

**MEDIZINISCHES RADIOLOGISCHES WISSENSCHAFTLICHES ZENTRUM DER RUSSISCHEN  
AKADEMIE DER MEDIZINISCHEN WISSENSCHAFTEN**

**„BESTÄTIGTE“**  
**Stellv. Direktor des Medizinischen  
radiologischen wissenschaftlichen  
Zentrums für wissenschaftliche  
Angelegenheiten,  
Dr. med. habil, Professor A. S. Sajenkogez.:**  
A. Sajenko  
den 30. Mai 2000 \_\_\_\_\_

**Bericht**

„Bewertung der Einwirkung des Galavits auf das System der natürlichen Zytotoxizität und auf die Veränderung der Expression der Marker der Lymphozyten des peripheren Blutes von gesunden Blutspendern und von Kranken mit onkologischer und somatischer Pathologie“

**Leiter:**  
**Leiterin des Laboratoriums für klinische Immunologie**

**gez. J. G. Kusmina**

**Verantw. Ausführende:**  
**Kandidat der biologischen Wissenschaften,  
verantw. wissenschaftlicher Mitarbeiter  
des Laboratoriums für klinische Immunologie**

**O. J. Watin**

**Kandidat der med. Wissenschaften,  
führende wissenschaftliche Mitarbeiterin  
des Laboratoriums für klinische Immunologie**

**gez. J. S. Pantelejewa**

**Obninsk  
2000**

## Inhaltsverzeichnis

Einleitung .....	3
Das Forschungsziel .....	4
Material und Methoden .....	4
Die Forschungsergebnisse .....	6
1. Aufgabe : Bewertung der Einwirkung verschiedener Galavit Konzentrationen auf die Wechselwirkung von zytotoxischen Lymphozyten gesunder Blutspender mit den Zielzellen (Linie K-562) .....	6
Bewertung der Einwirkung verschiedener Galavitkonzentrationen auf die Wechselwirkung von zytotoxischen Lymphozyten von Krebskranken mit den Zielzellen (K-562) .....	7
Bewertung der Einwirkung niedriger Galavitkonzentrationen (2,5 und 5,0 $\mu$ /ml) auf die Wechselwirkung der zytotoxischen Lymphozyten von Krebskranken mit den Zielzellen (Linie K-562).....	8
Niedrig <35 .....	9
2. Aufgabe : Bewertung der In-vitro-Einwirkung des Galavits auf die Zytotoxizitätsreaktion (Linie K-562) der Lymphozyten des Bluts von gesunden Blutspendern, von Kranken mit onkologischer und somatischer Pathologie je nach verschiedenen Bedingungen der Vorinkubation der Effektorzellen mit dem Präparat.....	10
Schlussfolgerungen .....	12
3. Aufgabe : Einwirkung des Galavits auf die Expression der Marker der Lymphozyten des Bluts von gesunden Personen bei In-vitro-Tests .....	13
Schlussfolgerungen .....	16

## Einleitung

Der Forschungsgegenstand der vorliegenden Arbeit ist ein neuer russischer Funktionsmodulator der Makrophagen, das Präparat Galavit, das im Zentrum für moderne Medizin „Medicor“, Moskau, entwickelt worden ist.

Dem bestätigten technischen Auftrag des Amtes für wissenschaftlich-technische Entwicklungen zufolge wurde bei In-vitro-Tests die Fähigkeit des Galavits als pharmakologisches Mittel bewertet, auf die natürlichen Killerzellen (ihre Menge und ihre Funktion) sowie auf die Zahl der T-Zellen und ihrer Subpopulationen einzuwirken.

Zur Zeit wird ein System der Zytotoxizität bestimmt, das im Organismus eine gewisse Autonomie besitzt und dessen Hauptfunktion die immunologische Kontrolle ist.

Die dominierende Rolle spielen im System der natürlichen Zytotoxizität die NK-Zellen. Bekanntlich gehören die NK-Zellen zum System der natürlichen Resistenz des Organismus, da sie keine spezifische Erkennung und vorherige Sensibilisierung erfordern, um die Zielzellen zu erkennen und zu töten.

Ihrer Herkunft nach sind die NK-Lymphozyten der T-Reihe verwandt, wovon das Vorhandensein gemeinsamer Marker (CD2, CD56) und die mit den T-Killern gemeinsame Funktion zeugen. Als Marker der NK-Zellen dienen die Antigene CD56, CD57. Die Subfraktion der K-Zellen wird durch das Molekül CD 16 markiert.

Die zytotoxischen T-Lymphozyten (T-Killer) sind eine Abart der T-Lymphozyten und expressieren den Korezeptor CD8. Bei der immunen Antwort differenzieren sich die T-Killer-Vorläufer zu zytotoxischen T-Effektorzellen, die bei Kontakten ebenfalls zum Eingehen der Zielzellen führen.

Die Killerzellen beider Typen spielen eine wichtige Rolle beim Schutz des Organismus vor Geschwulstwachstum und Virusinfektionen: bei der Eliminierung von virusinfizierten und mutierten Zellen, bei der Kontrolle über die Prozesse der Proliferation und Differenzierung somatischer Zellen, bei der Abstoßungsreaktion von Transplantaten.

Die Mechanismen der NK-abhängigen und T-zellulären Zytolyse unterscheiden sich voneinander. Bei der Infektion durch intrazelluläre Agenten gehört die entscheidende Schutzrolle in den frühen Infektionsstadien den NK-Zellen, deren Zytolyse offenbar ein perforinabhängiger Mechanismus zugrunde liegt, der zur Entwicklung der Apoptose führt, an deren Realisierung Perforine, Fas-Rezeptoren und Faktoren von Geschwulstnekrosen teilnehmen. Die Zytolyse nimmt 1-2 Stunden in Anspruch.

Im Unterschied zu der von den NK ausgelösten Zytotoxizität erfordert das Anfangsstadium der T-Zellen-Zytolyse die Einschaltung einer Reihe von zusätzlichen Mechanismen, darunter die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der T-Zellen mit der Herausbildung eines Killer-Pools.

