

ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΤΗΣ 20ΗΣ ΜΑΪΟΥ 1993

ΠΡΟΕΔΡΙΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΔΕΣΠΟΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΙΑΤΡΙΚΗ. — **Ἐπίδραση τῆς κυκλοσπορίνης - Α, ἐπὶ καρκίνου παχέος ἐντέρου ἀνθρώπου, ἐμφυτευθέντος εἰς πειραματόζωα, ὑπὸ τοῦ Ἀκαδημαϊκοῦ κ. Γρ. Σκαλκέα καὶ τῶν Ἀ. Κωστάκη, Σ. Τσελένη-Μπαλαφούτα, Σ. Γιάγκου, Δ. Ἡλιοπούλου, Χρ. Κουντούρη, Α. Χαλιάσου, Π. Καραγιαννάκου, Γ. Καρατζᾶ***.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ἡ Κυκλοσπορίνη-Α, εἶναι κυκλικὸ ἐνδεκαπεπτίδιο, ποὺ ἀπομονώθηκε ἀπὸ τὸ μύκητα *Tolypocladium inflatum* καὶ ἀποτελεῖ ἰσχυρὸ ἀνοσοκατασταλτικὸ παράγοντα. Στὴν καθ' ἡμέρα κλινικὴ πράξι, χρησιμοποιεῖται μὲ ἐπιτυχία, στὶς μεταμοσχεύσεις ὀργάνων, μὲ σκοπὸ τὴν πρόληψη τῆς ἀπορρίψεως [1], καθὼς καὶ στὴ θεραπευτικὴ ἀντιμετώπιση πολλῶν αὐτοακνόσων νοσημάτων [2].

Κλινικὲς καὶ πειραματικὲς ἐργασίες, [2,3,4,5,6,7,35,36] ἐνοχοποιοῦν τὸ ἀνοσοκατασταλτικὸ αὐτὸ φάρμακο, ὡς ὑπεύθυνο γιὰ τὴν πρόκληση κακοήθων ὄγκων στοὺς μεταμοσχευμένους ἀσθενεῖς, χωρὶς ὅμως νὰ ὑπάρχουν σαφεῖς ἐνδείξεις καὶ ὁμοφωνία ἐπὶ τοῦ μηχανισμοῦ τῆς δράσεώς του. Ἀπὸ πολλοὺς, ἡ καρκινογόνος δράση τῆς κυκλοσπορίνης ἀποδίδεται στὴν ἀνοσοκατασταλτικὴ τῆς ιδιότητα, ἐνῶ ἄλλοι ὑποστηρίζουν ὅτι τὸ φάρμακο ἔχει ἄμεση ἐπίδραση στὸ ἐπίπεδο τοῦ DNA.

Ἡ κυτταροτοξικὴ δράση τοῦ φαρμάκου, ἐναντι τῶν Τ-λεμφοκυττάρων φαίνεται ὅτι παίζει καθοριστικὸ ρόλο γιὰ τὴν ἐμφάνιση νεοπλασμάτων ποὺ σχετίζονται ἄμεσα μὲ τὴν ἀνοσοκαταστολή, ὅπως εἶναι γιὰ παράδειγμα τὸ σάρκωμα Kaposi καὶ ὀρισμένα λεμφώματα [8,9,10]. Ἡ ἐμφάνιση κακοηθείας θὰ μπορούσε νὰ ὀφείλεται

* GR. SKALKEAS, A. KOSTAKIS, S. TSELENI-BALAFOUTA, S. GAGOS, D. ILIOPOULOS, CH. KOUNTOURIS, A. HALIASSOS, P. KARAYANNACOS, G. KARATZAS, **Influence of Cyclosporin-A, on a human colon cancer cell line transplanted in nude mice.**

σ' αὐτὴ καθ' αὐτὴ τὴν ἀναπόφευκτη —ἀλλὰ καὶ ἐπιθυμητὴ— ἀνεπάρκεια τοῦ ἀνοσο-
λογικοῦ συστήματος, μὲ ἀποτέλεσμα τὴν ἐγκατάσταση καὶ ἐξέλιξη τῆς νόσου.
Πράγματι ἡ διακοπὴ τοῦ φαρμάκου σὲ ἀσθενεῖς ποὺ ἐμφάνισαν σαρκώματα εἶχε ὡς
ἀποτέλεσμα τὴν ὑποχώρηση τῶν σαρκωμάτων καὶ τὴν πλήρη ἴαση [9,10,11]. Ἀπὸ
τὴν ἄλλη πλευρὰ, φαίνεται πολὺ πιθανὸν ὅτι τὸ φάρμακο, ἐκτὸς τῆς ἀνοσοκατασταλ-
τικῆς του δράσεως, ἔχει ἐπιπρόσθετη, ἀνεπιθύμητη μεταλλαξιγόνο ἐπίδραση.

Σύμφωνα μὲ τὶς παρατηρήσεις τῶν Yusawa καὶ συν., ἡ κυκλοσπορίνη, σὲ λεμ-
φοκύτταρα ἀνθρώπου *in vitro*, φαίνεται ὅτι ἐπιδρᾷ στὸ ἐπίπεδο τοῦ DNA, προκα-
λώντας αὐξηση τῶν ἀνταλλαγῶν γενετικοῦ ὕλικου μεταξὺ ἀδελφῶν χρωματίδων, φαι-
νόμενο ποὺ συνδέεται μὲ μεταλλαξιγένεση [13]. Ἐνῶ ὁ Ding ἀνέφερε ὅτι τὸ ποσοστὸ
τῶν χρωμοσωματικῶν διαταραχῶν, ποὺ παρατηρήθηκαν σὲ λεμφοκύτταρα περιφε-
ρικοῦ αἵματος ἀσθενῶν ὑπὸ ἀνοσοκαταστολῆ μὲ κυκλοσπορίνη, ἐμφανίσθηκε σημαν-
τικὰ αὐξημένο σὲ σχέση μὲ τοὺς ἀσθενεῖς ποὺ ἐλάμβαναν διαφοροτικὸ ἀνοσοκατα-
σταλτικὸ σχῆμα ἢ σὲ σύγκριση μὲ τὸν γενικὸ πληθυσμὸ [14].

Ἡ ἐπίδραση τῆς κυκλοσπορίνης στὴν *in vivo* ἀνάπτυξη καὶ ἐξέλιξη καρκίνου
ἀποτελεῖ ἀμφιλεγόμενο σημεῖο. Ἔχει ἀποδειχθεῖ ὅτι ἡ κυκλοσπορίνη ἐπιταχύνει
τὴν ἀνάπτυξη ἥπατικῶν μεταστάσεων μετὰ ἀπὸ ἔγχυση καρκινικῶν κυττάρων στὴν
πυλαία κυκλοφορία σὲ ἀρουραίους [15], ἐνῶ ὑποστηρίζεται ὅτι ἐπιδρᾷ κατασταλτικὰ
στὴν ἀνάπτυξη καρκίνου τοῦ παγκρέατος, ἀναστέλλοντας τὴ δραστηριότητα τοῦ ἐνζύ-
μου ὀρνιθίνης δεκαρβοξυλάση καὶ παρεμβαίνοντας στὸ μεταβολισμὸ τῶν πολυαμινῶν,
ἀπαραιτῶν μορίων στὴν ἀνάπτυξη τῶν καρκινικῶν κυττάρων τοῦ παγκρέατος [16].

Σὲ προηγούμενη ἀνακοίνωσή μας [17], παρουσιάσαμε σημειακὲς μεταλλάξεις
στὸ κωδικόνιο 12 τοῦ πρωτοογκογονιδίου K-Ras, σὲ μεταμοσχευμένους ἀσθενεῖς
ποὺ ἐμφάνισαν κακοήθεις νεοπλασίες, εὐρισκόμενους ὑπὸ ἀνοσοκατασταλτικῆς θερα-
πείας μὲ κυκλοσπορίνη.

Στὴν πειραματικὴ αὐτὴ φάση τῆς ἐρευνητικῆς μας προσπάθειας, σκοπὸς μας
ἦταν ἡ μελέτη τῆς ἐπιδράσεως τῆς κυκλοσπορίνης, στὴν κινητικὴ τῆς ἀναπτύξεως,
τὴν κλωνικὴ ἐξέλιξη καὶ τὴ βιολογικὴ συμπεριφορὰ τῆς συνεχοῦς καρκινικῆς κυτ-
ταρικῆς σειρᾶς SW-480, *in vivo* σὲ ἀθυμικοὺς ποντικούς καὶ *in vitro* σὲ κυτταρικὲς
καλλιέργειες.

Οἱ χαρακτηριστὲς ποὺ μελετήσαμε ἦσαν : α) Ὁ ρυθμὸς ἀναπτύξεως τῶν καρκι-
νικῶν κυττάρων (growth kinetics), παρουσία τῆς κυκλοσπορίνης, *in vivo*, μετὰ τὴν
ἐμφύτευση ὄγκου στοὺς ἀθυμικοὺς ποντικούς καὶ *in vitro*, σὲ κυτταρικὲς καλλιέργειες.

β) Ἡ παθολογοανατομικὴ εἰκόνα τῶν ὄγκων ποὺ ἐμφανίσθηκαν στὰ πειραμα-
τόζωα τὰ ὁποῖα ἔλαβαν κυκλοσπορίνη.

γ) Ἡ καρουτυπικὴ εἰκόνα καὶ ἡ κλωνικὴ ἐξέλιξη τοῦ ὄγκου, πρὶν, καὶ μετὰ τὸν

έμβολιασμό τῶν καρκινικῶν κυττάρων στὰ πειραματόζωα καὶ τὴν ἔκθεσή τους ἢ ὄχι στὴν κυκλοσπορίνη.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Ἡ κυτταρική σειρά τῶν πειραμάτων μας ἦταν ἡ SW-480 (ATCC CCL 228), μία ἀπὸ τὶς καλύτερα μελετημένες κυτταρικές σειρές καρκίνου τοῦ παχέος ἐντέρου τοῦ ἀνθρώπου [18]. Τὰ ταχύτατα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα τῆς ἐν λόγω σειρᾶς, πού ἀπομονώθηκαν καὶ χαρακτηρίστηκαν ἀπὸ τὸν Leibovitz καὶ τοὺς συνεργάτες του τὸ 1976, προέρχονται ἀπὸ ἄνδρα ἡλικίας 50 ἐτῶν μὲ ἀδενοκαρκίνωμα τοῦ παχέος ἐντέρου χαμηλῆς διαφοροποιήσεως (στάδιο B κατὰ Duke) [19]. Ἡ ἐπιλογή τῆς ἀνωτέρω κυτταρικῆς σειρᾶς ἔγινε μὲ βασικά κριτήρια τοὺς ὑψηλοὺς ρυθμοὺς ἀναπτύξεως πού ἐμφανίζει *in vitro*, τὴν ἱκανότητα σχηματισμοῦ ὄγκων σὲ ἀθυμικούς ποντικούς καὶ τὸ γεγονός ὅτι ἡ καρουτυπική της εἰκόνα εἶναι σχετικὰ ἀπλούστερη ἀπὸ ἄλλες παρόμοιες κυτταρικές σειρές [18,20,21].

