

A szelídgesztenye (*Castanea sativa* Mill.) extractumok tumorsejtgyátló hatása

Czibalmos-Kozma Ferenc¹, Papp Erika²

¹DCH MED KFT, Mecseknádas, Gyermekorvosi Praxis, ²Mohács Város Kórháza, Ált. Belgyógyászati Osztály és Diabetológia Szakrendelés

Efectul inhibitor al extractului de castană comestibilă asupra liniilor celulare maligne

Viața este parte a Universului, și „matematica Universului trebuie să fie frumoasă” (Garrett Lisi), viața trebuie să aibă o matematică frumoasă. Procese biologice fără rațiune, pur și simplu, nu există. Însă țesuturile maligne posedă funcții noi, complexe, utile numai lor înseși – din mecanisme alterate nu pot rezulta funcții speciale, dezvoltare, și adaptare. Cancerul face ceva contrar intereselor organismului: aparent, organismul acționează illogic. Dar acesta nu e întâmplător. Studiul examinează modelarea etiologiei mitocondriale-mutante posibile ale malignității, bazându-se pe modele matematice posibile ale celulei, ca sistem, pe conceptul mașinii-Turing, pe căile fluxului informației în celulă. Studiul prezintă descoperirea algoritmilor posibilelor acțiuni ale mitocondriilor mutante (posibile provenite din endosimbioză, paraziți intracelulari) în cursul malignizării și prezintă câteva rezultate preliminare ale experimentelor autorilor, cu agenți cu efect posibil asupra mitocondriilor probabil mutante ale celulelor maligne, de exemplu: extractul de castană comestibilă, aleasă pentru că prezintă rezultate pozitive în urma modelării matematice.

Cuvinte cheie: malignitate, modelare, mitocondrii.

The inhibitory effect of sweet chestnut extracts on tumor cell cultures

Life is a part of the Universe, and “the mathematics of the Universe should be beautiful” (Garrett Lisi). Life should have a beautiful mathematics too. Life processes lacking reason simply do not exist. But the malignant tissues have new, special, complex functions, useful for themselves only – from the wrong mechanisms developed functions and capacity of adaptation cannot arise. In cancer, apparently the organism poses an illogical program. But this is not probable. This study examines the modelling of the possible mutant-mitochondrial aetiology of the malignancy, based on the logically possible models of the cells as systems, in the concept of the Turing-machines, on the possible information pathways in the cell. It presents the algorithms of the possible actions of the mutant-mitochondria (arising from endosymbionts to intracellular parasites); the preliminary results from the authors’ original lab works with possible anti-mitochondrial agents, like the effect of sweet chestnut extracts (chosen thanks to the results of mathematical modelling) upon malignant cells.

Keywords: malignancy, modelling, mitochondria

Orvostudományi Értesítő, 2009, 82 (4): 272-279

www.orvudert.ro

Az onkológia fő problémái a tumorigenesis mechanizmusának tisztázása és a ma használtakkal ellentétben a tumorsejtekre szelektíven toxikus, nagy terápiás-toxikus küszöbkülönbséggel rendelkező szerek bevezetése. Csak részben tisztázott a tumorigenesis molekuláris szempontból, tanulmányukban a szerzők a problémát új módon, elméleti matematikai modellezéssel közelítik meg. A sejt, mint rendszer Turing modellel, időbeli működése algoritmikusan, a sejtek-szervezet relációrendszer a játék-elmélettel modellezhető. A tumorsejt, mint rendszer az outputján olyan tulajdonságokat (pl. klonális transzformáció) manifesztál, amelyek egy része komplexitása miatt nem lehet hiba eredménye (vagy éppen vezérelten indukált, a sejt szempontjából hibás, de a tumornak kedvező működés). Az információ-áramlási útvonalak analizéséből matematikailag következik, hogy ilyen output manifesztációk (evolúciós okokból) nem származhatnak a mag-genom információhalmazából, csak idegen kódtól (pl. EBV, HPV, egyéb), mert az önkárosító mutáció kihull a szelekciós rostán. Fölvetődik így az endoszimbioza mikroorganizmus, a mitokondrium mutációja (az apoptózis szembeni önfenntartás miatt), mint a tumorigenesis oka, miután feltételezhetően proliferációt indukáló intracelluláris parazitává lett. Filogenetikai rokonához, a fitoplazmához erősen hasonló, így az ezen növényi kórokozóra nagyban rezisztens szelídgesztenyében mindkettő ellen ható anyag meglétét tételeztünk fel. Ez a mutáns

mitokondriális targeten ható új szer lehetne. Szeretnénk ezen a helyen felhívni a figyelmet arra, hogy az onkológiai kutatás egyik legmodernebb tendenciája a „Mathematical Oncology” névvel fémjelzett terület, amelynek a Cancer Review nemrég különszámot is szentelt. Az NCI (az U. S. A. Nemzeti Rákkutató Intézete) szuperszámítógépek összekapcsolt hálózata segítségével végez molekuláris hatástani szimulációkat. A matematikai modellezési elméletek alkalmazása újszerű, de semmiképpen nem szokatlan módja a rákkutatásnak. Mindazonáltal a gyógynövényeknél nagyon sok esetben a hatásukról kapott eredmények készítették a fitokémikusokat az új hatóanyag felfedezésére (pl. Taxus baccata hatóanyagai).

Vizsgálatunk célja: az emberre nem toxikus szelídgesztenye (termése élelmiszer, levele, virága népgyógyászati szer) kivonatok malignus sejtvonalakra in vitro gyakorolt hatásának vizsgálata.

