

Natürliches Zeolith-Klinoptilolith: neues Mittel in der Antikrebs-Therapie

Prof. Dr. med. Kresimir Pavelic, Universität Zagreb

Abstrakt.

Natürliche Silikatmaterialien, einschließlich Zeolith-Klinoptilolith, weisen unterschiedliche biologische Aktivitäten auf und sind als Impfstoffmittel und bei der Behandlung von Diarrhoe erfolgreich eingesetzt worden. Wir stellen hiermit eine neue Anwendung des feingemahlene Klinoptilolith als potenzielles Mittel in der Antikrebs-Therapie vor. Die Behandlung von Mäusen und Hunden mit Klinoptilolith, die an einer Vielzahl von Tumoren erkrankt waren, führte zu einer Verbesserung des allgemeinen Gesundheitszustands, einer Verlängerung der Lebensdauer und einer Verminderung der Tumorgröße.

Die lokale Applikation von Klinoptilolith bei an Hautkrebs erkrankten Hunden verminderte die Tumorbildung und das Tumorwachstum überaus effektiv. Toxikologische Studien an Mäusen und Ratten haben darüber hinaus gezeigt, dass die Behandlung keine negativen Auswirkungen hat. In vitro-Gewebekulturen zeigten, dass das feingemahlene Klinoptilolith eine Proteinkinase B (c-Akt) verhindert, die Expression von p21WAF1/CIP1 und p27KIP1 Tumor-Suppressorproteinen stimuliert und das Zellwachstum bei verschiedenen Krebszelllinien blockiert.

Damit kann gefolgert werden, dass die Klinoptilolith-Behandlung das Krebswachstum beeinträchtigen könnte, in dem Überlebenssignale abgeschwächt und Tumor-Suppressorgene in behandelten Zellen angeregt werden.

Abkürzungen: EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor, FBS: Fetales Kälberserum, MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase, PDGF: Wachstumsfaktor aus Thrombozyten; SDS: Natriumdodezylsulfat.

Einführung

Zeolithen sind hydratisierte natürliche und synthetische mikroporöse Kristalle mit scharf konturierten Strukturen, die AlO_4 und SiO_4 Tetraeder enthalten und durch die üblichen Sauerstoffatome verbunden sind [1]. Zeolithen sind aufgrund ihrer Eigenschaften als Katalysatoren, Ionenaustauscher, Adsorptionsmittel und Detergens-Gerüststoffe zu fungieren, umfassend in verschiedenen industriellen Anwendungen verwendet worden [2, 3, 4, 5, 6]. Es ist ebenfalls bekannt, dass Silikate und Alumosilikate biologische Aktivitäten besitzen, die sich entweder positiv oder negativ auswirken. Talg und Silikate werden seit vielen Jahren bei der Hautpflege verwendet, während scharf konturierte Strukturen und katalytische Aktivitäten die Alumosilikate zu einem attraktiven Modellsystem für Protein- und Enzymangleichung werden lassen [7]. Jüngste Ergebnisse haben ebenfalls demonstriert, dass natürliches, biologisch nicht-toxisches Klinoptilolith aus Kuba als Glukoseabsorptionsmittel überaus effektiv ist; dies wird als potenzielle Medikation für Personen vorgeschlagen, die an Diabetes Mellitus leiden [8].

Die bekannteste positive biologische Aktivität von natürlichem Klinoptilolith ist seine Wirkung auf Diarrhoe-Erkrankungen (vgl. [9] und die darin enthaltenen Querverweise). Klinoptilolith verringert das Eintreten von Tod und Krankheit (Diarrhoe-Syndrom), die durch intestinale Krankheiten bei Schweinen, Ratten und Kälbern (vgl. [9] und die darin enthaltenen Querverweise) hervorgerufen werden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde eine

umfassende Studie über anti-diarrhoische Medikamente auf der Grundlage von natürlichem Klinoptilolith als aktives Material in der Therapie von akuten diarrhoischen Krankheiten bei Menschen durchgeführt [9]. Die Forschung führte zur Zulassung des antidiarrhoischen Medikaments Enterex für Menschen.

Zusätzlich haben sich Nachweise ergeben, dass Zeolithen eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Immunsystems einnehmen. Ueki et al. [10] und Aikoh et al. [10] haben aufgezeigt, dass Silika, Silikate und Alumosilikate als nichtspezifische Immunstimulatoren fungieren, ähnlich den Superantigenen. Superantigene sind eine Art von immunstimulierenden und krankheitserregenden Proteinen bakterieller und viraler Herkunft, die die Fähigkeit besitzen, relativ große Fraktionen (5-20%) von T-Zellen-Populationen zu aktivieren. Die Aktivierung erfordert die gleichzeitige Interaktion von Superantigenen mit V β -Bereich der T-Zellen-Rezeptoren und mit komplexen Molekülen der Klasse II, die über eine große Gewebeverträglichkeit verfügen, auf der Oberfläche der die Antigene darstellenden Zellen [10]. Pro-entzündliche Makrophagen, die zu den Antigen-darstellenden Zellen MHC der Klasse II gehören, werden durch bindegewebsfaserbildende Silikateilchen aktiviert [12, 13, 14 15]. Die Versuche von Ueki und seinen Mitarbeitern [10] haben tatsächlich gezeigt, dass die Beseitigung von positiven MHC-Klasse II DP/DR-Zellen zu einem Mangel an Makrophagenstimulation durch Asbest führt.

Die direkte Interaktion von Silikatpartikeln mit anderen Zellen als Lymphozyten ist ebenfalls festgestellt und beschrieben worden. Es scheint, dass die mineralischen Partikel Änderungen in der Genexpression auslösen können, in dem Signale in Bezug auf die Gentransaktivierung initiiert werden [16]. Die Exposition von Zellen an Silikateilchen ist gezeigt worden und führt zu einer Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), der Proteinkinase C und zu stressaktivierten Proteinkinasen [17].

Wichtige Transkriptionsfaktoren, wie das Protein 1 als Aktivator und der Nuklearfaktor κ B, werden ebenfalls aktiviert und die Expression von pro-entzündlichen Zytokinen (Interleukin 1 α , Interleukin 6 und der Tumornekrose-Faktor α) wird erweitert [18]. Veränderungen an der Rezeptorenaktivierungskinetik oder der Aktivität der Integrins können auch für das beobachtete Verhalten verantwortlich sein. Alternativ hat sich gezeigt, dass Partikel, die von Phagozyten umgeben sind, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies stimulieren [19]. Kürzlich zeigte sich, dass die Redox-Regulierung von Genexpression ein allgemeines Phänomen in den meisten Zellen ist.