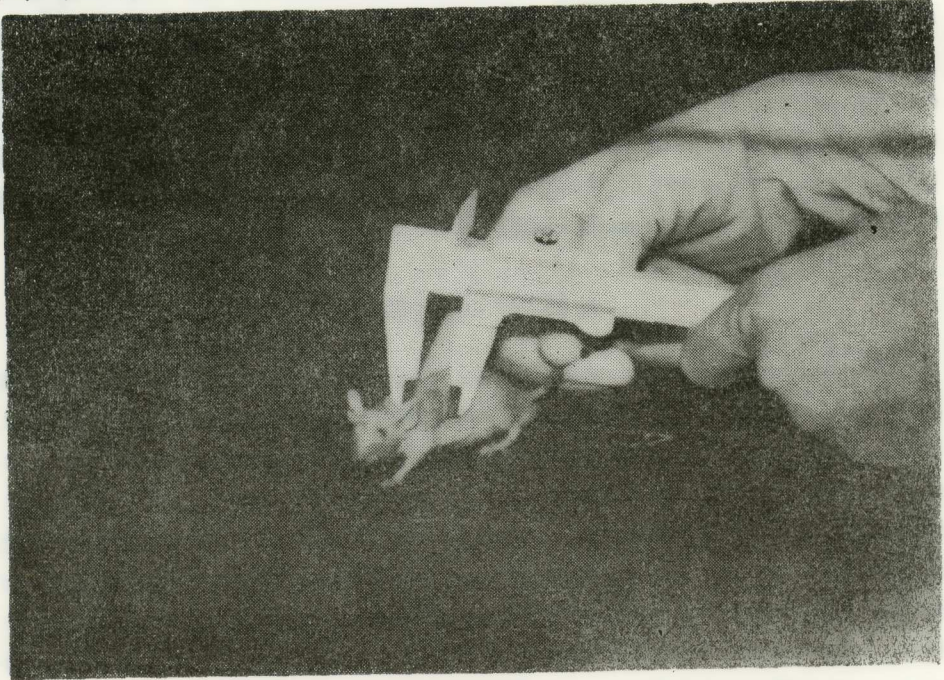
A. IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ

Χρησιμοποιήθηκαν ἄρσενικοὶ ἀθυμικοὶ ποντικοὶ (nude mice) τοῦ τύπου Swiss balb.c nu/nu (B&K,UK), ἡλικίας 6 ἐβδομάδων. Τὰ πειραματόζωα αὐτὰ εἶναι προιόντα μεταλλάξεως, ἐπιβιώνουν μόνον σὲ ἄσηπτες ἐργαστηριακές συνθήκες καὶ χρησιμοποιοῦνται εὐρύτατα στὴ βασική καὶ τὴν ἐφαρμοσμένη ἔρευνα κατὰ τοῦ καρκίνου [22,23,24]. Στους ἀθυμικούς ποντικούς εἶναι δυνατόν νὰ ἐμφυτευθοῦν καὶ νὰ ἐξελιχθοῦν μὲ ἐπιτυχία ὡς ἄλλομοσχεύματα, νεοπλάσματα πού προέρχονται ἀπὸ τὸν ἄνθρωπο [24]. Τὰ ἀθυμικά ποντίκια διατηρήθηκαν σὲ εἰδικούς κλωβοὺς ἀπομονώσεως, ἐτρέφοντο μὲ ἀποστειρωμένη τροφή (Roche), ἐνῶ ὅλοι οἱ χειρισμοὶ ἐπ' αὐτῶν πραγματοποιήθηκαν ὑπὸ ἄσηπτες συνθήκες, σὲ θάλαμο LAF (Laminar Air Flow).

Τὰ κύτταρα τῆς SW-480, τὰ ὁποῖα ἀναπτύσσονταν σὲ θρεπτικό μέσο μὴ ἐξαρτώμενο ἀπὸ παροχὴ διοξειδίου τοῦ ἀνθρακα (CO₂ Independent Med.-Gibco), ἐμπλουτισμένο μὲ 15% ὀρὸ ἐμβρίου βοδῆς (Foetal Calf Serum, Gibco), παρελήφθησαν ἀπὸ ὑποπλήρεις (subconfluent) μονοστιβάδες, μὲ ἐνζυματικὴ ἀποκομιδὴ. Μετὰ ἀπὸ διαδοχικές φυγοκεντρήσεις-ἐκπλύσεις τὰ κύτταρα ἐπαναιωρήθηκαν σὲ φυσιολογικὸ ὀρό. Ὁ ἀριθμὸς καὶ ἡ βιωσιμότητά τους ὑπολογίσθηκαν μὲ ἔμβια χρώση ἀποκλεισμοῦ (trypan-blue) στὸ μικροσκόπιο, μὲ χρῆση αἰμοκυτταρομέτρου Neubauer [25].

Τὴν πρώτη ἡμέρα τοῦ πειράματος, 3×10^6 καρκινικά κύτταρα ἐμβολιάσθηκαν ὑποδορίως στὴ ράχη κάθε πειραματοζώου. Τὰ πειραματόζωα χωρίσθηκαν σὲ 2 ομά-

δες. Στην ομάδα A ($n = 10$), μία ημέρα πριν την εμφύτευση των καρκινικών κυττάρων χορηγήθηκε εφάπαξ υποδορίως το σκεύασμα Sandimmun (Sandoz) σε δόσολογία 0,05 mg κυκλοσπορίνης ανά πειραματόζωο που είναι ανάλογη με εκείνη που λαμβάνουν οι μεταμοσχευμένοι ασθενείς [1]. Η χορήγηση του φαρμάκου συνεχίστηκε καθημερινώς σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στα πειραματόζωα της ομάδας B ($n = 10$) ουδεμία φαρμακευτική ή χημική ουσία χορηγήθηκε. Η μέτρηση της αναπτύξεως του όγκου γινόταν κάθε 7 ημέρες με τη χρησιμοποίηση μικροδιαστημομέτρου (φωτ. 1).



Φωτ. 1. Μέτρηση του μεγέθους του όγκου σε άθιμο ποντικό (nude mouse) με μικροδιαστημόμετρο.

Σε όσα πειραματόζωα δεν αναπτύχθηκαν όγκοι μετά τον αρχικό έμβολιασμό των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε έπανοφθαλμισμός κατά την 27η ημέρα του πειράματος.

Μεταξύ 75ης και 120ης ημέρας από την έναρξη του πειράματος τα πειραματόζωα και των δύο ομάδων έθανατώθηκαν και υποβλήθηκαν σε λεπτομερή παθολογοανατομική εξέταση ενώ ιστοτεμάχια από τους όγκους ελήφθησαν υπό άσηπτες συνθήκες, προς ιστοκαλλιέργεια, με σκοπό την καρυοτυπική ανάλυση.

B. IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ

Προκειμένου να διευκρινισθεῖ ἐὰν ἡ ἐπίδραση τῆς κυκλοσπορίνης ὀφείλεται στὴν ἀνοσοκατασταλτικὴ τῆς δράση ἢ σὲ ἄμεση φαρμακολογικὴ ἐπίδραση στὸ ἐπίπεδο τοῦ DNA, μελετήσαμε ἐπίσης τὴν ἐπίδραση τοῦ φαρμάκου ἐπὶ τῶν καρκινικῶν κυττάρων τῆς ἀνωτέρω σειρᾶς *in vitro*, ὅπου δὲν ὑφίσταται ἀνοσολογικὸς μηχανισμός.

Γιὰ τὸ σκοπὸ αὐτὸ θέσαμε σὲ ἑπτὰ τρυβλία διηρημένα σὲ 24 κυψέλες χωρητικότητος ἐνὸς κυβικοῦ ἑκατοστοῦ ἐκάστη 10×10^4 καρκινικὰ κύτταρα. Σὲ κάθε μία κυψέλη προσετέθη 1 ml τοῦ θρεπτικοῦ μέσου RPMI-1640 ἐμπλουτισμένου μὲ 15% ὀρὸ ἐμβρίου βοῦς, L-γλουταμίνη καὶ 2% ἀντιβιοτικά (Penicillin 1.000 u/ml, Streptomycin 1.000 mg/ml καὶ Gentamycin 50 ug/ml-Gibco-BRL). Τὰ κύτταρα καλλιεργήθησαν σὲ ἀτμόσφαιρα 5% CO₂, στοὺς 37° C. Ἡ δράση τοῦ φαρμάκου μελετήθηκε στὶς συγκεντρώσεις 0.02, 0.2, 0.4, 1.0 καὶ 10 μg ἀνὰ ml θρεπτικοῦ μέσου. Καθημερινῶς καὶ γιὰ ἑπτὰ ἡμέρες ἀπὸ τὴν ἑναρξὴ τοῦ πειράματος τὰ κύτταρα κάθε κυψέλης ἀποκολλῶντο ἐνζυματικῶς μὲ τὴ χρησιμοποίησις διαλύματος Θρυψίνης - EDTA (Gibco-BRL), ἡ ὁποία ἀναστέλλετο μὲ περίσσεια ὀροῦ καὶ τὰ κύτταρα καταμετροῦντο σὲ ἠλεκτρονικὸ μετρητὴ κυττάρων (Coulter counter). Ἡ ὅλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σὲ τετραπλῆς κυτταροκαλλιέργειες καὶ ἐπαναλήφθηκε εἰς διπλοῦν.

Ἡ διάρκεια 7 ἡμερῶν κρίθηκε ἱκανοποιητικὸ χρονικὸ διάστημα γιὰ τὴν πραγματοποίησις τοῦ *in vitro* ἐλέγχου διότι πέραν αὐτοῦ τοῦ διαστήματος, ἡ ἐπιφάνεια τῶν κυτταροκαλλιεργειῶν καλύπτεται ὀλοσχερῶς ἀπὸ τὰ καρκινικὰ κύτταρα μὲ ἀποτέλεσμα τὴν παρεμπόδιση ἐξ ἐπαφῆς τοῦ πολλαπλασιασμοῦ των, ἡ παρουσία δὲ καταβολικῶν προϊόντων καὶ ἡ ἔνδεια τοῦ θρεπτικοῦ μέσου καθιστοῦν τίς μεγαλύτερου χρονικοῦ διαστήματος μελέτες ἀνακριβεῖς [25].

Γ. ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Γιὰ τὴν καρουτυπικὴ ἀνάλυση, 0,01-0,05 μg/ml κολσεμιδίου (Colcemid, Gibco-BRL) προσετέθησαν στὸ θρεπτικὸ μέσο τῶν μητρικῶν κυτταροκαλλιεργειῶν καὶ τὰ κύτταρα ἐπάσθησαν 1-12 ὥρες στοὺς 37° C. Μετὰ τὴν ἐνζυματικὴ ἀποκόλληση τῶν κυττάρων ἀπὸ τὴν ἐπιφάνεια τῆς φιάλης ἀκολουθοῦσε κατεργασία μὲ ὑποτονικὸ διάλυμα KCl 0,075 M γιὰ 15-20 min καὶ μονιμοποίησις μὲ διάλυμα τοῦ Carnoy. Τὰ κυτταρολογικὰ παρασκευάσματα τῶν χρωμοσωμάτων κατεργάζοντο μὲ διάλυμα 2XSSC καὶ ἀκολουθοῦσε χρώση G-ταινιῶν μὲ τὴ μέθοδο τοῦ Seabright [26]. Σὲ

κάθε μία κυτταρική καλλιέργεια φωτογραφίζοντο στη μέγιστη μεγέθυνση συμβατικού οπτικού μικροσκοπίου περίπου 30 μιώσεις. Καρυότυπος γινόταν σε τουλάχιστον 15 μεταφράσεις ανά κυτταρική καλλιέργεια. 'Η κατάταξη τῶν χρωμοσωμάτων ἔγινε κατὰ I.S.C.N. 1991 [27].