Anyag és módszer

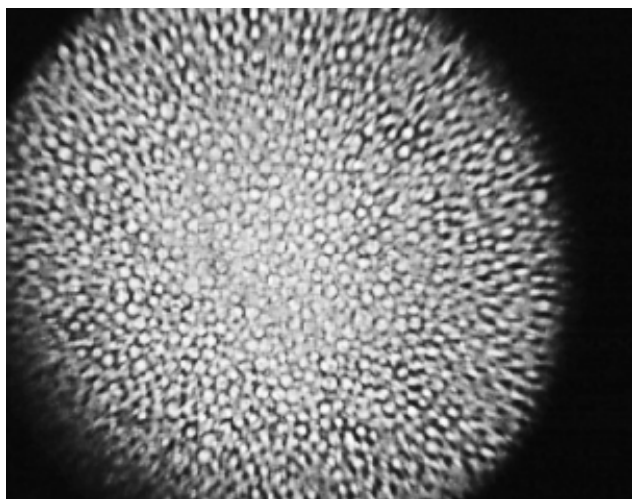
A Dél-Dunántúlon, a Mecsek hegység keleti részén, a Kelet-Mecsek Természetvédelmi területen, az É. sz. 46,16894° – K. h. 18,42731° GPS koordinátától (Rockenbauer Pál sírja) keletre található, mintegy 10 km átmérőjű körön belül, a májusi virágzás idején, amikor a mézelő méhek a maximális gyűjtési fázisban voltak, a legszebben virágzó, csakis egészséges, fiatal és közepes korú szelídgesztenyefákról, a teljes virágzó ágvégeket gyűjtöttük levéllel, virággal, ágvéggel együtt, a főutaktól legkevesebb fél kilométerre és ezeket szárítottuk ki teljesen, sötét, szellős helyen. A gyűjtés során egy fáról csak kevés virágzatot gyűjtöttünk, a fa kémelése érdeké-

Dr. Czibalmos-Kozma Ferenc
7695-Mecseknádasd, Magyarország
Mező u. 13.sz.,
e-mail: drcfhu@gmail.com; drpapperika@yahoo.com
www.cancer.uw.hu

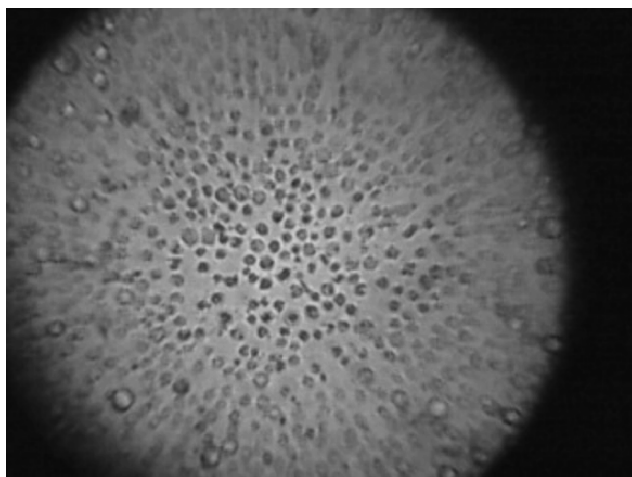
ben. A teljes megszárított anyagot fragmentáltuk, majd nagy fordulatszámú rozsdamentes acélkéses őrlőgéppel finomra porítottuk és száraz, hűvös, sötét helyen alufóliába csomagolva tároltuk. Ezt használtuk a későbbi kísérletekhez. A növényi részeket nem választottuk külön, a szárított virágzó ágvégek teljes anyagát használtuk, ugyanazon módszerrel készült ugyanazon kivonatot minden kísérletnél [1]. A továbbiakban az ECACC [14] normák szerint SP2/0-Ag14, HT 1080, ND-C tumorsejtkultúrákon in vitro teszteltük a szelídgesztenye kivonatok 50-800 mcg/ml koncentrációi hatását a kultúrák standard táptalajaiban, CO₂-t tartalmazó atmoszférájú inkubátorban, 24-48 órás inkubációt és hatóanyagmentes vakpróbát használva kontrollként.

Vizsgálatok malignus sejtkultúrákon

1. SP2/0-Ag14, ECACC No.: 85072401, Mouse × Mouse hybridoma, **1. ábra**: Kontroll kultúra, *Castanea sativa* extractum nélkül. **2. ábra**: *Castanea sativa* extractum hozzáadására masszív tumorsejt necrosis és degeneráció látható



1. ábra. SP2/0-Ag14, kontroll kultúra



2. ábra. SP2/0-Ag14, kultúra gesztenyekivonattal kezelve

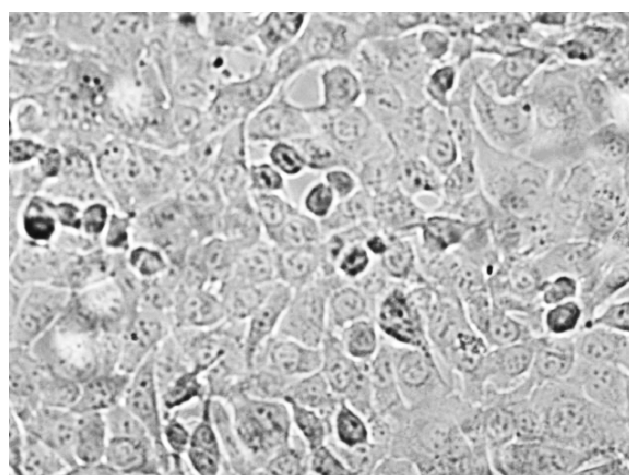
(*Castanea sativa* Mill. subst. sicc. 10,0 g, 100 ml aq. dest. 20°C-os, felfőzve 5 perc alatt 100°C-ig, főzve 60 sec., majd 5 perc után centrif., szűrve, 0,2-el sterilre. 15 ml sejtkultúrára 0,250 ml szűrlet. 8,2 + 0,02 mg/ml, subst. sicc.-ból 2,05 mg 15 ml-ben = 136 mcg/ml a sejtkultúrában). 2008. Feb. 07. 13:00. Pécs, Immunol. Biotechnol. Int. 2008. Feb. 08. 13:00: masszív tumorsejt necrosis és degeneráció látható).