Deshalb wirken sich die Immunomechanismen, die mit der Aktivität der zytotoxischen T-Zellen verbunden sind, welche mehrere Mechanismen der Zytolyse der Zielzellen benutzen, später (nach 3-7 und mehr Tagen) aus.

Störungen der Zytotoxizität wurden bei vielen Erkrankungen festgestellt. So wurde nachgewiesen, daß bei der Entwicklung von Epithelkarzinomen bis zu 50% der Kranken eine Hypofunktion dieser Zellen haben. Bei an Lupus erythematoses Kranken wurden Antikörper gegen die NK-Zellen festgestellt. Ohne die Wechselwirkung mit den Zielzellen zu unterdrücken, inhibieren diese Antikörper doch ausgeprägt ihre zytotoxische Aktivität. Die Funktion der NK-Zellen ist bei Aids-Kranken, bei Lueskranken, bei Kranken an juveniler

rheumatoider Arthritis, beim Cediak-Higashischen und beim Shegrenschen Syndrom unterdrückt.

Deshalb ist die Möglichkeit, auf das System der natürlichen Zytotoxizität einzuwirken, sehr wichtig und die Erforschung der Wirkung des Präparats „Galavit“ auf den funktionellen Zustand und die Anzahl von Killerzellen aktuell.

## Das Forschungsziel

**DAS FORSCHUNGSZIEL** bestand darin, in vitro die Einwirkung des Galavits auf die zytotoxische Funktion der natürlichen Killer und die Expression der Marker der NK-Zellen und der T-zytotoxischen Lymphozyten von gesunden Blutspendern, von Kranken mit onkologischen und somatischen Erkrankungen zu erforschen.

Zur Erreichung dieses Ziels wurden folgende Aufgaben gelöst:

1. Bewertung der In-vitro-Einwirkung verschiedener Galavitkonzentrationen im System der Wechselwirkung der zytotoxischen Lymphozyten des peripheren Bluts von gesunden und kranken Personen mit den Zielzellen (Linie K-562) bei Anwendung unterschiedlicher Relationen Effektoren/Ziele (25:1, 12:1 und 6:1).
2. Bewertung der In-vitro-Einwirkung verschiedener Bedingungen der Vorbehandlung der NK-Zellen des Bluts von gesunden Blutspendern und von Kranken mit onkologischer und somatischer Pathologie mit dem Galavit auf den Zytotoxizitätsindex im Verhältnis zur Zellenlinie K-562.
3. Erforschung der In-vitro-Einwirkung verschiedener Galavitkonzentrationen auf die Expression der Marker der Killerzellen des Bluts von gesunden Blutspendern und von an Lymphogranulomatose Kranken je nach verschiedenen Bedingungen der Inkubation der Zellen mit dem Präparat.

## Material und Methoden

Die Erforschung der Zytotoxizität der NK-Zellen erfolgte an Mononuklearen des peripheren Bluts von gesunden Blutspendern und von Kranken mit verschiedener onkologischer und somatischer Pathologie.

Die Mononukleare wurden durch Blut-Zentrifugierung mit einem Dichtegradienten von Fikall/Verographin ( $d = 1.077 \text{ g/cm}^3$ ) erhalten.

Die natürliche zelluläre Zytotoxizität der Killer wurde am Verhältnis zu den Zielzellen radiometrisch gemessen. Als Zielzellen diente eine durch  $\text{H}^3$ -Uridin markierte Suspensionskultur von menschlichen Myeloblasten K-562 im Medium RPMI-1640, das durch ein 10%iges embryonales Kalbsserum und Glutamin ergänzt war. Um die zytotoxische Wirkung zutage treten zu lassen, wurden  $1 \cdot 10^4$  Zielzellen und unterschiedliche Mononuklearmengen der zu untersuchenden Suspension (6 - 12 - 25 je 1 Ziel) binnen 14 Stunden inkubiert. Darauf wurde der Inhalt der Versuchsproben (Uridin-markierte Ziele + Effektoren) und der Kontrollproben (Uridin-markierte Ziele) auf Milliporenfilter abgesetzt. Des Weiteren wurde die Intensität der Einschaltung des Isotops in den Versuchs- und den Kontrollproben bestimmt. Das Reaktionsergebnis wurde durch den zytotoxischen Index (ZI) charakterisiert.

$$\text{ZI} = \left( 1 - \frac{\text{Einschaltung in den Probezellen}}{\text{Einschaltung in den Kontrollzellen}} \right) \times 100\%$$

Die Verteilung der untersuchten Gruppen von praktisch gesunden und von kranken Personen nach dem nosologischen Merkmal und dem Behandlungsstadium ist in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

**Personengruppen, in denen die Einwirkung des Galavits auf den Zytotoxizitätsindex der natürlichen Killer erforscht wurde**

Untersuchte Gruppen	Anzahl der Untersuchten
<b>Gesunde Blutspender</b>	12
<b>Krebskranke</b>	56
Vor der Behandlung	40
Bösartige Lymphome	21
Krebs des Gebärmutterkörpers und der Eierstöcke	9
Krebs des Magen-Darm-Kanals	8
Kehlkopfkrebs	2
Nach der Behandlung	16
Bösartige Lymphome	8
Krebs des Magen-Darm-Kanals	3
Kehlkopfkrebs	2
Blasenkrebs	3
<b>Kranke mit somatischer Pathologie</b>	11
Polyosteoarthrose	8
Herzischämie	2
Rheumatoide Arthritis	1
Insgesamt:	79

Die Tabelle 2 zeigt Angaben über die Zahl der im Rahmen des 3. Abschnitts durchgeführten Untersuchungen, bei denen die Einwirkung des Galavits auf die Expression der Marker der Killerzellen erforscht wurde.

Tabelle 2

Untersuchte Gruppen	Anzahl der Untersuchten
<b>Gesunde Blutspender</b>	5
<b>Lymphogranulomatose-Kranke</b>	4
Insgesamt:	9

Das Galavit-Aminophthalhydrazid („Medicor“, Moskau) wurde mit einer isotonischen Natriumchloridlösung bis zur erforderlichen Endkonzentration - 2,5, 5, 10, 25, 50/75, 150, 300, 600 µg/ml - verdünnt.