Die o. g. Kenntnisse über Zeolithen und andere Silikate haben dazu geführt, die biologische Aktivität von natürlichem Klinoptilolith zu testen. Die mechanische Behandlung von natürlichem Klinoptilolith wurde angewandt, um kleine Partikel (MZ) zu erzeugen, die auf mögliche Toxizität und Antikrebs-Aktivität in vivo geprüft wurden. **Hier zeigt sich nachweislich, dass oral verabreichtes natürliches Klinoptilolith nicht toxisch ist und sich bei der Krebsbehandlung in Tierversuchen als sehr nützlich erwiesen hat.** Zusätzliche in vitro-Gewebekulturversuche mit verschiedenen Krebszelllinien zeigten, dass die MZ-Behandlung intrazelluläre Signalwege ändert, was zur Hemmung der überlebenden Signale und zur Induktion von Tumorsuppressorgenen führt.

Material und Methoden

Natürliches Klinoptilolith

Das feine Pulver von natürlichem Klinoptilolith wurde anhand von tribomechanischer Mikonisierung erworben. Die chemische Zusammensetzung von MZ wurde durch die Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Qualitative und quantitative Phasenanalysen von

MZ wurden anhand einer Röntgendiffraktometrieanalyse des Puders unter Anwendung eines Siemens 5000D-Diffraktometers mit CuK α -Strahlung im Bereich $2\theta = 4-80^\circ$ durchgeführt. Thermogravimetrische und differenzial-thermogravimetrische Analysen von MZ/ wurden mit einer TA 4000 Systemanlage (Mettler-Toledo) ausgeführt. Die Aufheizgeschwindigkeit betrug 10 K/min in stickstoffhaltiger Atmosphäre. Die teilchengroßen Verteilungskurven der MZ wurden von einem Mastersize XLB (Malvern) teilchengroßen Laser-Lichtstreuungsanalysegerät aufgenommen.

Zelllinien und Proliferationsversuch

Die Wirkung von MZ auf eine in vitro Zellproliferation wurde bei verschiedenen menschlichen Zelllinien untersucht: diploide Fibroblasten (Hef522), Zervixkarzinom (HeLa), Dickdarmkarzinom (CaCo-2, Ht-29 und SW 620), Mammakarzinom (MCF-7 und SkBr-3) und der Fibrosarkom-Zelllinie einer Maus. Die Zellen wurden mit einem modifizierten Eagle-Mittel von Dulbecco unter Hinzufügung von 10% fetalem Kälberserum (FBS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37° C kultiviert. Im Sinne der Proliferationsversuche wurden die Zellen bei einer Konzentration von 1×10^4 Zellen/ml auf 96-Mikrowellenplatten (200 μ /Gestell) gesetzt. Nach dem Ansetzen über Nacht wurde das Standardmittel durch das Mittel ersetzt, das mit entweder 0,5, 5 oder 50 Mg/ml MZ vorbehandelt war. Für diesen Zweck wurden das Mittel und MZ gemischt und nach 18 Stunden Mischvorgang wurde MZ durch Zentrifugieren (5000 g 10 Minuten lang) pelletiert.

Die Zellen wurden dann für weitere 72 Stunden inkubiert, als die Lebensfähigkeit der Zellen (Zellwachstum) unter Anwendung eines MTT-Versuchs gemessen wurde, der Dehydrogenase-Aktivität in lebensfähigen Zellen aufspürt. Zu diesem Zweck wurde auf das Mittel verzichtet; auf jede Platte wurde jetzt MTT bei einer Konzentration von 20 μ g/40 μ l hinzugefügt. Nach vier Stunden Inkubation bei 37° C waren die Ausfällungssedimente in 160 μ l DMSO aufgelöst. Die Absorption wurde auf einem enzymverbundenen Immunsorptionsmittel-Anzeigegerät bei 570 nm gemessen. Die Zellproliferation wird als Absorptionsprozentsatz ausgedrückt, der in der mit einer bestimmten MZ-Konzentration behandelten Zelllinie aufgenommen wird, in Bezug auf die Absorptionskontrolle nicht behandelte Zellen, die mit 100% ausgedrückt wurde.

Analyse von p21WAF1/CIP1 und p27KIP1

Versuche mit p21WAF1/CIP1 und p27KIP1 wurden an menschlichen Drüsengewebs- (CaCo-2) und menschlichen Zervixkarzinom-Zelllinien (HeLa) durchgeführt. Die Zellen, die ursprünglich in Gewebekulturkolben gezogen wurden, wurden gesammelt und auf Glasplättchen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Mittel entweder durch ein frisches Standardmittel (kontrollierte Zellen) oder das Mittel ersetzt, das mit 50mg/ml MZ vorbehandelt worden war. Nach 72 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit PBS gereinigt und in Methanol mit 3% Wasserstoffperoxid gelegt (Kemika, Zagreb, Kroatien).

Die Proteinexpression, p21WAF1/CIP1 und p27KIP1, wurde immunzytochemisch analysiert. Die nichtspezifische Bindung wurde durch Anwendung eines normalen Hasenserums (1:10) für die Dauer von 30 Minuten blockiert. Primärantikörper p21 (5 μ g/ml, PharMingen) und p27 (2 μ g/ml, Transduction Laboratories) konnten sich über Nacht bei 4° C binden. Die Plättchen wurden dreimal in PBS gereinigt. Sekundärantikörper (Hasen-Antimaus; Dako, Dänemark) wurden eine Stunde lang bei Raumtemperatur angewandt. Schließlich löste sich die Peroxidase-Antiperoxidase-Bindung 1:100 in PBS und wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur angewandt. Nach Reinigung mit PBS wurden die Plättchen mit 0,025% Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (Sigma) sieben Minuten lang gefärbt, das 4% H₂O₂

enthielt und dann mit Hematoxylin für 30 Sekunden erneut gefärbt. Die Plättchen wurden mit einem Lichtmikroskop (Olympus) untersucht. Der Grad an nichtspezifischen Färbungen wurde für jede Messung festgestellt, unter Verwendung von kontrollierten Zellen, die auf die gleiche Art erzeugt wurden, jedoch den Primärantikörpern nicht ausgesetzt waren.

Die Konzentration des Antigens wurde bewertet, in dem die relative visuelle Intensität eines farbstoffbildenden Etiketts festgestellt wurde; die Ergebnisse werden auf einer Drei-Punkte-Tabelle dargestellt: -, negative Färbungen; +, schwache Färbungen; und ++, moderate Färbungen.

