmazni.

A futtatásokat lezáruló rendszerben végeztük. A foltok jobb szétválasztása érdekében 3-4-szer futtattunk egymás után, és a papírokat minden egyes futtatás után megszárítottuk.

Az aminosavak kimutatására az általánosan használt ninhydrin eljárás /0.5 % acetóban, vagy butanolban oldva/ mellett isatint /135/ is használtunk /0.4 % acetóban, vagy butanol: ecetsav = 96:4 oldatban/. Ez utóbbi eljárást a következőképpen módosítottuk: a kromatogramokat 3-szor egymásután mártottuk be az isatin-oldatba és szárítottuk meg, majd 100-110 °C-on előhívtuk. Ezt követőleg forró paraffinon húztuk át a papírokat, aminek következtében a foltok sokkal intenzívebbé váltak, és sokkal később halványodtak el, mint a nem-paraffinosított papírok /22. ábra/.

Néhány esetben speciális reakciót is al-



22. ábra

Izatinnal előhívott aminosav kromatogramok
 a/ paraffinozás nélkül b/ paraffinozással



23. ábra

11 napos élő csirkeembryó szívfibroblast kultúra
 M-199 tápfolyadékban. Középen ana- és telofázis
 figyelhető meg. Kb. 60x

kalmastunk, így pl. az Ehrlich és Pauly reakciót a gyűrűs aminosavakra /tyrosin, histidin, tryptophan/, a Sakaguchi /8-oxychinolin/ reakciót argininre. Az aminosavak alacsony koncentrációja miatt azonban nem kaptunk kielégítő eredményt.

A nukleinsav bázisok előhívására a bromfenolkék - ezüstnitrát tartalmú Wood-féle reagensen kívül/152/ még néhány egyéb eljárást is kipróbáltunk. Ezek közül a Reguera /126/ módszere vált be legjobban. Ő ezüstnitrát-káliumbikromát tartalmú reagenset használt. A Wood reagenssel előhívott kromatogramokat napfény hatásának tettük ki. Ezáltal a foltok jobban értékelhetőkké váltak. A fenti eljárásokat még U.V. fényben történő vizsgálattal egészítettük ki.

Az aminosavak és nukleinsav bázisok azonosítása modellanyagok egyedi futtatásával történt. A kísérleti anyagok kontrolljaként a nem-használt tápfolyadék szolgált. A foltok kvantitatív kiértékelését megpróbáltuk fotócellás papírcsíkkiértékelő berendezéssel is elvégezni /MTA Biokémiai Intézet/, de a műszer számos hibalehetősége miatt ettől el kellett tekintenünk. Ezért a Pasiéka által alkalmazott vizuális módszerrel értékeltük ki az eredményeket. A foltok csökkenése, halványodása az illető anyagnak a fel-

használatát, felvételt, növekedése pedig a sejtekből történő leadását jelentette. A csökkenést x, xx és xxx, a növekedést +, ++ és +++ - fokozatokkal jelöltük. Az első fokozatnál enyhébb, vagy két fokozat közötti változás esetén zárójel-t használtunk /pl. /+/, x/x/, stb./.

Kísérleti eredmények és azok megbeszélése.

Morfológiai megfigyelések:

A csirkembryó szívfibroblast kultúrákban az anyaszövetből kinövő új sejtek néhány nap alatt összefüggő sejtréteget alakítottak. A sejtek megjelenése szabályos, orsóalaku volt. A citoplasma sem szemcséket, sem vakuolákat nem tartalmazott. Mitózisok gyakran megfigyelhetők voltak /23. ábra/. 3-4 hét után a sejtek fokozatosan degenerálódni kezdtek, majd egyre több sejt szakadt le az üveg felületéről.

A tripszinezett vázmyoblastok morfológiája kevésbé volt szabályos. A citoplasma keskeny szegély formájában vette körül a sejtmagot, és igen finom, vékony nyulványokban végződött

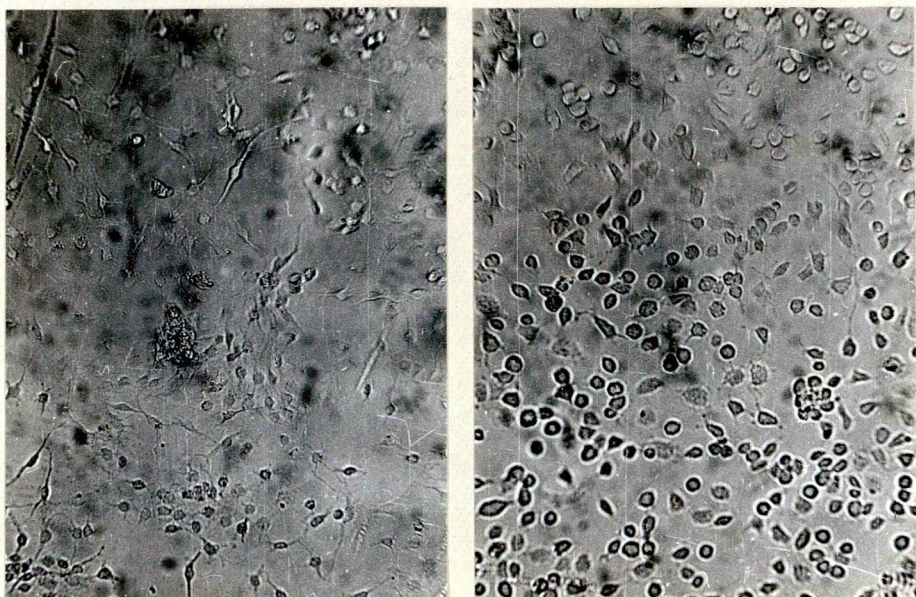
/24/a ábra/. Azok a kulturák, amelyek tápfolyadékába 0.6 % polyvinyl-pyrrolidint /PVP/ tettünk, sokkal kedvezőbb képet mutattak. A sejtek citoplasmájának térfogata megnőtt, a vékony sejtnyulványok redukálódtak /24/b ábra/.

A HeLa sejtek morfológiája bizonyos változást szenvedett a szérumszentes milióba való átvitel után. A sejtek konturja egyre élesebbé vált, a sejtek lassan poligonális formát vettek fel, majd az összefüggő sejtréteg is fellazult. A mitózisaktivitás az első 24 órában még intenzív volt, majd fokozatosan csökkenni kezdett /25. ábra/. Ezzel párhuzamosan egyre több piknotikus sejt jelent meg, amelyek később leváltak az üveg felületéről.

Az egéraszcitos sejtek sűrű rétegben tapadtak az üvegfelületre, míg egy részük a tápfolyadékban lebegett. Osztódó alakot nem figyeltünk meg.

Az aminosavak hasznosítására vonatkozó megfigyelések:

Az aminosavak mennyisége a tápfolyadékban nőhet, csökkenhet, vagy változatlan maradhat a tenyésztés folyamán. Vizsgálatainkban a két előbbi esettel foglalkoztunk. A különböző sejtek aminosav hasznosítását az 5. táblázat tünteti fel. Minden

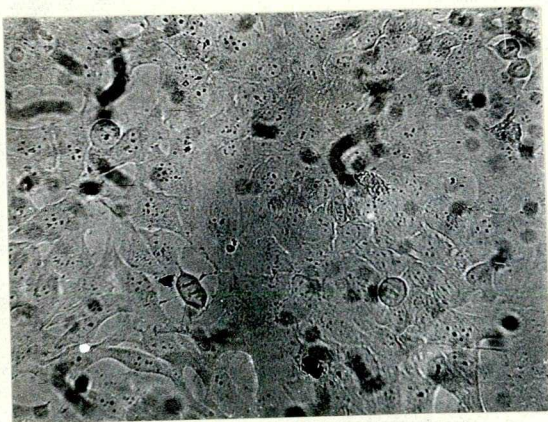


24. ábra

K16 csirkeembrió vázanyoblastok M-199 tápfolyadékban.
14 napos tenyésztet, 2 nappal a tápfolyadékesére után.
Kb. 60x

a/ kontroll

b/ 0,5 % polyvinyl-
pyrrolidin



25. ábra

K16 HeLa sejtek M-199 tápfolyadékban. 1 napos tenyész-
tet. A képen több sejtosztódás figyelhető meg.
Kb. 60x

5. táblázat

Normális és daganat sejtek aminosav hasznosítása szövettenyésztésben

Aminosavak	Normális sejtek			Daganat sejtek				
	Sziv-fibroblast	Vázmyoblast PVP nélkül	PVP-vel	HeLa	NK/Ly	Ehrlich	ENG	S-180
cystin	xxx	x	xx	xx	xx	xx	xx	xx
arginin	o	o	o	o , x	xx	xxx	xxx	xxx
glutamin	xxx	x	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
asparaginsav	x	o	xx	xx	xx	x	x	xx
glycin	x	o	x	o	+	+	+	+
glutaminsav	x , +	x	xx	++	x	x	o	x
alanin	++	+	x	x	xx	x	x	xx
prolin	xx , +	+	xx	x	xx	xxx	xx	xx
methionin	x , +	+	xx	xx	xx	x	x	xx
valin	x	x	xx	x	xxx	xx	xx	xxx
phenylalanin	x	x	xx	x	xx	xx	xx	xx
/iso/leucin	x	o	xx	x	xx	xx	xx	xx

x = aminosav csökkenés a tápfolyadékban o = nincs változás

+ = aminosav növekedés a tápfolyadékban

PVP = polyvinyl-pyrrolidin / 0.6 % /

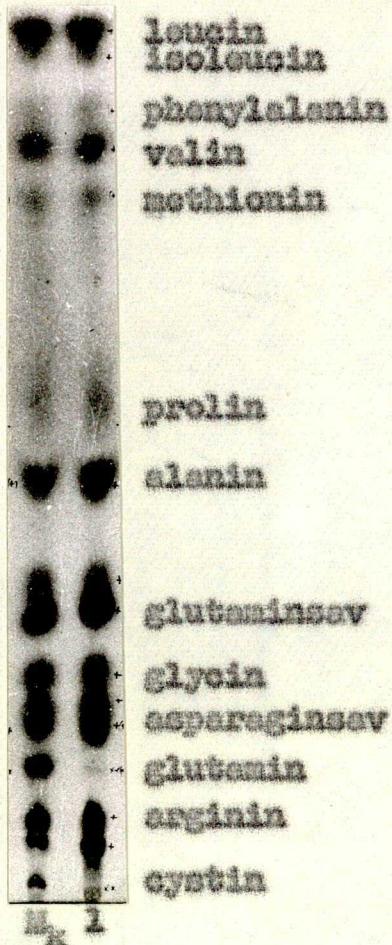
sejttípus hasonlította a cystint, glutamint, asparaginsavat, valint, phenylalanint, leucint és isoleucint. A szerzők többsége egyetért abban, hogy a glutaminnak mind a normális, mind a malignus sejtek táplálkozásában, növekedésében fontos szerepe van. Fischer /59/ a csirkeembryó szívfibroblastok, Biggers és mtsai /15/ embryonális csirke-, egér- és patkány szervkulturák, Westfall és mtsai /147/ egérmáj-parenchyma sejttörzsek növekedésében betöltött fontos szerepét mutatták ki. Lucy és Kinnaldini /78/ csirkeembryó vázmyoblastok tápfolyadékában a glutamin csökkenéséről számolt be. McCarty /82/, valamint Sinclair és Lealie /136/ összehasonlító aminosav-anyagszere vizsgálatokban normális és malignus sejttörzsek glutamin-felvételét figyelték meg.

E vizsgálatokkal ellentétben Fazleka és mtsai /106, 107, 109/ azt találták, hogy frissen explantált, anyassövettel rendelkező normális sejtek növelik, míg emberi malignus sejttörzsek csökkentik a tápfolyadék glutamin-tartalmát a tenyésztés folyamán. Szerintük /105/ ez az eltérés anyagcsere-különbséget jelenthet normális és malignus sejtek között. Gothoskar és mtsai /47/ a glutaminnak a szintetikus médiumból való kihagyásával a

csirke szívfibroblast kulturák túlélésének meghosszabbodását és fokozottabb növekedését figyelték meg. E sejtekben glutamin-aszintetáz aktivitást mutattak ki /Gothoskar és mtsai 47/, amely valószínűleg a glutaminsavat glutaminná alakította. Szerintük lehetséges, hogy a tápfolyadék glutamin-többlete ezen enzim aktivitásának a következménye.

Bigners /14/ csirkeembryó szervkulturákban lényegesnek találta a glutamint a növekedéshez, és nem tartotta valószínűnek a glutamin képződését a glutaminsavból. Sinclair és Leslie /136/, Pasieka megfigyelésével kapcsolatban, a glutamin-többlet forrásként a sejtautolízis lehetőségét vetette fel.

Saját vizsgálatainkban a glutaminnak mind a normális, mind a malignus sejtek részéről történő intenzív felvételét figyeltük meg /26. és 27. ábra/. Az autolízis vizsgálata céljából Hanks-oldatban inkubáltunk szívfibroblast kulturákat, de glutamin-felsszaporodást nem tapasztaltunk. Mivel Pasieka módszere nem biztosította a glutamin-folt jó elválását, és ezáltal a kiértékelés sem volt megbízható, 3 - 4 hetes futtató oldatot alkalmaztunk, amellyel a glutamin-folt teljes szeparálódását sikerült elérnünk /26. ábra/. Vizsgálataink alapján nem tudtuk megerősíteni Pasieka és mtsai

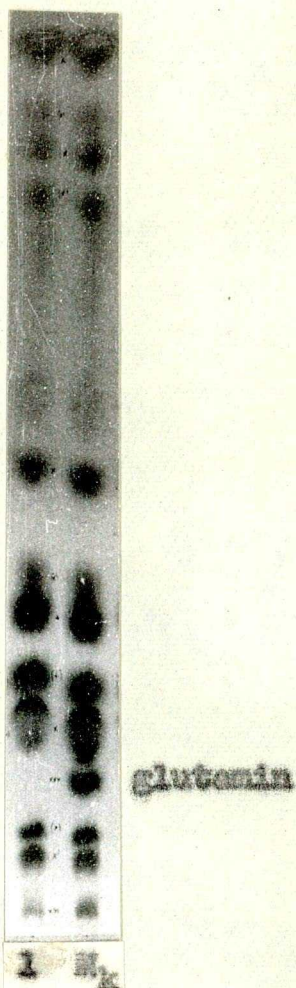


26. ábra

Csirkeembryó szívfibroblastok
aminósav hasznosítása. M_k =
tápfolyadék kontroll; 1 = 3
napos tenyésztet, 3 nappal a
tápfolyadékcseré után. Nin-
hydrin reakció.