In der 1. Versuchsreihe wurden zwecks Erforschung der Galaviteinwirkung auf die Kooperation von zytotoxischen Lymphozyten mit den Zielzellen die Mononukleare von Blutspendern oder von Kranken und die markierten Zellen K-562 in den entsprechenden Lösungen 25:1, 12:1, 6:1 zusammen mit verschiedenen Galavitkonzentrationen (2,5, 5, 10, 25, 50, 75, 150, 300, 600 µg/ml) in Planchetten mit je 96 Alveolen inkubiert. 14 Stunden später wurde der ZI bestimmt.

In der nächsten Versuchsreihe wurde die Einwirkung der Vorbearbeitung von zytotoxischen

Lymphozyten mit dem Galavit auf ihren funktionellen Zustand hin erforscht. Bei vorherigen Versuchen wurde festgestellt, dass von den erforschten Fristen der Vorinkubation von Mononuklearen mit dem Galavit (1, 3, 20, 24 Stunden) die Dauer von 20 - 24 Stunden für seine immunmodulierende Wirkung am optimalsten war. In der Hauptversuchsgruppe wurden vor der Reaktion der Zytotoxizität die Mononukleare des Bluts der untersuchten Gruppen von gesunden und kranken Personen binnen 20 Stunden mit verschiedenen Galavitdosen inkubiert. Die Zellen wurden zweimal im vollen Medium gewaschen, und darauf wurde die Zytotoxizitätsreaktion durchgeführt.

Zur Erforschung der Möglichkeiten der Galaviteinwirkung auf die Expression der Marker der Killerzellen (CD16+ CD56+, CD3+CD16+ CD56+. CD8+) wurde die Vorinkubation von Mononuklearen des peripheren Bluts mit verschiedenen Galavitkonzentrationen binnen 0,5 -1, 5-3, 0 - 20,0 Stunden bei einer Temperatur von 37° vorgenommen, worauf die standardmäßige Reaktion der I mm unofluoreszenz mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern mit doppeltem Marker (Firma Becton Dickinson) folgte. Das Ablesen der Reaktion wurde auf dem Zytofluorimeter FACScan vorgenommen.

## Die Forschungsergebnisse

### 1. Aufgabe :

#### Bewertung der Einwirkung verschiedener Galavit Konzentrationen auf die Wechselwirkung von zytotoxischen Lymphozyten gesunder Blutspender mit den Zielzellen (Linie K-562)

Die Resultate der Einwirkung verschiedener Galavitkonzentrationen (5, 10, 25, 50, 75, 150, 300 µ/ml) auf den ZI-Wert der NK-Zellen von drei gesunden Blutspendern bei der Anwendung der Relationen Effektoren/Ziele von 25:1, 12:1 und 6:1 sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle3

#### Einwirkung verschiedener Galavitkonzentrationen auf den Zytotoxizitätsindex der Mononukleare des Bluts von gesunden Blutspendern bei den Effektoren/Ziele-Relationen von 25:1, 12:1 und 6:1

Galavit-Konzentr., µg/ml	ZI, % 25: 1	ZI, % 12 : 1	ZI, % 6 : 1
<b>Kontrolle</b>	41.1 ± 0.67	25.9 ± 1.65	14.4 ± 1.36
5.0	41.8 ± 3.41	20.5 ± 3.24	15.1 ± 2.97
10.0	38.9 ± 1.16	23.6 ± 2.67	15.8 ± 2.56
25.0	40.3 ± 2.67	23.7 ± 3.67	19.5 ± 2.55
50.0	42.5 ± 4.45	24.1 ± 0.89	15.8 ± 1.96
75.0	39.2 ± 3.93	25.8 ± 1.86	15.8 ± 2.97
150.0	36.9 ± 1.62	22.7 ± 1.30	13.1 ± 1.48
300.0	41.0 ± 1.79	22.0 ± 2.51	18.2 ± 0.15

Die erhaltenen Ergebnisse zeugen davon, dass bei normalem ZI-Wert niedrige, mittlere und hohe Galavitkonzentrationen (im Bereich von 5,0 bis zu 300 µ/ml) bei unterschiedlichen Effektoren/Ziele-

Relationen die Zytotoxizität der Mononukleare des Bluts von gesunden Blutspendern nicht wesentlich modifizieren.

### **Bewertung der Einwirkung verschiedener Galavitkonzentrationen auf die Wechselwirkung von zytotoxischen Lymphozyten von Krebskranken mit den Zielzellen (K-562)**

Die Resultate der Einwirkung mittlerer und hoher Galavitkonzentrationen (25, 75, 150, 300 und 600  $\mu$ /ml) auf den ZI-Wert der NK-Zellen von vier Krebskranken vor der Behandlung bei der Anwendung der Relationen Effektoren/Ziele von 25:1, 12:1 und 6:1 sind in der Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4

#### **Einwirkung verschiedener Galavitkonzentrationen auf den ZI von Krebskranken vor der Behandlung bei den Effektoren/Ziele-Relationen von 25:1, 12:1 und 6:1**

<b>Galavit-Konzentr., <math>\mu</math>g/ml</b>	<b>ZI, % 25: 1</b>	<b>ZI, % 12: 1</b>	<b>ZI, % 6:1</b>
<b>Kontrolle</b>	43.8 $\pm$ 1.50	32.0 $\pm$ 2.12	14.5 $\pm$ 0.40
25.0	38.3 $\pm$ 1.00	23.2 $\pm$ 1.35	16.9 $\pm$ 1.85
75.0	37.8 $\pm$ 1.20	25.0 $\pm$ 0.45	14.9 $\pm$ 0.80
150.0	40.2 $\pm$ 1.50	29.1 $\pm$ 2.99	20.0 $\pm$ 1.02
300.0	41.9 $\pm$ 2.03	27.6 $\pm$ 2.71	15.6 $\pm$ 1.3
600.0	39.9 $\pm$ 0.15	31.5 $\pm$ 2.25	—
Zahl der Beobachtungen	4	4	2

Die erhaltenen Ergebnisse zeugen davon, dass bei den Krebskranken vor der Behandlung mit einem normalen ZI-Anfangswert die Zytotoxizität bei der Anwendung von mittleren und hohen Galavitkonzentrationen (im Bereich von 25,0 bis zu 600  $\mu$ /ml), ebenso wie bei den gesunden Blutspendern, bei unterschiedlichen Effektoren/Ziele-Relationen nicht wesentlich modifiziert wird.