2. HT 1080, ECACC No. 85111505, Human fibrosarcoma,

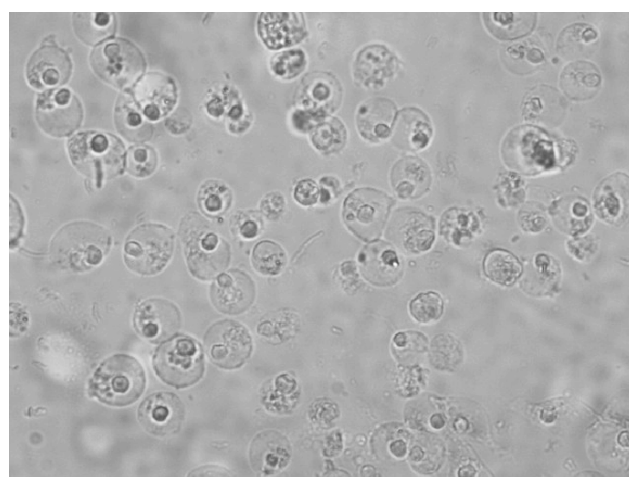
3. ábra: Kontroll kultúra, *Castanea sativa* extractum nélkül.

4. ábra: *Castanea sativa* extractum hozzáadására masszív tumorsejt necrosis és degeneráció látható (*Castanea sativa* Mill. subst. sicc. 10,0 g, 100 ml aq. dest. 20°C-os, felfőzve 5 perc alatt 100°C-ig, főzve 60 sec., majd 5 perc után centrif., szűrve, 0,2-el sterilre. Hozzáadás után 800 mcg/ml a sejtkultúrában). Pécs, PTE OEC ÁOK Pharmacologiai Int., 2008 Feb. 13, 11:00. 2008 Feb. 14. 11:00: masszív tumorsejt necrosis és degeneráció látható. **5. ábra** a **4. ábra** kinagyított részlete.

3. ND-C, ECACC No. 92090913, Mouse neuroblastoma × Rat neurone hybrid, **6. ábra**: Kontroll kultúra, *Castanea sativa* extractum nélkül. **7. ábra**: *Castanea sativa* extractum



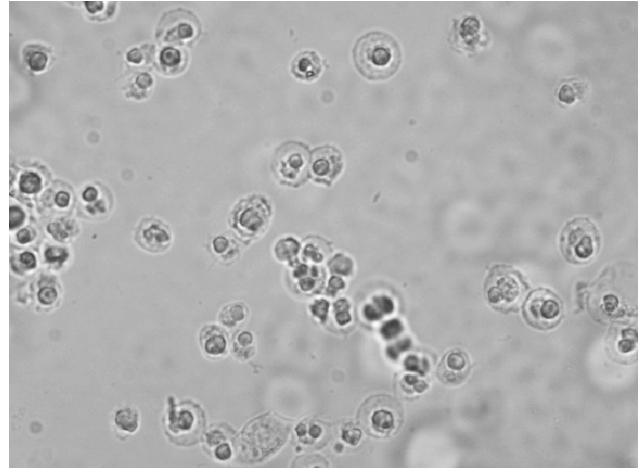
3. ábra. HT 1080, kontroll kultúra



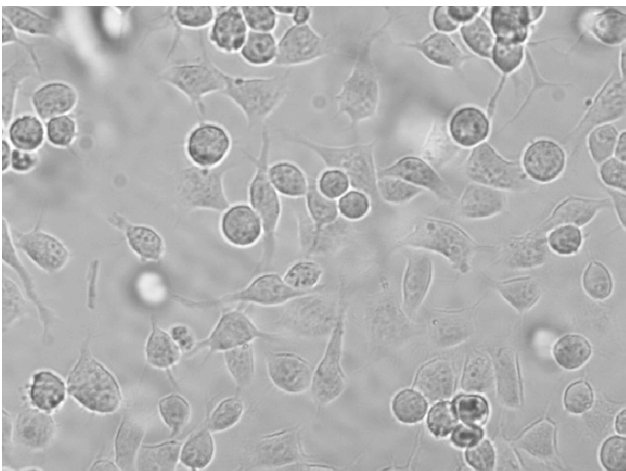
4. ábra. HT 1080, kultúra gesztenyekivonattal kezelve



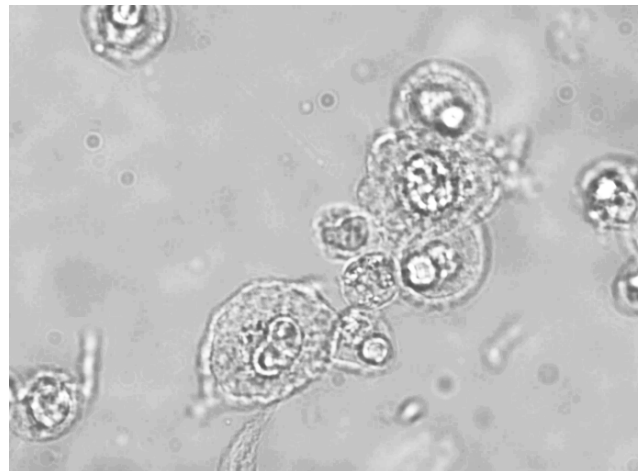
5. ábra. HT 1080, kultúra gesztenyekivonattal kezelve