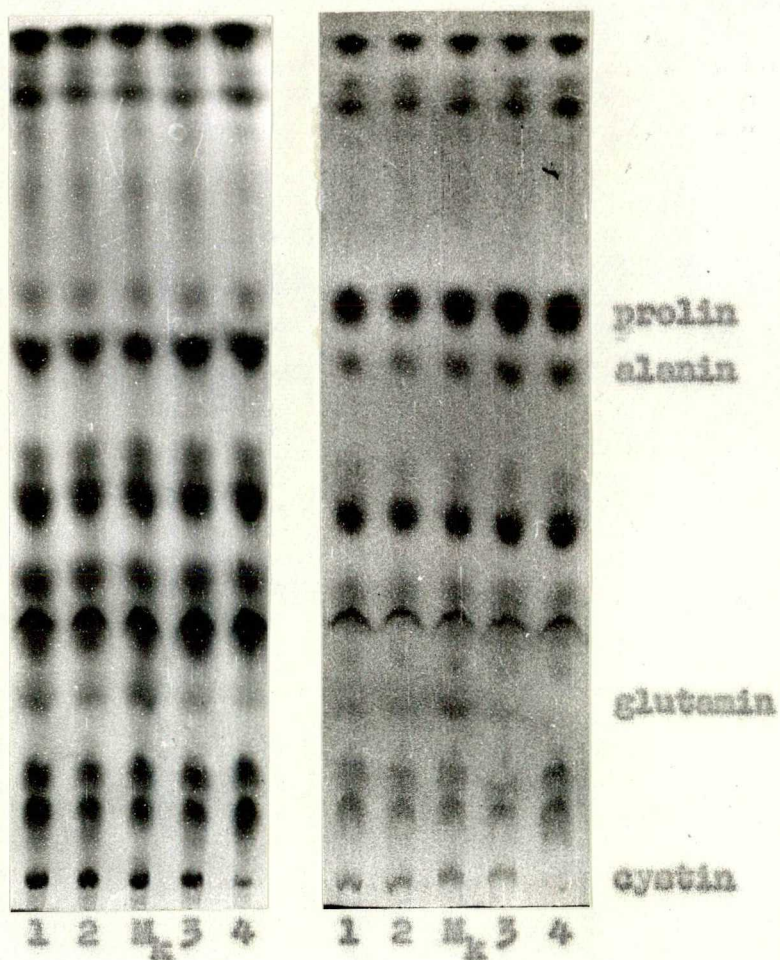
27. ábra

Hela sejtek aminósav hasz-
nosítása. M_k = tápfolyadék
kontroll; 1 = 3 napos te-
nyésztet. Ninhydrin reakció.



megállapítását a malignus és non-malignus sejtek közötti glutamin-anyagcsere különbségre vonatkozólag. Egyetértünk Udenfriend és utasai /145/ azon megállapításával, amely szerint Pasieka megfigyelése nagyobb valószínűségű, ha nem állna fenn az a tény, hogy az összes malignus sejt emberi, és csaknem az összes non-malignus sejt állati eredetű.

A nyoblastok cystin-felvétele csak a 12. nap után vált intenzívvé. A glutamin hasznosítása egyenletesen fokosódott a 15. napig /28/a ábra/. Az alanin- és prolin-leadás a 7. napig csökkent, majd egyre fokosódott /28/b ábra/. 0.6 % FVP jelenlétében egyrészt fokosódott az aminosavak hasznosítása, másrészt, az alanin és prolin leadása helyett azok intenzív felvétele volt megfigyelhető. Katsuta és Takaka /66/ a normális és malignus sejtek makromolekuláris igényét tanulmányozva, különbség - a sejttáplálkozás szempontjából később - ériás molekulákkal /FVP, dextran, alginseav/ szupplementálta a tápfolyadékot. Megállapították, hogy a magasabb molekulásulyu FVP /molsuly = 700.000/ 0.1 % koncentrációban adva a szintetikus tápfolyadékhoz, 99.5 %-ban tudta a szérumfehérjéket helyettesíteni. Ez arra utal, hogy a szérumfehérjéknek a szerepe inkább fizikokémiai, mint táplálkozásbeli.



28. ábra

Tripaszinezett csirkeembrió vázagyoblastok aminosav hasznosítása. M_k = tápfolyadék kontroll. 1, 2, 3 és 4 = 1, 7, 12 és 15 napos tenyészetek 1, 6, 5 és 4 nappal a tápfolyadékcseré után.

a/ Ninhydrin
reakció

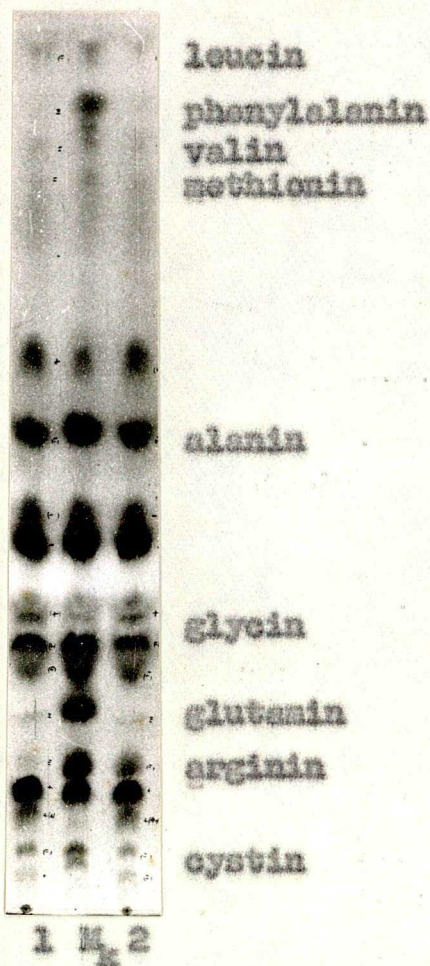
b/ Ixatin
reakció

A HeLa sejtek tápfolyadékában a glutamin csökkenésével párhuzamosan nőtt a glutaminsav mennyisége /27. ábra/. Levintov és mtsai /75/ jelzett aminosavakkal végzett vizsgálataikban kimutatták, hogy HeLa sejtek tenyészeiben a glutamin C-váza a fehérje glutaminsav-, asparaginsav- és prolin-residuumába épült be. Valószínű, hogy a sejtek a glutamint először glutaminsavvá alakították, amely részt vesz a prolin és asparaginsav bioszintézisében. Williams és Hanson /151/ HeLa sejtek mitokondriumában egy glutamináz-t mutatott ki, amely a glutamint glutaminsavvá és ammóniává alakítja. Ezen megfigyelések alapján feltételezték, hogy a glutaminsav-többlet a glutamin egy részének átalakulásából származott. A glutamin egyéb folyamatokban is részt vesz. Bam és Popp /4/ megállapította, hogy a glutamin Ehrlich ascites sejtekben transzaminációs reakciókon keresztül részben glutaminsavvá, részben alfa-ketoglutársavvá alakul. A transzaminációs reakciók Barban és Schulze /6/ szerint igen általánosak szövetkultúrákban is. A glutamin általános jelentőségét Roberts és Simonsen /129/ így fejezte ki: "...glutamine is truly essential for intracellular processes in all cells."

Az arginin hasznosítása tekintetében je-

lényes különbséget tapasztaltunk az embrionális és a malignus sejtek között. Az egérdaganatsejtek többségének tápfolyadékából gyakorlatilag eltűnt az arginin a tenyésztés folyamán /29. és 30. ábra/. A daganatsejtek fokozott arginin-igényét számos szerző megfigyelte. Starbuck és Busch /139/ vizsgálatai szerint a daganatsejtek fokozottabban inkorporálták az arginint a megfehérjékbe, mint a normális sejtek. Kieler /70/ az arginin mitózist serkentő hatásáról számolt be szövettényezetekben. Trybell és Houtman /144/ szerint az S-180 sejtek in vitro kétszer olyan intenzív növekedéssel válaszoltak arginin-szupplementálásra, mint a szivfibroblastok.

Ugy látszik azonban, hogy az arginin egy része a sejtbe bejutva átalakul. Hanson és Thomas /80/ kimutatta, hogy L-sejtek tenyésztése folyamán a sejtszaporodás csökkenését arginin-hiány okozta, amely arginin hozzáadásával kivédhető volt. Szerintük az arginin-hiány egy enzim bontó tevékenysége folytán jött létre. Malignus sejtekben fokozottabb az argináz enzim aktivitása. Westfall és mtsai /149/ szerint azok a malignizálódott sejttörzsek, amelyek állatba való visszaoltás után kis- vagy nagy mértékben keltettek daganatot, 20-szor, illetve 400-szor nagyobb argináz-aktivitással rendelkeztek,

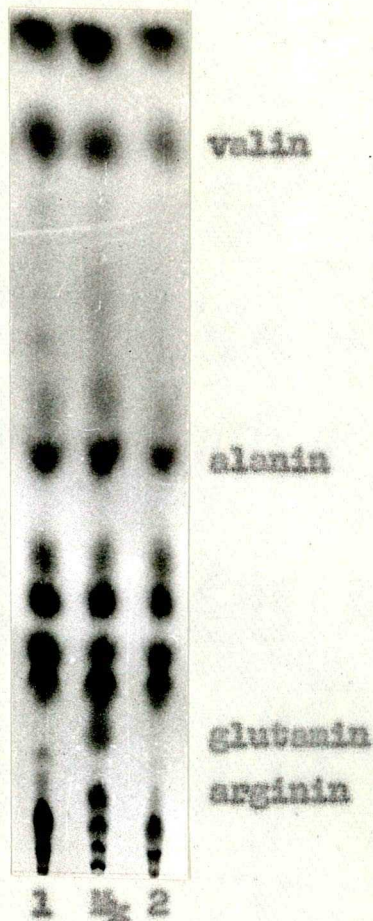


29. ábra

Egértáganatsejtek aminosav-hasznosítása. M_K = tápfolyadék kontroll; 1 = 8-180 e-gérsarcoma sejtek; 2 = NK/ly egérlymphoma sejtek. 2 napos tenyészetek. Ninhydrin reakció.

30. ábra

Egértáganatsejtek aminosav-hasznosítása. M_K = tápfolyadék kontroll; 1 = ENG egérsarcoma sejtek; 2 = Ehrlich-Lettré egércarcinoma sejtek. 2 napos tenyészetek. Ninhydrin reakció.



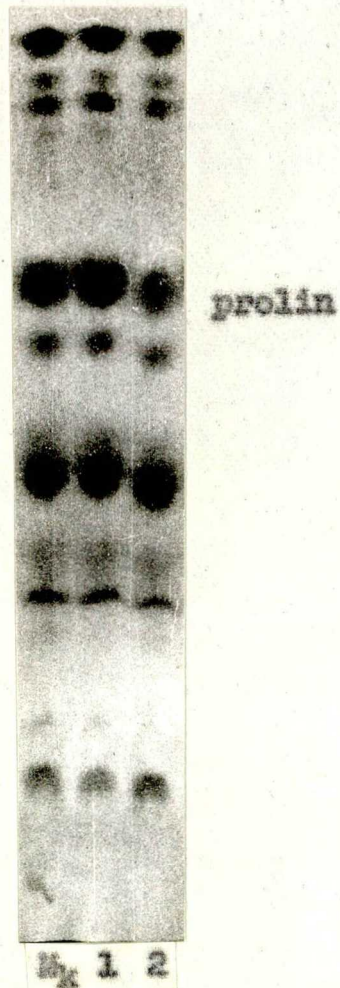
mint az eredeti, non-malignus sejtek.

A tápfolyadék pH-ja befolyással volt a sejtek aminosav hasznosítására. Lugosabb miliőben /pH 7.4 felett/ fokozottabb volt a sejtek aminosav felvétele. Legjellemzőbb példa erre a prolin változása: Savas miliőben nőtt, míg lúgosban csökkent a médium prolin-tartalma /31. ábra/. A daganatsejtek alacsonyabb pH-nál is intenzív prolin-felvételt tanúsítottak.

A methionin mennyisége a fibroblastok tápfolyadékában többnyire csökkent, bár néhány alkalommal felfezaporodása is megfigyelhető volt. Pasioka és mtsai /106/ nagy mennyiségű felfezaporodásáról számoltak be, amely arányos volt a cystin csökkenésével.

Festfall és mtsai /148/ HeLa sejtek tápfolyadékának aminosav változását vizsgálták, szuszpenziós kultúrákban, természetes összetételű tápfolyadékokban. A szabad aminosavak mennyisége a prolin kivételével csökkent a tenyésztés folyamán. Az aminosavak egy része keto-savakká alakult át.

A glycin mennyisége az embryonális sejtek tápfolyadékában csökkent, míg az egérdaganatsejtekében növekedett. Ez utóbbi esetben a glycin a daganatsejtek szabad aminosav-"pool"-jából származott.



31. ábra

A tápfolyadék pH-jának befolyása csirkeembrió
szívfibroblastok prolin-hasznosítására. M_x =
tápfolyadék kontroll; 1 és 2 = 17 napos tenyé-
szet, 6 nappal a tápfolyadékcseré után. 1 =
pH 6.7; 2 = pH 7.5. Isztin reakció.

Hanka-oidatban történő inkubálás esetén ugyanis nagyobb glicin-mennyiség jelent meg a kromatogramokon. Kit /71/ lymphosarcomák szabad aminosav tartalmát vizsgálva megállapította, hogy a sejtek nagyobb mennyiségű glicint, alanint és prolint tartalmaznak. A glicin részt vesz a purinok de novo szintézisében. Lehetséges, hogy az embryonális sejtek tenyészetekben, ahol sejtszaporodás is történt, a glicin egy részét a sejtek a nukleinsav bázisok szintéziséhez használták fel. Az egérdaganatsejtek kulturáiban sejtszaporodás nem történt, mivel azoknak szérumra és embryó extraktumra is szükségük van ahhoz, hogy a sejtosztódás meginduljon /Pálvi 116/.

Az alanin mennyisége - éppen ellenkezőleg - növekedett az embryonális-, és csökkent a malignus sejtek tápfolyadékában. Christensen és Henderson /24/ Ehrlich asciteses egereket különböző aminosavakkal etetve megfigyelte, hogy a daganatsejtek intenzívebben vették fel az alanint, mint a máj- és izomsejtek.

Az aminosavak hasznosításának tanulmányozása folyamán a sejtek purin-anyagszeréjét is figyelemmel kísértük. /6. táblázat/ A tápfolyadék nukleinsav-bázisai közül csak az adenint tudtuk biztosan kimutatni az általunk alkalmazott módszer-

6. táblázat

Normális és daganat sejtek purin hasznosítása szövettenyésztésben

Purin- bázisok	Normális s e j t e k			D a g a n a t s e j t e k				
	Sziv- fibro- blast	Vázmyoblast PVP nélkül	PVP- vel	HeLa	NK/Ly	Ehrlich	ENG	S-180
adenin	xxx	x	x	x	xxx	xxx	xxx	xx
hypoxanthin	+++	+	+	+	++	o , +	o , +	++
"B"-régio	o	o	o	o	++	+++	+++v	++

x = purinbázis csökkenés a tápfolyadékban

o = nincs változás

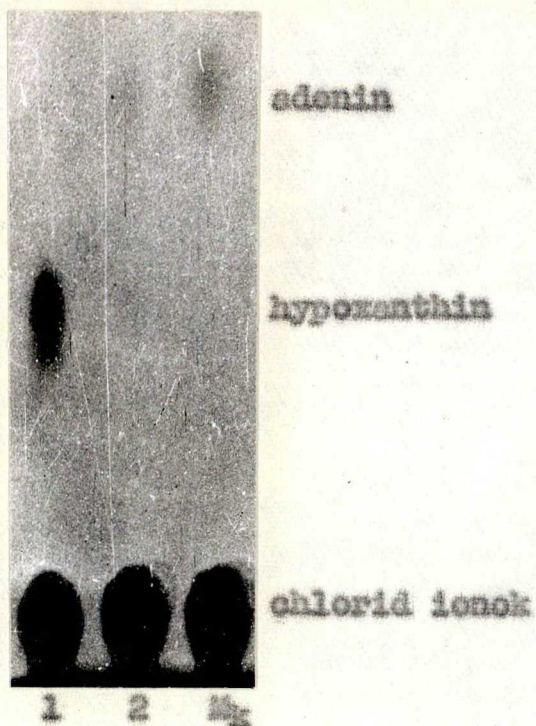
+ = purinbázis növekedés a tápfolyadékban

PVP = polyvinyl-pyrrolidin / 0.6 % /

rekkel, mivel a többi bázis /guanin, xanthin, hypoxanthin, thymin, uracil/ az adeninnél sokkal kisebb koncentrációban volt jelen a tápfolyadéokban. /Adenin: 10 mg/l; többi: 0.3 mg/l./

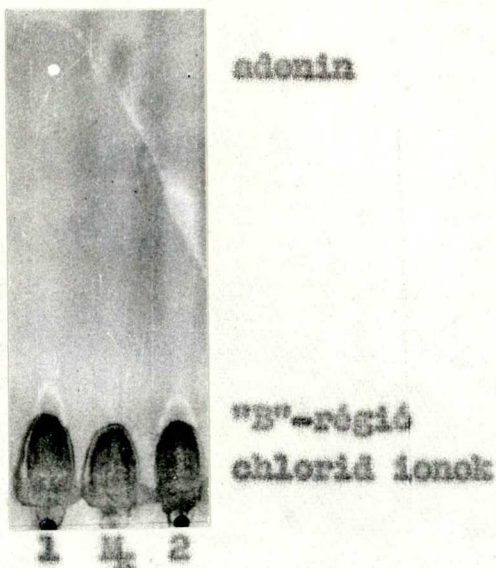
A szívfibroblastok és egérdaganatsejtek tápfolyadékaiból csaknem teljesen eltűnt az adenin /32. és 33. ábra/, míg a HeLa sejtek és a myoblastok csak kis mértékben hasznosították ezt a purinbázist /32., 34. és 35. ábra/. Lu és Winnick /76, 77/ az adenin- C^{14} -nek az embrionális kultúrákba történő aktív beépüléséről számolt be. Fileri és Ledoux /121/ vizsgálataiból ismeretes, hogy a HeLa sejtek is képesek preformált purinokat beépíteni a nukleinsavakba. Hakala és Taylor /48/ az adeninnek az S-180 és HeLa sejtek in vitro növekedésére kifejtett kedvező hatásáról számolt be. Az adenin a sejtek nukleinsav-frakciójába épült be.