**Bewertung der Einwirkung niedriger Galavitkonzentrationen (2,5 und 5,0 µ/ml) auf die Wechselwirkung der zytotoxischen Lymphozyten von Krebskranken mit den Zielzellen (Linie K-562)**

Im nächsten Stadium der Arbeit wurde die Einwirkung niedriger Galavitkonzentrationen (2,5 und 5,0 µ/ml) auf den ZI der Mononukleare des Bluts von Kranken mit onkologischer Pathologie erforscht. Bei den untersuchten Kranken variierten die ZI-Werte sowohl in den Kontrollproben als auch bei der Bearbeitung mit dem Galavit erheblich: von 6,3 bis 72,0 (bei der Relation Effektoren/Ziele = 25:1), von 5,6 bis 53,4 (bei 12:1) und von 2,8 bis 37,8 (bei 6:1).

Die Ergebnisse der gemittelten Angaben sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5

**Einwirkung niedriger Galavitkonzentrationen (2,5 und 5,0 µ/ml) auf den ZI der Mononukleare des Bluts von Kranken mit onkologischer Pathologie (vereinigte Gruppe) bei den Effektoren/Ziele-Relationen von 25:1, 12:1 und 6:1**

Relation Effektoren/Zielzellen	ZI, %		
	Kontrolle	2,5 µ/ml	5,0 µ/ml
<b>Kranke vor d. Behandlung</b>			
25:1	35.3 ± 6.67	36.5 ± 7.67	38.7 ± 5.17
12:1	24.2 ± 4.86	23.5 ± 4.19	22.2 ± 2.69
6:1	19.7 ± 3.60	17.2 ± 4.58	17.6 ± 2.43
<b>Kranke nach d. Behandlung</b>			
25:1	49.3 ± 5.94	44.4 ± 3.90	40.4 ± 3.19
12:1	24.7 ± 1.05	30.2 ± 3.15	28.0 ± 2.40
6:1	14.0 ± 1.63	15.9 ± 2.23	17.2 ± 3.34

Wie gezeigt wird, konnten Einwirkungen niedriger Galavitkonzentrationen bei unterschiedlichen Effektor/Ziel-Relationen in der Gruppe von Krebskranken vor und nach der Behandlung laut gemittelten Angaben nicht festgestellt werden.

Mit Rücksicht auf das individuelle Gefälle der Kennziffern wurde ferner die Einwirkung niedriger Galavitkonzentrationen auf die Zytotoxizität je nach dem ZI-Wert (25:1, 12:1, 6:1) bei der Kontrolle in drei Krankengruppen - mit hohem (über 48), mittlerem (35 - 48) und niedrigem (unter 35%) ZI-Wert - erforscht (Tabelle 6).

Tabelle 6

**Einwirkung niedriger Konzentrationen des Galavits je  
nach seinem Wert in der Kontrolle**

Galavit-Konzentr., $\mu\text{ml}$	ZI-Wert, %		
	Hoch >48	Mittel 35 - 48	Niedrig <35
<b>25:1</b>			
<b>Kontrolle</b>	<b>60.7 ± 3.99</b>	<b>41.7 ± 0.85</b>	<b>17.9 ± 3.56</b>
<b>2.5</b>	<b>56.8 ± 4.31</b>	<b>41.0 ± 1.43</b>	<b>19.6 ± 2.52</b>
<b>5.0</b>	<b>42.8 ± 3.07</b>	<b>37.3 ± 1.59</b>	<b>30.2 ± 5.00</b>
<b>12:1</b>			
<b>Kontrolle</b>	<b>36.4 ± 4.89</b>	<b>25.7 ± 1.36</b>	<b>12.1 ± 1.95</b>
<b>2.5</b>	<b>31.8 ± 4.62</b>	<b>29.6 ± 5.00</b>	<b>17.2 ± 3.59</b>
<b>5.0</b>	<b>26.9 ± 4.35</b>	<b>23.8 ± 2.38</b>	<b>17.2 ± 1.39</b>
<b>6:1</b>			
<b>Kontrolle</b>	<b>23.0 ± 5.90</b>	<b>14.9 ± 0.73</b>	<b>11.7 ± 3.58</b>
<b>2.5</b>	<b>23.2 ± 6.00</b>	<b>18.3 ± 5.45</b>	<b>11.8 ± 3.02</b>
<b>5.0</b>	<b>22.0 ± 7.10</b>	<b>16.5 ± 2.70</b>	<b>16.2 ± 1.99</b>
<b>Beobachtungen</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>5</b>

Bei der Anwendung niedriger Galavitkonzentrationen wurde die deutliche Tendenz zur Senkung des hohen und zur Erhöhung des niedrigen Zytotoxizitätswertes nachgewiesen, was mit der Konzeption der Immunmodulation übereinstimmt. Bei mittleren ZI-Werten (35 -48) war ein Effekt des Präparats bei beliebigen Effektoren/Ziele-Relationen nicht zu verzeichnen.

Die erhaltenen Angaben stimmen mit den Resultaten, die in den Tabellen 3 und 4 dargestellt sind, überein: Das Galavit übt in den Gruppen von gesunden Blutspendern und von Krebskranken bei einem normalen ZI-Anfangswert keine Einwirkung aus.