7. ábra. ND-C, kultúra gesztenyekivonattal kezelve

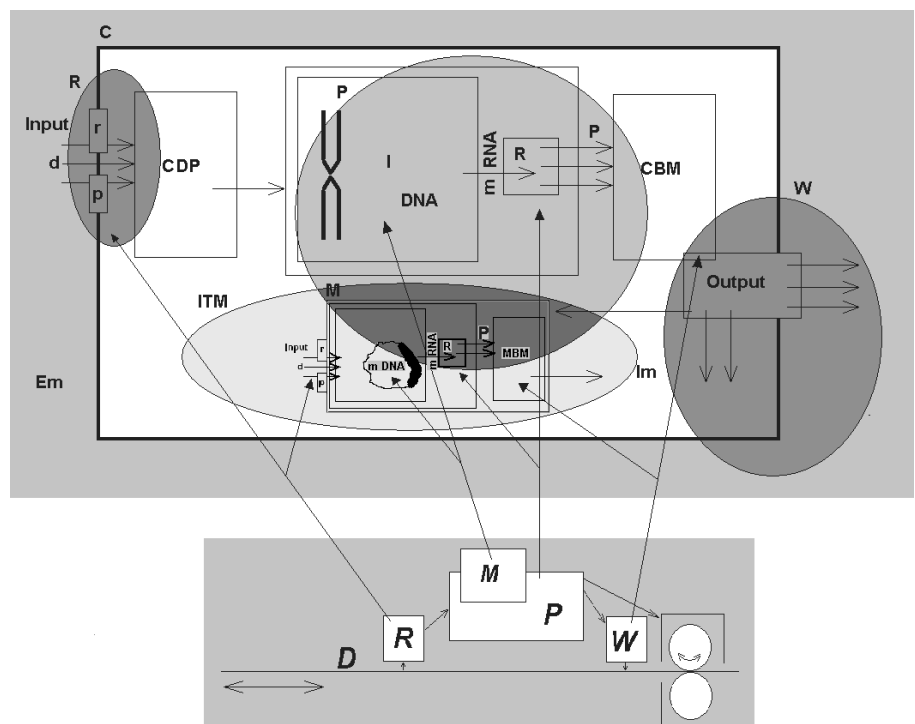


6. ábra. ND-C, kontroll kultúra



8. ábra. ND-C, kultúra gesztenyekivonattal kezelve

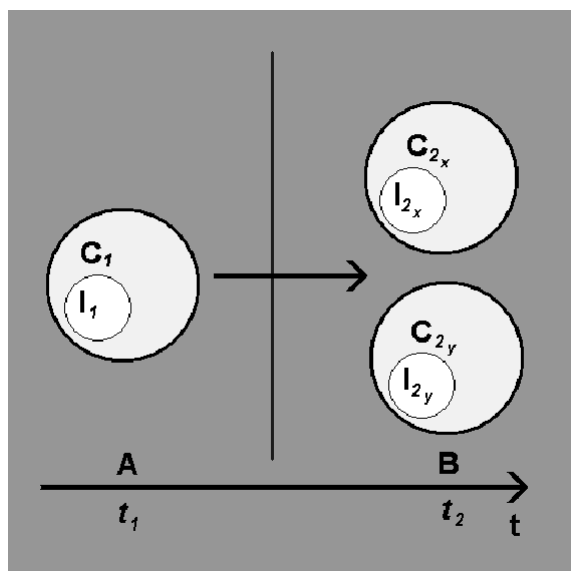
9. ábra. a Turing-gép elvének alkalmazása az élő sejtre. Ábramagyarázat: M: utasításkészlet, P: Processzor, W: író fej (rendszer output), R: olvasófej (rendszer input), D: adat az adathordozón. A sejtinputja az r: receptorok, d: direkt membrántranszport, p: transzmembrán proteinek által a CDP jelátviteli apparátuson át juttatja az információt a DNA utasításkészlet által vezérelt R riboszómák és CBM sejt biokémiai apparátusa P processzoregységéhez, amelyek a W kimeneten manifesztálódó eredményhez vezetnek. Látható, hogy a mitokondrium „included az includerben” rendszer.



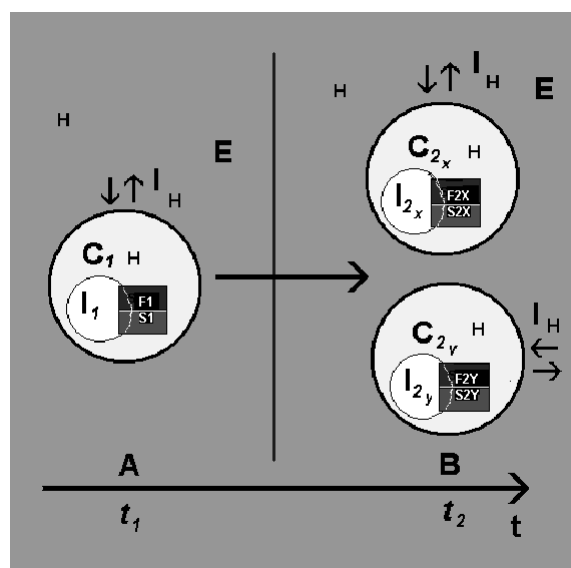
hozzáadására masszív tumorsejt necrosis és degeneráció látható (*Castanea sativa* Mill. subst. sicc. 10,0 g, 100 ml aq. dest. 20°C-os, felfőzve 5 perc alatt 100°C-ig, főzve 60 sec., majd 5 perc után centrif., szűrve, 0,2-el sterilre. Hozzáadás után 400 mcg/ml a sejt kultúrában). Pécs, PTE OEC ÁOK Pharmacologiai Int., 2008 Feb. 13, 11:00. 2008 Feb. 14. 11:00: masszív tumorsejt necrosis és degeneráció látható. A 8. ábra a 7. ábra kinagyított részlete.

Megbeszélés

Fölvetődik a kérdés: a szerzők miért pont a nem toxikus szelídgesztenye kivonatait választották, holott a legtöbb daganatellenes kemoterápiás szer (a növényi eredetűek is) erősen toxikusak? Szerzők részéről teljes szemléletváltásról van szó