Παρόμοια διαδικασία ἀκολογήσαμε καὶ στὶς ἱστοκίτες καλλιέργειες ποὺ ἀναπτύχθηκαν μετὰ τὴν ἐνζυματικὴ ἀποικοδόμηση τῶν συμπαγῶν ὄγκων ποὺ ἐμφανίσθηκαν στὰ πειραματόζωα. Γιά τὴν πραγματοποίηση τῶν ἱστοκαλλιιεργειῶν χρησιμοποιήσαμε μέθοδο μηχανικῆς καὶ ἐνζυματικῆς ἀποικοδομήσεως τοῦ ἱστοῦ, πρὸς κυτταρικὸ ἐναιώρημα, μετὰ τὴ βοήθεια τοῦ ἐνζύμου κολλαγέναση (Sigma) ὅπως αὐτὴ περιγράφεται ἀπὸ τὸν Fresney (1987) [25].

Δ. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

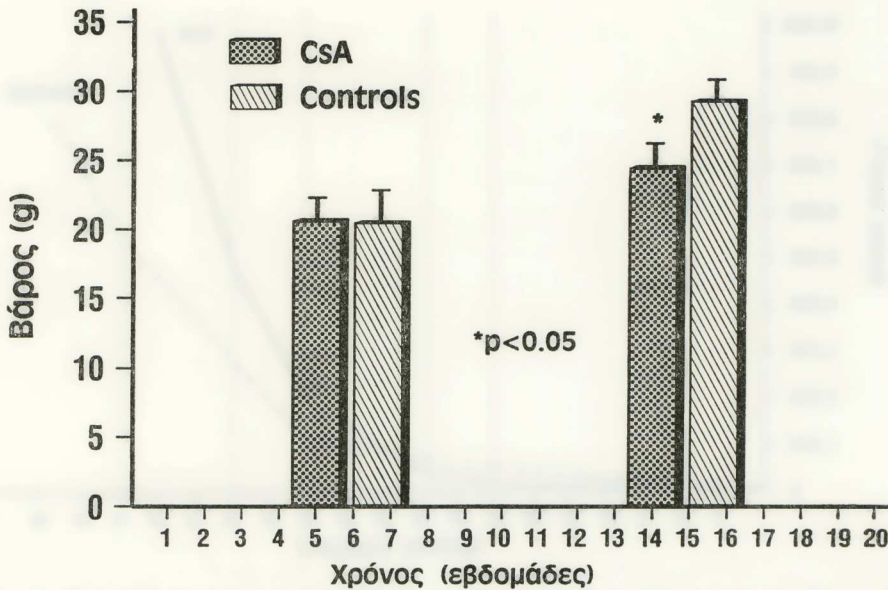
Γιά τὴν παθολογοανατομικὴ μελέτη ὁλόκληρα τὰ μονιμοποιημένα σὲ φορμόλη πειραματόζωα, παρασκευάσθηκαν ἐπιμελῶς, μετὰ σκοπὸ τὴν ἐντόπιση πιθανῶν μεταστάσεων στὸ ἥπαρ, τοὺς πνεύμονες καὶ τὸν ἐγκέφαλο. Τομῆς ἀπὸ διάφορες θέσεις τοῦ ὄγκου, ἀλλὰ καὶ ἀπὸ διάφορα σπλάχνα (πνεύμονες, ἥπαρ, ἐγκέφαλος), χρωματίσθηκαν μετὰ Αἱματοξυλίνη-Ἐωσίνη, πρὸς μικροσκοπικὴ ἐξέταση.

Α Π Ο Τ Ε Λ Ε Σ Μ Α Τ Α

In vivo μελέτη

'Η πρώτη ἐμφάνιση ψηλαφητῶν ὄγκων στὰ πειραματόζωα τῆς ομάδος ἐλέγχου σημειώθηκε μετὰ ἀπὸ 30-33 ἡμέρες ἐνῶ στὴν ομάδα ποὺ ἐλάμβανε κυκλοσπορίνη, παρατηρήθηκε καθυστέρηση 5-7 ἡμερῶν. Μετὰ βάση τὸ μέγεθος, ἡ ἀνάπτυξη τῶν ὄγκων μέχρι τὴν 45ῃ ἡμέρα ἦταν περίπου ἡ αὐτὴ μετὰ τῶν δύο ομάδων, μετὰ μικρὴ ὑπεροχή, στατιστικῶς ἀσήμαντη, στὴν ομάδα ἐλέγχου. Ἀπὸ τὴν 60ῃ ἡμέρα ἡ σχέση ἀνάπτυξως ἀντιστρέφεται, μετὰ ἀποτέλεσμα κατὰ τὴν 70ῃ ἡμέρα νὰ παρατηρηθεῖ στὴν ομάδα τῆς κυκλοσπορίνης μεγάλη αὐξηση τοῦ ὄγκου μετὰ σημαντικῶς στατιστικὴ διαφορὰ ($p < 0.001$).

Κατὰ τὴ ζύγιση τῶν πειραματοζώων τὴν 55ῃ ἡμέρα τὰ ποντίκια ποὺ ἐλάμβαναν κυκλοσπορίνη παρουσίασαν 13% ἀπώλεια βάρους (μ.ο. : 24 gr) σὲ σχέση μετὰ τοὺς μάρτυρες (27.8 gr). Ὁ χρόνος ἐπιβιώσεως τῶν ἀθυμικῶν ποντικῶν ποὺ ἐλάμ-



Σχήμα 1. Σύγκριση του σωματικού βάρους των πειραματοζώων κατά τη διάρκεια του πειράματος. (Βάρος εις γραμμάρια, χρόνος εις εβδομάδες).

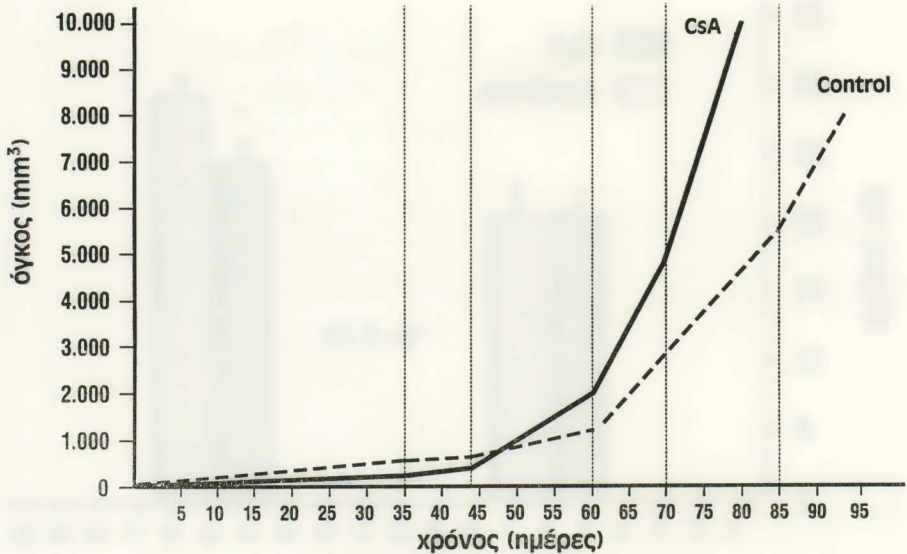
βαναν το φάρμακο ήταν μικρότερος (2.5-3 μήνες) σε σχέση με τον αντίστοιχο χρόνο για την ομάδα ελέγχου που ήταν 3, 6-4 μήνες (σχήμα 1).

Η κινητική της ανάπτυξης των μέσων όρων των όγκων που αναπτύχθηκαν στις δύο ομάδες των πειραματοζώων εμφάνισε σημαντικές διαφορές. Μετά την 45η ημέρα ο ρυθμός ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων ήταν πολύ ταχώς στα πειραματόζωα που έλάμβαναν κυκλοσπορίνη, με αποτέλεσμα κατά την 70ή ημέρα να σημειωθεί ο μέγιστος όγκος (11.857,5 κυβ. χιλιοστά). Η μέγιστη ανάπτυξη του όγκου στους μάρτυρες σημειώθηκε με καθυστέρηση 30 ημερών και το μέγεθός του ήταν κατά 6,5% μικρότερο (σχήμα 2).

Από τα πειραματόζωα στα όποια πραγματοποιήθηκε επανανοφθαλμισμός κατά την 27η ημέρα του πειράματος εκείνα που έλάμβαναν το φάρμακο παρουσίασαν ενωρίτερα όγκους από ό,τι οι μάρτυρες. Η ανάπτυξη των όγκων αυτών ήταν σαφώς μεγαλύτερη από αυτή που σημειώθηκε στην ομάδα ελέγχου ($p < 0.001$).

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Κατά την Παθολογοανατομική εξέταση τα πειραματόζωα τα όποια έλάμβαναν κυκλοσπορίνη παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικώς μεγαλύτερη ανάπτυξη των



Σχήμα 2. Κινητική ανάπτυξεως τής κυτταρικής σειράς SW-480, in vivo, σε άθυμικούς μύς τών ομάδων ελέγχου (Control) και κυκλοσπορίνης (CSA). Όγκος σε mm³, χρόνος σε ημέρες.

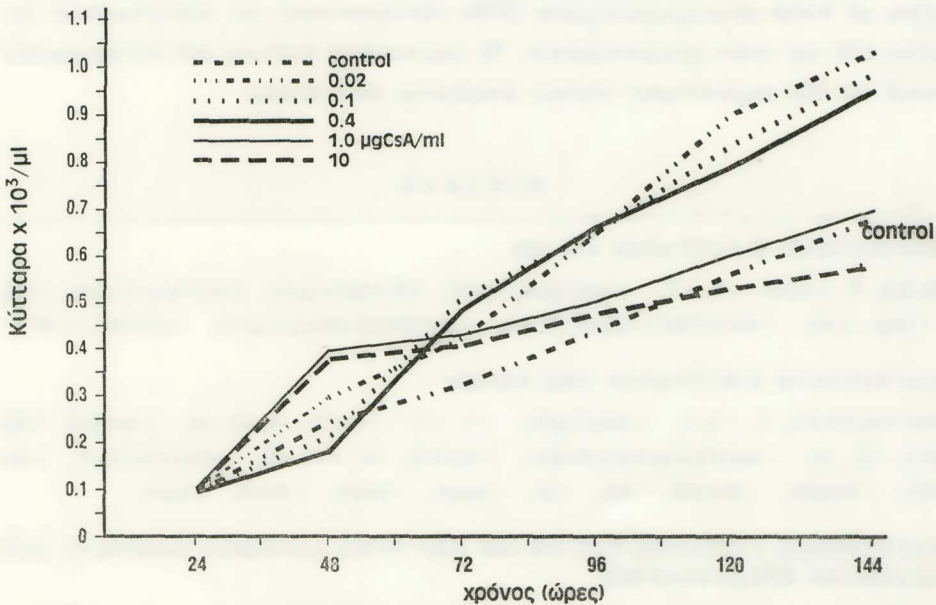
όγκων. Οί όγκοι τών πειραματοζώων πού έλάμβαναν τó φάρμακο ανάπτυχθηκαν ύποδοριώς και είχαν μείζονα διάμετρο 1.5 έως 4 έκατοστά ($\bar{X} = 2.42$ εκ.), σε όλες δέ τις περιπτώσεις, διηθούσαν τούς γραμμωτούς μύες με έξαιρέση τόν μικρότερο όγκο. Σε καμία περίπτωση δέν παρατηρήθηκε αίματογενής μετάσταση.