Biochemische Studien von Signalwegen

Die folgenden wurden angewendet: epidermaler Wachstumsfaktor (EGF; Intergen), Wachstumsfaktor durch Thrombozyten (PDGF) BB (Amgen), Proteinleiter-Eckwerte (10-200 kDa; Life Technologies), Leupeptin und Miniprotease-Inhibitorsatz (Boehringer-Mannheim), Prefabloc (Fluka), Aprotinin (Trasylol, Bayer) und Nitrozellulose-Membran (Millipore). Affinität purifizierende Hasen-Polyclonal anti-Akt, anti-p-Akt, anti-JNK, anti-pJNK und anti-pERK2 (MAPK) Antigene wurden von den Biolaboratorien in New England erworben. Die Hasen-Polyclonal anti-ERK2 (C-14) Antikörper stammten von Santa Cruz Biotechnology. Sekundärantikörper, peroxid-konjugierte Schwein-Antihasen Antikörper kamen von den Biolaboratorien in New England, das peroxid-konjugierte Schaf-Antimaus-Immunoglobulin kam von Amersham/Pharmacia und das peroxid-konjugierte Protein A stammte von Kirkegaard and Perry Laboratories.

Ratten-Fibrosarkomzellen wurden in Petri-Schalen (6 cm Durchmesser) im RPMI-Medium mit 10%iger FBS bis zu 80% Konfluenz produziert. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen 24 Stunden nicht gefüttert. Nachfolgend wurden die Zellen mit einem MZ-vorbehandelten Mittel mit oder ohne 10% FBS für eine Dauer von 0, 5, 30 oder 60 Minuten oder mit EGF (100µg/ml) und PDGF (40µg/ml) behandelt. Nach dem vorgegebenen Behandlungszeitraum wurden die Zellen mit PBS gereinigt und auf den eiskalten Lysispuffer plaziert, der 50mM Hydroxyethylpiperazin-Ethan-Sulfonsäure, pH 7,2, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 20mM NaF, 2 mM Natriumorthovanadat, 1% (w/v) Triton X-100, 10% (w/v) Glycerin und Protease-Hemmer (1 mM Pefabloc, 10µg/ml Leupeptin und 1% Trasylol) enthielt. Nach 45 Minuten, bei 4°C, durch leichtes Schütteln wurde eine lösliche Fraktion durch Zentrifugieren bei 4°C und für eine Dauer von 15 Minuten bei 13.000 g hergestellt. Gleiche Mengen der Zelllysate (gemessen anhand des Bradford-Versuchs) wurden mit 3 X Natriumdodezylsulfat (SDS) Musterpuffer gemischt und 2 Minuten lang bei 98° C erhitzt. Die Proteine wurden mit einer SDS Polyacrylamidgel-Elektrophorese getrennt und auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen. Immunblots wurden mit 5% Kälberserumalbumin in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl) für die Dauer von einer Stunde blockiert, für die Dauer von einer Stunde mit Primärantikörpern in TBS inkubiert (anti-pAkt, anti-pJNK, anti-pERK2), sechs Mal zehn Minuten lang jeweils in TBS 0,05% Triton X-100 gereinigt und dann für eine Stunde mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Nach weiteren Reinigungen wurden die Immunblots durch Verwendung verbesserter Chemilumineszenz-Reagenzien sichtbar. Zur erneuten Untersuchung der Blots wurden diese in Desorptionspuffern (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7; 2% SDS; 100 mM 2-Mercaptoethanol) bei 58° C 25 Minuten lang inkubiert, umfassend mit TBS gereinigt, erneut blockiert (vgl. oben) und dann mit den entsprechenden Antikörpern erneut geblottet.

Isolierung der apoptotischen DNA-Fragmente

HeLa-Zellen (1 x 10⁵) wurden in einem 10ml großen Kolben für die Dauer von 24 Stunden gezogen, danach wurde das Mittel entfernt und durch ein MZ-vorbehandeltes Mittel (vgl.oben) ersetzt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen trypsinisiert, durch Zentrifugieren (1200 g) pelletiert und zweimal in PBS gereinigt. Danach wurden die Zellen 10 Sekunden lang erneut in 100 µl Lysispuffer (1% NP-40 in 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) aufgeschwemmt und fünf Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde in ein neues Eppendorf-Rohr übertragen, während das Pellet nochmals mit 100 µl Lysispuffer inkubiert und wie zuvor zentrifugiert wurde. Die überstehenden Flüssigkeiten wurden zusammengetragen und zwei Stunden in 1% SDS und Rnase (5µg/µl) bei 56°C inkubiert, wonach die Proteinases K der endgültigen Konzentration von 2,5 µg/µl übernacht hinzugefügt wurde. DNA-Fragmente wurden unter Zusatz von 1/2 Volumen von 10 M Ammoniumazetat und 2,5 Volumen von vorgekühltem reinem Ethanol pelletiert. Nach dem Zentrifugieren (30 Minuten, 12.000 g) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gereinigt, zehn Minuten lang bei 12.000 g zentrifugiert, getrocknet und in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8) aufgelöst. Die DNA wurde auf 1,5% Agarosegel sichtbar gemacht.

Tiere

Mäuse

Es wurden CBA/HZgr und C57BL/6-Mäuse beider Geschlechter verwendet. Die toxischen Versuche wurden am CBA/HZgr-Züchtungsstamm vorgenommen, während die Versuche mit Tumoren an beiden Züchtungsstämmen durchgeführt wurden. Für nichtklinische Toleranzteststudien wurden männliche Mäuse des BALB/c-Stammes verwendet. Zu Beginn der Versuche waren die Tiere ca. vier Monate alt und wogen zwischen 25 und 28 g. Bis zu Beginn der Versuche wurden die Mäuse unter Standardbedingungen mit unbeschränktem Zugang zu Futter und Wasser gehalten.

Ratten

Sowohl männliche als auch weibliche Wistar-Ratten aus der Tierzuchtcolonie des Institute for Medical Research, Zagreb, Kroatien, wurden für die toxischen und nichtklinischen Toleranztestreihen verwendet. Zu Beginn der Versuche waren die Ratten 2-3 Monate alt, die Männchen wogen durchschnittlich 300 g, die Weibchen 200 g.

Hunde

22 Hunde wurden für die Versuche verwendet. Es waren unterschiedliche Rassen, Weibchen und Rüden dabei, die zwischen 3 und 42 kg wogen und zwischen 5 und 14 Jahre alt waren. Die Daten über die 14 Hunde, bei welchen eine Krankheitsverbesserung eintrat, werden in Tabelle 2 dargestellt.

Applikation von mechanisch behandeltem natürlichem Klinoptilolith

Aufgrund der Nichtlöslichkeit der getesteten Substanz wurde es den Tieren entweder oral oder in ihrem Futter (bei den Mäusen und Ratten) ergänzend als Pulver zum normalen Futter gegeben oder in Kapseln (Hunde), die unter das Futter gemischt wurden. Beim Test des Wachstums des mammaryären aplastischen Karzinoms oder mammaryären aplastischer Karzinometastasenbildungen wurden MZ und normales Futter für die Labormäuse (Pliva, Zagreb, Kroatien) im Verhältnis von 20%:80% gemischt. Jede Maus fraß durchschnittlich ca. 4 g täglich und konsumierte ca. 800 g MZ. Beim Test des Wachstums der Pigmentzellentumore wurde MZ den Mäusen oral (per Sonde) in Dosierungen von 20, 30 und 40 mg/Maus fünf Mal pro Tag verabreicht (die getesteten Dosierungen entsprachen 100, 150 und 200 mg/Maus). In den toxischen Studien wurde MZ mit üblichem Futter gemischt.