Az adenin csökkenésével párhuzamosan egy új feltűnést figyeltük meg a kromatogramokon, a hypoxanthin-régióban. A hypoxanthin leadása a szívfibroblast kultúrákban volt a legintenzívebb /32. ábra/, a többi sejtféleség tenyésztésében kisebb mértékű volt /34. és 35. ábra/, sőt, nem is mindig volt kimutatható /33. ábra/. Az adenin csökkenéséről, és a hypoxanthin megjelenéséről



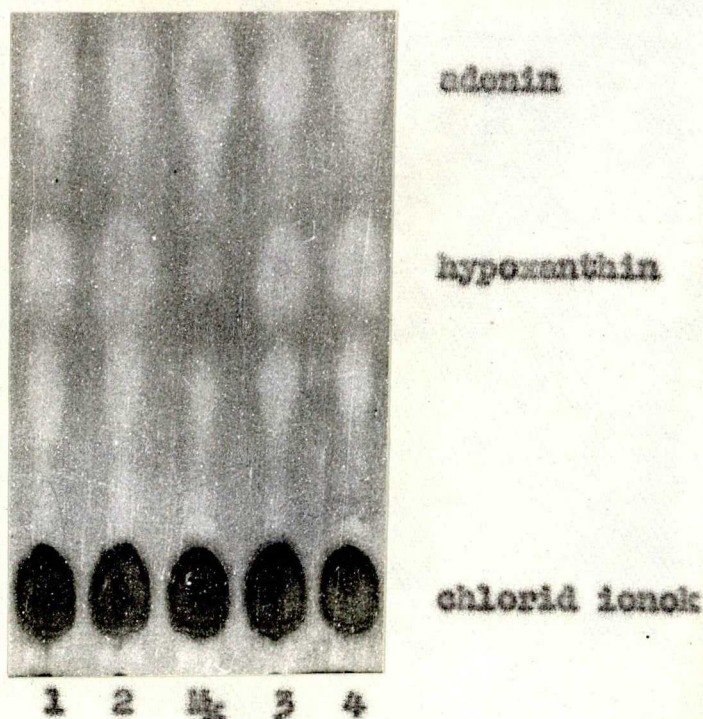
32. ábra

Csirkesebryó szívfibroblastok és HeLa sejtek purinbázis hasznosítása. M_K = tápfolyadék kontroll; 1 = 9 napos fibroblast tenyészet, 5 nappal a tápfolyadékcseré után; 2 = 3 napos HeLa kultúra. Wood reakció.



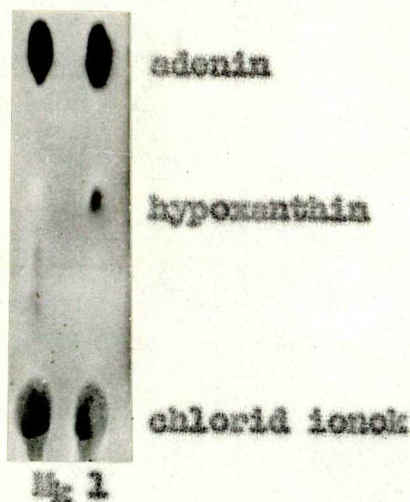
33. ábra

Egérdeganatsejtek purinbázis hasznosítása. M_K = tápfolyadék kontroll; 1 = ENG egérsarcoma sejtek; 2 = Ehrlich-Lettré egércarcinoma sejtek. 2 napos tenyészetek. Wood reakció.



34. ábra

Csirkesebryó vázmyoblastok purinbázis hasznosítása.
 M_x = tápfolyadék kontroll; 1, 2, 3 és 4 = 1, 7, 12 és 16 napos myoblast tenyészet, 1, 6, 5 és 4 nappal a tápfolyadékcserére után. Wood reakció és napfény.



35. ábra

Csirkesebryó vázmyoblastok purinbázis hasznosítása.
 M_x = tápfolyadék kontroll; 1 = 17 napos myoblast kultúra, 5 nappal a tápfolyadékcserére után. Ezüst-nitrát-bikromát reakció.

ről csirkesebryó szív-, máj-, vese-, mejonvese- és L-sejtek kultúráiban Pasiaka és stsei /197, 198/ számoltak be. Szerintük az aminosavak és nukleinsav-bázisok hasznosítása között nincs közvetlen összefüggés, mivel a glutaminnak a tápfolyadékából való kihagyása nem módosította az adenin és hypoxanthin változását.

Az adeninre és a hypoxanthinra vonatkozó megfigyeléseink alapján úgy véljük, hogy az előbbi csökkenése és az utóbbi megjelenése a tápfolyadékban összefügg egymással. Lehetséges, hogy az adenin egy része direkt beépül a nukleinsavakba, egy másik része pedig enzimatisz bomlást szenvedve hypoxanthinná alakul. Az adenáz, amely az adenin - hypoxanthin átalakulást katalizálja, aránylag kis mennyiségben van jelen a szövetekben, az adenosin dezamináz sokkal elterjedtebb /23/.

Az egérdaganatsejtek tápfolyadékában egy másik jellegzetes foltot is észleltünk, amely közvetlenül a chlorid ionok foltja felett helyezkedett el /33. ábra/. A folt U.V. fényben abszorpciót mutatott, Wood-féle reagenssel narancssárga színreakciót adott. Ez utóbbi reakciója savas karakterre utal. A foltot azonosítani nem tudtuk, valószínűleg nukleinsav bomlástermék.

A normális és malignus sejtek in vitro aminosav anyagcseréjére vonatkozó vizsgálataink folyamán megállapítottuk, hogy az egyes sejtféleségek a különböző aminosavak hasznosítása tekintetében eltérnek egymástól. Az eltérések nem általánosíthatók úgy, mint a malignus és nem-malignus sejtek között fennálló különbségek, hanem inkább úgy, mint sejtspecifikus jellegek.

Chemotherápiás szerek hatása normális- és daganat-
sejtek aminosav-hasznosítására szövettenyésztésben.

A chemotherápiás szerek daganatgátló tulajdonságainak tanulmányozása mellett egyre kiterjedtebben foglalkoznak azok hatásmechanizmusának felderítésével. A szerek támadáspontjának, hatásmódjának ismerete közelebb visz az "irányított" chemotherápia megvalósításához. Screenelési vizsgálataink folyamán azt tapasztaltuk, hogy a szerek egymástól eltérő morfológiai változásokat idéznek elő ugyanazon sejtfőleségen. Másrészt, a különböző - normális és malignus - sejtek ugyanazon szer azonos dózisára különbözőképpen reagálnak. E megfigyelések késztettek bennünket arra, hogy más szempontból is tanulmányozzuk egyes szerek hatását.

Skinner és Bennett /137/ szerint a jelenlegi tudásunk még kevés arra, hogy biztonság-
gal kiválaszthatnánk egyetlen rendszert egy ágens hatásmechanizmusának tanulmányozására; inkább az tűnik kívánatosnak, hogy minden egyes szert több rendszerben tanulmányozzunk, mivel az ezekből nyert információk teljesebb képet nyújthatnak azok hatásmechanizmusáról, mint egyetlen rendszeré.

A szövettényésztés igen kedvező módszernek kínálkozik a szerek hatásmechanizmusának vizsgálatára, mivel a sejtek és a szerek egymásra hatása külső befolyástól mentesen, standard körülmények között vizsgálható. Eddigi ismereteink szerint a chemotherápiás anyagok elsősorban a nukleinsav anyagcserét befolyásolják, így a legtöbb vizsgálat is ezzel foglalkozik /Wheeler 150/. Jóval kevesebb adat van arra vonatkozólag, hogyan befolyásolják a szerek az aminosav anyagcserét, ill. a fehérje-szintézist. A szövetkulturákon főleg antagonisták, "reversal" tanulmányokat végeztek, amelyek során azt vizsgálták, milyen metabolitokkal védhető ki egy antineobolit, vagy más típusú chemotherápiás anyag sejt-károsító, ill. növekedést gátló hatása /Hsu és mtsai 58; Rich és mtsai 128/.

Kísérleteink folyamán azt tanulmányoztuk, hogy a különböző típusú daganatellenes szerek milyen dózisban csökkentik, vagy gátolják a különböző sejtek aminosav felvételét; van-e különbség közöttük abban a tekintetben, hogy más és más aminosav hasznosítását befolyásolják. Ezzel párhuzamosan azt is megvizsgáltuk, hogyan változik a különböző sejtek adenin-felvétele és hypoxanthin-leadása a szerekkel történő kezelés folyamán.

Anyag és módszer.

Vizsgálatainkban hazailag előállított, és Intézetünk által részletesen tanulmányozott szerek, valamint más, ismert chemotherápiás anyagok hatását tanulmányoztuk. A szerek és a kísérletekben alkalmazott dózisok a következők voltak:

Alkyléző szerek:

- 1./ Degranol /67/: 25, 50, 100, 150 és 200 γ /ml
- 2./ Melphalan: 30, 50, 60 és 100 γ /ml
- 3./ TBM: 25, 50 és 75 γ /ml
- 4./ Mannitayleran /68, 146/: 500 és 1000 γ /ml

Antimetabolitok:

- 5./ 6-Mercaptopurin: 100 és 500 γ /ml
- 6./ Anethopterin: 100 és 500 γ /ml

Alkaloidák:

- 7./ Vinca rosea extraktum/69/:

1:10.000, 1:1000, 1:100 és 1:10 hígítások, ill.

VR-8 /Vincalukoblastin/:

0.001, 0.01, 0.1 és 1 γ /ml

Antibiotikum:

- 8./ Chloramphenicol: 100 és 1000 γ /ml

/ A vegyületek szerkezeti képletei a 14. és 15. oldalon láthatók./

A vegyületeket Hanks-oldatban, vagy a tápfolyadékban oldottuk fel. A vízben rosszul oldódó anyagokat szuszpenzió formájában adtuk a tenyészetekhez.

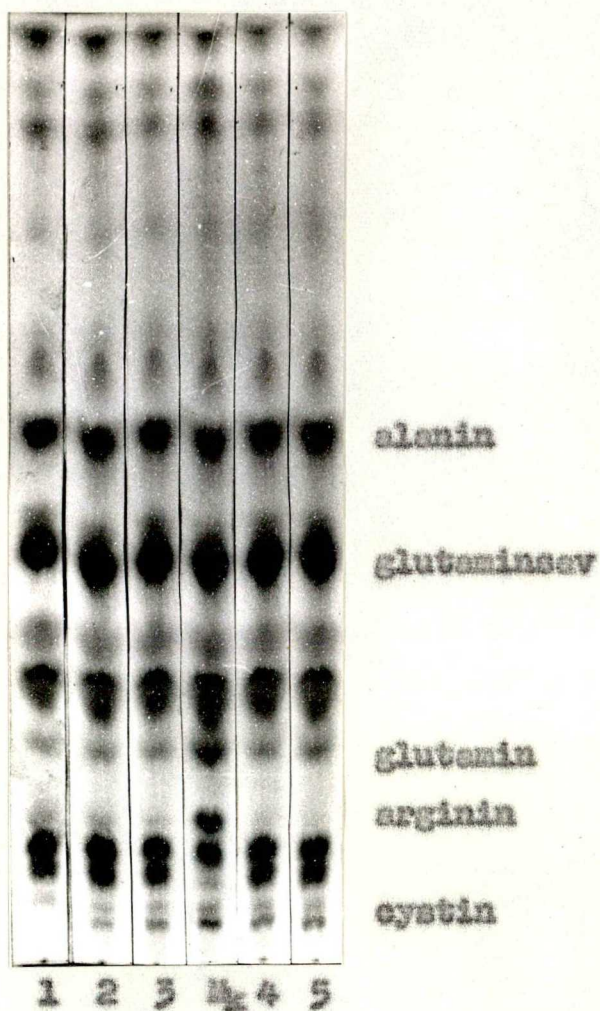
A tenyészetek készítése ugyanolyan módon történt, mint az aminosav anyagcsere vizsgálatok esetében. A vizsgálatokhoz szívfibroblastokat, HeLa sejteket, valamint 3-L3o és HK/Ly egérdaganatsejteket használtunk. A szívfibroblast kultúrákat az explantálás után 10 - 12 nap múlva kezeltük, amikor az aminosav-felvétel maximális periódusba jutott. A kezelés időtartama 4 - 5 nap volt. A HeLa kultúrákat akkor kezeltük, amikor az eredeti, szérum-tartalmu tápfolyadékot M-199 szintetikus tápfolyadékkal cseréltük fel. Az egérdaganatsejt kultúrák kezelése az explantálással egyidőben történt. Minden tenyészet tápfolyadéka M-199 szintetikus médium /93/ volt.

A kísérletek befejezésekor a tápfolyadékokat az előző részben ismertetett módon, papirkromatográfiás módszerrel analizáltuk és értékeltük. A chemotherápiás kezelés folyamán az élő kultúrákon mikroszkópos megfigyeléseket is végeztünk.

Kísérleti eredmények.

Az előkísérletek szerint alacsony szerdózisok, amelyek morfológiai elváltozást nem idéstek elő, az aminosav hasznosítást sem befolyásolták. Ezért a továbbiakban olyan szerkoncentrációkat is alkalmaztunk, amelyek a sejteken jelentős morfológiai elváltozást hoztak létre. A tápfolyadékokban lévő 20 aminosav közül 6 esetében figyeltünk meg szembetűnő módosulást azok hasznosításában, a szerhatás következtében.

A cystin-t mindegyik sejtféleség intenzíven felvette a tápfolyadékból, nem-kezelt tenyészetekben. Jelentősen gátolta a folyamatot az alkylszerek csoportjába tartozó Degranol /100 és 200 γ /ml/, Melfalan /50 és 100 γ /ml/, és TEM /75 γ /ml/ /Pályi 110, 112/. A 36. ábra szemlélteti, hogy a nem-kezelt tenyészethez képest az emelkedő Degranol-koncentráció miként csökkentette az S-180 sejtek cystin-hasznosítását. A Vinca rosea extraktum még 1:10 hígításban sem változtatva meg sem a normális, sem a malignus sejtek aminosav felvételét /69/, jöllehet a HeLa sejteken pl. már sokkal nagyobb hígításu Vinca kivonatok igen erős és jellegzetes morfológiai elváltozásokat idéstek



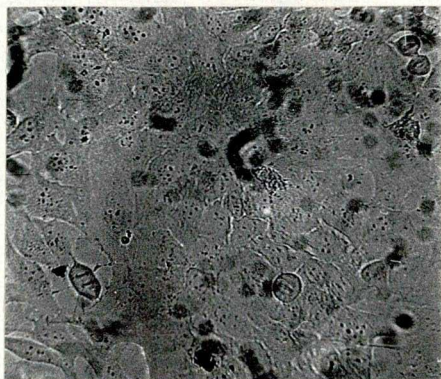
36. ábra

Degranol hatása S-180 sejtek aminosav hasznosítására, 2 napos tenyészet. M₁ = tápfolyadék kontroll; 1 = nem-kezelt tenyészet; 2, 3, 4 és 5 = 25, 50, 100 és 200 µg/ml Degranollal 48 óráig kezelt tenyészetek. Ninhidrin reakció.