10. ábra. Normális sejtosztódás

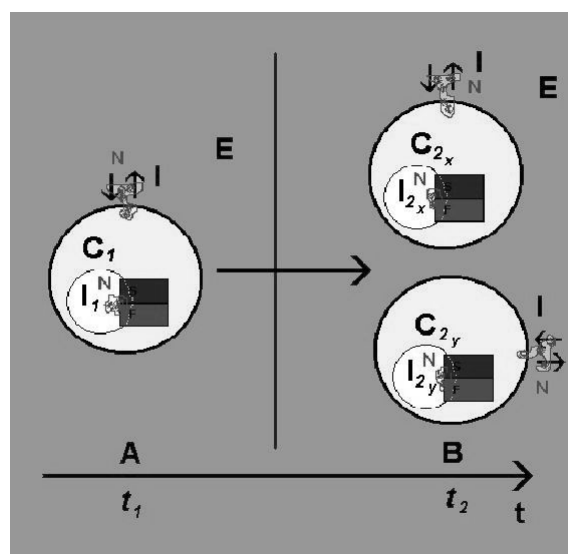


11. ábra. Normális sejtosztódás

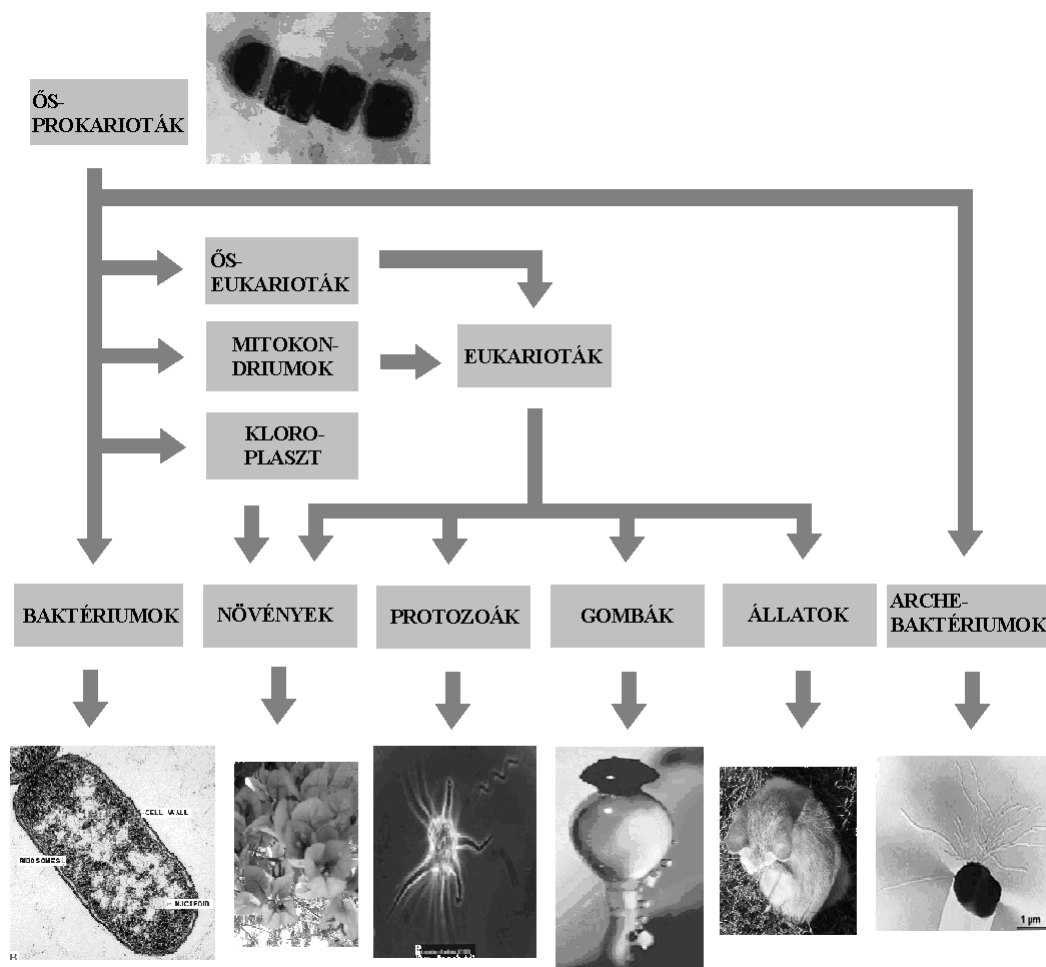
az orvosi kutatás eddigi gyakorlatával szemben [1, 5, 10]. A matematikai modellezés esetünkben megelőzte a laboratóriumi munkákat. Létezik már az a matematikai apparátus, amely alkalmas véleményünk szerint a rákos sejt viselkedésének leírására. Ennek egy részét magyar tudósok alkották: Neumann János, Ludwig von Bertalanffy, Harsányi János továbbá a Neumannal együtt Nobel-díjat kapott amerikai John Nash [7, 8, 9, 12], akit a Beautiful Mind – Egy csodálatos elme c. filmből jól ismerünk, valamint az Enigma kódját megfejtő Alan Turing [4, 11], vagy kortársunk, Stephen Wolfram [13]. Az említett szerzők maradandót alkottak a játékelmélet, rendszerelmélet, algoritmikus modellezés stb. területén. Elméleteik tumorbiológiában történő használatáról bővebben a www.cancer.uw.hu oldalon olvashatunk. Mit tud a daganatsejt, amit egy elromlott sejt elvileg nem kellene tudjon? Például strómaképzés előzi meg különleges anyagok hatására a metasztázisok sejtjeinek odavándorlását, hírnök sejtjeik készítik elő a metasztázist. Neoangiogenesis, növekedési faktorok képzése, klonális transzformáció, kemoterápia-rezisztencia – akár egy agresszív fertőzéshez is hasonlítható a folyamat [5, 10]. Mindez azonban matematikailag nem modellezhető úgy, mint egy hiba következménye. A következőkben erről a modellezésről mutatunk be pár fogalmat szerzők saját munkájából [1] (9. ábra).

Informatikai dinamika a sejtosztódásban, normális sejtosztódás (10. ábra). Ennek esetén C1 sejt osztódását látjuk C2x és C2y sejtekké, itt az I1, I2x, I2y információ megegyezik, self (10. ábra). Itt az I1, I2x, I2y információ megegyezik, self, az S1, S2x, S2y struktúra és az F1, F2x, F2y funkció megegyezik, self, a külső – belső homeosztázis self-vezérelt, perzisztál (11. ábra).

Ezzel szemben N idegen információ (pl. mutálódott mitokondriális DNS, HPV vírus stb. hatására az I (N) hatására C1 sejt osztódásakor az I1, és az I2x, I2y információ részben non-self, az S1, S2x, S2y struktúra és az F1, F2x, F2y funkció részben non-self, a külső – belső homeosztázis rész-



12. ábra. Malignus manifestációk



13. ábra. Az élet evolúciója ősprokariótától az emlősökig

ben non-self vezérelt (malignus manifesztációk – 12. ábra):

A fenti modellezési ismereteket tekintve véve és mitokondrium metabolikus folyamatait és genetikáját leíró tanulmányokból látható, hogy az „ős” protomitokondrium feltételezett anyagcseréjéhez képest valószínűleg sokkal specializáltabb, tehát komplexebb funkciókra lehet képes. A humán mtDNS viszont nagyjából megőrizte eredeti információmennyiségét is és az evolúció során még ki is bővült a gazda-genomból géntranszfer útján (pl. amikor a porcos halak a hideg tengerekbe vándoroltak, ilyen úton lett képes a mitokondrium a hőtermelésre). Lynn Margulis a mitokondriális genommal kapcsolatosan nagyon mélyreható vizsgálatokat végzett, ő az endoszimbióta elmélet kidolgozója, ezt mára bizonyítottnak tekintik [6]. Ugyancsak idetartozik megemlíteni a LUA – LUCA elméletet megemlítése, mert ezáltal derült ki az esetleges összefüggés a mitokondriumok és mai rokonai közt, és mert így vetődött fel a növényi fitoplazmák ellen ható esetleges növényi hatóanyagok szelektív toxicitásának gondolata a rokon mutálódott mitokondriummal szemben (olyan növényeket kerestünk, melyek nem mérgezőek, tehát a specializálódott mitokondriumra nem hatnak).

Az élet evolúciója az ősprokariótától az emlősökig hosszú utat járt be (13. ábra), az ősprokariótától kialakult

protomitokondrium [1, 2, 3, 6] endoszimbiotikus integrációja az őseukariótákba hozta létre a mai életformák többségét, csak a baktériumok kivételével ezalól, melyek közül jó néhány a mitokondriumok rokona, és ez is felhívja a figyelmet a mitokondriális és a mag-genom eltéréseire, illetőleg a kórosan aktiválódott, korábban blokkolt szakaszait is működésbe hozó mitokondriális genom szelektív hatástalanításának esetleges lehetőségére.

Feltűnő a malignus sejtekben a rengeteg, hiperaktív és hipertrófiás mitokondrium. Fentiek tükrében ez nem következménye, hanem valószínű oka lehet a malignus elfajulásnak: a folyamatot rendszerként tekintve, az apoptózis beindulására a mitokondriumok önmaguk életbenmaradása érdekében valószínűleg felülvezérlik és proliferációra készítik a gazdasejtet [1, 2, 3]. Mindenképpen említésre érdemes a daganatokat igen ritkán produkáló alacsonyabbrendű élőlények és az ember mitokondriális DNS-e közti óriási különbség. A cápákban ezek szerint nem rákellenes anyag lehet, hanem éppen a mitokondriumok proliferáció-inducer képessége hiányozhat.

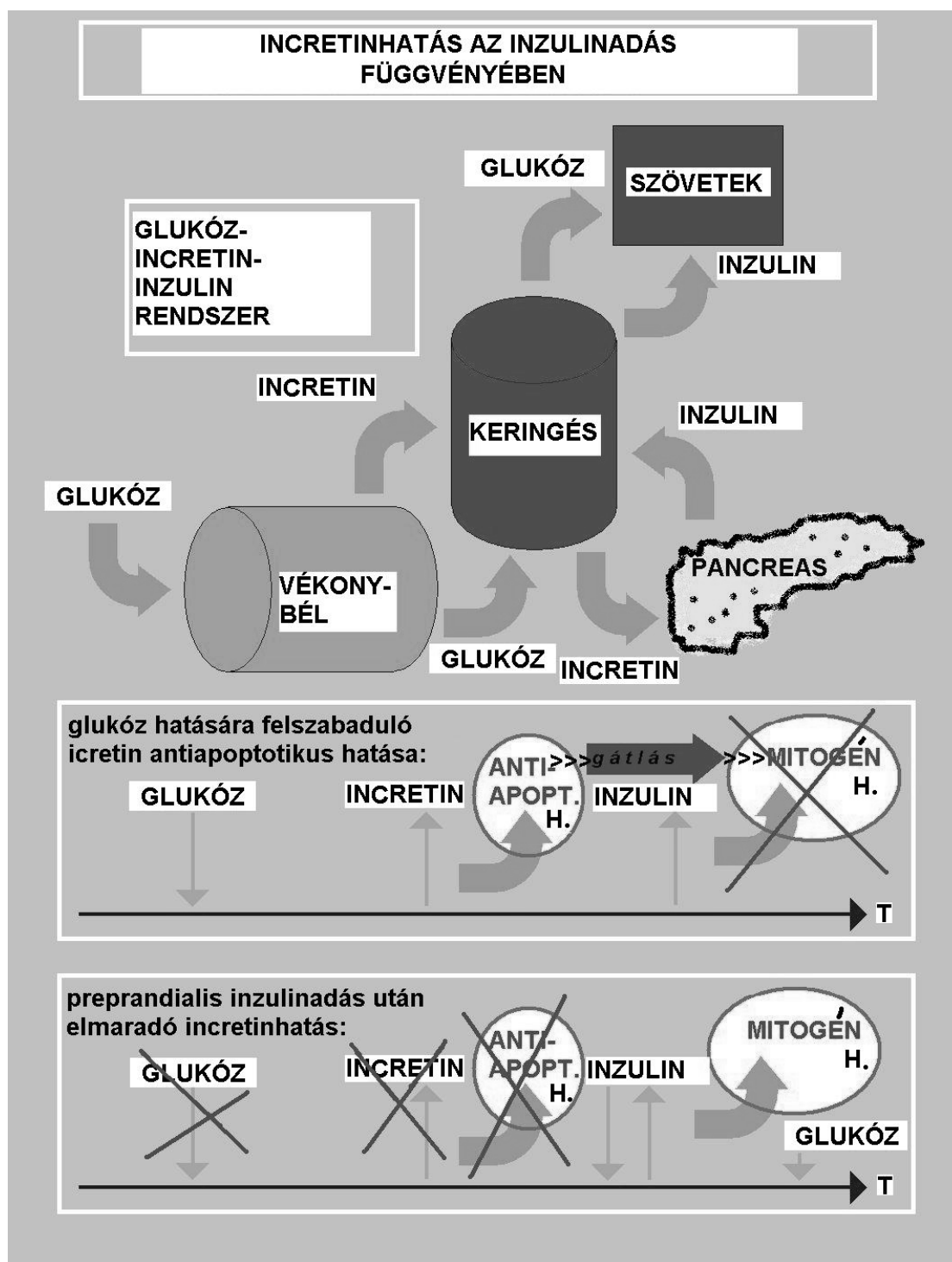
Amennyiben az apoptózis valóban triggere lehetne a mitokondriális mutációnak, az apoptózisok számát megnövelő bármely folyamat, illetőleg az antiapoptotikus hatás elmaradása a malignus elfajulás esélyét növelheti. Ez lehet