Tumore

Mammakarzinome traten spontan bei den CBA/HZgr-Mäusen auf, die in der Tierzucht-Abteilung der Abteilung für Molekularmedizin, Ruder Boskovic Institute, Zagreb, Kroatien, gehalten wurden. Der Tumor ist ein höchst aplastisches Karzinom mit einer hohen Häufigkeit von Mitosen; er bildet keine glandulären Strukturen und führt zu spontanen Metastasen in den Lungen. Nach der Transplantation von 1×10^6 lebenden Tumorzellen in die Tiere entwickelt sich ein wachsender Tumor, der den Tod der Maus nach vier Wochen verursacht. Im Sinne des Experiments wurde die Tumorzellsuspension stets von einem in vivo wachsenden Tumor vorbereitet.

Melanoma B16, ursprünglich aus dem Holt Radium Institute, Manchester, GB, stammend, ist im Ruder Boskovic Institut seit 1975 erhalten und durch subkutane Inokulation einer Suspension, die 2×10^6 Tumorzellen enthält, den C57BL/6-Mäusen in die Flanken verabreicht worden.

Spontane Tumore bei Hunden waren von unterschiedlicher Herkunft, Größe und Stellen. Die Daten über 14 Tumore werden in Tabelle 2 aufgeführt. Bei weiteren 8 nicht in der Tabelle 2 dargestellten Tumoren handelte es sich um zwei Lymphome, zwei autoimmune hämolytische Anämien und jeweils einen Prostata-Tumor, ein Osteosarkom, ein mammäres Fibrochondroadenokarzinom und eine Epulis.

Um Tumorzellen in Suspension zu erhalten, wurden den Mäusen große Teile des Tumors entnommen und in kleine Teile aufgeschnitten (Hank Lösung). Den Partikeln wurde Zeit zum Setzen gegeben und die überstehende Flüssigkeit (Zellsuspension) wurde entfernt und bei $150 \text{ g } 10$ Minuten lang zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut aufgeschwemmt und die Lebensfähigkeit der Zellen wurde anhand eines Trypan-Blau-Ausschlusstests untersucht: mehr als 90% der Tumorzellen waren lebensfähig. Um einen lokal wachsenden Tumor zu erhalten, wurde ein Impfmateriale von $0,1 \text{ ml}$ (1×10^6 enthaltende lebensfähige Tumorzellen) subkutan in den rechten Oberschenkel der Empfängermaus injiziert. Das Tumorstadium wurde täglich nach der Tumorzellen-Inokulation in die Maus überprüft. Als der Tumor nachgewiesen werden konnte, wurde seine Größe gemessen. Drei Durchmesser wurden festgestellt und das Tumorstadium wurde ebenfalls berechnet. Um experimentelle Lungenmetastasen zu erhalten, wurden der Maus $0,25 \text{ ml}$ in ihre Schwanzvene gespritzt, die 1×10^5 mammäre aplastische Karzinomzellen enthielten. Die Mäuse wurden 18 Tage später getötet. Die Lungen wurden entnommen, in Wasser gereinigt, in Lappchen getrennt und in ein Fixierungsmittel getaucht. Makroskopisch sichtbare Knötchen auf der Lungenoberfläche wurden gezählt.

Toxikologische Studien

Vorklinische toxikologische Untersuchungen wurden nach den Standards und Vorschriften der Organisation für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Prinzipien der Lebensmittellaborpraktik (Paris 1998), durchgeführt. Die Testreihe hatte zum Ziel, einen „Grenz“-Test festzulegen, unter Applikation von hohen MZ-Dosierungen, 2×200 und $2 \times 500 \text{ mg/Maus}$ täglich oral (per Sonde) für die Dauer von 6, 14 und 30 Tagen. Da MZ nicht den Tod der Mäuse in einem „Grenz“-Test verursachte, wurde ein Test mit unterschiedlichen Dosierungen bei den Mäusen vorgenommen; die täglichen Dosierungen lagen im Bereich von 60 bis 400 mg/Maus (MZ wurde oral per Sonde für die Dauer von 30 Tagen verabreicht). Wieder waren keine toxischen Anzeichen zu verzeichnen. Daher wurde ein klassischer

akuter, subchronischer und chronischer toxischer Versuch mit Mäusen und Ratten jeweils beider Geschlechter durchgeführt.

Mäuse

Die Mäuse entstammten dem CBA/HZgr-Züchtungsstamm. MZ wurde in pulverisierter Form mit Standardfutter im Verhältnis von 25:75% gemischt. Die Dauer der Studie betrug wie folgt: akute Toxizität, 1 Monat; subchronische Toxizität, bis zu drei Monaten; chronische Toxizität, bis zu sechs Monaten. Die Tiere wurde auf folgendes überwacht: Phänotypveränderungen, Verhaltensveränderungen und Überlebensdauer (täglich), Körpergewichtsveränderungen (wöchentlich), Menge an verbrauchtem Wasser und Futter (die Überprüfung erfolgte am 14. und 28. Tag, als die Mäuse 24 Stunden lang in metabolischen Käfigen gehalten wurden, fünf Mäuse pro Käfig), Veränderungen in den hämatologischen, klinischen, chemischen Serumparametern (Erythrozyten, Leukozythen, Thrombozythen, Hämatokriten, Hämoglobin, Glukose, alkalische Phosphatase, Aspartataminotransferase, Alaninaminotransferase, Bilirubin, anorganisches Phosphor und Kalzium; nach 1, 3 und 6 Monaten); die klinisch-chemischen Urinparameter (Glukose, Proteine, Urobilinogen, Bilirubin, Nitrite, Erythrozythen, Leukozythen, pH-Werte und besondere Gravität; der Urin wurde gesammelt, während die Mäuse einmal pro Monat 24 Stunden lang in metabolischen Käfigen gehalten wurden). Pathohistologische Analysen von Leber, Milz, Nieren, Gehirn, Lungen, Hoden, Eierstöcken, Zwölffingerdarm, Augen, Magen, Dick- und Dünndarm, Muskeln, Herzmuskeln, Bauchspeicheldrüse, inneren Brustdrüsen- und Achsellymphknoten wurden an einer getöteten Versuchsmaus und einer kontrollierten Maus vorgenommen.