Ίστολογικά πρόκειται για άδιαφοροποίητα καρκινώματα συμπαγοϋς τύπου, από στρογγύλα εύμεγέθη κύτταρα με προέχον ήωσινόφιλο πυρήνιο και κατά τόπους γιγάντιες κυτταρικές μορφές. Τó κυτταρόπλασμα κυμαινόταν από λίγο έως μέτριο. Ή κυτταρική άτυπία ήταν γενικά μεγάλη και οί μιτώσεις πολλές. Όλοι οί όγκοι παρουσίαζαν έκτεταμένες νεκρώσεις, όρισμένοι δέ και άποτιτανώσεις.

Στά πειραματόζωα τής ομάδας έλέγχου οί όγκοι ανάπτυχθηκαν ύποδοριώς και δυό από αυτούς παρουσίασαν εξέλκωση. Ή μείζων διάμετρος κυμαινόταν μεταξύ 1.5 και 3 έκατοστά ($\bar{X} = 2.07$). Μόνο ένας όγκος παρουσίαζε διήθηση γραμμωτών μυών. Ό ίδιος όγκος είχε μικρομεταστάσεις στον πνεύμονα. Ή ιστολογική εξέταση τών όγκων απέκάλυψε άδιαφοροποίητα καρκινώματα με μορφολογία παρόμοια με τήν ομάδα πού έλάμβανε τó φάρμακο. Παρατηρήθηκαν άφθονες μιτώσεις και νεκρώσεις. Στά πειραματόζωα τά όποια έλάμβαναν κυκλοσπορίνη, αντίθετα προς τήν ομάδα έλέγχου, διαπιστώθηκε σαφής διήθηση τών παρακειμένων μυών.

In vitro μελέτη

Κατά τη λογαριθμική φάση τῆς ἀναπτύξεως τῶν κυττάρων τῆς σειρᾶς SW-480, ἡ παρουσία δόσεων κυκλοσπορίνης ἀναλόγων πρὸς αὐτὲς οἱ ὁποῖες χορηγοῦνται στοὺς μεταμοσχευμένους ἀσθενεῖς, (0.02, 0.1, 0.4 καὶ 1.0 $\mu\text{g/ml}$) εἶχε ὡς ἀποτέλεσμα τὸν ταχύτερο πολλαπλασιασμό τῶν καρκινικῶν κυττάρων (σχῆμα 3). Τὰ κύτταρα



Σχῆμα 3. Κινητική ἀναπτύξεως τῶν καρκινικῶν κυττάρων τῆς σειρᾶς SW-480, in vitro, παρουσία χαμηλῶν (0.02, 0.1), μέσων (0.4) καὶ ὑψηλῶν δόσεων (1.0 καὶ 10.0 $\mu\text{g/ml}$) κυκλοσπορίνης (CsA).

τὰ ὁποῖα ἀναπτύχθηκαν παρουσία χαμηλῶν καὶ μέσων δόσεων κυκλοσπορίνης (0.02, 0.1 $\mu\text{g/ml}$), ἐμφάνισαν μὲ ἐλαφρὰ καθυστέρηση, ὑψηλοὺς ρυθμοὺς ἀναπτύξεως σὲ σχέση μὲ τὶς κυτταροκαλλιέργειες ἐλέγχου μὲ ἀποτέλεσμα κατὰ τὴν ἑβδόμη ἡμέρα τοῦ πειράματος νὰ ἀνευρίσκονται 1.000 κύτταρα ἀνὰ μικρόλιτρο θρεπτικοῦ μέσου ἐνῶ οἱ ἀντίστοιχες κυτταροκαλλιέργειες ἐλέγχου, περιεῖχαν μόλις 700. Ἡ διαφορά αὐτὴ εἶναι στατιστικῶς σημαντικὴ ($p < 0.01$).

Δοσολογία 1 $\mu\text{g/ml}$ κυκλοσπορίνης δὲν ἐπηρέασε τὴν ἀνάπτυξη τῶν κυττάρων, μὲ ἀποτέλεσμα νὰ ἐμφανίζονται παρόμοια ἐπίπεδα μὲ τὶς κυτταροκαλλιέργειες ἐλέγχου, ἐνῶ ὑψηλὴ δόση τοῦ φαρμάκου (10 $\mu\text{g/ml}$) εἶχε τοξικὸ ἀποτέλεσμα (400 κύτταρα/ μl θρεπτικοῦ μέσου κατὰ τὴν ἑβδόμη ἡμέρα τοῦ πειράματος).

ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Ἡ κυτταρογενετική ἀνάλυση τῆς μητρικῆς κυτταρικῆς σειρᾶς τοῦ πειράματος μας ἀπεκάλυψε τὴν παρουσία τριῶν τουλάχιστον διακριτῶν ὑποκλώνων. Ὁ βασικὸς κλώνος ἦταν περιδιπλοειδικὸς μὲ 55-58 χρωμοσώματα σὲ ποσοστὸ περίπου 75% τοῦ συνολικοῦ κυτταρικοῦ πληθυσμοῦ, ἐνῶ συνυπῆρχε τετραπλοειδικὸς ὑποκλώνος σὲ ποσοστὸ 10-15%. Παρατηρήθηκαν ἐπίσης σὲ χαμηλότερα ποσοστὰ πυρῆνες μὲ διπλὰ μικροχρωμοσώματα (DMs chromosomes) καὶ πολυπλοειδικοὶ πυρῆνες 150 καὶ πλέον χρωμοσωμάτων. Ἡ καρυοτυπικὴ ἀνάλυση τοῦ ἀντιπροσωπευτικοῦ καὶ τῶν παράπλευρων κλώνων ἀναφέρεται στὸν πίνακα.

Π Ι Ν Α Κ Α Σ

ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ Ε-ΚΥΤΤΑΡΩΝ SW-480

56,XX,-Y, +2,4q-, +5, +7, +der(7)ins(7)(q22), t(8;9)(p11;p11), t(10;12)(p15;q11), +11, +12q-, +13, +der(17)t(17;?)(p11;?)-18, +der(20)t(5;20)(q15;p11), +der(20), +22

ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ R-ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ SW-480

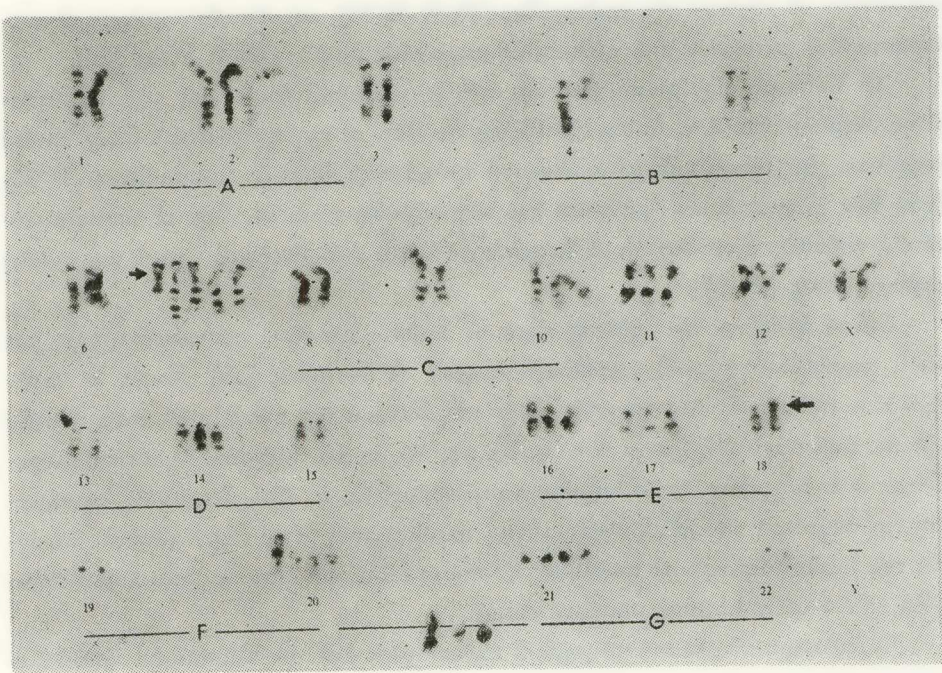
102-110,XXXX,-Y, +2,-4, +del(4)(q11), +7, +7, +der(7), -8,-10,-10, +der(10), +der(10), -12, -12, +der(13)dup(13)(q21q34), +der(13), -16, +17,-18, +der(19)t(19;?), +der(20), +der(20), +der(20), +21, +21, +mar1, +mar2, +mar3, +mar4

ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ SW-480 ΑΠΟ ΟΓΚΟ ΑΘΥΜΙΚΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΠΟΥ ΕΛΑΜΒΑΝΕ ΚΥΚΛΟΣΠΟΡΙΝΗ

62,XX,-Y, +2, +del(4)(q11), +7, +der(7)ins(7)(q22), +del(7)(q22)
t(8;9)(p11;p11),t(10;12)(p15;q11), +11, +12q, +der(13)dup(13)(q21q34), +14, +16, +17,18p +, +20, +der(20)t(5;20)(q15;p11), +der(20), +21, +21, +mar1, +mar2.

Τὰ κύτταρα τὰ ὁποῖα ἐλήφθησαν ἀπὸ τὶς ἱστοκαλλιέργειες τῶν ὄγκων πού ἀναπτύχθηκαν στὴν ὁμάδα ἐλέγχου ἐμφάνισαν παρόμοια καρυοτυπικὰ εὐρήματα.

Οἱ ἱστικὲς καλλιέργειες τῶν ὄγκων πού ἀναπτύχθηκαν στὰ πειραματόζωα τὰ ὁποῖα εἶχαν λάβει κυκλοσπορίνη χωρὶς νὰ παρουσιάξουν σημαντικὲς δομικὲς ἀποκλίσεις ἀπὸ τὸν καρυότυπο τῆς μητρικῆς σειρᾶς, ἐμφάνισαν ἀνευπλοειδικότερο χρωμοσωματικὸ τύπο μὲ 63-66 χρωμοσώματα. Ἀξιοσημείωτη εἶναι ἡ παρουσία τοῦ σταθεροῦ χρωμοσωματικοῦ δείκτου 7q-, σὲ ὅλες τὶς περιτριπλοειδεῖς μιτώσεις τῆς ἱστοκαλλιέργειας πού πραγματοποιήθηκε ἀπὸ πειραματόζωο πού ἐλάμβανε κυκλοσπορίνη. Ἐκτὸς τοῦ δείκτου αὐτοῦ, στὸν ἀντιπροσωπευτικὸ κλώνο τῆς ἀνωτέρω ἱστοκαλλιέργειας, παρατηρεῖται ἐπιπρόσθετος χρωμοσωματικὸς δείκτης ὁ 18p+,



Φωτ. 2. Καρυότυπος 62 χρωμοσωμάτων από όγκο SW-480, που αναπτύχθηκε σε πειραματόζωο τής ομάδας που έλαμβανε κυκλοσπορίνη (τα βέλη σημειώνουν τους χρωμοσωματικούς δείκτες 7q- και 18p+).

καθώς και πολυσωμίες του χρωμοσώματος 21. (φωτ. 2). Παράπλευρος κλώνος τής ίδιας ιστικής καλλιέργειας, με 65-69 χρωμοσώματα, φέρει πολλούς από τους χρωμοσωματικούς δείκτες του τετραπλοειδικού υποκλώνου τής μητρικής σειράς και εμφανίζει μεγαλύτερη γενετική αστάθεια (genetic imbalance).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από την ανακάλυψη τής κυκλοσπορίνης και την εφαρμογή της στην ανοσοκαταστολή έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες με σκοπό να αποσαφηνισθεί ή σχέση του φαρμάκου με τη νεοπλασία. Οι έρευνητικές αυτές προσπάθειες πραγματοποιήθηκαν τόσο *in vivo* σε πειραματόζωα (εύθυμικούς και άθυμικούς ποντικούς), όσο και *in vitro* σε κυτταροκαλλιέργειες διαφόρων τύπων κυττάρων [15,16,28,29, 30,31,32,33].