Somit wurden bei der Erforschung der Galaviteinwirkung auf die kooperative Wechselwirkung von Effektoren mit Zielzellen in der Reaktion der zellulären Zytotoxizität folgende Ergebnisse erzielt:

1. Das Galavit (im Konzentrationsbereich von 5,0 bis 300  $\mu\text{ml}$ ) modifiziert bei unterschiedlichen Effektoren/Ziele-Relationen nicht wesentlich die Zytotoxizität der Mononukleare des Bluts von gesunden Blutspendern.
2. Das Galavit (im Bereich von mittleren und hohen Konzentrationen, d.h. von 25,0 bis 600,0  $\mu\text{ml}$ ) modifiziert bei verschiedenen Effektoren/Ziele-Relationen die Zytotoxizität der Mononukleare des Bluts von Krebskranken vor der Behandlung bei ihrem normalen Anfangswert ebenfalls nicht wesentlich.
3. Das Galavit in niedrigen Konzentrationen (2,5 - 10,0  $\mu\text{ml}$ ) zeigt eine immunmodulierende Aktivität, senkt den hohen und erhöht den niedrigen ZI-Wert bei Krebskranken vor und nach der Behandlung.

## 2. Aufgabe :

### Bewertung der In-vitro-Einwirkung des Galavits auf die Zytotoxizitätsreaktion (Linie K-562) der Lymphozyten des Bluts von gesunden Blutspendern, von Kranken mit onkologischer und somatischer Pathologie je nach verschiedenen Bedingungen der Vorinkubation der Effektorzellen mit dem Präparat

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde die Wirkung der Vorinkubation von zytotoxischen Lymphozyten mit dem Galavit; mit nachfolgender zweimaliger Wäschtung und der Durchführung der Zytotoxizitätsreaktion untersucht.

Im Unterschied zur vorherigen Versuchsreihe, in der die Galaviteinwirkung auf die Kooperation von zytotoxischen Lymphozyten mit den Zielzellen bewertet wurde (das Galavit wirkte auf beide Zelltypen - die Effektoren und die Zielzellen - ein, die sich gleichzeitig in der Reaktionsmischung befanden), lag die Betonung in dieser Reihe auf der Vorbearbeitung der Effektorzellen.

Analysiert werden die Resultate der In-vitro-Einwirkung verschiedener Galavitkonzentrationen (2,5, 5, 10, 25, 50, 150, 300  $\mu$ /ml) auf die Zytotoxizität der natürlichen Killer von gesunden Blutspendern und von Krebskranken (die Effektoren/Zielzellen-Relation von 25:1) unter verschiedenen Bedingungen der Zelleninkubation mit dem Präparat:

1. - Inkubationsdauer: 1, 3, 20 und 24 Stunden.
2. - Galavitdosis: 2,5 5, 10, 25, 50, 150 und 300  $\mu$ /ml.

In der Tabelle 7 sind die Resultate der Einwirkung des Galavits in der Konzentration von 5  $\mu$ /ml auf den ZI je nach der Dauer der Vorbearbeitung der Lymphozyten von gesunden Blutspendern und von Krebskranken mit dem Präparat bei der Effektoren/Ziele-Relation von 25:1 dargestellt.

Tabelle 7

#### Galaviteinwirkung (5 $\mu$ /ml) auf den ZI je nach der Dauer der Vorbearbeitung der Lymphozyten von gesunden Blutspendern und von Krebskranken mit dem Präparat (Effektoren/Zielzellen-Relation von 25:1)

	1 Stunde	3 Stunden	20 Stunden	24 Stunden
<b>Spender(n=4)</b>				
<b>Kontrolle</b>	41.0 $\pm$ 4.38	38.8 $\pm$ 2.50	43.8 $\pm$ 3.35	44.5 $\pm$ 2.01
<b>Galavit</b>	36.6 $\pm$ 1.97	41.6 $\pm$ 2.07	52.0 $\pm$ 2.67	51.9 $\pm$ 1.26*
<b>Kranke (n=4)</b>				
<b>Kontrolle</b>	25.5 $\pm$ 6.6	24.3 $\pm$ 7.68	27.7 $\pm$ 6.54	24.9 $\pm$ 5.00
<b>Galavit</b>	22.2 $\pm$ 5.95	20.1 $\pm$ 8.20	36.7 $\pm$ 4.78	34.4 $\pm$ 3.50

\* Unterschiede im Vergleich mit den Kennziffern in der Kontrolle ( $p < 0,05$ ) signifikant.

Die erhaltenen Resultate zeugen davon, dass eine kurze (1- bis 2-stündige) Vorinkubation der Lymphozyten des Bluts der untersuchten Personen mit Galavit (5,0  $\mu$ /ml) keine wesentlichen Veränderungen des ZI-Wertes gegenüber der Kontrolle nach sich zog; bei längerer (20- bis 24-stündiger) Inkubationsdauer der Mononukleare des Bluts mit dem Galavit wurde eine deutliche Tendenz zur ZI-Erhöhtung in der Krankengruppe und eine nachweisbare Erhöhtung des ZI (\*) in der Gruppe der gesunden Blutspender festgestellt.

In der nächsten Versuchsreihe wurde die In-vitro-Einwirkung verschiedener Galavitkonzentrationen (2,5, 5, 10, 25, 50, 150, 300  $\mu$ /ml) auf die Zytotoxizität der NK-Zellen von

Krebskranken vor Beginn der Behandlung bei der Anwendung der Effektoren/Ziele-Relationen von 25:1 bei einer 20-stündigen Vorinkubation der Zellen mit dem Präparat untersucht (Tabelle 8).

Tabelle 8

**Galaviteinwirkung auf den Zytotoxizitätsindex der Lymphozyten des Bluts von Krebskranken vor Beginn der Behandlung bei einer 20-stündigen Vorinkubation mit dem Präparat in den Konzentrationen von 2,5, 5,0, 10, 25, 50, 150 und 300 µg/ml**

<b>Galavit-Konzentr., µg/ml</b>	<b>ZI, % 25:1</b>
<b>Kontrolle</b>	<b>26.5 ± 1.82</b>
<b>2.5</b>	<b>35.9 ± 2.88*</b>
<b>5.0</b>	<b>36.5 ± 2.09*</b>
<b>10.0</b>	<b>36.5 ± 1.85*</b>
<b>25.0</b>	<b>28.2 ± 3.26</b>
<b>50.0</b>	<b>24.1 ± 3.59</b>
<b>150.0</b>	<b>17.4 ± 3.06*</b>
<b>300.0</b>	<b>9.6 ± 2.76*</b>
<b>Zahl der Beobachtungen</b>	<b>19</b>

\* Unterschiede im Vergleich mit den Kennziffern in der Kontrolle ( $p < 0,05$ ) signifikant.

Die Forschungsergebnisse zeugen davon, dass bei einer 20-stündigen Vorinkubation der Lymphozyten des Bluts von Krebskranken mit verschiedenen Galavitkonzentrationen vor Beginn der spezifischen Behandlung die ZI-Werte im Vergleich mit der Kontrolle im Bereich der Galavitdosen von 2,5 - 10 µ/ml wesentlich anstiegen, im Bereich von 25 - 50 µ/ml sich nicht veränderten und bei maximalen Dosen von 150 - 300 µ/ml nachweisbar sanken.

Des weiteren wurde die In-vitro-Einwirkung niedriger Galavitkonzentrationen (5, 10 µ/ml) auf die Zytotoxizität der NK-Zellen von Kranken mit onkologischer und somatischer Pathologie vor und nach der Behandlung bei einer Effektoren/Ziele-Relation von 25:1 nach einer 20-stündigen Vorinkubation der Zellen mit dem Präparat untersucht (Tabelle 9).

Tabelle 9

**Besonderheiten der Einwirkung einer 20-stündigen Vorinkubation der Lymphozyten des Bluts von Kranken mit onkologischer und somatischer Pathologie mit dem Galavit (5 und 10 µg/ml) vor und nach der Behandlung auf den ZI (Effektoren/Ziele-Relation von 25:1)**

Untersuchte Gruppen	ZI,%		
	Kontrolle	5 µ/ml	10 µ/ml
<b>Krebskranke</b>			
<b>Vor d. Behandlung:</b>			
- Vereinierte Gruppe (n=15)	28.7 ± 3.18	35.5 ± 2.10	36.8 ± 2.29*
- Niedriger ZI (<34%) (n=11)	23.2 ± 2.30	35.3 ± 2.90*	36.4 ± 2.41*
- Hoher ZI (>34%) (n=4)	43.9 ± 4.96	36.0 ± 1.42	keine Angaben
<b>Nach d. Behandlung (n=13)</b>	25.2 ± 3.29	38.0 ± 4.92*	32.4 ± 3.00
<b>Nicht onkologische Kranke</b>			
<b>Vord. Behandlung (n=5)</b>	39.5 ± 7.93	36.4 ± 5.30	46.0 ± 4.12
<b>Nach d. Behandlung (n=4)</b>	35.4 ± 4.62	34.7 ± 2.80	37.9 ± 3.92

\* Unterschiede im Vergleich mit den Kennziffern in der Kontrolle ( $p < 0,05$ ) signifikant.

Die Resultate zeugen davon, dass bei einer 20-stündigen Vorinkubation der Lymphozyten des Bluts von Krebskranken vor der Behandlung mit niedrigen Galavitkonzentrationen (5 -10 µ/ml) die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen im Vergleich mit der Kontrolle wesentlich zunahm und dem Normalwert zustrebte; am ausgeprägtesten war dieser Effekt bei Kranken mit einem anfänglich zu niedrigen Zytotoxizitätswert. In der Gruppe der Kranken mit einem vor der Behandlung hohen ZI erfuhr die funktionelle Aktivität der NK-Zellen keine wesentliche Veränderung.

Bei Krebskranken wurde nach der Chemo- und Strahlentherapie eine Senkung der Zytotoxizität (ein ZI von weniger als 34% bei 10 der 13 Kranken vermerkt) mit nachfolgender wesentlicher Erhöhung nach der Inkubation mit Galavit festgestellt.

In der Gruppe der nicht onkologischen Kranken (rheumatoide Arthritis, Herzischämie, Osteoporose) wurde eine andere Gesetzmäßigkeit festgestellt: Die vor und nach der Behandlung konstatierten hohen ZI-Werte erfahren nach einer 20-stündigen Vorinkubation mit Galavit keine wesentliche Veränderung.

Die dargestellten Angaben verweisen auf eine modulierende In-vitro-Einwirkung des Galavits auf die zytotoxische Aktivität der Mononukleare des menschlichen Bluts und zeugen von der Zweckmäßigkeit einer weiteren vertieften Erforschung der Galaviteinwirkung auf das Immunsystem.

### Schlussfolgerungen

1. Es wurde festgestellt, dass eine 20- bis 24-stündige Vorinkubation von Mononuklearen des Bluts mit Galavit (Konzentration von 5,0 µ/ml) den ZI in der Gruppe der gesunden Blutspender erhöht und seine nachweisbare Erhöhung in den Gruppen der Krebskranken und der Personen mit somatischer Pathologie bewirkt. Eine kurzzeitige (1- bis 3-stündige) Vorinkubation der Lymphozyten des Bluts der untersuchten Personen mit dem Galavit (5,0 µ/ml) ergab keine wesentliche Einwirkung auf die ZI-Werte im Vergleich mit der Kontrolle.

2. Eine bis zu 20-stündige Vorinkubation der Mononukleare des Bluts von Krebskranken mit verschiedenen Galavitkonzentrationen vor Beginn der spezifischen Behandlung erhöht die ZI-Werte bei Galavitdosen von 2,5 bis 10 µ/ml wesentlich, verändert sie bei 25 - 50 µ/ml nicht und senkt sie bei maximalen Dosen von 150 - 300 µ/ml.

3. Die Vorinkubation der Lymphozyten der Krebskranken mit kleinen Galavitkonzentrationen (5-10  $\mu$ /ml) vor der Behandlung erhöhte den ZI wesentlich, bis zur Norm; am ausgeprägtesten ist der Galaviteffekt bei Kranken mit anfänglich zu niedrigem Zytotoxizitätswert. In der Gruppe der Kranken mit einem vor der Behandlung hohen ZI erfuhr die funktionelle Aktivität der NK-Zellen unter der Einwirkung des Galavits keine wesentliche Veränderung.