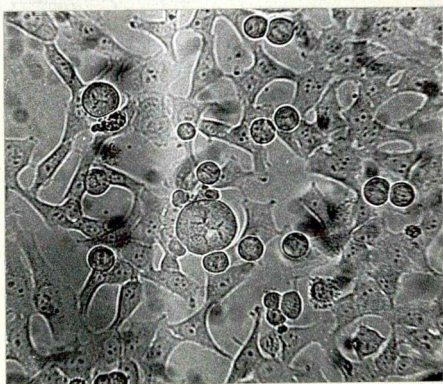
elő /37. ábra/. Non-kezelt kulturákban szabályos sejteket és osztódásokat figyeltünk meg /37/a ábra/. 1:10.000 hígításu Vinca kivonat hatására az összefüggő sejtréteg felhasult, a mitózisok száma felcsaporodott, gyakoriakká váltak a multipoláris és más típusu torz sejtosztódások, a sejtek konturja élesebbé vált /37/b ábra/. 1:1000 hígításnál már minden sejt leblokkolódott az osztódás folyamán, majd elpusztult /37/c ábra/. A Vinca kivonat 1:100 hígításban már a nyugvó sejtek erős károsodását idézte elő. A sejtek egy része hosszú-szakássá, fibroblast-szerűvé vált, a citoplazma legyesdeszerűen kiterült, míg a mag körül inkább annak tömörülése volt megfigyelhető /37/d ábra/. 1:10 hígításu extraktum hatására a sejtek nagy része lekerekedett, a citoplazma erősen granulálttá, vakuolizálttá vált /37/e ábra/.

A 6-Merceptopurin és a Mannitayleran kisé fokozta a cystin-felvételt HeLa kulturákban. A többi szer esetében a változások minden sejtféleségnél csekélyek voltak. /7. táblázat/

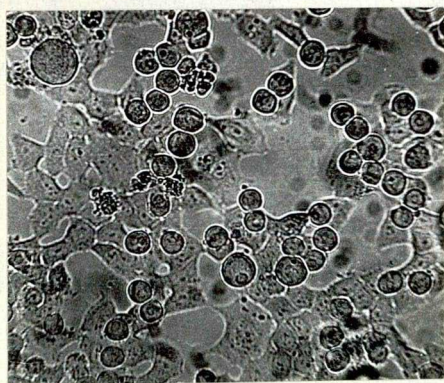
Az arginint az egérdaganatsejtek jelentős mértékben hasznosították. A chemotherápiás szerek közül a Melphalan /100 γ /ml/ csökkentette lényegesen az HK/Ly sejtek arginin-felvételét



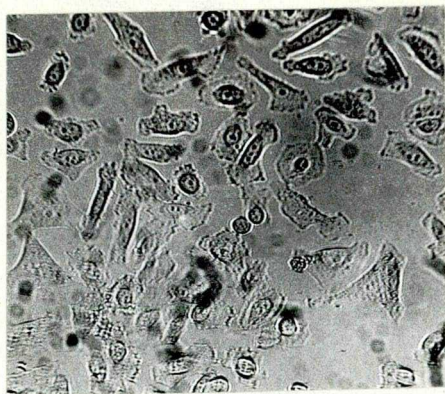
a



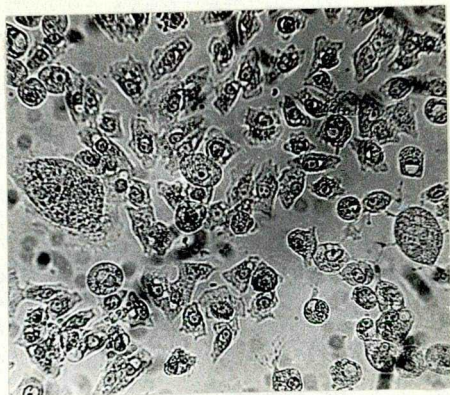
b



c



d



e

37. ábra

Vinca rosea kivonat hatása HeLa sejtek morfológiájára, M-199 tápfolyadékban, a = nem-kezelt sejtek; b - e = különböző hígításu Vinca rosea kivonattal kezelt sejtek, b = 1:10.000; c = 1:1000; d = 1:100; e = 1:10. Kb. 60x

7. táblázat

Chemoterápiás szerek hatása különböző sejtek cystin hasznosítására

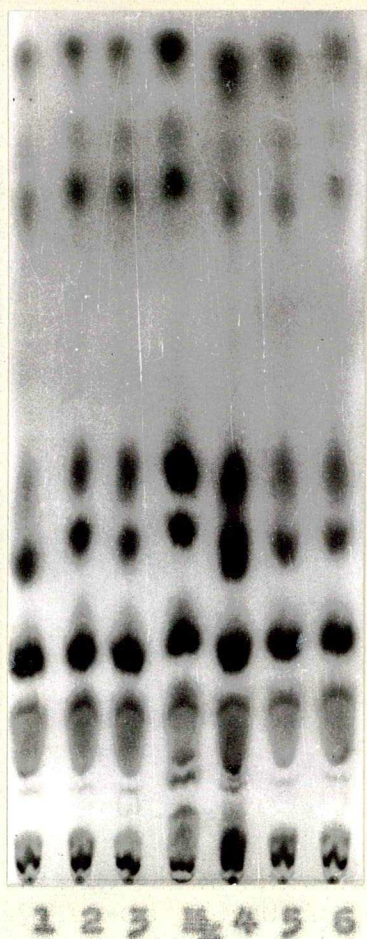
Chemoterápiás szerek	Szigfibroblast		HeLa		NK/Ly		S-180	
	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt
Degranol	xxx	o	xxx	x	x(x)	o	xxx	o
Melphalan	xxx	x	x	o	x(x)	o		
TEM	xxx(x)	x						
Mannitmyleran	xxx	xx	x	xx	x(x)	x		
6-Mercaptopurin			x	x(x)	x(x)	x		
Amethopterin			x	(x)	x(x)	o		
Vinca extr.	xx	xx	xx	xx	x	x		
Chloramphenicol	xxx	xx			x(x)	x		

x = aminosav csökkenés a tápfolyadékban

o = nincs változás

/38. ábra/, a Chloramphenicol /1000 γ /ml/ és a Degranol /200 γ /ml/ csak csekély mértékben, míg az utóbbi az S-180 kultúrákban inkább fokozta az arginin hasznosítását /35. ábra/. Az Amethopterin és 6-Mercaptopurin /100 és 500 γ /ml/, a Vinca rosea extraktum /1:10/, ill. a VR-S /1 γ /ml/, és a Mannitayleran /1000 γ /ml/ nem csökkentette a daganatsejtek arginin-felvételének mértékét /38. ábra, 3. táblázat/.

A glutamin-t minden sejtféleség intenzíven vette fel, nem-kezelt tenyészetekben. Az NK/ly sejtek glutamin-felvételét egyik szer sem tudta lényegesen befolyásolni. /9. táblázat/ A Degranol /100 γ /ml/ és a TEM /25, 50 és 75 γ /ml/ igen erősen gátolta a szívfibroblast kultúrák glutamin-hasznosítását /39. ábra/. Az előzőekben már volt szó arról, hogy lugos miliőben fokozódott a sejtek aminosav-felvétele. Esembejött volt, hogy a szív-fibroblastok intenzív glutamin-hasznosítását 1000 γ /ml Mannitayleran sem csökkentette lugos miliőben, míg alacsonyabb pH-nál 500 γ /ml dózisa is jelentősen gátolta a folyamatot /40. ábra/. A Melfhalen 60 γ /ml dózisa, amely már jelentős citológiai károsodást okoz, a szívfibroblastok glutamin-felvételét nem, a HeLa sejteket erősen

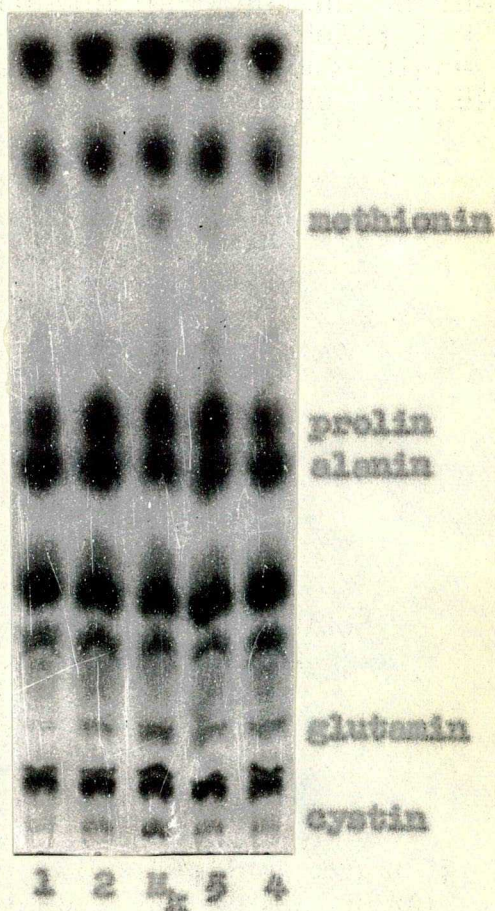


38. ábra

Melphalan és aminotranszferáz hatása HK/Ly sejtek aminosav hasznosítására, 2 napos tenyészetek. M_x = tápfolyadék kontroll; 1 és 2 = 100 és 500 γ /ml Anethopterin hatása; 3 = nem-kezelt tenyészet; 4 = 100 γ /ml Melphalan hatása; 5 és 6 = 500 és 100 γ /ml 6-Mercaptopurin hatása, 48 órák kezelés. Izatin reakció.

39. ábra

TEM hatása csirkeembrió szívfibroblastok aminosav hasznosítására, 17 napos tenyészet. M_x = tápfolyadék kontroll; 1 = nem-kezelt tenyészet; 2, 3 és 4 = 25, 50 és 75 γ /ml TEM hatása, 72 órák kezelés. Izatin reakció.



8. táblázat

Chemoterápiás szerek hatása különböző sejtek arginin hasznosítására

Chemoterápiás szerek	Sziófibroblast		HeLa		NK/Ly		S-180	
	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt
Degranol	+	o	x	x	xx	x	xx	xxx
Melphalan	o	o	o	o	xxx	xx		
TEM	(x)	o						
Mannitmyleran	x	(x)	o	x	xx	xx		
6-Mercaptopurin			o	x	xxx	xxx		
Amethopterin			o	o	xxx	xxx		
Vinca extr.	o	x	x	x	xxx	xxx		
Chloramphenicol	+	o			xx	x		

x = aminosav csökkenés a tápfolyadékban

+

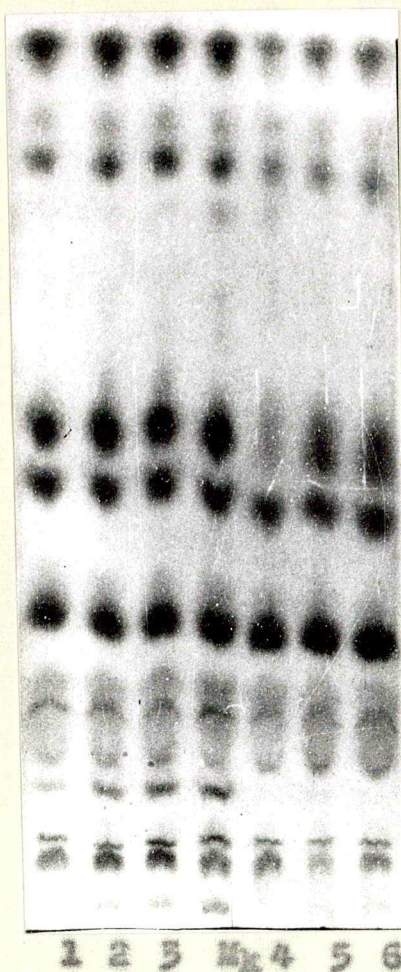
9. táblázat

Chemoterápiás szerek hatása különböző sejtek glutamin hasznosítására

Chemoterápiás szerek	Szivfibroblast		HeLa		NK/Ly		S-180	
	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt
Degranol	xxx	x	xxx	x(x)	xx(x)	xx(x)	xx	x
Melphalan	x(x)	x(x)	xx	o	xx(x)	x(x)		
TEM	xxx	x						
Mannitmyleran	xxx	xxx	xx	x	xx(x)	xx(x)		
6-Mercaptopurin			xx	xx(x)	xx(x)	xx(x)		
Amethopterin			xx	xx	xx(x)	xx(x)		
Vinca extr.	xx	x	xx	x	xxx	xx		
Chloramphenicol	xxx	xx			xx(x)	xx		

x = aminosav csökkenés a tápfolyadékban

o = nincs változás



40. ábra

Mannitayleran hatása csirkesebryó szívfibroblastok aminosav hasznosítására. 16 napos tenyészet. M_K = tápfolyadék kontroll; 1-3 = savas milió; 4-6 = lúgos milió; 1 és 4 = nem-kezelt tenyészetek; 2 és 5 = 500 γ /ml MM, 3 és 6 = 1000 γ /ml MM hatása. 4 napos kezelés. Izatin reakció.

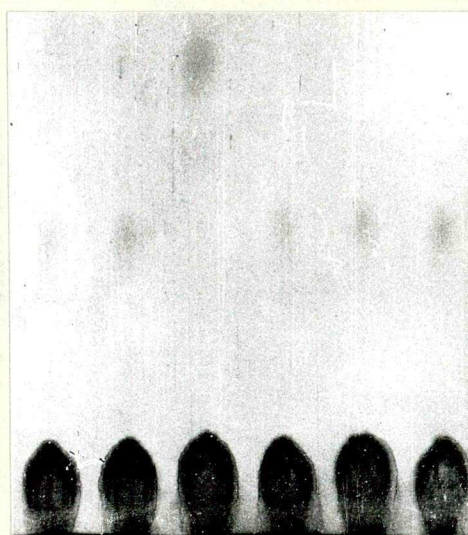
prolin
alanin

glutamin

cystin

41. ábra

Degranol hatása csirkesebryó szívfibroblastok purinbázis hasznosítására. 18 napos tenyészet. M_K = tápfolyadék kontroll; 1 = nem-kezelt tenyészet; 2, 3, 4 és 5 = 12.5, 25, 50 és 100 γ /ml Degranol hatása. 5 napos kezelés. Wood reakció.



adenin

hypo-
xanthin

chlorid
ionok

1 2 M_K 3 4 5

csökkentette. A Vinca kivonat és a Chloramphenicol kisebb mértékű gátlást okozott, míg az antimetabolitok 500 γ /ml dózisban is hatástalannak bizonyultak erre a folyamatra.

A glutaminsav hasznosítása nem-kezelt kulturákban igen változatos képet mutatott. A fibroblast kulturákban sem lehetett esetről esetre következetes változást megfigyelni. Ez a labilitás volt jellemző chemotherápiás kezelés hatására is. /10. táblázat/ Jellemző volt pl. a fibroblast kulturákra, hogy Degranol, TEM és Mannitayleran hatására glutaminsav-felssaporodás következett be a tápfolyadékban, míg a Vinca kivonat és a Chloramphenicol a glutaminsav felvételét fokozta. A Melfhalen nem befolyásolta a fibroblastok glutaminsav-hasznosítását. HeLa és HK/Ly kulturákban a változás iránya ellenkezővé vált kezelés hatására: a Mannitayleran, a 6-Mercaptopurin, és főleg a Vinca extraktum nemcsak megszüntette a glutaminsav leadását HeLa kulturákban, hanem annak csekély felvételét idézte elő. Másrészt, Melfhalen és Chloramphenicol hatására HK/Ly kulturákban glutaminsav-leadás kezdődött.