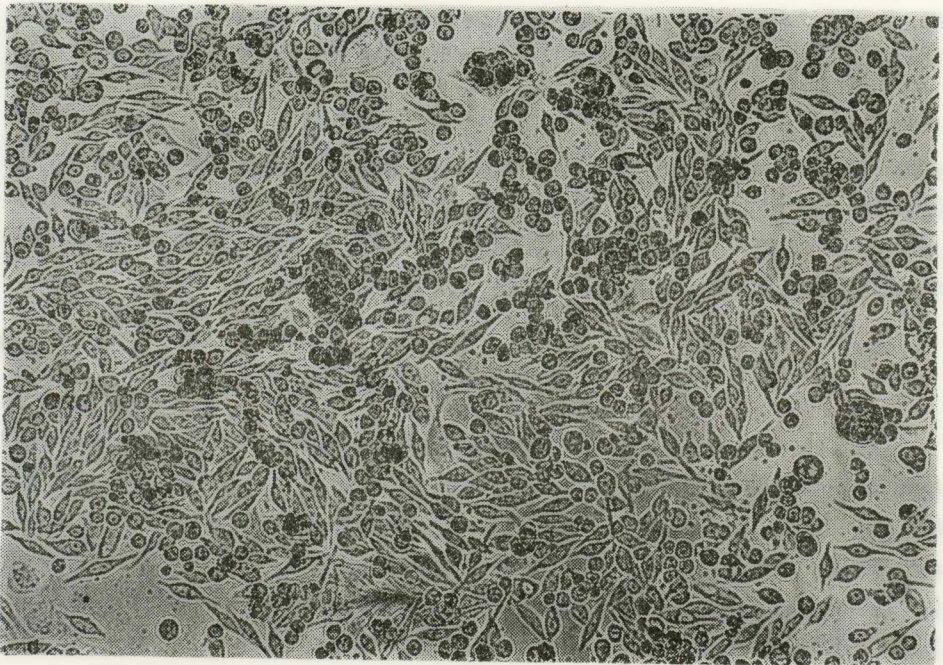
Έχει αποδειχθεί ότι μέσες και ύψηλες δόσεις κυκλοσπορίνης προκαλούν, εκτός των γνωστών κυτταροτοξικών αποτελεσμάτων επί των T-λεμφοκυττάρων, κυτταρο-

τοξικότητα σε κύτταρα της επιδερμίδας [30,31,32,33], και ευαισθητοποίηση σε κυτταροστατικά κυττάρων από ανθεκτικές καρκινικές σειρές (MDR cells) [34].

Ο Yuzawa, είχε επισημάνει την πιθανή μεταλλαξιγόνο δράση της κυκλοσπορίνης. Λεμφοκύτταρα τα όποια εξετέθησαν *in vitro* σε συγκεντρώσεις 1-5 μg/ml του φαρμάκου έμφάνισαν αύξημένα ποσοστά ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων. Η αύξηση των χρωματιδικών θραύσεων που παρατηρήθηκε και *in vivo* σε μεταμοσχευμένους ασθενείς είναι δυνατό να επιφέρει αστάθεια του γενετικού υλικού και πιθανή καρκινογένεση [13,14].

Για να ελέγξουν την υπόθεση αυτή, οι Yokota και συν., πραγματοποίησαν μια σειρά πειραμάτων χημικής μεταλλαξιγενέσεως σε ποντικούς [35]. Χωρίς να παρατηρήσουν σημαντική διαφορά στην εμφάνιση αδενωμάτων στους πνεύμονες, μεταξύ των ποντικών που έλάμβαναν το φάρμακο και της ομάδος ελέγχου, σημείωσαν μεγαλύτερη ανάπτυξη των όγκων παρουσία κυκλοσπορίνης. Οι ίδιοι έρευνητές, επισήμαναν την ταχύτερη μετεξέλιξη θηλωμάτων του δέρματος προς καρκινώματα, παρουσία της κυκλοσπορίνης, σε ποντικούς οι όποιοι εξετέθησαν στο χημικό καρκινογόνο TPA (12-0-tetradecanol phorbtor ester).

Αντίστοιχα πειράματα με χημικά καρκινογόνα από τον Shinozuka απέδειξαν



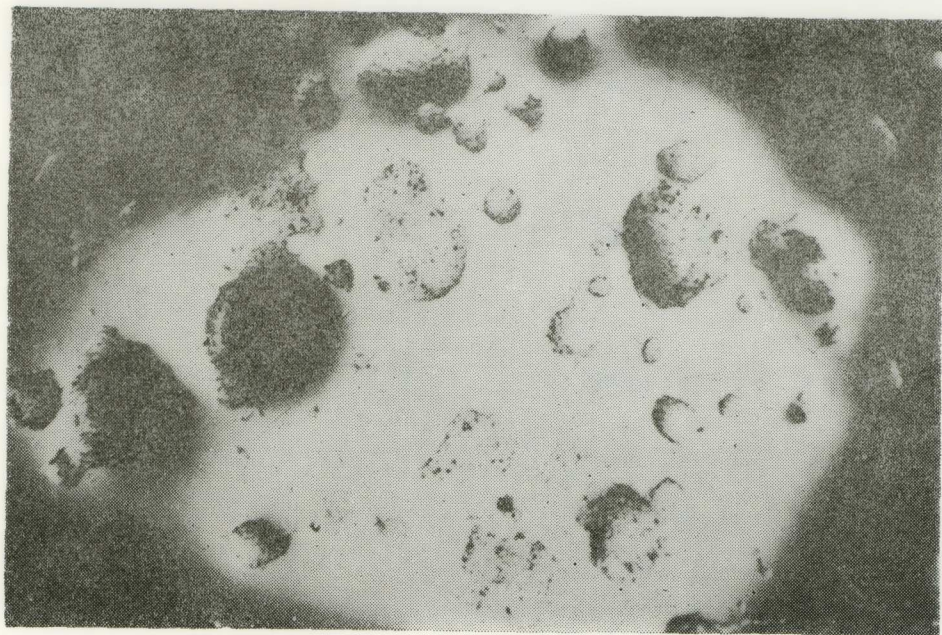
Φωτ. 3. Αποικία E-κυττάρων της SW-480. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε πλαστική επιφάνεια της φιάλης κυτταροκαλλιεργείας ως μονοστιβάδα (100X).

μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης λεμφωμάτων σε πειραματόζωα τα όποια έλάμβαναν κυκλοσπορίνη [36].

Ο Nelson [37] και ο Servilla και συν. [38] αναφέρουν επίσης μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης καρκίνου του δέρματος σε ποντικούς, οι όποιοι έξετέθησαν σε υπεριώδεις ακτινοβολίες και έλάμβαναν κυκλοσπορίνη, σε σύγκριση με τους μάρτυρες στους όποιους δέν χορηγήθηκε κανένα φάρμακο.

Στήν παρούσα έργασία μελετήθηκε ή επίδραση τής κυκλοσπορίνης στην κινητική τής αναπτύξεως καρκινικών κυττάρων τής σειράς SW-480, με σκοπό νά προσδιορισθούν οι πιθανές μεταβολές πού προκαλεί ή έκθεση τών κυττάρων στό φάρμακο, τόσο στό ρυθμό πολλαπλασιασμού, όσο και στή βιολογική συμπεριφορά ενός προϋπάρχοντος καρκίνου.

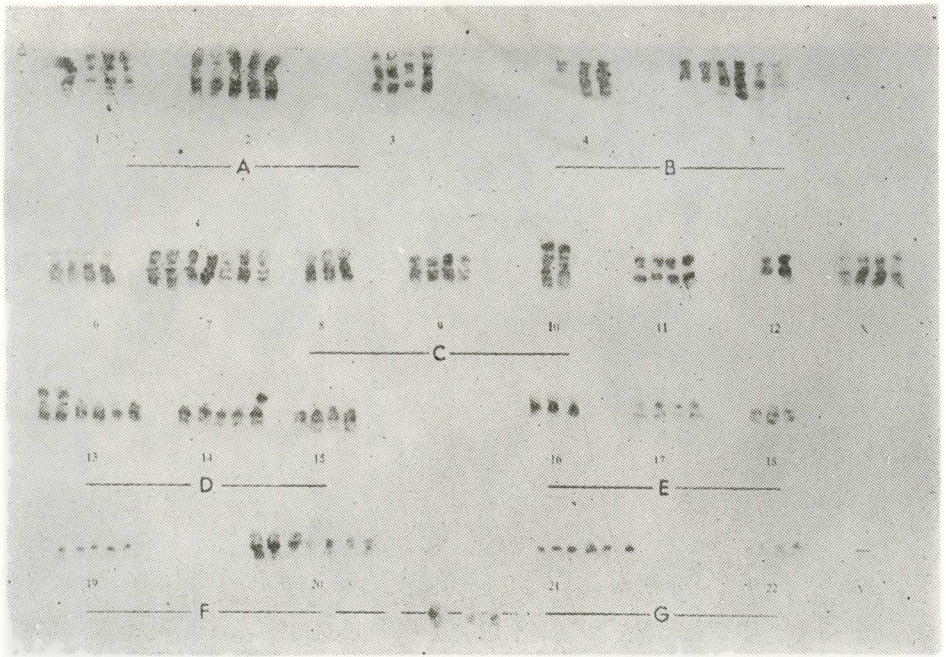
Παρατηρήθηκε ότι τò μεγαλύτερο ποσοστό τών κυττάρων τής σειράς SW-480, μετά τήν ένζυματική κατεργασία πρòς ανακαλλιέργεια, προσκολλάται στην επιφάνεια τής πλαστικής φιάλης και αναπτύσσεται σε τυπικές άποικίες επιθηλιακών κυττάρων (φωτ. 3). Έκτός τών κυττάρων επιθηλιακής μορφολογίας, τά όποια ό Tomita όνομάζει E-κύτταρα [48], λεπτομερής μικροσκοπική παρατήρηση μπορεί νά αποκαλύψει τήν παρουσία ενός ύποπληθυσμού κυττάρων με μορφολογία περισσότερο σφαιρική, μεγαλύτερη διαταραχή στή σχέση πυρήνα κυτταροπλάσματος και περισ-



Φωτ. 4. Δίκην πύλων συσσωματώματα του ύποκλώνου τής SW-480 πού άποτελείται από κύτταρα σφαιρικής μορφολογίας (R-κύτταρα). (50X).

σότερη διαθλαστικότητα. Τα κύτταρα αυτά συγκροτούν χαλαρότερες άποικίες οι οποίες συχνά αναπτύσσονται σε συσσωματώματα δίκην πέλων. Ο ίδιος έρευνητής και οι συνεργάτες του κατόρθωσαν να άπομονώσουν και να χαρακτηρίσουν τον υποπληθυσμό αυτόν ονομάζοντάς τον R-κύτταρα (R-round cells) (φωτ. 4). Τα R-κύτταρα έχουν σαφείς φαινοτυπικές διαφορές από τον βασικό κλώνο τις οποίες ο Leibovitz είχε ήδη αναφέρει κατά την αρχική μελέτη [19]. Η κινητική της ανάπτυξης των κυττάρων του υποκλώνου της SW-480, με τη σφαιρική μορφολογία, σύμφωνα με τον Tomita εμφανίζει ταχύτερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα κύτταρα επιθηλιακής μορφολογίας (E-κύτταρα) [18]. Τα R-κύτταρα της SW-480, όταν άπομονωθούν, δίδουν συχνότερα μεταστάσεις σε άθυμικούς ποντικούς [18].