Ratten

Es wurden Wistar-Ratten verwendet. MZ wurde mit Standardfutter im Verhältnis von 25:75% und 50:50% gemischt. Die Dauer der Studie betrug wie folgt: akute Toxizität, 1 Monat; subchronische Toxizität, drei Monate; chronische Toxizität, 12 Monate. Die Tiere wurde auf folgendes überwacht: Phänotypveränderungen, Verhaltensveränderungen und Überlebensdauer (täglich), Körpergewichtsveränderungen (viertägig), Futtermenge (täglich) und Wassermenge (viertägig) und auf Veränderungen in den hämatologischen, klinischen, chemischen Serumparametern (vgl. die Untersuchungen bei Mäusen; einmal pro Monat). Pathohistologische Analysen von Leber, Milz, Nieren, Gehirn, Lungen, Hoden, Eierstöcken, wurden nach 1, 6 und 12 Monaten an einer getöteten Versuchsratte und einer kontrollierten Ratte vorgenommen.

Die reproduktive/entwicklungsbedingte Toxizität wurde bei Mäusen (CBA/HZgr) aufgrund ihrer kurzen Verdauung und der großen Ausscheidungsmenge untersucht. MZ wurde in pulverisierter Form mit Standardfutter im Verhältnis von 25:75% gemischt und verabreicht. Für die reproduktive Toxizitätsstudie wurden zehn männliche und zehn weibliche Mäuse 50 Tage lang bzw. mindestens 14 Tage lang mit MZ enthaltendem Futter gefüttert, das heißt, vor der Paarung. Die Behandlung dauerte während des Zeitraums vor der Trächtigkeit, während des Trächtigkeitzeitraums (ein Zyklus) und bis Ende des Säugens an. Das gleiche Tierpaar wurde mit MZ gefüttert und während vier aufeinanderfolgende Zyklen (ca. 4-5 Monate) beobachtet. Der gleiche Plan wurde bei den kontrollierten nicht behandelten Tieren angewendet. Die Elterngeneration wurde für die Dauer eines Zyklus überwacht (Zeitraum vor der Trächtigkeit, Trächtigkeitzeitraum) in Bezug auf Fruchtbarkeit (Bestehen oder Nichtbestehen von Ausscheidungen im bestimmten Zyklus), Geburtsergebnisse, Sterblichkeit und pathohistologische Erscheinungen der Eierstöcke nach dem 4. Zyklus. Die Anzahl der gesamten und lebensfähigen geborenen Tiere sowie der Körpergewichtszuwachs der Jungtiere und die Jungtiersterblichkeit bis zum Ende des Säugens wurden ebenfalls aufgenommen.

Für die Missbildungsstudien wurden gesunde, unbehandelte, trächtige Mäuse mit MZ gefüttert, das dem Standardfutter ab dem 6. Tag bis zum 16. Tag der Trächtigkeit zugemischt wurde; die Mäuse wurden einen 1 Tag vor der Geburt getötet. Die Föten wurden mikroskopisch-pathologisch untersucht.

Die lokale Toleranz wurde bewertet, um sicherzustellen, ob die Testsubstanz an den Körperstellen im Körper toleriert wurde, die gegebenenfalls mit dem Produkt als Folge seiner Verabreichung in Kontakt kommen.

Wiederholte Dosierungstests auf der Haut zwecks Toleranz wurden bei männlichen Wistar-Ratten und männlichen BALB/c-Mäusen durchgeführt. MZ wurde auf die rasierte Hautstelle des gesamten Rückenbereichs der Tiere auf drei Arten appliziert: (a) als ursprüngliches Puder, (b) gemischt mit neutraler Creme im Verhältnis von 1:1, (c) gemischt mit Paraffinöl im Verhältnis von 1:1. Die Tiere wurden im Verlauf von 28 Tagen zwei Mal täglich behandelt. Makroskopische Veränderungen an der behandelten Hautstelle wurden täglich untersucht. Die ausgelassenen Stellen am Rücken der Tiere wurden als Kontrolle genutzt. Für die mikroskopische Analyse der möglichen Veränderungen wurden die Hautproben einen 1 Tag nach der letzten Behandlung gesammelt. [...]

Analyse der intrazellulären Signalpfade in MZ-behandelten Zellen

Da frühere Studien dargestellt haben, dass Silikatpartikeln ausgesetzte Zellen eine Aktivierung von MAPK, Proteinkinase C und stress-aktivierter Proteinkinasen/JNK [17] zur Folge haben, haben wir weiterhin untersucht, ob die MZ-Behandlung auch mitogenetische und Überlebens-Signalpfade in diesen Zellmodellen berühren.

Die wichtigsten Ergebnisse wurden bei der Messung der Aktivität des Akt-Proteins erzielt. Akt, oder Proteinkinase B, ist kürzlich dargestellt worden, um Überlebenssignale nach der Phosphoinositid-3-Kinase durch Phosphorylierung von Bad-Proteinen . Wir haben eine Erhöhung in der Akt-Phosphorylierung als Reaktion auf das Serum, EGF oder die Insulinbehandlung festgestellt. Die Zugabe des MZ vorbehandelten Mittels, das 10% FBS enthält, zu den Zellen, verminderte die Akt-Phosphorylierung im Vergleich zu den Zellen, die nur mit dem das Mittel enthaltende Serum erhielten, während die Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF und PDGF die Aktivität wiederherstellten (Abb. 3A) und den Wirkungen von MZ auf das Zellwachstum widerstanden. Die Bestimmung der Aktivität von Akt zu verschiedenen Zeiten nach Zugabe des MZ-vorbehandelten Mittels mit 10% FBS zeigte nach fünf Minuten eine geringe Verminderung des pAkt-Stands. Diese Verminderung wurde nach 30 und 60 Minuten Behandlungszeit (Abb. 3B) umso deutlicher. Die Zugabe von MZ-vorbehandelten Mitteln ohne Serum zu den Zellen erhöhte die Aktivität von Akt jedoch nur im Vergleich zu den Zellen, die kein Serum erhielten. Die Behandlung der Zellen mit EGF übernacht erhöhte ebenfalls die Akt-Aktivität. Eine kombinierte Behandlung der Zellen mit EGF und einem MZ-vorbehandelten Mittel übernacht verminderte die Akt-Aktivität und zeigte, dass die Inhibition von Akt gegebenenfalls mit der MZ-Inhibition von EGF-ausgelösten Pfaden in Verbindung gebracht werden kann. [...]

Induktion von programmierter Zelltod-Apoptose

Um zu bewerten, ob durch MZ verursachtes gehemmtes Zellwachstum aufgrund eines programmierten Zelltods eintritt, d. h. Apoptose, wurde der Versuch durchgeführt, kleine DNA-Fragmente zu isolieren. Eine große Menge an kleinen (abgebauten) DNA-Fragmenten

in der DNA zu isolieren würde bedeuten, dass MZ einen programmierten Zelltod in behandelten Zellen verursacht. Das Ergebnis einer kleinen DNA-Fragment-Isolation von den HeLa-Zellen ist in Abb. 5 aufgeführt. Die von MZ-behandelten Zellen isolierte DNA (Line 3a, Menge an geringfügig molekularer abgebauter DNA, ist mit Pfeil gekennzeichnet) stellte einen wesentlichen Abbau im Vergleich zur DNA aus unbehandelten Zellen dar (Linie 2). Der DNA-Abbau in MZ-behandelten Zellen erfolgt sehr wahrscheinlich aufgrund des induzierten programmierten Zelltods (Apoptosis). [...]