Az alanin mennyisége általában nőtt a

10. táblázat

Chemoterápiás szerek hatása különböző sejtek glutaminsav hasznosítására

Chemoterápiás szerek	Szivfibroblast		HeLa		NK/Ly		S-180	
	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt
Degranol	o	++	+	+	x	x	+	o
Melphalan	xx	xx	+	o	o	+		
TEM	(+)	+(+)						
Mannitmyleran	+	++	+	x	x	x		
6-Mercaptopurin			+	(x)	o	o		
Amethopterin			+	+(+)	o	o		
Vinca extr.	x	xx	++	x	x	o		
Chloramphenicol	o	xx			x	+		

x = aminosav csökkenés a tápfolyadékban

+

o = nincs változás

normális sejtek, és csökkent a daganatsejtek tápfolyadékában. A fibroblastok és myoblastok alanin-leadása Degranol, Melfhalan és Vinca kivonat hatására csökkent, vagy teljesen megszűnt. Lugosabb miliőben a fibroblastok is alanin-felvételt tanúsítottak.

Mannitaylerannal való kezelés alkalmával az alanin felvétele megszűnt /40. ábra/ /110/. TEM és Chloramphenicol nem befolyásolta az alanin-leadást.

Míg a HeLa kulturákban nem voltak lényeges változások az alanin hasznosításában, az HK/Ly tenyészetekben jelentősen módosult az alanin változása chemotherápiás, elsősorban Melfhalan /100 γ /ml/ kezelést követőleg. Míg a nem-kezelt tenyészetekben csökkent, Melfhalan hatására nőtt a tápfolyadék alanin-tartalma /38. ábra/. Amethopterin és Vinca kivonat csökkentette az alanin felhasználását, a 6-Mercaptopurin nem volt rá befolyással. /11. táblázat/

A prolin hasznosításának iránya és mértéke aszivfibroblast kulturákban a miliő pH-jától függött. Lugos miliőben 500 és 1000 γ /ml Mannitayleran hatására az intenzív prolin-felvétel erősen csökkent, míg savas miliőben a prolin-leadás szűnt meg kezelés következtében /40. ábra/. Melfhalan /60 γ /ml/, Degranol /100 γ /ml/ és Vinca rosea kivonat /1:10/ hatására nemcsak megszűnt a prolin felvétele, hanem

11. táblázat

Chemoterápiás szerek hatása különböző sejtek alanin hasznosítására

Chemoterápiás szerek	Szivfibroblast		HeLa		NK/Ly		S-180	
	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt
Degranol	++	+	x	o	+	+	+	+
Melphalan	+	o	o	o	xx	+++		
TEM	+	+						
Mannitmyleran	x	o	o	x	+	x		
6-Mercaptopurin			o	o	xx	xx		
Amethopterin			o	o	xx	x		
Vinca extr.	+	o	x	x	xx	x		
Chloramphenicol	++	++			+	+		

x = aminosav csökkenés a tápfolyadékban

+

intenzív prolin-akkumuláció történt a tápfolyadékban. TSM /75 γ /ml/ hatására ugyancsak megszűnt a szívfibroblastok prolin-hasznosítása. HeLa kultúrákban kissé fokozódni látszott a prolin felvétele Degranol, Mannitmyleran és Amethopterin kezelésre, és csökkent Vinca-kezelés folyamán. Az HK/Ly sejtek intenzív prolin-hasznosítását csak a Melfalan, a Vinca alkaloida és a Chloramphenicol csökkentette csekély mértékben. /12. táblázat/

Az adenin-t a normális és daganatsejtek - a HeLa sejtek kivételével - intenzíven hasznosították a tenyésztés folyamán. A chemotherápiás szerek általában nem csökkentették a sejtek adenin-felvételét. A 41. ábrán látható, hogy a Degranol emelkedő dózisa sem gátolták meg a szívfibroblastok adenin-felhasználását. Néhány esetben, pl. TSM hatására szívfibroblast kultúrákban, Vinca kezelésre HeLa kultúrákban és Chloramphenicol hatására HK/Ly kultúrákban kis mértékben csökkent az adenin felvétele. /13. táblázat/

Az adenin csökkenésével egyidejűleg nőtt a tápfolyadék hypoxanthin-tartalma, nem-kezelt tenyészetekben. Chemotherápiás kezelés hatására a hypoxanthin leadása általában fokosódott. Melfalan és

12. táblázat

Chemoterápiás szerek hatása különböző sejtek prolin hasznosítására

Chemoterápiás szerek	Szivfibroblast		HeLa		NK/Ly		S-18o	
	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt
Degranol	+	++	x	xx	xx	xx	x	x
Melphalan	x	+++	o	(x)	xx	x		
TEM	xx)	o						
Mannitmyleran	xxx	x	o	x	xx)	xx		
6-Mercaptopurin			o	o	xx	xxx)		
Amethopterin			o	x	xx	xx		
Vinca extr.	x	++	xx)	(x)	xxx	xx		
Chloramphenicol	+	+			xx	x		

x = aminosav csökkenés a tápfolyadékban

+

o = nincs változás

13. táblázat

Chemoterápiás szerek hatása különböző sejtek adenin hasznosítására

Chemoterápiás szerek	Szivfibroblast		HeLa		NK/Ly		S-18o	
	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt
Degranol	xxx	xx(x)	x(x)	x(x)	xxx	xx	x(x)	xx(x)
Melphalan	xxx	xxx	x	x(x)	xxx	xxx		
TEM	xxx	x(x)						
Mannitmyleran	xxx	xx(x)	x	x(x)	xxx	xxx		
6-Mercaptopurin			x	?	xxx	?		
Amethopterin			x	x	xxx	xxx		
Vinca extr.	xxx	xxx	xx	x	xxx	xxx		
Chloramphenicol	xxx	xxx			xxx	x(x)		

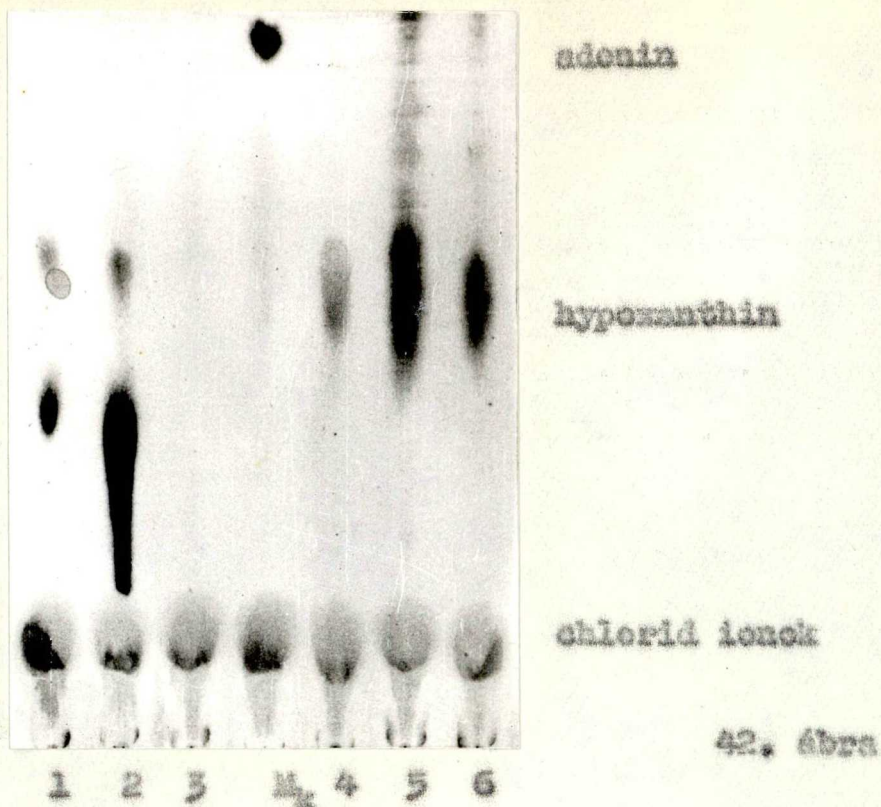
x = **adenin** csökkenés a tápfolyadékban

? = **nem értékelhető** / a 6-Mercaptopurin foltja zavar /

antimetabolitok hatására a hypoxanthin mennyisége jelentősen megnövekedett az HK/Ly sejtek tápfolyadékában, és ugyanakkor az adenin felvétele nem csökkent /42. ábra/. A Vinca rosea alkaloidája /VR-6/ szintén fokozta a hypoxanthin akkumulációját a szívfibroblastok és az HK/Ly sejtek médiumában /43. ábra/. A Mannitryleran nem volt befolyással a szívfibroblastok hypoxanthin-leadására, sőt, HK/Ly sejteknél csökkentette a leadás mértékét. A Hela sejtek csekély mértékű hypoxanthin-leadása mindegyik szer hatására fokozódott. /14. táblázat/

Az eredmények megbeszélése.

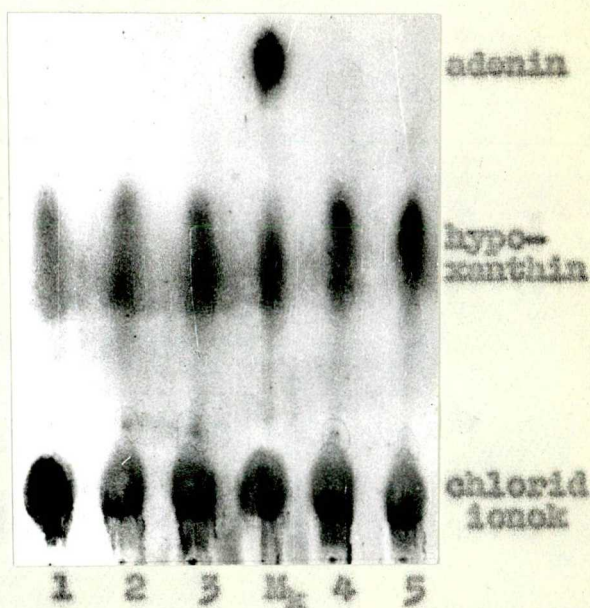
A chemotherápiás szerek hatását analizálva megállapítható, hogy azok a dózisok, amelyek a sejtek pusztulását idésték elő, nem gátolták meg azonnal és teljes mértékben az aminosav-felvételt. A változások általában biokémiai szinten kezdődnek, és a morfológiai elváltozások csak később jelentkeznek. Ezért az volt várható, hogy alacsony dózisokkal is ki tudunk mutatni olyan változásokat, amelyek biokémiai szinten következnek be. A módszerrel azonban a kezdeti változásokat nem lehetett regisztrálni. Az a tény, hogy a nagy dózisokkal ke-



Melfalan és antinetabolitok hatása NK/Ly sejtek purinbázis hasznosítására. 2 napos tenyészet. M_x = tápfolyadék kontroll; 1 és 2 = 100 és 500 γ /ml Allothopterin hatása; 3 = nem-kezelt tenyészet; 4 = 100 γ /ml Melfalan hatása; 5 és 6 = 500 és 100 γ /ml 6-Mercaptopurin hatása. 48 órák kezelés. Ezüstnitrát-bikromát reakció.

43. ábra

VR-8 /Vincalukoblastin/ hatása NK/Ly sejtek purinbázis hasznosítására. 2 napos tenyészet. M_x = tápfolyadék kontroll; 3 = nem-kezelt tenyészet; 1, 2, 4 és 5 = 0,01, 0,01, 0,1 és 1 γ /ml VR-8 hatása. 48 órák kezelés. Ezüstnitrát-bikromát reakció.



14. táblázat

Chemoterápiás szerek hatása különböző sejtek hypoxanthin leadására

Chemoterápiás szerek	Sziófibroblast		HeLa		NK/Ly		S-180	
	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt	kontroll	kezelt
Degranol	++	++(+)	(+)	++	++(+)	++(+)	+	++
Melphalan	+	++	+	(+)	(+)	+++		
TEM	+	(+)						
Mannitmyleran	++	++	+	(+)	++(+)	(+)		
6-Mercaptopurin			+	++	(+)	+++		
Amethopterin			+	++	(+)	++		
Vinca extr.	+	++(+)	(+)	+	(+)	(+)		
Chloramphenicol	++	(+)			++(+)	++		

+ = hypoxanthin növekedés a tápfolyadékban

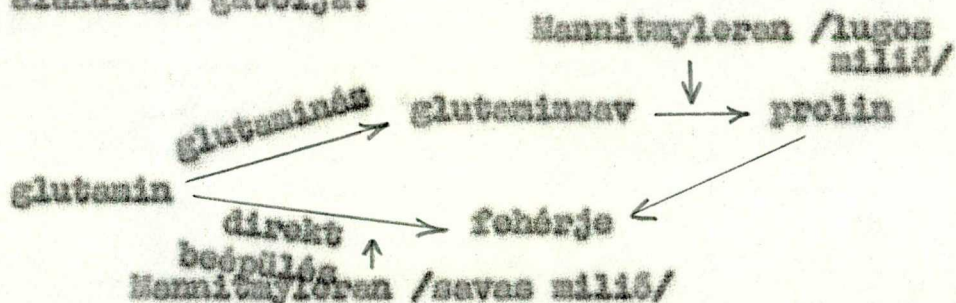
selt, és erősen károsodott kultúrák tápfolyadékában is kimutatható változás, arra enged következtetni, hogy a sejteknek elegendő idejük volt az aminosavak felvételére, mielőtt a szerhatás kifejlődött volna. Brewer és mtsai /18/ azt találták, hogy a Mustárnitrogén kis dózisa megállította a sejtosztódást és a dezoxiribonukleinsav-szintézist L-sejtek tenyésze- teiben, míg a ribonukleinsav- és fehérje-szintézis még néhány napig normális mértékben folytatódott. Ezzel magyarázható, hogy miért nem szűnik meg azon- nal az aminosav-felvétel a kezelt sejtekben. Néhány esetben a kezelt kultúrák tápfolyadékát a vizsgált szert nem tartalmazó, kontroll tápfolyadékkal cse- réltük fel. Azt tapasztaltuk, hogy ha a sejtek pusztulását állapítottuk meg mikroszkópos vizsgálattal, a tápfolyadék összetételében sem sikerült aktív sejttevékenységre utaló változást kimutatni.

A szerrek hatásmechanizmusa szempontjából fontosabb volt az a kérdés, hogy van-e "szelektív aminosav-gátlás", ami alatt azt értjük, hogy az e- gyek chemotherápiás anyagok más-más aminosav fel- vételére hatnak-e. Az erre vonatkozó irodalom több- nyire in vivo /állatkísérleti/, vagy baktérium kul- turákon végzett vizsgálatról számol be, és csak egy-két jelzett aminosavnak a beépülésével, ill.

annak gátlásával foglalkozik. Crathorn és Hunter /30/ különböző mustár-származékok, köztük a Melphalan /phenylalanin-mustár/ hatását tanulmányozta *Staphylococcus* kulturák aminosav felvételére. A phenylalanin beépülését az in vivo hatásosabb származékok in vitro erősebben gátolták a többinél. Crathorn szerint lehetséges, hogy bizonyos mustár-származékok gátló hatásának jelentős részét az okozza, hogy azok már a tápfolyadékban kémiai reakcióba lépnek a médium szabad aminosavjaival. Az alkylzés Ross /131/ szerint az aminos- és szulfid-csoportokon is történhet. Nyhan és Hoehn-Saric /103/ a serin mustár-származékának hatását vizsgálta az aminosav beépülésre. A szer a methionint éppugy gátolta, mint a serin beépülését, amely szerintük azt mutatja, hogy nem analog-inhibitorként hat, hanem mint mustár-származék. Perevosszikeva és Beloussov /120/ Sarcosin /Melphalan/, Thio-TEPA és Phosphosin befolyását vizsgálta a glycin, methionin és lysin felvételére és inkorporációjára patkány tumorokban, valamint egérmájban és hepatomában. A Sarcosin mind az aminosav-felvételt, mind pedig az aminosavaknak fehérjékbe való beépülését gátolta.

A többféle aminosav gátlásának vizsgálatával lehetőségünk volt a "szelektív aminosav-gátlás"

tanulmányozására. Az eredményekből kitűnt, hogy a szerek nem egyformán gátolták az egyes aminosavak felvételét. Az alkyliző szereket /Degranol, Melphalan, TEM/ a cystin-felvétel nagyobb foku csökkentése, vagy gátlása jellemezte. A Mannitayleran a cystin- és glutamin-felvételt savas milióban erősen, lúgosban gyengén gátolta, míg az intenzív prolin-hassznosítást csaknem megszüntette lúgos környezetben. E megfigyelés meglepő volt számunkra, mivel a szer citotoxikus hatása lúgos közegben fokozódott /119/. Ezért azt vártuk, hogy a cystin és glutamin felvétele is csökkenjen lúgos milióban. A glutaminsav mennyisége viszont nőtt a tápfolyadékban kezelés után, ami arra utal, hogy a glutamin-glutaminsav átalakulás fokozódott. A glutamin a prolin C-láncának alkotásában a glutaminsaven keresztül vesz részt /Levintow és mtsai 75/. A prolin-felvétel viszont gátolt, így lehetséges, hogy a Mannitayleran részint a glutaminsav-prolin átalakulást gátolja:



Coles és mtsai /26/ a Melpalan, Mannitmyleran és Mustárnitrogén, valamint más alkylész szerek hatását vizsgálva a glicin-beépülésre megállapították, hogy a Mannitmyleran - a többi szertől eltérően - nem gátolta az inkorporációt.

A Melpalan a glutamin-felvételt legintenzívebben a HeLa kulturákban gátolta, míg a normális sejtek glutamin-felvétele nem változott. Az előzőekben már említettük, hogy a HeLa sejtek fokozottabb érzékenységet tanúsítottak a Melpalan iránt, mint az embryonális sejtek. Az a tény, hogy a szer a HeLa sejtek glutamin-felvételét erősebben csökkentette, mint a többi sejtét, biokémiai oldalról támaszthatja alá a Melpalan szelektív hatását.

As arginin felvételét HK/Lg kulturákban a Melpalan erősen, a Degranol és Chloramphenicol gyengén, a többi anyag nem gátolta. Busch és mtsai /20/ kimutatták, hogy különböző alkylész szerek, alkaloidek és antimetabolitok egyaránt gátolták az arginin beépülését Walker tumor magfőhárjába, in vivo. Kísérleteinkben az antimetabolitok nem hatottak az arginin-felvételre, ami részben ezzel magyarázható, hogy a szerek elég rosszul oldódtak.

A glutaminnak és argininnek a tápfolya-

dékban való csökkenése enzimatiszus átalakulással is összefüggésben lehet /glutamináz, argináz/. A keselés hatására bekövetkező csökkentebb hasznosításuk tehát az említett enzimek működésének csökkentése vagy gátlása útján is bekövetkezhettett. A glutamin-felvétel csökkentése befolyással van a nukleinsav-szintézisre, mivel a glutamin részt vesz a purinok de novo szintézisében. Roberts és mtsai /130/ szerint a megnövekedett szabad glutamin-mennyiség, amelyet chemotherápiás kezelés után figyeltek meg a kísérleti állatok különböző szöveteiben, a nukleinsav- és fehérje-szintézis gátlásával van összefüggésben.

A *Vinca rosea* alkaloidája a glutamin, glutaminsav és prolin hasznosítását befolyásolta. Johnson és mtsai /63, 64/ a *Vinca rosea* egyik alkaloidáját, a Vincalukoblastin hatását szövetkultúrákban tanulmányosva megállapították, hogy a szer hatással szemben a glutaminsav, asparaginsav, alfa-ketoglutársav, valamint az arginin és származékai /ornithin, citrullin/ antagonistá hatást fejtettek ki. Az említett metabolitok a szervezet anyagcsere folyamataiban közvetlen összefüggésben vannak egymással.

A chemotherápiás szerek a sejtek alanin-

anyagcserejét különbözőképpen befolyásolták. A fibroblastok növelték a tápfolyadék alanin-koncentrációját, amely azonban Degranol, Melfhalan és Vincetivon hatására csökkenni kezdett. A malignus sejtek alanin-felvétele viszont jelentősen csökkent kezelés után, sőt Melfhalan hatására alanin-leadás következett be HK/Ly kulturákban. Myhan /102/ kimutatta, hogy a Melfhalan és más mustár-származékok gátolták az alanin- C^{14} beépülését patkányok szöveteibe és daganatsejtjeibe. Hölzel /57/ a Trenimonnak /imino-származék/ hasonló hatásáról számolt be, Yoshida ascites sejtekkel kapcsolatban.

Az eddigi ismeretek alapján a daganatellenes szerek elsősorban és igen intenzíven a nukleinsavakra hatnak. Az antimetabolitok /Amethopterin, DON, Azaserin, 6-Mercaptopurin / a nukleinsav-bázisok de novo szintézisével interferálnak /Skipper és Bennett 137/, míg a mustár-származékok részint a nucleotidok foszforilálását, illetve a polynucleotidok képződését gátolják /Drysdale és Htsai 35/, részint az óriás molekulák alkyláció útján fejtik ki gátló hatásukat /Ross 131/. A Mustárnitrogén gátolni képes az adenin beépülését a daganatba, in vivo /Trass és Htsai 143/. Bijvoet és Busch /16/ megállapította, hogy az uracil-mus-

tár gátolta az uracil- C^{14} inkorporációját a tumor és lép nukleinsav frakcióiba.

In vitro kísérleteinkben az adenin-felvétel - néhány kivételtől eltekintve - általában nem csökkent kezelés hatására. Gátolta az adenin-bevezetést a TEM a szívfibroblastok, a Vinca kivonat a HeLa sejtek, a Degranol és a Chloramphenicol az HK/Ly sejtek tenyészeteiben. A 6-Mercaptopurin hatását nem lehetett jól értékelni, mivel a szer, mint purin-észak, maga is reagált az előhívóval, és a keletkezett folt erősen zavarta a kiértékelést. Nichol /97/ különböző feltételek között tanulmányozta a 6-Mercaptopurinra a HeLa és S-180 sejtek növekedésére gyakorolt hatását. Megállapította, hogy preformált purinok távollétében az Amethopterin és a 6-Mercaptopurin gátolta a növekedést. Ez azonban adenin- és hypoxanthin-adagolással megszüntethető volt.

Érdekes, hogy míg az adenin-felvétel nem módosult, a hypoxanthin-leadás általában fokozódott kezelés hatására kísérleteinkben. Legszembetűnőbb volt a hypoxanthin megjelenése az HK/Ly sejtek tápfolyadékában, Melfalannal és antimetabolitokkal történő kezelés után. Valószínű, hogy a hypoxanthin felhalmozódása részben a szerek hatására létrejött

nukleinsav-lebomlás következménye. E folyamat főleg azon esetekre volt jellemző, ahol morfológiailag erős sejtszétválást figyeltünk meg, pl. Melphalen hatására. 6-Mercaptopurin hatására jelentősen nőtt - elsősorban az HK/Ly sejtek tápfolyadékában - a hypoxanthin mennyisége. A szer hatásmechanizmusára vonatkozó vizsgálatok szerint jelentős hypoxanthin-akkumulációt figyeltek meg kezelés után *Lactobacillus casei* kultúrákban /49/. Feltehető, hogy itt is hasonló jelenségről van szó.

Az aminosav-felvétel befolyásolására vonatkozó vizsgálataink eredményei alapján megállapítottuk, hogy a különböző szerek eltérő módon hatnak az egyes aminosavak hasznosítására. Továbbá, ugyanaz a szer másképp befolyásolja a különböző sejtfeleségek aminosav-felvételét.

Összefoglalás.

Új, a daganatok növekedését hatékonyan gátló anyagok felkutatására szövettenyésztő eljárást dolgoztunk ki. A kísérletekhez csirkesebryó szívfibroblastokat, S-180 egérsarcoma sejteket és HeLa sejttörzset alkalmaztunk. Egy vizsgálati sor 48 órát vesz igénybe. A kiértékelés részben kvalitatív, részben kvantitatív. Az adatokból hozzávetőlegesen meghatározható a vizsgált anyag toxicitása, növekedésgátló sajátsága és citológiai hatása. Ismert daganatellenes szerek kipróbálásával megállapítottuk, hogy eredményeink megközelítőleg azonosak az irodalomban közölt eredményekkel.

Az in vitro nyert eredmények gyakran meg-
egyeznek az in vivo kísérletek adataival. Az in vitro fals negatív eredmények magyarázata az, hogy a szervezet átalakítja a vegyületeket, amelyek tehát megváltozott alakban válnak hatásosak in vivo. Ezen átalakulás in vitro nem következik be /pl. Endoxan, Myleran/. A fals pozitív eredmények esetében fordított a helyzet: a szervezetben az in vitro hatásosnak mutatható vegyület elbomlik, hatástalanná válik.

Egyes anyagok igen szelektíve károsítják

a malignus sejteket in vitro. Ezek között gyakori az in vivo hatásos anyag /TEM, Mustárnitrogén, Melphalan/. A szelektív hatás azonban többnyire csak azok dózishatáron belül érvényes, és in vivo többnyire hatástalanok /puryl-histamin/. Az in vitro kísérletek elsősorban a vizsgált szerek direkt citotoxikus sajátosságait, valamint citológiai hatásait derítik fel. Tapasztalataink szerint, és az irodalmi adatok alapján az a véleményünk, hogy egyetlen sejtféleség alkalmazása is elég a szerek hatásosságának lemérésére.

Az egyéb in vitro módszerek /protozoa-, gomba-, baktérium-, agar-lemez-teszt, stb./ eredményeivel összehasonlítva, a szövettenyésztő módszerrel nyert eredmények közelítik meg leginkább az in vivo kísérletek eredményeit, mivel a többi eljárásnak számos hibalehetősége van.

Egyedül a szövettenyésztő módszerrel kapott eredmények alapján nem lehet kiszűrni a hatásos anyagokat, a fals pozitív és fals negatív eredmények miatt. Tömeges vizsgálatoknál azonban a módszer nem nélkülözhető. Legeredményesebben a természetes eredetű anyagok /alkaloidák, antibiotikumok/ kutatásánál tudtuk felhasználni. A hatóanyag izolálása folyamán a nagy mennyiségű frak-

ció kiértékelése állatkísérletben nem volt keresztülvihető, ezért azt csak szövettényezetekben bíráltuk el.

A különböző normális és malignus sejtfeleségek között fennálló különbségek tanulmányozása céljából összehasonlító vizsgálatokat végeztünk normális és daganatsejtek aminosav- és purin-anyagcseréjére vonatkozólag. A kísérletekhez a következő sejtfeleségeket használtuk: frissen explantált csirkeembryó szívfibroblast és vázmyoblast, S-180 és EHC egérsarcoma, Ehrlich-Lettré egércarcinoma, HK/19 egérlymphoma, és HeLa sejt-törzs. Megállapítottuk, hogy a sejtfeleségek között eltérés van az aminosav-hasznosítást illetőleg. Ezek az eltérések azonban nemcsak a normális és malignus sejtfeleségek között állnak fenn. Tapasztalataink szerint az eredményeket több tényező befolyásolhatja. Lugosabb milióban pl. fokosódott az aminosavak felvétele. A szívfibroblastok savas környezetben növelték, lugosban csökkentették a tápfolyadék prolin-tartalmát. Polyvinyl-pyrrolidin kedvezően befolyásolta a myoblastok morfológiai állapotát, és fokozta az aminosav-felvételt.

Minden sejtfeleség hasznosította a cys-

tint, glutamint, asparaginsavat, valint, phenylalanint, leucint és isoleucint. A normális sejtek tápfolyadékában az alanin mennyisége nőtt, a gliciné csökkent, míg a daganatsejteknél éppen fordítva volt. A glutaminsav és methionin hasznosítása a szivfibroblastok részéről nem volt következetes. A HeLa sejtek tápfolyadékában nőtt a glutaminsav mennyisége, amely valószínűleg a sejtekben lévő glutaminás hatására keletkezett a glutaminból. Az arginint csak a malignus sejtek hasznosították intenzíven. Lehetséges, hogy az arginin jelentős csökkenése a malignus sejtekben lévő erős argináz-tevékenység következménye.

Minden sejtféleség hasznosította a tápfolyadékban lévő adenint. A sejtek a tenyésztés folyamán hypoxanthint adtak le a médiumba. Az egérdaganatsejtek tápfolyadékában egy másik, savas karakterű anyagot is megfigyeltünk, amely valószínűleg nukleinsav-bomlástermék.

A megfigyelt különbségek véleményünk szerint nem daganat-specifikus jellegek, mivel mind a normális-, mind a malignus sejtféleségek között is vannak eltérő jellegek az aminosavak hasznosításában.

A chemotherápiás szerek hatásának több

oldalról történő tanulmányozása céljából kísérleteket végeztünk arra vonatkozólag, hogy a különböző szerek eltérő módon hatnak-e a sejtek aminosav-hasznosítására. Megvizsgáltuk a Degranol, 2EM, Melfhalen, Mannitayleran, Amethopterin, 6-Mercaptopurin, Vinca rosea kivonat és Chloramphenicol hatását csirkeembryó szívfibroblastok, Hela sejtek, valamint S-180 és HK/1y egérdaganatsejtek aminosav- és purinbázis-hasznosítására. Megállapítottuk, hogy a maximális sejtkárosodást okozó dózisek nem szüntették meg az aminosav-felvételt. A kísérletekből kiderült, hogy bizonyos eltérés van az egyes szerek befolyása között.

A cystin-felvételt elsősorban az alkylkész szerek csökkentették, míg az antimetabolitok inkább fokozták. A glutamin-felvételre a legtöbb vegyület befolyással volt, de a Mannitayleran csak azvas millióban gátolta a felvételt. Az Amethopterin és 6-Mercaptopurin a sejteknek sem a morfológiáját, sem az aminosav-felvételt nem befolyásolta lényegesen. A Vinca kivonat olyan magas koncentrációban sem csökkentette a cystin-felvételt, amely morfológiailag igen erős sejtkárosodást idézett elő.

A szerek - kevés kivételtől eltekintve -

nem hatottak a sejtek adenin-hasznosítására, míg a hypoxanthin-leadás általában fokozódott kezelés hatására.

A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy a különböző típusú szerek eltérő módon befolyásolják az egyes aminosavak hasznosítását. Továbbá, a különböző sejtek aminosav-felvételére ugyanas a szer eltérő módon hat.

Irodalom.

- 1./ Ammann, G.A. - Saffermann, R.S.: The onion test as a possible screening method for antitumor agents.
Antibiot. and Chemother. 5, 1 /1958/
- 2./ Antikajian, G. - Wright, L.E. - Plummer, J.I. - Weintraub, S.: The effect of TBM, Aureomycin, and some 4-amino derivatives of folic acid on tissues - in vitro.
J. nat. Cancer Inst. 12, 269 /1951/
- 3./ Bellweg, H.: Személyes közlés.
- 4./ Baru, I. - Popp, I.: Le métabolisme de l'acide glutamique et de la glutamine dans les néoplasies et les tissus non néoplasiques.
Bull.Ass.franç.Cancer, 47, 108 /1960/
- 5./ Barban, S. - Schulze, H.O.: Transamination reactions of mammalian cells in tissue culture.
J. biol. Chem. 234, 829 /1959/
- 6./ Bássler, G. - Hernádi, F. - Jeney, A.: Cyto-
statikumok hatásának mérése metylén-
hidrodehydrogenase gátlása alapján.
Magy. Onkol. 4, 108 /1960/
- 7./ Bennett, L.L. - Skipper, H.E. - Toolan, H.W. - Rhoads, C.P.: Searches for exploitable bioche-
mical differences between normal and
cancer cells.II. Nucleic acid purine
metabolism in human tumors.
Cancer Res. 16, 252 /1956/
- 8./ Bienelo, J.J.: Tissue culture screening of agents
in experimental cancer chemotherapy.
In:Vischer, M.B./ed./: "Methods in
Medical Research." The Year Book Pub-
lishers, Inc., Chicago, 1948-1951.
Vol. 4, 1951.

- 9./ Bieseke, J.J.: Purine antagonism and differential toxicity of some imidazo-1,2,3-triazines in mouse-tumor tissue cultures.
Cancer, 5, 787 /1952/
- 10./ Bieseke, J.J.: Assay of carcinolytic and carcinostatic agents.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 58, 1129 /1954/
- 11./ Bieseke, J.J.: Studies with cancer cells and experimental chemotherapeutic agents in tissue culture.
Bull. N.Y. Acad. Med. 2.ser. 32, 290 /1957/
- 12./ Bieseke, J.J. - Berger, R.E. - Clarke, M.:
Tissue culture screening of purines and purine nucleosides for selective damage to mouse sarcoma cells.
Cancer Res. 12, 399 /1952/
- 13./ Bieseke, J.J. - Berger, R.E. - Wilson, A.Y. - Hitchings, G.H. - Ellen, G.B.: Studies on 2,6-diaminopurine and related substances in cultures of embryonic and sarcomatous rodent tissues.
Cancer, 4, 186 /1951/
- 14./ Biggers, J.D.: L-glutamine and the growth of embryonic chick tibiotarsi in vitro.
Nature, 189, 1016 /1961/
- 15./ Biggers, J.D. - Gwatkin, R.B.L. - Heyner, S.:
Growth of embryonic avian and mammalian tibiae on a relatively simple chemically defined medium.
Exp. Cell Res. 25, 41 /1961/
- 16./ Bijvoet, F. - Busch, H.: Effect of 5-bis/2-chloroethyl/-aminouracil on incorporation of uracil-2-C¹⁴ into RNA of tumor-bearing rats.
Biochem. Pharmacol. 6, 161 /1961/
- 17./ Bradner, W.F. - Clarke, D.A.: Inhibition of anaerobic bacteria as a screen for anti-tumor agents.
Cancer Res. 18, 299 /1958/

- 18./ Brewer, H.B. - Comstock, J.P. - Aronow, L.:
Effects of nitrogen mustard on protein and nucleic acid synthesis in mouse fibroblasts growing in vitro.
Biochem. Pharmacol. 8, 281 /1961/
- 19./ Broda, E. - Suschny, O. - Bucker, W. - Kellner, G.:
Effects of hydrogen ion concentration on tissue in culture.
Exp. Cell Res. 18, 171 /1959/
- 20./ Busch, H. - First, D.C. - Lindsay, A. - Cohen, E. - Amer, S.: Inhibition by antitumour agents of labeling of nuclear proteins in vivo with L-arginine-U-¹⁴C.
Biochem. Pharmacol. 2, 123 /1961/
- 21./ Cancer Chemotherapy National Service Center:
Screening methodology studies.
CCNSC specifications for screening in tissue culture.
Cancer Chemother. Repts. 1, 63 /1959/
- 22./ Carrel, A.: Artificial activation of the growth in vitro of connective tissue.
J. exp. Med. 17, 14 /1913/
- 23./ Chargaff, E. - Davidson, J.N.:
"The Nucleic Acids."
Acad. Press, Inc., New York. Vol.2, 1955.
- 24./ Christensen, H.N. - Henderson, M.B.: Comparative uptake of free amino acids by mouse ascites carcinoma cells and normal tissues.
Cancer Res. 12, 229 /1952/
- 25./ Gobb, J.P. - Walker, D.G.: Effect of Actinomycin D on tissue cultures of normal and neoplastic cells.
J. nat. Cancer Inst. 21, 263 /1958/
- 26./ Coles, H.W. - Johnstone, R.M. - Quastel, J.H.:
The effects of alkylating agents on the incorporation of glycine-¹⁴C into tissue proteins in vitro.
Cancer Res. 20, 1523 /1960/

- 27./ Cornman, I.: A selective lethal effect of penicillin on sarcoma cells growing with normal tissue in roller tube cultures.
J. gen. Physiol. 28, 113 /1944/
- 28./ Cornman, I.: Survival of normal cells in penicillin solutions lethal to malignant cells.
Science, 99, 247 /1944/
- 29./ Cornman, I. - Grunbee, R.A.: The different susceptibilities to nitrogen mustard of normal and malignant tissue growing in vitro.
Fed. Proc. 6, 390 /1947/
- 30./ Crathorn, A.R. - Hunter, G.D.: The effect of nitrogen mustards on the incorporation of amino acids into protein by *Staphylococcus aureus*.
Biochem. J. 62, 37 /1957/
- 31./ DiPaolo, J.A. - Moore, G.E.: An evaluation of ascites tumor cell plating for screening chemotherapeutic agents.
Antibiot. and Chemother. 2, 465 /1957/
- 32./ DiPaolo, J.A. - Moore, G.E.: The use of ascites tumors in solid agar for screening of cancer chemotherapeutic agents.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 75, 870 /1958/
- 33./ DiPaolo, J.A. - Rosenfield, R.: The use of anaerobes and respiratory-deficient yeast mutants as a screening procedure for potential tumor-inhibiting agents.
Cancer Res. 18, 1214 /1958/
- 34./ Dixon, G.J. - Schabel, F.M. - Skinner, H.E. - Dulmadre, E.A. - Duncan, H.: Experimental evaluation of potential anticancer agents. V. In vitro cell culture as a tool in primary drug evaluation and antibiotic isolation.
Cancer Res. 21, No.8/Part 2/ 535 /1961/

- 35./ Drysdale, R.B. - Hopkins, A. - Thomson, R.Y. - Snell, R.M.S. - Davidson, J.H.: Some effects of nitrogen and sulphur mustards on the metabolism of nucleic acids in mammalian cells.
Brit. J. Cancer, 12, 137 /1958/
- 36./ Eagle, H.: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.
Science, 130, 432 /1959/
- 37./ Eagle, H. - Foley, G.E.: The cytotoxic action of carcinogenic agents in tissue culture.
Amer. J. Med. 21, 739 /1956/
- 38./ Eagle, H. - Foley, G.E.: Cytotoxicity in human cell cultures as a primary screen for the detection of anti-tumor agents.
Cancer Res. 18, 1017 /1958/
- 39./ Fischer, A.: On protein metabolism of tissue cells in vitro.
J. nat. Cancer Inst. 13, 1399 /1953/
- 40./ Foley, G.E. - Eagle, H.: The cytotoxicity of antitumor agents for normal human and animal cells in first tissue culture passage.
Cancer Res. 18, 1012 /1958/
- 41./ Foley, G.E. - Eagle, H. - Snell, R.M.S. - Ridder, R.W. - Inger, R.M.: Studies on the use of in vitro procedures for the screening of potential antitumor agents: Comparison of activity in mammalian cell cultures and microbiological assays alone and in combination with experimental anti-tumor activity.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 76, 952 /1958/
- 42./ Foley, G.E. - Friedman, O.M. - Drolet, R.P.: Studies on the mechanism of action of Cytoxan. Evidence of activation in vivo and in vitro.
Cancer Res. 21, 57 /1961/

- 43./ Foley, G.E. - McCarty, R.B. - Hinns, V.H. -
Snell, E.B. - Guilford, R.M. - Klidner, G.V. -
Dewey, V.C. - Inay, P.S.: Screening proce-
dures for experimental cancer che-
motherapy. A comparative study of
the use of microorganisms in the
screening of potential antitumor
agents.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 75, 413 /1958/
- 44./ Garattini, S. - Leonardi, A. - Mor, C. -
Murelli, S. - Palma, V.: Ricerche sull' atti-
vita antitumorale dell' 1,6-bis/ben-
taclorocetilamino/-1,6-desossi-D-
mannitolo /BCM/.
Arch. ital. Pat. 1, 140 /1957/
- 45./ Gey, G.O. - Coffman, W.D. - Rubicek, M.T.:
Tissue culture studies of the pro-
liferative capacity of cervical
carcinoma and normal epithelium.
Cancer Res. 12, 264 / 1952/
- 46./ Gothoskar, B.P. - Rains, P.W. - Tate, S.S. -
Ramakrishnan, C.V.: Glutamine metabolism of
chick-heart tissue, rat-heart tis-
sue, and human hypertrophic cervi-
cal tissue cultivated in synthetic
media.
J. nat. Cancer Inst. 24, 573 /1960/
- 47./ Gothoskar, B.P. - Ratnan, S. - Ramakrishnan,
C.V.: Non-requirement of glutamine for
proliferation of chick embryonic
heart fibroblasts in a synthetic
medium.
Indian J. med. Res. 46, 576 /1958/
- 48./ Hakala, M.T. - Taylor, E.: The ability of pu-
rine and thymine derivatives and of
glycine to support growth of mamma-
lian cells in culture.
J. biol. Chem. 234, 126 /1959/
- 49./ Handschumacher, R.E. - Welch, A.D.: Agents
which influence nucleic acid meta-
bolism.
In: Chargaff, E.-Davidson, J.W.:
"The Nucleic Acids." Acad. Press,
Inc., New York. Vol. 3, 1960.

- 50./ Hanks, J.H. - Wallace, R.E.: Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. Proc.Soc.exp.Biol./N.Y./ 71, 196 /1949/
- 51./ Hardinge, M.G. - Courville, D.A. - Hardinge, M. - Fujikawa, S. - Harvey, R.: Action of plant extracts on transplanted mouse tumors. Screening data I. Cancer Res. 21, No.8/Part 2/ 573 /1961/
- 52./ Harrison, R.G.: Observations on the living developing nerve fiber. Proc.Soc.exp.Biol./N.Y./ 4, 140 /1906-7/
- 53./ Herrmann, B.C. - Gablike, J.: Virus plaque-inhibition test applied to compounds of interest in oncology. Cancer Chemother. Reps. 14, 85 /1961/
- 54./ Hilwig, I.: Gewebekulturen als Modelle für chemotherapeutische Versuche. Medizin und Chemie, 6, 496 /1958/
- 55./ Hilwig, I.: Prüfung chemotherapeutischer Substanzen auf Verursachung reversibler und irreversibler Zellschäden am Modell der Gewebekultur. Z. Krebsforsch. 65, 513 /1963/
- 56./ Hirschberg, E.: Tissue culture in cancer chemotherapy screening. Cancer Res. 18, 869 /1958/
- 57./ Hölzel, F.: Der Einfluss von 2,3,5-Trisaethylenimino-benzochinon/1,4/ auf den Einbau von ¹⁴C-markierten Aminosäuren in das anaerob glykolytisch wachsende Yoshida-Ascites-Tumorzellen. Z. Naturforsch. 16, 792 /1961/
- 58./ Hsu, T.C. - Milofsky, L. - Fuerst, R.: Studies on 4-aminopyrazolo/3,4-d/-pyrimidine: reversal of cellular damage in the HeLa strain. Tex.Rep.Biol.Med. 16, 472 /1958/

- 59./ Issekutz, B.: Az experimentális és klinikai farmakológia.
M.T.A. Biol. Orv. Csatl. Készl. 14, 41
/1963/
- 60./ Jeney, A. - Pálvi, I. - Hernádi, F. - Vályi-Nagy, K.: Search for antagonistic Actinomycetae in Hungarian soils. V. Effects of fermentation liquids in various in vitro tumour tests.
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. /in press/
- 61./ Johnson, I.S.: Cancer research: cell production versus cell function in tissue culture.
Cancer Res. 18, 367 /1958/
- 62./ Johnson, I.S. - Simpson, P.J. - Cline, J.C.: Comparative studies with chemotherapeutic agents in biologically diverse in vitro cell systems.
Cancer Res. 22, 617 /1962/
- 63./ Johnson, I.S. - Viantis, J. - Mattes, B. - Wright, H.F.: Anti-tumor principles derived from *Vinca rosea* Linn. II. Further studies of biological activities of Vincalukoblastine.
In: "Canadian Cancer Conference."
Acad. Press, Inc., New York.
Vol. 4, 1961.
- 64./ Johnson, I.S. - Wright, H.F. - Svoboda, G.H. - Viantis, J.: Anti-tumor principles derived from *Vinca rosea* Linn. I. Vincalukoblastine and leurosine.
Cancer Res. 20, 1016 /1960/
- 65./ Karnofsky, D.A. - Simmel, E.B.: Effects of growth-inhibiting chemicals on the sand-dollar embryo, *Echinarachinus Farns.*
In: Homburger, F./ed./: "Progress in Experimental Tumor Research."
S. Karger, Basel-New York.
Vol. 3, 1963.

- 66./ Katsuta, H. - Takeoka, T.: Macromolecular requirements of normal and malignant cells.
Symp. Cell Chem. 10, 91 /1960/
- 67./ Kellner, E. - Hémet, L.: 1,6-bis/ -chloräthyl-
amino/-1,6-desoxy-D-mannit dichlor-
hydrat /SCM/, ein neues Stickstoff-
lostderivat.
Z. Krebsforsch. 61, 165 /1956/
- 68./ Kellner, E. - Hémet, L.: Biological effect
of 1:6-dimethanesulphonyl-D-man-
nitol in animal experiments.
Brit. J. Cancer, 13, 469 /1959/
- 69./ Kellner, E. - Hémet, L. - Trihák, E. - Pálvi,
A. - Grezál, S.: Untersuchungen bezüglich der
zytostatischen Wirkung der Vinca-
Rosa-Alkaloide.
In: "V. Ungarische Krebstagung 1961
in Budapest." Verl. Ung. Akad. Wiss.,
Budapest, 1962.
- 70./ Kieler, J.: The influence of amino acids on
mitotic activity in fibroblast cul-
tures. II. Effect of arginine, his-
tidine, and lysine.
Acta path.microbiol.Scand. 33, 350
/1953/
- 71./ Kit, S.: Free amino acid content and trans-
aminase activity of lymphatic tis-
sues and lymphosarcomas.
Cancer Res. 13, 694 /1953/
- 72./ Leiter, J. - Abbott, E.J. - Bourke, A.E. -
Fitzgerald, D.E. - Schepartz, S.A.: Screening
data from the Cancer Chemotherapy
National Service Center Screening
Laboratories. IX. Plant extracts.
Cancer Res. 22, No.7/Part 2/ 609
/1962/
- 73./ Leiter, J. - McDonald, M.M. - Schepartz, S.A.:
screening data from the Cancer
Chemotherapy National Service Center
Screening Laboratories. X. Cell cul-
ture cytotoxicity tests.
Cancer Res. 22, No.8/Part 2/ 837
/1962/

- 74./ Lettré, H. - Ballweg, H. - Endo, H. - Schleich, A. - Siebs, W.: Some studies with analogues of kinetin.
Biochem. Pharmacol. 1, 137 /1958/
- 75./ Levintow, L. - Eagle, H. - Pies, K.A.: The role of glutamine in protein biosynthesis in tissue culture.
J. biol. Chem. 227, 929 /1957/
- 76./ Lu, K.H. - Winnick, T.: Studies of nucleic acid metabolism in embryonic tissue culture with the aid of C¹⁴-labeled purines.
Exp. Cell Res. 6, 345 /1954/
- 77./ Lu, K.H. - Winnick, T.: The correlation of growth with incorporation of radioactive metabolites into nucleic acids in embryonic tissue culture.
Exp. Cell Res. 7, 238 /1954/
- 78./ Lucey, J.A. - Rinaldini, L.M.: The amino acid metabolism of differentiating skeletal myoblasts in vitro.
Exp. Cell Res. 17, 385 /1959/
- 79./ Mackenzie, G.G. - Mackenzie, J.B. - Beck, P.: The effect of pH on growth, protein synthesis and lipid-rich particles of cultured mammalian cells.
J. biophys. biochem. Cytol. 2, 141 /1961/
- 80./ Manson, L.A. - Thomas, W.J.: Metabolism of arginine by mouse fibroblast, strain L.
Proc. Soc. exp. Biol. /N.Y./ 104, 209 /1960/
- 81./ McAllister, R.M. - Grunseier, P.W. - Coriell, L.L. - Blakemore, S.R.: A quantitative technique for the measurement of in vitro cytotoxicity of 5-fluoro-2'-deoxyuridine /FUDR/, nitrogen mustard /HN2/, and other antitumor agents.
Cancer, 12, 938 /1959/