Η καρυοτυπική εικόνα των R-κυττάρων παρουσιάζει έναν περιτετραπλοειδικό τύπο ο οποίος φαίνεται ότι έχει προκύψει από ένδοξαναδιπλασιασμό του βασικού κλώνου. Κατά την έργασία μας ταυτοποιήσαμε πλήρως τον καρυότυπο των R-κυττάρων (φωτ. 5), τα οποία παρατηρήσαμε σε ποσοστά ανάλογα με αυτά των άλλων έρευνητών [18,19] (15% επί του γενικού πληθυσμού της SW 480 κατά την λογαριθμική φάση της ανάπτυξης). Είναι χαρακτηριστικό ότι η καρυοτυπική ανάλυση του όγκου που αναπτύχθηκε στο μοναδικό πειραματόζωο της μελέτης μας που παρουσίασε

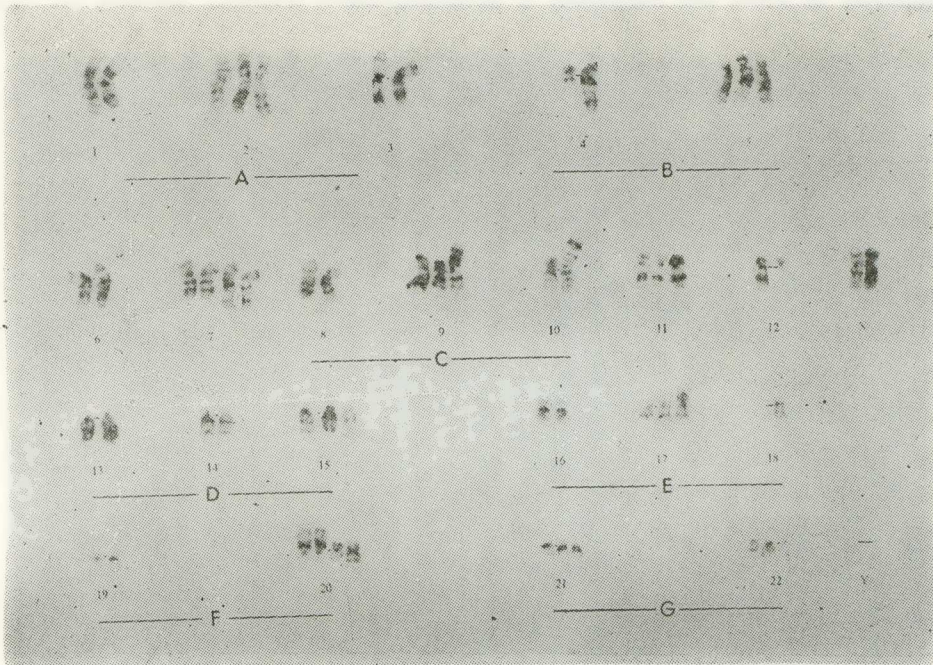


Φωτ. 5. Καρυότυπος 102 χρωμοσωμάτων του τετραπλοειδικού υποκλώνου της SW-480. (R-κύτταρα).

αίματογενή μετάσταση στους πνεύμονες και άνηκε στην ομάδα έλέγχου απέκάλυψε την παρουσία του R-ύποκλώνου σε ποσοστό 85%. Φαίνεται ότι στο πειραματόζωο αυτό επιλέχθηκε ο υποπληθυσμός εκείνος της SW-480 ο οποίος φέρει χαρακτηρισές ύψηλης κακοηθείας.

Οί ιστικές καλλιέργειες τών όγκων που αναπτύχθηκαν στα πειραματόζωα τα όποια είχαν λάβει κυκλοσπορίνη, χωρίς να παρουσιάζουν σημαντικές δομικές αποκλίσεις από τον καρύτυπο τής μητρικής σειράς, έμφάνισαν άνευπλοειδικότερους ύποκλώνους 63-66 χρωμοσωμάτων. Άξιοσημείωτη είναι ή παρουσία του σταθεροϋ χρωμοσωματικού δείκτη 7q- σε όλες τις μιτώσεις τής ιστοκαλλιέργειας που πραγματοποιήθηκε από πειραματόζωο που έλάμβανε κυκλοσπορίνη. Ο χρωμοσωματικός αυτός δείκτης δέν παρατηρήθηκε στις ιστοκαλλιέργειες τών όγκων οί όποιοι αναπτύχθηκαν στους μάρτυρες. Η άνεύρεση ενός δευτέρου παράπλευρου κλώνου, ο όποιος έκτός του 7q-, εξέφραζε και τις χαρακτηριστικές αριθμητικές χρωμοσωματικές διαταραχές τών ύψηλης κακοηθείας R-κυττάρων τής SW-480, είναι ένδεικτική του γεγονότος ότι παρουσία τής κυκλοσπορίνης αναπτύσσονται πιδ επίθετικοί καρβινικοί πληθυσμοί.

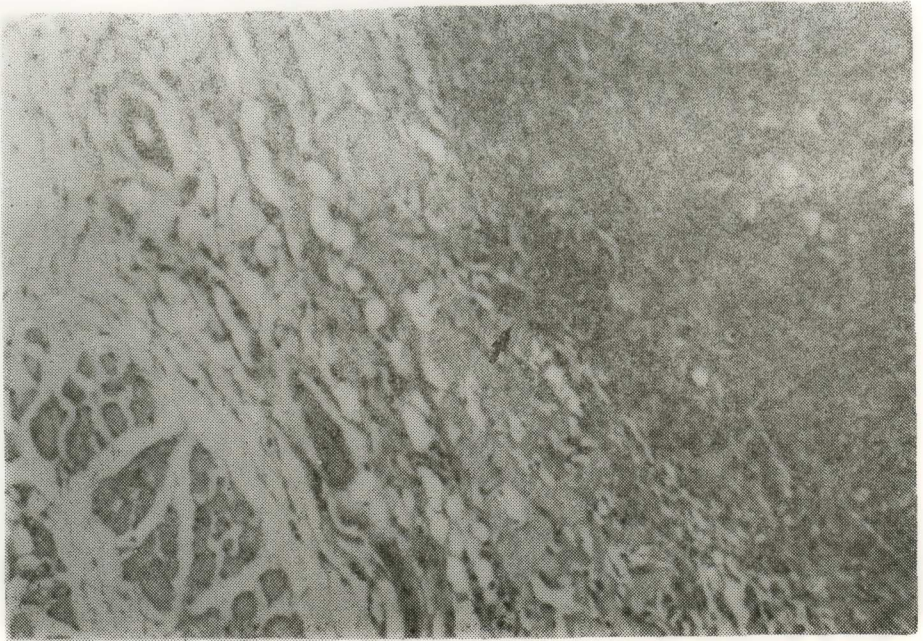
Αύξηση τών χρωμοσωματικών διαταραχών στο περιφερικό αίμα άσθενών υπό



Φωτ. 6. Καρύτυπος 55 χρωμοσωμάτων από τον αντιπροσωπευτικό κυτταρικό πληθυσμό τής SW-480. (E-κύτταρα).

άνοσοκαταστολή με κυκλοσπορίνη αναφέρονται και από τον Z. Ding [14]. Δεν έχουν μέχρι σήμερα δημοσιευθεί στοιχεία όμως τα όποια να αφορούν στην επίδραση της κυκλοσπορίνης επί της κλωνικής εξέλιξης καρκινικών κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη έπισημαίνεται η παρουσία ενός καινούργιου υποπληθυσμού της SW-480, ο οποίος αναπτύχθηκε παρουσία κυκλοσπορίνης in vivo. Ο υποκλώνος αυτός της μητρικής κυτταρικής σειράς διατηρεί τους βασικούς κυτταρογενετικούς χαρακτήρες, που περιγράφονται ανωτέρω, είναι όμως ανευπλοειδικότερος και εμφανίζει έναν καινούργιο χρωμοσωματικό δείκτη, ένα όμολογο του χρωμοσώματος 7 με έλλειμμα τμήματος του μεγάλου βραχίονος στη θέση 7q22. Η πιθανή ενεργοποίηση του όγκογονιδίου met, το οποίο εδράζεται σ' αυτή την χρωμοσωματική θέση [39,40,41], είναι δυνατό να εξηγήσει τα παθολογοανατομικά εύρηματα της μελέτης μας. Ο χρωμοσωματικός δείκτης 7q-, είναι γνωστό ότι συνδέεται με ύψηλή κακοήθεια και κακή πρόγνωση [42]. Ένα ακόμη ένδεικτικό στοιχείο είναι η ανεύρεση παρόμοιων πολυσωμιών με αυτές που παρατηρήθηκαν στον περιτετραπλοειδικό υποκλώνο των R-κυττάρων της μητρικής σειράς οι οποίες είναι πιθανόν ότι ευθύνονται για τους κακοηθέστερους χαρακτήρες που παρουσιάζουν αυτά τα κύτταρα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η παρουσία της κυκλοσπορίνης σε δόσεις ανάλογες με αυτές που λαμβάνουν οι μεταμοσχευμένοι άσθεनेίς, φαίνεται ότι έχει



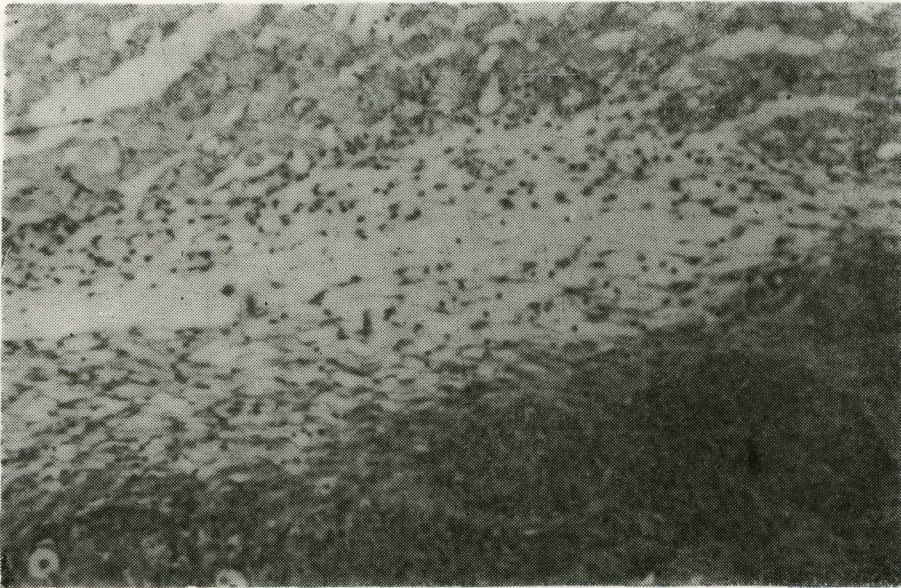
Φωτ. 7α: Διήθηση γραμμωτών μυϊκών ινών (βέλος) από τα κύτταρα της SW-480.

έπαγωγικά αποτελέσματα τόσο στην ανάπτυξη τῶν καρκινικῶν κυττάρων τῆς SW - 480, ὅσο και στή δημιουργία καὶ ἐπιλογή ὑποπληθυσμῶν τῆς μητρικῆς σειρᾶς με χαρακτηριστῆρες ὑψηλῆς κακοηθείας.

Κατὰ τὴν ἱστολογικὴ ἐξέταση ἡ ομάδα τοῦ ἐλάμβανε κυκλοσπορίνη παρουσίαζε μεγαλύτερη μείζονα διάμετρο τῶν ὄγκων, εἶχε δὲ μεγαλύτερη συχνότητα διηθήσεως τῶν γραμμωτῶν μυῶν (φωτ. 7). Ὁ Eceles ἀναφέρει σημαντικὰ μεγαλύτερα ποσοστὰ μεταστάσεων σὲ πειραματικὰ μοντέλα ἀναπτύξεως καρκίνου ἐπὶ συγγενικῶν ποντικῶν [43].

Σύμφωνα με τὴν Bennet, εὐθυμικοὶ ποντικοὶ οἱ ὁποῖοι ἐλάμβαναν 20mg κυκλοσπορίνης/kg σωματικοῦ βάρους παρουσίασαν σημαντικὰ μικρότερη σωματικὴ ἀνάπτυξη σὲ σχέση με τοὺς μάρτυρες. Ἡ ἴδια ἐρευνήτρια ἐπισημαίνει τὴν κυτταροτοξικὴ δράση τοῦ φαρμάκου σὲ κυτταροκαλλιέργειες ἰνοβλαστῶν ποντικοῦ [44]. Τὰ ἀποτελέσματα τῆς ἐν λόγω ἐρευνήτριας παρουσιάζουν ἐνδιαφέρον καθ' ὅτι ἡ κυτταροτοξικὴ ἐπίδραση τῆς κυκλοσπορίνης φαίνεται ὅτι ἐπισυμβαίνει σὲ δόσεις μεγαλύτερες τοῦ 1μg/ml καὶ μάλιστα μετὰ τὴ λογαριθμικὴ φάση τῆς ἀναπτύξεως τῶν κυττάρων. Ἀντίστοιχο ἀποτέλεσμα εἶχαν δόσεις παρόμοιες με αὐτὲς τοῦ χρησιμοποιοῦθησαν *in vitro* στὴν παροῦσα μελέτη.

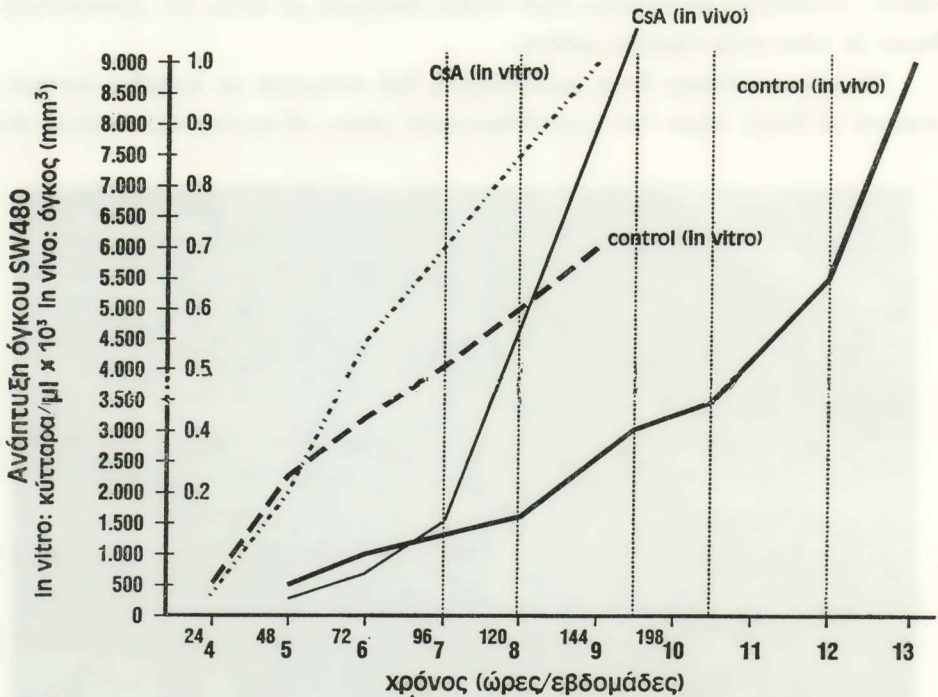
Ἀναφέρεται ἐπίσης ὅτι ἡ κυκλοσπορίνη δρᾷ συνεργικὰ με ὀρισμένα κυτταροστατικά σὲ δόσεις πέραν τοῦ 1μg/ml θρεπτικοῦ μέσου, σὲ κυτταροκαλλιέργειες τῶν



Φωτ. 7β: Ὁ ὄγκος ἀφορίζεται ἀπὸ τις μυικὲς ἴνες με ἰνώδη ἰστό. Ὅμαδα μαρτύρων.

άνθεκτικῶν στὰ κυτταροστατικά καρκινικῶν κυτταρικῶν σειρῶν GM 3639 καὶ U-1285 (MDR-cells: multidrug resistant cells) [45,46]. Σ' αὐτὴ τὴν περίπτωση ἡ κυκλοσπορίνη φαίνεται ὅτι κατὰ κάποιον τρόπο συγχρονίζει τὸν κυτταρικό κύκλο τῶν ἀνθεκτικῶν στὰ κυτταροστατικά καρκινικῶν κυττάρων καὶ προάγει τὴν ἐπικράτηση ταχύτερα διαιρούμενων ὑποπληθυσμῶν πού εἶναι περισσότερο εὐαίσθητοι στὰ χημειοθεραπευτικά.

Ἡ προαγωγή τῆς ἀναπτύξεως ἑνὸς ὑποκλώνου ὑψηλῆς κακοηθείας παρουσία τῆς κυκλοσπορίνης, ἐπιβεβαιώνει τόσο τὰ ἀποτελέσματα τῆς *in vivo* κινητικῆς ἀναπτύξεως ὅσο καὶ τὰ συμπεράσματα τὰ ὁποῖα προέκυψαν ἀπὸ τὶς *in vitro* μελέτες στὶς κυτταρικές μας καλλιέργειες. Τὸ γεγονός αὐτὸ ἐνισχύεται ἀπὸ τὴ μορφή τῶν καμπυλῶν ἀναπτύξεως (σχ. 4) στὶς ὁποῖες παρατηρεῖται ἀρχικὴ καταστολὴ τῆς ἀναπτύξεως τῶν καρκινικῶν κυττάρων, ἀκολουθεῖ ὅμως μετὰ τὴν πάροδο χρονικοῦ διαστήματος ἀντιστοίχου καὶ στὶς δυὸ μεθόδους, κατακόρυφη αὐξηση τοῦ ρυθμοῦ ἀναπτύξεως μὲ ἀποτέλεσμα μετὰ ἀπὸ 60 ὥρες στὶς κυτταρικές καλλιέργειες ἢ 60 περίπου ἡμέρες *in vivo*, νὰ ἐμφανίζεται στατιστικῶς σημαντικὴ διαφορὰ ἀπὸ τὶς ὁμάδες



Σχῆμα 4. Σύγκριση τῆς κινητικῆς ἀναπτύξεως τῆς καρκινικῆς σειρᾶς SW-480 *in vivo* καὶ *in vitro*. Παρουσιάζεται ἡ ἀνάπτυξη τῶν ὄγκων *in vivo*, καθὼς καὶ ὁ πολλαπλασιασμός τῶν καρκινικῶν κυττάρων *in vitro*.

ἐλέγχου. Αυτό το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί, (κατά το οποίο τὰ κύτταρα, παρουσία κυκλοσπορίνης, αναπτύσσονται με βραδύτερους ρυθμούς από ό,τι οί μάρτυρες) θεωρούμε ότι είναι ικανό για τήν ἐπαγωγή του ὑποκλώνου ἢ τῶν ὑποκλώνων ὑψηλῆς κακοηθείας.

Ἡ ἐπίδραση τῆς κυκλοσπορίνης σέ χαμηλές δόσεις ἔχει ὡς ἀποτέλεσμα τή μεταβολή του ἤδη διαταραγμένου καρυοτύπου τῆς SW-480 σέ μορφές ὑψηλότερης κακοηθείας, προσδίδοντας στοιχεῖα γιά τή δράση του φαρμάκου αὐτοῦ ἐπὶ του γενετικού ὕλικου τῶν κυττάρων καὶ μάλιστα σέ δόσεις ἀντίστοιχες με αὐτὲς που χορηγούνται κατὰ τήν ἀνοσοκατασταλτικὴ ἀγωγή τῶν μεταμοσχευμένων ἀσθενῶν. Ἡ μετεξέλιξη αὐτῆ τῶν καρκινικῶν κυττάρων τῆς ἀνωτέρω σειρᾶς, σέ παράπλευρους κλώνους ὑψηλῆς κακοηθείας παρουσία τῆς κυκλοσπορίνης, πιστοποιήθηκε σέ ὅλα τὰ ἐπιμέρους στάδια τῆς ἐργασίας μας κατὰ τὰ ὅποια διαπιστώθηκε μεγαλύτερη αὐξηση τῆς καρκινικῆς μάζας καὶ τῆς διηθητικῆς ικανότητος του ὄγκου.

Συμπερασματικά, ἡ ἐργασία μας παρέχει ἐνδείξεις ὅτι ἡ κυκλοσπορίνη, ἐκτὸς τῆς προφανοῦς ἔμμεσης σχέσης της με τὴν ἀνάπτυξη νεοπλασιῶν που σχετίζονται με τὴν ἀνοσοκατασταλτικὴ της ιδιότητα, συμβάλλει στή μετεξέλιξη τῶν καρκινικῶν κυττάρων σέ κακοηθέστερες μορφές καὶ με ἄμεσο τρόπο. Ἀπὸ τὰ ἀποτελέσματα τῆς μελέτης μας, που ἀποκλείουν ὅτι τὸ φάρμακο δρᾷ ὡς αὐξητικὸς παράγοντας, μπορούμε νὰ ὑποθέσουμε ὅτι σέ περιβάλλον κυκλοσπορίνης ἐξελίσσονται ὑποπληθυσμοὶ καρκινικῶν κυττάρων με ὑψηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμοῦ καὶ ἐπιθετικότερη βιολογικὴ συμπεριφορά. Ἡ ὑπόθεση αὐτὴ μπορεῖ νὰ ἐξηγήσει τὰ ἀσυνήθιστα αὐξημένα ποσοστά κακοήθων νεοπλασμάτων που ἐμφανίζονται στοὺς μεταμοσχευμένους ἀσθενεῖς ὅπως καὶ τὴν πολὺ κακὴ πρόγνωση που ἔχουν οἱ καρκινοπαθεῖς που ὑποβάλλονται σέ ἀνοσοκαταστολή.

Ἡ ἄμεση σχέση τῆς κυκλοσπορίνης-Α με τὴν νεοπλασία, μπορεῖ νὰ ὀφείλεται στή χημικὴ της συγγένεια με τὴν Ρ-γλυκοπρωτεΐνη [46,47]. Φαίνεται πολὺ πιθανὸ ὅμως ὅτι ἀλληλεπιδρᾷ καὶ με ἄλλους ἄγνωστους μοριακοὺς μηχανισμοὺς στὸ ἐπίπεδο του DNA, ἔχοντας γενετοξικὰ ἀποτελέσματα [13,14]. Ἐν κατακλιθεῖ, οἱ ἀσθενεῖς που ὑποβάλλονται σέ ἀνοσοκαταστολή ἀποτελοῦν ὁμάδα ὑψηλοῦ κινδύνου με μεγαλύτερη πιθανότητα ἐμφάνισης νεοπλασιῶν. Ἰδιαίτερη προσοχὴ πρέπει νὰ δίδεται στὶς περιπτώσεις ἐκεῖνες στὶς ὁποῖες προϋπάρχει καρκίνος καὶ εἶναι ἀπαραίτητη ἡ ἀνοσοκαταστολή. Στὶς περιπτώσεις αὐτὲς εἶναι πολὺ πιθανὸ νὰ ὑπάρξει δραματικὴ ἐπιδείνωση τῆς νόσου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Freeman D. J. (1991): Pharmacology and pharmacokinetics of Cyclosporine. *Clin. Biochem.* **24** : 9-14.
2. Arellano F., Krupp P. (1993): Malignancies in reumatoid arthritis patients treated with cyclosporin A *Br.J. Rheumatol.* **32** : 72-75.
3. Busnach G., Civati G., Brandò B., Broggi M. L., Cechipi G., Raggi G., Canino A., Mineti L. (1993): Viral and neoplastic changes in the lower genetic tract in women with renal allografts. *Transpl. Proc.* **25**; 1389-90.
4. Gruber S. A., Skjei K. L., Sothorn R. B., Robison L., Tzardis L., Moss A., Gillingham K., Canafax D. M., Matas A. J. and Dunn DL, (1991): Cancer development in renal allograft recipients treated with conventional and cyclosporine immunosuppression. *Transplant. Proc.* **23** (1) : 1104-1105.
5. Cyclosporin and neoplasia. *The Lancet*, May 14, 1983 : p. 1083.
6. Penn I., First M. R. (1986) : Development and incidence of cancer following cyclosporine therapy. *Transplant. Proc. Vol. XVII* No 2, Suppl 1 (April) : 210-213.
7. Penn I. (1987) : Cancers following cyclosporine therapy. *Transplantation* **43** (1) : 32-35.
8. Ryffel B. (1992) : The carcinogenicity of cyclosporin-A. *Toxicology* **73**; 1-22.
9. Brown L. A., Wiselka M., Campbell A., Pringle J. H., Nicholson K., Lauder I. (1991) : High-grade T-cell lymphoma following treatment with cyclosporin A. *Histopathology* **19** ; 225-29.
10. Bencini P. L., Montagnino G., Tarantino A., Alesei E., Ponticelli C., Caputo R. (1993) : Kaposi's sarcoma in kidney transplant recipients. *Arch. Dermatol.* **129** ; 248-50.
11. Heering P., Mesching R., Gluck S., Kreusser W., Plewig G., Grabensee B. (1989) : Kaposi's sarcoma after kidney transplantation. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **114** (37) ; 1407-10.
12. Terzoli E., Alfarone C., Cardamone I., Izzo F., Lucatelli S., Olivadese A., Ranuzzi M. (1989) : Kaposi's sarcoma and kidney transplant. *G. Ital. Oncol.* **9**(4) 129-34.
13. Yusawa K., Kondo I., Fukao K., Iwasaki Y., Hamaguchi H. (1986) : Mutagenicity of cyclosporine - Induction of sister chromatid exchange in human cells. *Transplantation* **42**; 61-63.
14. Ding Z. (1989) : Studies on chromosome aberrations of peripheral T-lymphocytes in cadaveric kidney allograft recipients. *Transpl. Proc.* **21**; 3205-3208.
15. Van der Elst J., De Greve J., Geerts F., De Neve W., Storme G., Willems G. (1986) : Quantitative study of liver metastases from colon cancer in rats after treatment with cyclosporine-A. *J. NCI* **77** (1); 227-231.
16. McLachlan G., Thomson A. W., Wallace H. M. (1990) : Effects of cyclo-

- sporine in combination with α -difluoromethylornithine on growth and polyamine metabolism of human T-leukaemia cells in culture. *Biochem. Soc. Trans.* **18** (6): 1226.
17. Skalkas G. D., Spandidos D. A., Kostakis A., Balafouta-Tseleni S., Choremi E., Iliopoulos D., Haliassos A. (1991): K-Ras oncogenes mutations in neoplasias of kidney transplanted patients: preliminary results with a new technique. *Anticancer Research* **11**: 2091-2094.
 18. Tomita N., Jiang W., Hibshoosh H., Warbuton D., Kahn S., Weinstein B. (1992): Isolation and characterisation of a highly malignant variant of the SW 480 human colon cancer cell line. *Cancer Res.* **52**: 6840-6847.
 19. Leibovitz A., Stinson J., McCombs W., McCoy C., Mazur K., Mabry N. (1976): Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* **36**: 4562-69.
 20. Yaseen N., Watmore A., Potter A., Potter C., Jacob G., Rees R. (1990): Chromosome studies in eleven colorectal tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* **44**: 83-97.
 21. Lin J., Cheng J., Tzeng C., Meng C. (1991): An animal model of colon cancer metastatic cell line with enhanced metastasizing ability. *Dis. Colon Rectum* **34**: 458-463.
 22. Flanagan P. (1966): Nude: a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.* **8**:295.
 23. Pantelouris E. M. (1968): Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* **217**, 370.
 24. Fu X., Besterman J., Moposov A., Hoffman R. (1991): Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9345-9349.
 25. Fresney R. I. (1987): *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* Alan R. Liss Inc. New York.
 26. Seabright M. (1971): A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* **2**: 971.
 27. I. S. C. N. (1991): *An International System for Cytogenetic Nomenclature-Cancer Cytogenetics.* F. Mitelman (ed). S. Karger Basel 1991.
 28. Yabu K., Warty V. S., Shinozuka H. (1990): Cyclosporine enhances the growth of carcinogen-induced enzyme-altered foci in rat liver. *Hepatology* **13** (2): 304-309.
 29. Kondo Y., Yura Y., Iga H., Yanagawa T., Yoshida H., Furumoto N., Sato M. (1990): Effect of Hexamethylene Bisacetamide and Cyclosporin A on Recovery of Herpes Simplex Virus 2 from the in Vitro Model of Latency in a Human Neuroblastoma Cell Line. *Cancer Res.* **50**: 7852-7857.
 30. Nickoloff B., Mitra R. (1989): Inhibition of 125 I-EGF binding to cultured keratinocytes by antiproliferative molecules gamma interferon, Cyclosporin, and transforming growth factor-beta. *J. Invest. Dermatology* **93**: 799-803.
 31. Dykes P., Brunt J., Marks R. (1990): The effect of Cs-A on human epidermal keratinocytes in vitro. *Br. J. Dermatol.* **122**: 173-180.
 32. Urabe A., Kanitakis J., Viac J., Thiviolet J. (1989): Cyclosporine inhibits directly in vivo keratinocyte proliferation of living human skin. **92**: 755-757.

33. Nickoloff B., Fisher G., Mitra R., Voorhees J. (1988) : Direct cytopathic effects of CsA, on rapidly proliferating cultured keratinocytes and dermal fibroblasts. *Transplantation Proc.* **20** : 85-90.
34. Larson R., Fridborg H., Csoka G., Bergh J., Nygren P. (1992) : Cytotoxic action of cyclosporins on human tumor cell lines is not dependent on immunosuppressive activity. *Anticancer Res.* **12**; 1581-1586.
35. Yokota K., Hattori A., Kunz T., Shinozuka H. (1989) : Experimental analysis of the effects of cyclosporine on the induction and growth of epithelial tumors. *Transpl. Proc.* **21**; 3211-3214.
36. Shinozuka H., Gill T., Kunz H., Witkowski L., Demetris J., Perera M. (1986) : Enhancement of the induction of murine thymic lymphomas by cyclosporine. *Transplantation* **41**: 377-380.
37. Nelson E.W., Eichwald E. J., Shelby J. (1987) : Increased ultraviolet radiation-induced skin cancers in cyclosporin treated mice. *Transplant Proc.* **19**; 526-27.
38. Servilla K., Burnham K., Daynes R. (1987) : Ability of Cs-A to promote the growth of transplanted ultraviolet radiation induced tumors in mice. *Transplantation* **44**; 291-295.
39. Rowley J.D. (1983) : Human oncogene locations and chromosome aberrations. *Nature* **301** : 290.
40. Mittelman F., Heim S. (1990) : Chromosome abnormalities in cancer. *Cancer Det. Prev.* **14** : 57.
41. Nowell P. C. (1976) : The clonal evolution of tumour cell populations. *Science* **194** :23.
42. Mirro J. (1992) : Pathology and immunology of acute leukemia 6 (supl. 4) 13-15.
43. Eccles S., Heckford E., Alexander P. (1980) : Effect of cyclosporin on the growth and spontaneous metastasis of syngeneic animal tumors. *Br. J. Cancer* **42**; 252-259.
44. Mutch D., Herzog T., Chen C., Collins J. (1992) : The effects of cyclosporin A, on the lysis of ovarian cancer cells by cisplatin and adriamycin. *Gynecol. Oncol.* **47** : 28-33.
45. Ryffel B. et al (1991) : Identification of the multidrug resistance related membrane oligoprotein as an acceptor for cyclosporin. *J. Resp. Res.* **11**; 675-86.
46. McLachlan G., Thomson A. W., Wallace H. M. (1990) : Effects of cyclosporine in combination with α -difluoromethylornithine on growth and polyamine metabolism of human T-leukaemia cells in culture. *Biochem. Soc. Trans.* **18** (6) : 1226-31.

SUMMARY

Influence of Cyclosporin - A, on a human colon cancer cell line transplanted in nude mice.

Cyclosporin-A, a powerful immunosuppressant, has been used successfully for organ transplantation. However many clinical and experimental studies have pin-pointed that this drug may contribute to de novo arising of tumors in transplanted patients. The exact role of cyclosporin in the carcinogenic process remains controversial. In this study, we experimentally tested whether cyclosporin exerts any effects in the growth and biological behaviour of human colon adenocarcinoma cells of the SW-480 cell line in vivo and in vitro. For this reason 3×10^6 cancer cells have been subcutaneous injected in 20 nude mice. Half of the animals were daily injected with 15 μg of cyclosporin per mouse. The control group received no treatment regiment. Tumor growth was estimated weekly using a calliper. Seventy to 120 days after the initiation of the experiment, the nude mice were sacrificed and the whole animal was submitted for histopathologic examination. Fragments of the tumors were processed for tissue cultures in order to perform karyotypic analysis. For the in vitro assay, 100,000 cells of the above cell line were plated in each well of 7,24 well cell culture clusters. The effects of the drug were studied at concentrations 0.02, 0.1, 0.5, 1.0 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of cell culture medium. Cell growth was estimated by the use of a Coulter counter. The pathological examination revealed invasion of the surrounding muscles in the cyclosporin treated group. In the control group no invasion was found. Tumor growth was significantly higher in the cyclosporin treated animals, an observation compatible with the in vitro assays, in which low and median concentrations of the drug promoted tumor cell growth. The karyotypic analysis of the tumors arisen in the cyclosporin treated group revealed the appearance of new subpopulations of the paternal cell line, with more aneuploid karyotype containing a new chromosome marker not observed in the parental cell line, nor in the tumors arisen in the control group. These chromosome markers are associated with high malignancy and poor prognosis. The mechanisms by which cyclosporin modifies the biological behaviour of the cancer cells is not yet fully understood, however in this study, new subclones of the SW-480 cells evolved in the presence of cyclosporin. These subclones have more malignant cytogenetic and histopathologic characters, leading in worse biological behaviour.