### 3. Aufgabe :

#### Einwirkung des Galavits auf die Expression der Marker der Lymphozyten des Bluts von gesunden Personen bei In-vitro-Tests

Erforscht wurde die Einwirkung verschiedener Galavitkonzentrationen (0,1, 1,0, 5, 10, 25, 50 75, 150, 300, 600  $\mu$ /ml) auf die Veränderung der Expression der Marker der NK-Zellen und der zytotoxischen T-Zellen eines gesunden Blutspenders.

Die am Phikall-Verographin ausgeschiedenen Mononukleare des peripheren Bluts wurden binnen 30 - 90 Min. bei 37° C mit verschiedenen Galavitkonzentrationen vorinkubiert, worauf die standardmäßige Reaktion mit MAT mit doppeltem fluoreszentschem Marker folgte. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10

#### Einwirkung verschiedener Galavitkonzentrationen auf die Veränderung der Expression der Marker von NK-Zellen, CD56+16+CD3-, der zytotoxischen T-Zellen, CD3+CD56+16+, eines praktisch gesunden Menschen

Galavit-Konzentr., $\mu$ /ml	CD3+CD56+16+	CD3-CD56+16+	CD56+16+
Kontrolle	0.6	3.0	3.6
0.1	0.7	2.3	3.0
1.0	0.5	2.7	3.2
5.0	0.5	2.9	3.4
10.0	0.4	2.7	3.1
25.0	0.4	2.8	3.2
50.0	0.5	3.4	3.9
75.0	0.4	2.9	3.3
150.0	0.4	1.1	1.5
300.0	0.2	1.6	1.8
600.0	0.2	0.3	0.5

Unter der Einwirkung hoher Galavitkonzentrationen (150 - 600  $\mu$ /ml) wurde eine Senkung des Standes der Killerzellen von CD3+CD56+16+, CD3-CD56+16+ und der CD56+16+ festgestellt.

Eine analoge Tendenz ließ sich beim 2. Blutspender feststellen (Tabelle 11).

Tabelle 11

**Einwirkung verschiedener Galavitkonzentrationen auf die Veränderung der Expression der Marker der NK-Zellen, der Zellen CD56+16+CD3-, der zytotoxischen T-Zellen, der Zellen CD3+CD56+16+ eines praktisch gesunden Menschen**

<b>Galavit-Konzentr., µ/ml</b>	<b>CD3+CD56+16+</b>	<b>CD3-CD56+16+</b>	<b>CD56+16+</b>
<b>Kontrolle</b>	<b>1.0</b>	<b>4.5</b>	<b>5.5</b>
<b>0.1</b>	<b>1.0</b>	<b>3.1</b>	<b>4.1</b>
<b>1.0</b>	<b>2.0</b>	<b>4.2</b>	<b>6.2</b>
<b>5.0</b>	<b>0.8</b>	<b>4.2</b>	<b>5.0</b>
<b>10.0</b>	<b>0.4</b>	<b>3.6</b>	<b>4.0</b>
<b>25.0</b>	<b>0.4</b>	<b>3.6</b>	<b>4.9</b>
<b>50.0</b>	<b>0.4</b>	<b>2.9</b>	<b>3.4</b>
<b>75.0</b>	<b>0.4</b>	<b>2.8</b>	<b>3.2</b>
<b>150.0</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>
<b>300.0</b>	<b>0.7</b>	<b>2.5</b>	<b>3.2</b>

Ferner wurde die Galaviteinwirkung auf die Expression der Lymphozytenmarker des Bluts von 3 gesunden Personen bei In-vitro-Tests bewertet:

- der NK-Zellen (CD16+CD56+CD3-),
- der zytotoxischen T-Zellen (Killer, CD3+CD16+CD56+),
- der allgemeinen T-Zellen (CD3+),
- der T-Helfer/Induktoren (CD4+),
- der „naiven“ T-Helfer (CD4+CD45RA+).

Erforscht wurde die Einwirkung niedriger Galavitkonzentrationen (2,5, 10 µ/ml) auf die Veränderung der Expression der Marker von Lymphozyten bei einer 3- bzw. 20-stündigen Vorinkubation von Lymphozyten mit dem Präparat und bei der weiteren standardmäßigen Durchführung der Reaktion mit MAT mit doppeltem fluoreszentem Marker (Tabelle 12).

Tabelle 12

**Einwirkung niedriger Galavitkonzentrationen (2,5,10 µ/ml) auf die  
Veränderung der Expression der Marker der Lymphozyten von 3  
gesunden Blutspendern bei einer 3- bzw. 20-stündigen Vorinkubation  
mit dem Präparat**

Unterklassen Galavit-d. Lymphozyten, %	Kontrolle	Konzentration, µ/ml	
		2.5	10
<b>Vorinkubation von 3 St.</b>			
CD56+16+CD3-	9.3 ± 2.03	8.8 ± 1.68	10.7 ± 1.48
CD56+16+CD3+	3.2 ± 0.15	2.4 ± 0.64	2.8 ± 0.87
CD56+16+	12.5 ± 2.17	11.2 ± 1.37	13.5 ± 0.78
CD3+	68.1 ± 6.76	71.7 ± 3.08	72.9 ± 2.85
CD4+	53.3 ± 0.88	54.3 ± 0.88	53.7 ± 0.67
CD4+CD45RA	18.3 ± 0.86	19.0 ± 1.53	20.0 ± 2.00
<b>Vorinkubation von 20 St.</b>			
CD56+16+CD3-	6.0 ± 0.45	5.2 ± 2.10	6.0 ± 1.10
CD56+16+CD3+	2.0 ± 0.71	1.6±0.25	2.4 ± 0.60
CD56+16+	8.0 ± 1.43	6.9 ± 2.28	8.4 ± 1.00
CD3+	79.1 ± 3.40	81.8 ± 2.45	78.5 ± 3.55
CD4+	59.0 ± 2.65	—	61.4 ± 1.65
CD4+CD45RA	22.8 ± 3.00	-	17.2 ± 1.00

Es wird dargestellt, dass eine 3- bzw. 20-stündige Vorinkubation der Lymphozyten des Bluts von gesunden Blutspendern mit niedrigen Galavitkonzentrationen (2,5, 10 µ/ml) auf die Expression der untersuchten Marker der lymphoiden Zellen - der NK-Zellen (CD16CD56+CD3-), der zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD16+CD56+), der allgemeinen T-Zellen (CD3+), der T-Helper/Induktoren (CD4+) und der „naiven“ T-Helper (CD4+CD45RA+) - bei normalem Wert der Kennziffern keine wesentliche Einwirkung ausübt.