az oka az inzulin mitogén hatásának is, growth-factor-like mivolta mellett (14. ábra).

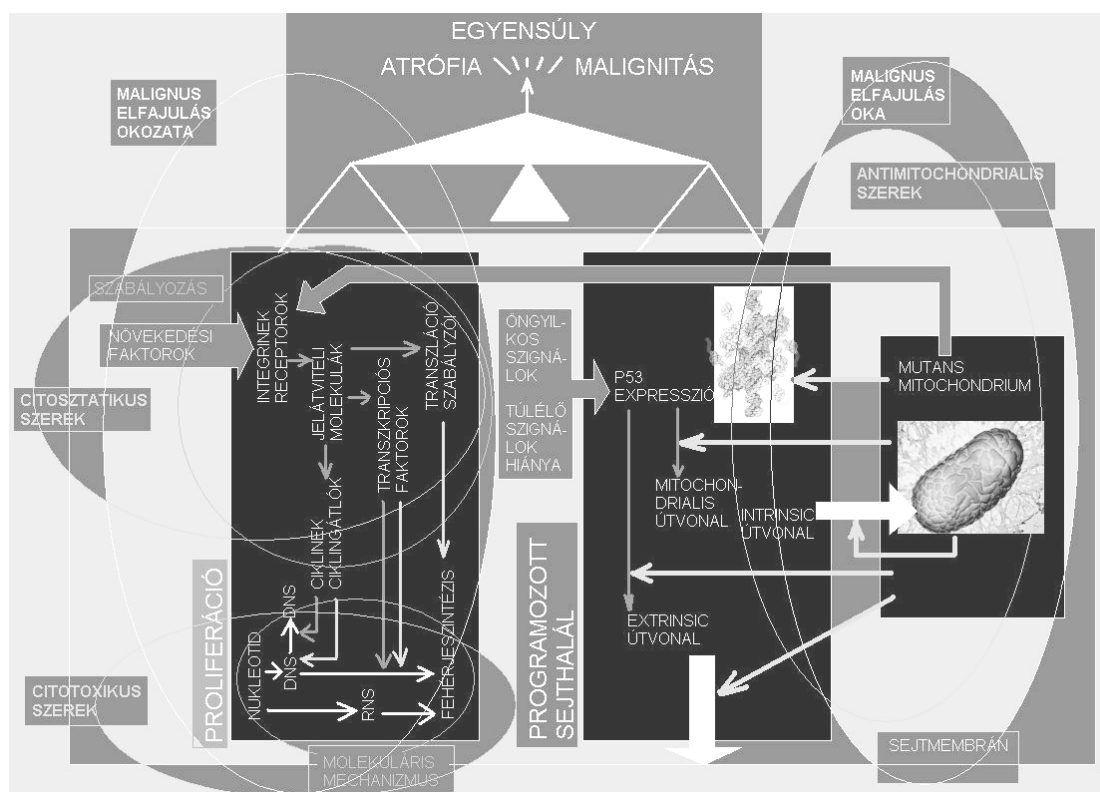
Látható, hogy a preprandialis inzulinadminisztráció a glukózra adott incretinválasz elmaradása miatt nemkívánatos módon az antiapoptotikus hatást csökkenti és ezáltal a mitogén hatást esetleg növelheti.

A továbbiakban a klasszikus antitumorális targetek mellett a feltételezett, mutáns mitokondriumokra ható target jellemzőit szemléltetjük (15. ábra):

Amennyiben a malignus sejt vezérlésében fontos szerepet tölt be a mitokondrium, akkor azt, mint atavisztikusan prokarióta tulajdonságokkal is rendelkező endoszimbiotát elvileg gátolhatják a bakteriális anyagcseretermékek, a penicillin antibiotikus hatásának analógiájára. A vizsgálatok céljára a sejt kultúra fenntartására használatos steril tápfolyadékot a PTE OEC ÁOK Mikrobiológiai intézetében *Streptococcus béta-haemol.* kultúrával oltottunk be és 24 órára 37 °C fokon inkubáltunk. Ezután a savas pH-val ren-



14. ábra. Glukózra adott incretinválasz

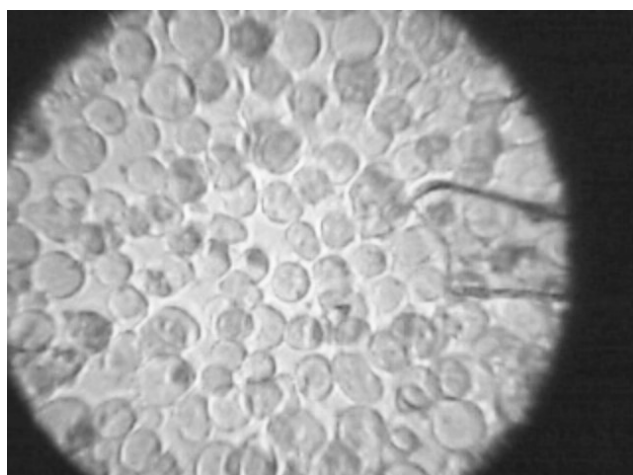


15. ábra. Antitumorális targetek

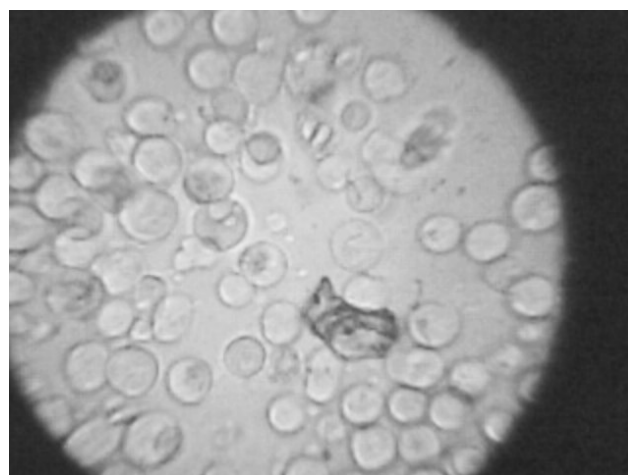
delkező, a felszaporodott és leülepedett baktériumtelepektől zavaros oldatot centrifugáltuk, sterilre szűrtük és a pH-t korrigáltuk. Ebből az anyagból fenntartó táptalajra oltva kontrollmintát vittünk a Mikrobiológiai Intézetbe, ahol az táptalajon inkubálva sterilnek bizonyult. SP2 kultúrát 1:4 arányban a fenti, korrigált, de bakteriális toxinokat tartalmazó és friss tápoldat keverékében 24 óráig inkubáltunk (16. ábra - szerzők saját laboratóriumában mikroszkópos kamerával, vízimmerziós technikával készült felvételek). A korábbi empirikus tapasztalatokkal egybevágóan, melyek szerint az erysipelasos fertőzés növeli a gégetumor műtete utáni túlélés esélyét, a sterilre szűrt Streptococcus toxin, eddigi eredményeink alapján, gátló hatást gyakorolt a malignus

sejtkultúrára, annak ellenére, hogy steril, baktériummentesre szűrt volt és pH-ját korrigáltuk, valamint a tápoldatnak csak 25 %-át tette ki (17. ábra), ellentétben a régi, ismert OK-432 kísérletekkel, ahol penicillinnel inaktivált Streptococcuslysatummal próbálták tumorgátló hatást elérni.

Ezek alapján javasoltuk a potenciálisan mutálódott mitokondrium, mint „nyolcadik antitumoralis target” lehetséges anyagai közt vizsgálatra tanulmányunk elméleti részében a bacterialis toxinokat is az antibiózis elvei alapján, a bacterialis toxin vs. mutans mitokondrium lehetősége miatt [1, 15].



16. ábra. SP2 kultúra



17. ábra. Streptococcus toxin hatása

Összefoglalás

A szelídgesztenye kivonatok erős citotoxicitást mutattak tumorsejtvonalakon. A kivonat komponenseinek szeparációs munkálatai jelenleg is folyamatban vannak, a cél egy olyan molekula megtalálása, amely önmagában nagy terápiás-toxikus küszöbkülönbséggel rendelkező antitumorális szer lehetne, vagy adjuvánsként csökkenthetné a klasszikus daganatellenes szerek terápiás dózisát. Honlap a www.cancer.uw.hu címen olvasható [1].

Irodalom

1. Czibalmos-Kozma F., Papp E. – *A rák mitokondriális elmélete*, www.cancer.uw.hu, (a honlapot a szerzők üzemeltetik és havi rendszerességgel karbantartják).
2. Gabaldón, T., Huynen M.A. – *The proto-mitochondrial metabolism*, *Science*, 2003, 301:690.
3. Henze K., Martin W. – *Evolutionary biology: essence of mitochondria*, *Nature*, 2003, 426:127–128.
4. Hodges A., Turing A. – *The Enigma*, Simon & Schuster, New York, 1983, 5.
5. Kleinsmith L.J. – *Principles of Cancer Biology*, Pearson Benjamin Cummings, 2006.
6. Margulis L., Dorion S. – *Dazzle Gradually: Reflections on the Nature of Nature*, Sciencewriters Books, 2007.
7. Morgenstern O., von Neumann J. – *The Theory of Games and Economic Behavior*, Princeton University Press, 1947.
8. Nash J. – *Equilibrium points in n-person games*, *PNAS*, 1950, 36:48–49.
9. Nash J. – *Non-Cooperative Games*, *The Annals of Mathematics*, 1951, 54:286–295.
10. Tannock I.F., Hill R.P., Bristow R. et al. (eds) – *The Basic Science of Oncology*, 4th ed., McGraw-Hill, 2005.
11. Turing A. – *Computing Machinery and Intelligence*, *Mind*, 1950, 59:433–460.
12. von Neumann J., Morgenstern O. – *Theory of games and economic behavior*, Princeton University Press, 1944.
13. Wolfram S. – *A New Kind of Science*, Wolfram Media, 2002.
14. *** Health Protection Agency Culture Collections – *European Collection of Cell Cultures* <http://www.hpacultures.org.uk/>.
15. *** Szabadalmi leírás – *Castanea sativa* Mill. (szelídgesztenye) kivonatok és az ezekből vagy ezekben található hatóanyagokból készült oldatok, infúziós oldatok, injekciók, tabletták, szirupok és egyéb gyógyszerformák felhasználása rosszindulatú daganatsejt kultúrák in vitro gátlására és rosszindulatú daganatos betegségek kezelésére, ©Dr. Czibalmos-Kozma Ferenc, Dr. Papp Erika 2008., M. Sz. H. szám: P0800453/2008.07.22.