Toxikologie

Die orale Zuführung von MZ bei Mäusen und Ratten für eine Dauer von 6 und 12 Monaten verursachte keine Veränderungen, die als toxische Wirkung der Behandlung betrachtet werden könnten. MZ regulierte und verkürzte den Vorträchtigkeitszeitraum. Die Anzahl der Jungtiere pro Geburt wurde bei MZ-behandelten Mäusen erhöht. Aus diesem Grund besteht wohl auch die Gewichtszunahme der Jungtiere bis zum Ende des Säugens. Als Schlussfolgerung wurde eine höhere Sterblichkeit der Jungtiere zwischen dem 8. und dem 21. Tag der neonatalen Phase beobachtet. Es bestehen jedoch keine Unterschiede zwischen den kontrollierten und den behandelten Tieren, die der Verabreichung von MZ eine reproduktive Toxizität zuschreiben würden. MZ hat die Toxizität während des Zeitraums der Organogenese nicht verursacht. Die Testsubstanz, MZ, war für die Haut weder toxisch noch hat sie allergische Reaktionen hervorgerufen.

Wirkung von MZ auf Tumorwachstum bei Tieren

Frühere Studien an kultivierten Zellen haben gezeigt, dass MZ das Wachstum von Krebszellen in vitro hemmt. Um die Wirkung von MZ zu untersuchen, wurden in vivo-Studien bei Mäusen, Ratten und Hunden durchgeführt. Nachfolgende Studien wurden an transplantierbaren Rattentumoren, Melanoma B16, und an Mammakarzinomen vorgenommen. Mammäre aplastische Karzinomzellen wurden in den rechten Oberschenkel von Mäusen injiziert, die in zwei Gruppen unterteilt wurden. Einer Gruppe (n=14) wurde MZ zum normalen Futter gegeben; das Futter wurde ab dem 15. Tag vor der Tumortransplantation bis zum Tod des Tieres gegeben. Der anderen Gruppe (n=14) wurde MZ ab dem Tag der Tumortransplantation bis zum Tod des Tieres gegeben. Eine Gruppe von fünf tumortragenden Mäusen erhielt Standardfutter und diente als Kontrollgruppe. Das Tumorwachstum wurde in beiden Gruppen erheblich gehemmt, die mit MZ-ergänzten Futter gefüttert wurden (Abb. 6). Die Tumorwachstumskurve für die einzelnen Tiere verlief einheitlich, insbesondere in dem Fall, in dem MZ vor der Transplantation des Tumors gegeben wurde. Es gab jedoch keinen Unterschied in Bezug auf das Überleben der Mäuse beider Gruppen. [...]

Melanoma B-16-Zellen wurden am Tag 0 subkutan in C57BL-Mäuse injiziert. Die folgenden 30 Tage erhielten die Mäuse MZ fünf Mal pro Tag oral. Das Tumolvolumen wurde aufgezeichnet; es war bei 5 von 80 Mäusen (tägliche Dosis von 150mg/Maus) erheblich niedriger als bei den Mäusen der Kontrollgruppe (Abb. 7A). Trotz der Tatsache, dass die Tumore nach Absetzen der MZ-Therapie rascher wuchsen (zwischen den Tagen 30 und 60 nach der Tumortransplantation), lebten die Mäuse statistisch sehr viel länger, als sie mit 200 und 150 mg MZ gefüttert wurden, als die kontrollierten Mäuse (Abb. 7B). Den für den Versuch mit mammärer aplastischer Lungenkarzinommetastasenbildung verwendeten Mäusen wurde MZ ab dem 15. Tag vor der Tumorzelleninjektion bis zum Versuchsende gegeben, d. h. 18 Tage nach der Tumortransplantation. Die Kontrollmäuse erhielten Standardfutter. Jede dieser beiden Gruppen umfasste 20 Tiere. Ca. 20-40 Knötchen pro Tier

wurden verzeichnet, aber es bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen (Daten sind nicht dargestellt). [...]

Von 22 Hunden, die an verschiedenen Arten spontaner Tumore erkrankt waren und mit MZ behandelt wurden, reagierten 14 auf die Therapie, d.h. der Tumor verschwand insgesamt oder die TumorgroÙe verminderte sich stark (vgl. Tabelle 2). Von drei Hunden mit Prostata tumor gab es einen, der nach der Sonographie eine Prostatazyste hatte (zusätzlich zum Prostata tumor (Fall 3). Der Hund war überaus ruhig, hatte keinen Appetit und bewegte sich kaum. Als die normale Therapie keine Wirkung zeigte, begann man mit der MZ-Therapie. Nach nur zwei Behandlungstagen wurde der Hund aktiv; am dritten Tag fraÙ er normal und am vierten Tag urinierte er normal (blutfreier Urin). Am 10. Tag hatte sich die GröÙe der Zyste und des Tumors verkleinert und nach einem Monat waren beide komplett verschwunden. Obwohl die Prostata nur unwesentlich kleiner wurde, zeigte der Hund keine Krankheitsanzeichen. An dieser Stelle ist es interessant festzustellen, dass die sehr hohen Serumwerte vor der Therapie für die Aspartataminotransferase (497 µmol/l) und die Alaninaminotransferase (433 µmol/l) nach einem Monat der MZ-Therapie auf normale Werte sanken (16 und 43 µmol/l) und für die Dauer des gesamten Beobachtungszeitraums (5 Monate) im normalen Bereich blieben.
(...)

Ein anderer Hund (Fall 2) hatte zusätzlich zu einem Prostata tumor einen Hodentumor. Dieser Hoden war ca. 20 cm im Durchmesser, als die MZ-Therapie begann. Nach einem Monat Therapie wurde die HodengröÙe um ein Drittel reduziert. Nach zwei Monaten Therapie wurde die HodengröÙe um die Hälfte reduziert und nach drei Monaten auf ein Drittel der GröÙe, die der Hoden vor der Behandlung hatte. [...]