- 82./ McCarty, E.: Selective utilization of amino acids by mammalian cell cultures. Exp. Cell Res. 27, 230 /1962/
- 83./ McCoy, F.A. - Maxwell, M. - Kruse, P.F.: The amino acid requirements of the Jensen sarcoma in vitro. Cancer Res. 19, 591 /1959/
- 84./ McCoy, F.A. - Maxwell, M. - Neuman, R.E.: The amino acid requirements of the Walker carcinosarcoma 256 in vitro. Cancer Res. 16, 979 /1956/
- 85./ McKenna, G.F. - Taylor, A.: Screening plant extracts for anticancer activity. Tex. Rep. Biol. Med. 20, 214 /1962/
- 86./ McKenna, G.F. - Taylor, A. - Carachael, H.: Cancer chemotherapy with plant extracts. Tex. Rep. Biol. Med. 16, 203 /1958/
- 87./ McKenna, G.F. - Taylor, A. - Gibson, B.S.: Further studies of plant extracts in cancer chemotherapy. Tex. Rep. Biol. Med. 17, 123 /1959/
- 88./ McKenna, G.F. - Taylor, A. - Gibson, B.S.: Extracts of plants and cancer chemotherapy. Tex. Rep. Biol. Med. 18, 233 /1960/
- 89./ Mayer-Rohn, J. - Jänner, M. - Krume, H.: Der Wert von in vitro-Methoden zur Ermittlung zytostatisch wirksamer Substanzen. Arzneimittel-Forsch. 10, 563 /1960/
- 90./ Miyamura, S.: A determination method for anti-cancer action of antibiotics by the agar-plate diffusion technique. Antibiot. and Chemother. 6, 280 /1956/
- 91./ Miyamura, S. - Miyayama, S.: An agar-plate diffusion method using HeLa cells for antitumor screening. Antibiot. and Chemother. 9, 497 /1959/

- 92./ Morgan, J.F.: Tissue culture nutrition.
Bact. Rev. 22, 20 /1958/
- 93./ Morgan, J.F. - Morton, H.J. - Parker, R.C.:
Nutrition of animal cells in
tissue culture. I. Initial stu-
dies on a synthetic medium.
Proc.Soc.exp.Biol./N.Y./ 73, 1
/1950/
- 94./ Németh, L.: A malignus tumorekka ható any-
gok kiválogatásának kísérletes
módszerei.
Kandidátusi értekezés. 1959.
- 95./ Németh, L. - Kellner, B.: In Form von As-
cites transplantierbare leukämi-
sche Lymphadenose bei Mäusen.
Naturwiss. 47, 544 /1960/
- 96./ Németh, L. - Kellner, B.: A new mouse as-
cites tumor to be used as a screen-
ing tool.
Neoplasma, 8, 337 /1961/
- 97./ Nichol, C.A.: Metabolism of neoplastic cells
and their response to certain drugs.
Canad. J. Biochem. 38, 409 /1960/
- 98./ Nitta, K.: Studies on the effects of Actino-
mycetes products on the culture of
human carcinoma cells/strain HeLa/.
I. The effect of known antibiotics
having no or slight tumor-inhibito-
ry activity on HeLa cells.
Jap.J.Med.Sci.Biol. 10, 277 /1957/
- 99./ Nitta, K.: Studies on the effects of Actino-
mycetes products on the culture of
human carcinoma cells/strain HeLa/.
II. The effect of known antitumor
antibiotics on HeLa cells.
Jap.J.Med.Sci.Biol. 10, 287 /1957/
- 100./ Nitta, K.: Studies on the effects of Actino-
mycetes products on the culture of
human carcinoma cells/strain HeLa/.
III. Comparative studies on anti-
HeLa-cell effects of known synthe-
tic substances.
Jap.J.Med.Sci.Biol. 10, 419 /1957/

- 101./ Hitta, K.: Studies on the effects of Actinomycetes products on the culture of human carcinoma cells/strain HeLa/. IV. Studies on Sarkomycin and its derivatives.
Jap.J.Med.Sci.Biol. 10, 429 /1957/
- 102./ Nyhan, W.L.: Effects of nitrogen mustards on the incorporation of amino acids into the proteins of tumor-bearing rats. I. Amino acid mustards and HN2.
J.Pharmacol.exp.Ther. 130, 268 /1960/
- 103./ Nyhan, W.L. - Hoshu-Saric, E.L.: Effects of nitrogen mustards on the incorporation of amino acids into the proteins of tumors and other tissues: the mustard derivative of serine.
Biochem. Pharmacol. 12, 457 /1963/
- 104./ Orasbee, A. - Corbman, I.: The place of tissue culture in a cancer chemotherapy screening program.
Cancer Res. 9, 384 /1948/
- 105./ Pasioka, A.E. - Morgan, J.F.: Glutamine metabolism of normal and malignant cells cultivated in synthetic media.
Nature, 182, 1201 /1959/
- 106./ Pasioka, A.E. - Morton, H.J. - Morgan, J.F.: The metabolism of animal tissues cultivated in vitro. I. Amino acid metabolism of chick embryonic heart fibroblasts cultivated in synthetic medium M 150.
J. nat. Cancer Inst. 16, 995 /1956/
- 107./ Pasioka, A.E. - Morton, H.J. - Morgan, J.F.: The metabolism of animal tissues cultivated in vitro. II. Amino acid metabolism of chick embryonic kidney, chick embryonic liver, and monkey kidney cortex cultures.
Canad. J. Biochem. 36, 171 /1958/

- 108./ Pasieka, A.E. - Norton, H.J. - Morgan, J.F.:
The metabolism of animal tissues
cultivated in vitro. III. Amino
acid metabolism of strain L cells
in completely synthetic media.
Canad. J. Biochem. 36, 771 /1958/
- 109./ Pasieka, A.E. - Norton, H.J. - Morgan, J.F.:
The metabolism of animal tissues
cultivated in vitro. IV. Compara-
tive studies on human malignant
cells.
Cancer. Res. 20, 362 /1960/
- 110./ Pálvi, I.: Sejtek aminosav- és purin-anyag-
cseréjének változása chemotherápi-
ás szerek hatására.
Magy. Onkol. 4, 185 /1960/
- 111./ Pálvi, I.: Vergleichende Untersuchungen zur
Frage des Aminosäure- und Purin-
stoffwechsels in Normal- und Ge-
schwulstzellkulturen.
In: "V. Ungarische Krebstagung 1961
in Budapest" Verl. Ung. Akad. Wiss.
Budapest, 1962.
- 112./ Pálvi, I.: The effect of chemotherapeutics
on the amino acid uptake by tumour
cells in tissue culture.
8th International Cancer Congress,
Moscow, 1962.
- 113./ Pálvi, I.: Detection of tumour-inhibiting
mannitol derivatives by means of
paper chromatography.
J. Chromatog. 9, 176 /1962/
- 114./ Pálvi, I.: Studies on amino acid and purine
metabolism in normal and malignant
cell cultures.
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 13,
Suppl. 5, 51 /1963/
- 115./ Pálvi, I.: Observations on amino acid utili-
zation of normal and malignant
cells in culture.
/Előkézzületben: Neoplasma/

- 116./ Pályi, I.: nem publikált megfigyelés.
- 117./ Pályi, I. - Grócsi, E.: Chemotherápiás szerek hatásának kiértékelése szövettenyésztésben.
Magy. Onkol. 4, 27 /1956/
- 118./ Pályi, I. - Grócsi, E.: Evaluation of the effects of chemotherapeutic agents on tissue cultures.
Neoplasma, 8, 195 /1961/
- 119./ Pályi, I. - Grócsi, E.: Influence of pH on cell-damaging effect of 1:6-di-methansulphonyl-D-mannitol in tissue cultures.
/In press/
- 120./ Perevoscsikova, K.A. - Belouszov, A.P.:
Vlijanije nekotoryh protivo-opukholevj preparatov na akkumulirovanyije aminokisloty rakovoj kletkoj i valucsonyije ih v belki opukholej szivotnik.
Vopr. Onkol. 9, No.3, 45 /1963/
- 121./ Fileri, A. - Ledoux, L.: Nucleic acid metabolism of human malignant cells.
Biochim.biophys.Acta, 26, 309 /1957/
- 122./ Plummer, J.I. - Wright, L.T. - Antikajian, G. - Weintraub, S.: Triethylene melamine in vitro studies. I. Mitotic alterations produced in chick fibroblast tissue cultures.
Cancer Res. 12, 795 /1952/
- 123./ Pomerat, C.M.: Action of chemical agents on living cells. II. Use of tissue culture in drug testing operations.
In: Visscher, M.B./ed./: "Methods in Medical Research." The Year Book Publishers, Inc., Chicago, 1948-1951. Vol. 4, 1951.
- 124./ Potter, V.R. - Elvehjem, C.A.: A modified method for the study of tissue oxidations.
J. Biol. Chem. 114, 495 /1936/

- 125./ Price, K.E. - Duck, R.E. - Schlein, A. -
Siminoff, P.: A comparison of the in vitro
susceptibility of HeLa and proto-
zoan cells to antitumor antibiotics.
Cancer Res. 22, 885 /1962/
- 126./ Requena, R.M. - Asimov, I.: The use of sil-
ver nitrate and sodium dichromate
in the detection of purines by
paper partition chromatography.
J. Amer. chem. Soc. 72, 5781 /1950/
- 127./ Reilly, H.C.: An evaluation of the use of
antimicrobial activity as a screen-
ing procedure for tumor-inhibiting
agents.
Cancer Res. Suppl. 3, 63 /1955/
- 128./ Rich, M.A. - Bolaffi, J.L. - Knoll, J.E. -
Cheong, L. - Widenoff, M.L.: Growth inhibi-
tion of a human tumor cell strain
by 5-fluorouracil, 5-fluorouridine,
and 5-fluoro-2'-deoxyuridine.
Reversal studies.
Cancer Res. 18, 230 /1958/
- 129./ Roberts, E. - Simonsen, D.G.: Free amino
acids and related substances in
normal and neoplastic tissues.
In: Edsall, J.T./ed./: "Amino Acids,
Proteins, and Cancer Biochemistry."
Acad. Press, Inc., New York, 1960.
- 130./ Roberts, E. - Tanaka, K.K. - Tanaka, T. -
Simonsen D.G.: Free amino acids in growing
and regressing ascites cell tu-
mors: host resistance and chemical
agents.
Cancer Res. 16, 970 /1956/
- 131./ Ross, W.C.J.: In vitro reactions of biologi-
cal alkylating agents.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 68, 669 /1958/
- 132./ Roux, W.: Meine entwicklungsmechanische
Methodik.
In: Abderhalden, E.: "Handbuch der
biologischen Arbeitsmethoden."
Urban und Schwarzenberg, Berlin,
1923.

- 133./ Baifer, A. - Grieskes, I.: Circular paper chromatography. II. Isatin as a color reagent.
Science, 119, 124 /1954/
- 134./ Schuurmans, D.M. - Duncan, D.T. - Olson, B.H.:
An agar plate assay for anticancer agents utilizing serially cultured sarcoma 180 /Wiley/.
Antibiot. and Chemother. 10, 535 /1960/
- 135./ Schuurmans, D.M. - Duncan, D.T. - Olson, B.H.:
Variations in drug sensitivity among five mammalian cell lines used in an agar plate assay.
Cancer Res. 21, 775 /1961/
- 136./ Sinclair, R. - Leslie, I.: Amino acid and glucose uptake in relation to protein synthesis in cells growing in tissue culture.
Biochim.biophys.Acta, 32, 58 /1959/
- 137./ Skipper, H.E. - Bennett, L.L.: Biochemistry of cancer.
Ann. Rev. Biochem. 27, 137 /1958/
- 138./ Smith, C.G. - Lunnis, W.L. - Grady, J.E.:
An improved tissue culture assay. II. Cytotoxicity studies with antibiotics, chemicals, and solvents.
Cancer Res. 19, 847 /1959/
- 139./ Starbuck, W.C. - Busch, H.: Kinetics of incorporation of L-arginine-U-¹⁴C into nuclear proteins of tumors and other tissues in vitro.
Cancer Res. 20, 891 /1960/
- 140./ Stubblefield, E. - Hsu, T.C.: Effect of phenylalanine nitrogen mustard on tissues in culture.
Antibiot. and Chemother. 2, 493 /1957/
- 141./ Taylor, A. - McKenna, G.F. - Burlage, H.M.:
Anticancer activity of plant extracts.
Tex.Rep.Biol.Med. 14, 538 /1956/

- 142./ Teplin, I.: A tissue culture cytotoxicity test for large-scale cancer chemotherapy screening.
Cancer Res. 19, 959 /1959/
- 143./ Trams, E.G. - Nadkarni, M.V. - Smith, P.K.: On the mechanism of action of alkylating agents. II. Effect of nitrogen mustard, Myleran, and X-radiation on nucleic acid biosynthesis.
Cancer Res. 21, 567 /1961/
- 144./ Ertell, A.A. - Neuman, R.B.: Growth response of stable and primary cell cultures to L-ornithine, L-citrulline, and L-arginine.
Exp. Cell Res. 20, 84 /1960/
- 145./ Udenfriend, S. - Weissbach, H. - Witons, C.: Metabolism of amino acids.
Ann. Rev. Biochem. 29, 207 /1960/
- 146./ Varsha, L. - Kuzmann, J.: 1,6-Dimethansulfonyl-D-Mannit, eine neue tumoraffine Substanz.
Naturwiss. 46, 84 /1959/
- 147./ Westfall, B.B. - Evans, V.J. - Peppers, E.V. - Hawkins, R.M. - Marle, W.B.: Effect of glutamine on the growth and metabolism of liver cells in vitro.
J. nat. Cancer Inst. 17, 131 /1956/
- 148./ Westfall, B.B. - Peppers, E.V. - Marle, W.B.: The change in concentration of certain constituents of the medium during growth of the strain HeLa cells.
Amer. J. Hyg. 61, 326 /1955/
- 149./ Westfall, B.B. - Peppers, E.V. - Evans, V.J. - Sanford, A.K. - Hawkins, R.M. - Fiorentini, R.C. - Kerr, H.A. - Hobbs, C.L. - Marle, W.B.: The arginase and rhodanese activities of certain cell strains after long cultivation in vitro.
J. biophys. biochem. Cytol. 4, 567 /1958/

- 150./ Wheeler, G.P.: Studies related to the mechanism of action of cytotoxic alkylating agents: a review.
Cancer Res. 22, 651 /1962/
- 151./ Williams, W.J. - Manson, L.A.: Glutaminase of the human malignant cell, strain HeLa.
J. biol. Chem. 232, 229 /1958/
- 152./ Wood, E.: A reagent for the detection of chloride and of certain purines and pyrimidines on paper chromatograms.
Nature, 176, 175 /1955/
- 153./ Wright, J.C. - Cobb, J.P. - Gumpert, S.L. - Colomb, F.M. - Safadi, D.: Investigation of the relation between clinical and tissue-culture response to chemotherapeutic agents on human cancer.
New Engl. J. Med. 257, 1207 /1957/
- 154./ Wright, J.C. - Cobb, J.P. - Gumpert, S.L. - Safadi, D. - Walker, D.C. - Colomb, F.M.: further investigation of the relation between the clinical and tissue culture response to chemotherapeutic agents on human cancer.
Cancer, 15, 284 /1962/