Es erscheint zweckmäßig, die Einwirkung des Galavits auf die Expression der Marker der lymphoiden Zellen bei zu niedrigen Kennziffern, darunter bei Krebskranken, einzuschätzen.

Im nächsten Abschnitt wurde die Einwirkung einer 20-stündigen Vorinkubation der lymphoiden Zellen von Lymphogranulomatose-Kranken mit verschiedenen Galavitkonzentrationen auf die Veränderung der Expression der oberflächlichen Marker der NK-Zellen, CD56+CD16+, der zytotoxischen T-Zellen, CD3+CD56+CD16+, und der frühen Vorläufer der Regulator-T-Zellen von „Double-Zellen“, CD4+CD8+, untersucht (Tabelle 13).

Tabelle 13

**Einwirkung verschiedener Galavitkonzentrationen auf die Veränderung der Expression der Marker der NK-Zellen, CD56+16+CD3-, der zytotoxischen T-Zellen, CD3+CD56+16+, der T-Suppressoren/zytotoxischen Zellen, CD8, und der T-Helfer, CD4+, bei Lymphogranulomatose-Kranken**

Galavit, µ/ml	CD3+CD56+	CD56+ CD16+(%)	CD3+(%)	CD4+(%)	CD8+(%)	CD4+ CD8(%)
	CD16+(%)					
<b>Kontrolle</b>	5.4 ± 2.0	9.9 ± 3.3	48.6 ± 1.7	23.2 ± 4.7	26.5 ± 6.7	3.2 ± 0.6
<b>2.5</b>	4.3 ± 2.0	7.4 ± 3.6	50.3 ± 1.7	22.9 ± 5.4	29.5 ± 6.2	6.3 ± 2.9
<b>10.0</b>	9.1 13.2	12.1 ± 3.3	47.1 ± 2.5	21.5 ± 4.4	28.0 ± 6.3	6.6 ± 2.4
<b>50.0</b>	5.0 ± 2.3	9.5 ± 2.9	41.0 ± 2.8	20.2 ± 5.8	26.4 ± 6.3	4.2 ± 1.8
<b>100.0</b>	9.2 ± 3.6	12.4 ± 4.8	46.8 ± 3.3	22.5 ± 4.1	27.2 ± 4.8	7.0 ± 2.1
<b>150.0</b>	5.2 ± 2.8	7.6 ± 3.6	42.1 ± 2.6	19.7 ± 4.6	23.4 ± 4.6	3.3 ± 1.7
<b>300.0</b>	5.9 ± 0.6	8.8 ± 1.4	46.7 ± 2.7	19.9 ± 4.3	25.0 ± 7.1	3.9 ± 1.4
<b>600.0</b>	2.7 ± 1.5	5.2 ± 2.6	44.6 ± 3.8	18.2 ± 4.3	24.4 ± 7.0	1.5 ± 0.6
<b>Zahl der Beobachtungen</b>			<b>4</b>			

Dargestellt ist das Fehlen wesentlicher Veränderungen in der Expression aller erforschten Marker im Bereich der Galavitkonzentrationen von 2,5 bis 300 µ/ml, ferner wird die deutliche Tendenz zur Senkung der Pegel der NK-Zellen, CD56+16+, der zytotoxischen T-Zellen, CD3+CD56+16+, und der frühen Vorläufer der Regulator-T-Zellen von „Double-Zellen“, CD4+CD8+, bei der Galavitkonzentration von 600 µ/ml festgestellt.

Wegen des geringen Untersuchungsumfangs tragen die Resultate vorläufigen Charakter; für genauere Schlüsse wäre es zweckmäßig, mehr analoges Forschungsgut zu sammeln.

### Schlussfolgerungen

1. Das Galavit hat in Konzentrationen von 0,1 - 75,0 µ/ml keine Einwirkung auf die Expression der Marker aller Typen der Killerzellen, CD3+CD56+16+, CD56+16+CD3- und CD56+16+, ausgeübt. Hohe Galavitkonzentrationen (150 - 600 µ/ml) senkten ihre Werte.
2. Eine 3- bzw. 20-stündige Vorinkubation der Lymphozyten des Bluts von gesunden Blutspendern mit geringen Galavitkonzentrationen (2,5, 10 µ/ml) hatte keine wesentliche Einwirkung auf die Expression der untersuchten Marker der lymphoiden Zellen bei Normalwerten: der NK-Zellen, CD16CD56+CD3-, der T-Killer, CD3+CD16+CD56+, der allgemeinen T-Zellen, CD3+, der T-Helfer, CD4+, und der „naiven“ T-Helfer (CD4+CD45RA+).
3. Bei einer 20-stündigen Vorinkubation der Lymphozyten des Bluts von Lymphogranulomatose-Kranken mit Galavitkonzentrationen von 2,5 bis 300,0 µ/ml wurde keine wesentliche Einwirkung auf die Expression aller erforschten Marker festgestellt. Bei der Galavitkonzentration von 600 µ/ml konnte eine deutliche Tendenz zur Senkung der Pegel der NK-Zellen, CD56+16+, der T-Killer, CD3+CD56+16+, und der frühen Vorläufer der Regulator-T-Zellen der „Double-Zellen“, CD4+CD8+, beobachtet werden.