Beim dritten Hund (Fall 1) wurde ein Prostataadenokarzinom diagnostiziert; dieser Hund kam in einem sehr schlechten Zustand in die Klinik. Er hatte große Schwierigkeiten beim Urinieren. Nach einem Monat klassischer Therapie wurde keine Verbesserung festgestellt. Dem Hund wurde ein Katheder eingesetzt. Die Therapie wurde für weitere 2 Wochen aufrechterhalten, schlug aber nicht an. Der Hund lag im Sterben und die Besitzer baten um Einschläferung. Die klassische Therapie wurde dann durch die MZ-Therapie ersetzt (3x200 mg/Tag). Nach einer Woche wurde eine allgemeine Verbesserung verzeichnet und der Katheder wurde entfernt. Nach 14 Tagen Therapie waren keine Anzeichen der Krankheit mehr sichtbar. Die Therapie dauerte weitere 14 Tage an; der Gesundheitszustand verbesserte sich täglich. Dann entschieden sich die Besitzer für eine Kastration (in den meisten Fällen werden die Prostataprobleme durch Kastration gelöst) und die MZ-Therapie wurde eingestellt. Acht Monate später lebte der Hund weiterhin und hatte keine größeren Gesundheitsprobleme.

Drei Hunde litten an Hauttumoren. Einer von ihnen (Fall 11) hatte drei Läsionen auf der Haut oberhalb des Schwanzes. Zwei wurden entfernt und das dritte, kleinste, wurde nicht entfernt. Histologisch wurde der Tumor als flachzelliges Karzinom diagnostiziert. Nach 1 Monat Therapie mit MZ verkleinerte sich der kirschgroÙe Tumor auf ein Drittel seiner GröÙe. Während der folgenden fünf Wochen verschwand die Läsion insgesamt. Der Hund ist noch immer (7 Monate später) in Behandlung. Der gegenwärtig 11 Jahre alte Hund ist sehr lebhaft und in ungewöhnlich guter Verfassung.

Ein anderer Hund (Fall 10) litt an einem Adenokarzinom auf der Haut des Schwanzes, das operativ entfernt wurde. Zwei Wochen nach dem Eingriff verheilte die Wunde jedoch nicht

und eine Amputation wurde in Erwägung gezogen. Der Hund erhielt MZ in Kapselform sowie pulverisiertes MZ direkt auf die Wunde. Die Wunde verheilte innerhalb von einer Woche.

Der dritte Hund (Fall 12) hatte ein Wachstum auf seiner Zunge von ca. 2 cm Durchmesser. Histologisch handelte es sich um ein flachzelliges Karzinom. Nach operativer Entfernung des Tumors heilte die Wunde nicht. Der Hund erhielt oral MZ-Kapseln und pulverisiertes MZ durch lokale Applikation. Fünf Tage später war die Wunde nicht mehr sichtbar.

Ein fünf Jahre alter Hund (Fall 13), bei dem eine vergrößerte linke Speicheldrüse (walnussgroßer Knoten) diagnostiziert wurde, wurde mit der konventionellen Therapie vier Monate lang ohne Erfolg behandelt. Während dieser Zeit wurde die Speicheldrüse immer größer und der Hund hatte ernsthafte Probleme mit Schlucken und Speichelfluss. Nach nur einer Woche MZ-Therapie wurde der Knoten weicher und verkleinerte sich um ein Drittel. Nach einer weiteren Woche verschwand der Knoten insgesamt und lediglich die Kapsel war zu ertasten. [...]

In einem Fall (Fall 14, Lungenkrebs) verschwanden die Tumoranzeichen innerhalb von 14 MZ-Behandlungstagen insgesamt.

Zusätzlich zu den Wirkungen von MZ auf die Primärerkrankung reagierten alle Hunde, auch die, bei welchen die Primärerkrankung nicht geheilt wurde, auf die MZ-Therapie in nur 7 Tagen; der allgemeine Zustand und die Verbesserungen im Verhalten hielten auch nach Abbruch der Therapie an. Das Gleiche wurde bei einigen hämatologischen und serumklinischen Parametern beobachtet, die vor und nach der Therapie gemessen wurden. Hämokrit ging in Fall 1 in den normalen Bereich zurück. Überaus hohe Serum-Bilirubin-Werte fielen auf den normalen Bereich in den Fällen 3 und 14, während die Serum-Urea-Konzentrationsveränderung in den Fällen 11 und 13 beobachtet wurde. Die wesentlichste Verbesserung wurde in Bezug auf die Aspartataminotransferase, die Alaninaminotransferase und die Alkalin-Leukozyt-Phosphatase festgestellt, mit prätherapeutischen Werten, die sich nach Beginn der Therapie in fast allen Fällen normalisierten (Nummern 1, 2, 3, 10, 13 und 14; Tabelle 2).

Diskussion

Zahlreiche natürliche Verbindungen werden üblicherweise für die Behandlung von verschiedenen Krankheiten verwendet, einschließlich des Grünen Tees und Soyabohnen-Extrakten (vgl. [20]). Die jüngsten Ergebnisse weisen darauf hin, dass diätische Produkte und Antioxidationsmittel ebenfalls eine günstige Wirkung, insbesondere auf Krebspatienten, haben. In vielen Fällen ist der exakte Mechanismus ihrer Wirkung noch nicht vollständig nachgewiesen. In diesem Bericht haben wir die Wirkung von natürlichem Klinoptilolit-Zeolith-Teilchen bei der Entwicklung von verschiedenen Krebsarten in vivo und in vitro untersucht. Wir haben herausgefunden, dass mechanisch aktivierte Klinoptilolit-Zeolithen als therapeutische Antikrebsmittel in Studien mit lebenden Tieren und in Gewebekulturen von Zellmodellen wirken. Oral appliziertes Klinoptilolit bei Mäusen und Hunden, die an einer Vielzahl von Tumorarten litten, führte zu einer wesentlichen Verkleinerung der Tumore und zur Verbesserung des allgemeinen Gesundheitszustandes bei einigen Tieren.

Die Wirkungspalette war unterschiedlich, von negativen Antitumorreaktionen bis hin zur Normalisierung der biochemischen Parameter, der Verlängerung der Lebensdauer und der Verkleinerung der Tumorgöße. Die besten Ergebnisse in Bezug auf die Tiere wurden bei der

Behandlung von Hautkrebs bei Hunden erzielt und weisen darauf hin, dass die Adsorption von einigen aktiven Verbindungen für die MZ-Aktivität verantwortlich ist (direkte Kontaktwirkung). Ergänzende Studien mit Gewebekulturen zeigten, dass die MZ-Behandlung die Proliferation und das Überleben einiger Krebszelllinien berührt. Eine Zugabe von MZ hemmte die Zellproliferation auf eine konzentrationsabhängige Art und Weise, teilweise aufgrund der Stimulierung der Inhibitoren von zyklinabhängigen Kinasen, der Inhibition der B/Akt-Expression und der Stimulierung des programmierten Zelltods.

Die hier beschriebenen Arbeiten wurden mit dem nichttoxischen, natürlichen Klinoptilolit durchgeführt, unter Berücksichtigung des Zeolith mit hohem Silikatgehalt. Die Zeolithpartikel waren im gesamten untersuchten pH-Bereich negativ geladen (pH 1-11). Die Elektromikroskopie zeigte das Fehlen von Fasern und die meisten Partikel waren rund und verfügten über eine überaus rauhe Oberfläche (Daten nicht dargestellt). Das Fehlen von Fasern, positiv geladenen Teilchen war hierbei sehr ermutigend, da diese Partikel in Asbest und Erionit-Zeolithen präsent sind, welche höchst karzinogen und mutationserzeugend sind. Zusätzlich katalysierten die aktivierten Zeolith-Partikel nicht die Produktion von hydroxolen Radikalen, im Gegensatz zu Asbest oder Erionit (Daten nicht dargestellt). Es scheint, dass das Fehlen von faserartigen Teilchen, die hydroxole Radikale erzeugen können, bei dieser Zeolith-Probe keine toxischen oder karzinogenen Auswirkungen hervorrufen, zumindest bei oraler Applikation.

Silikat- und Alumosilikat-Teilchen können direkt mit besonderen Zellen interagieren und ihre intrazellulären Pfade verändern, was zur Regulierung der Genexpression führt. MZ war insbesondere so erfolgreich bei der Hemmung der Proteinkinase B/Akt in in vivo-Versuchen mit Krebszellen. Diese Nichtaktivierung hatte ein gehemmtes Wachstum zur Folge und die Steigerung des Krebszellabsterbens. Die Hemmung von Akt durch die MZ-Behandlung wurde nur in Anwesenheit von Serum gezeigt. Das weist darauf hin, dass die Adsorption von Serumkomponenten einer der Mechanismen der MZ-Wirkung in diesen Versuchen sein kann. Die Zugabe von EGF zu einem serumfreien Mittel führte zur Aktivierung von Akt, was durch die MZ-Vorbehandlung ebenfalls blockiert wurde. Die Adsorption von an der Signaltransduktionskaskaden beteiligten Molekülen, wie z. B. Inositol-Phospholipiden und Kalzium, könnte ebenfalls zu der therapeutischen Wirkung beitragen. Vorläufige Lipidadsorptionsstudien zeigen, dass MZ ein starkes Lipidadsorptionsmittel ist. Ähnliche Ergebnisse werden bei der Proteinadsorption festgestellt. Änderungen von Membranreihenfolgen und Interaktionen anderer Proteine mit Membranproteinen könnten ebenfalls beteiligt sein [21], da die Membrantranslokation für die Aktivierung der Proteinkinase B/Akt erforderlich ist. Kürzlich ist gezeigt worden, dass die Aktivierung einer Phosphoinositid-3-Kinase und von Akt dafür verantwortlich ist, dass transformierte Epithelzellen ohne Zellanlagerungen überleben können. Jüngste Ergebnisse weisen darauf hin, dass die konstitutive Aktivierung einer Phosphoinositid-3-Kinase in fünf untersuchten kleinzelligen Lungenkrebszellen [22] für das rasche Wachstum und die Unabhängigkeit von kleinen Lungenkrebszellen verantwortlich ist. In Übereinstimmung damit führt die MZ-Behandlung zur Hemmung der Proteinkinase B/Akt-Pfade und zur nachfolgenden Apoptose in unserem Zellmodell. Mit Akt ist kürzlich dargestellt worden, dass ein wichtiger Zyklin-Hemmer und ein Tumorsuppressormolekül, p27KIP1 [22] inaktiviert werden können.

Wir liefern hier den Nachweis, dass die MZ-Behandlung das Level von p21WAF1CIP1 und p27KIP1 in Tumorzellmodellen erhöht. Es ist noch nicht erwiesen, ob die Inhibition von Akt mit der Regulierung der Expression der p21WAF1CIP1 und p27KIP1 Zellzyklus-Inhibitoren zu tun hat. Vorläufige Ergebnisse zeigen auch, dass MZ Stickstoffdioxid und andere Sauerstoffträger adsorbiert und deaktiviert. Kürzlich ist darüber hinaus berichtet worden,

dass Antioxidationsmittel die Aktivierung des Zyklin-Hemmers p21WAF1CIP1 [23] stimuliert. Dieses Molekül ist für den Stillstand des Zellwachstums verantwortlich. Seine Expression in Adenokarzinomen der Lunge steht positiv mit den optimistischen Überlebensprognosen in Einklang. Die vorliegende Studie beobachtete, dass aktiviertes Klinoptilolit Tumorsuppressormoleküle (p21 und p27) stimuliert.

Die Mechanismen der MZ-Wirkung in vivo bleiben zum gegenwärtigen Zeitpunkt größtenteils unbekannt. Die hier vorgelegten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Hemmung der Proliferation und das Überleben von Krebszellen Teil von Mechanismen sein können, die mit der Antikrebswirkung von MZ-Verbindungen zu tun haben. Weitere Studien über weitere Aspekte ihrer Wirkung, einschließlich der möglichen immunmodulierenden Wirkung von MZ werden in der Zukunft durchgeführt. Insgesamt beschreibt dieser Bericht die zellulären Wirkungen von MZ-Verbindungen in Gewebekultur-Zellmodellen und liefert Daten darüber, das natürliche Zeolith als therapeutische Mittel bei der Behandlung von in vivo Tumorarten eine Rolle spielt.
(Referenzen)

Quelle: Journal für Molekularmedizin - DOI 10.1007/s001090000176 -
Originalartikel. Eingegangen am 17. April 2000/Angenommen: 15. Oktober 2000/ Online-
Veröffentlichung.

Zu den Autoren:

Kresimir Pavelic
erhielt seinen akademischen Titel als Doktor der Medizin und experimenteller Onkologie von der Universität Zagreb, Kroatien. Er erhielt Forschungsstipendien an der RPMI in Buffalo, New York, an der Universität Cincinnati, Ohio, und ein Fulbright- stipendium an der Mayo Klinik in Rochester, Minnesota, USA. Er ist Leiter der Abteilung für Molekularmedizin am Ruder Boskovic Institut und Leiter des Nationalen Krebsforschungsprogramm der Republik Kroatien. Dr. Pavelic ist ebenfalls Professor für Molekularbiologie an der Universität Zagreb, Abteilung Pharmazie und Biochemie. Seine Forschungsinteressen umfassen Molekularmedizin, insbesondere erblich bedingte Krebserkrankungen.

Miroslav Colic
erhielt seinen akademischen Dokortitel am Fachbereich für Angewandte Oberflächenchemie und den Nebenfächern Molekularbiologie und Biophysik der Universität von Kalifornien, Berkeley, USA. Er ist gegenwärtig Vizepräsident der Forschungs- und Entwicklungsabteilung bei der Molecutec Corporation in Goleta, Kalifornien. Seine Forschungsinteressen umfassen freie Radikale in der Chemie und Biologie, Umweltchemie, biomedizinische Auswirkungen von diätischen Produkten und kleine Moleküle im Medikamentennachweis.

Wir danken Prof. Dr. Pavelic, dass er uns diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat.