

SZENT ISTVÁN EGYETEM,
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR,
Belgyógyászati Tanszék és Klinika

**TERÁPIAREZISZTENCIA FEHÉRJÉK
MŰKÖDÉSÉNEK VIZSGÁLATA
„FLOWCYTOMETRIA” ALKALMAZÁSÁVAL
DAGANATOS KUTYÁK NYIROKCSOMÓ
MINTÁIBAN**

Szakedolgozat

Készítette: Bóna Márta

Témavezető: Dr. Vajdovich Péter, egyetemi docens;
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar,
Belgyógyászati Tanszék és Klinika

Budapest
2010.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1. A lymphoma ismertetése és hazai előfordulása	4
2.1.1. Oktan.....	4
2.1.2. A lymphoma megjelenési formái.....	5
2.1.3. Kórjelzés	7
2.1.4. Klinikai tünetek	8
2.1.5. Differenciál diagnózis.....	9
2.1.6. Az anatómiai helyeződés és a betegség kiterjedtsége (fokozatba sorolás)	11
2.1.7. A szövettani típus meghatározása.....	12
2.1.8. Kórlefolyás és gyógykezelés	12
2.2. A terápia rezisztencia.....	15
2.3. Membránpumpa-fehérjék és működésük.....	16
2.3.1. Az ABC-transzporterek.....	17
2.3.2. A Pgp általános biológiai szerepe.....	19
3.1.1. A Pgp szerepe a kutyák daganatos kórképeiben.....	20
2.2. Az MDR fehérjék (Pgp/MDR1/ és MRP-k) kimutatása.....	20
2.3. Az effluxmechanizmus gátlásának lehetőségei.....	25
2.4. Az áramlás-citometria.....	26
3. Anyag és módszer	28
3.1. A vizsgálatban szereplő állatok és azok csoportosítása.....	28
3.2. Mintavétel	28
3.3. A mintafeldolgozás és előkészítés.....	29
3.4. Az áramlás-citometriás mérés	33
3.5. Statisztikai vizsgálatok	36
4. Eredmények	37
4.1. IC calcein szintek	37
4.2. MAF-értékek	38
5. Megbeszélés.....	42
5.1. Célkitűzéseink megvalósulása	42
5.2. Eredményeink értelmezése	42
5.3. Az eredményeikből levont következtetések.....	43
6. Összefoglalás	45
7. Summary.....	46
8. Rövidítések jegyzéke.....	47
9. Irodalomjegyzék.....	48
10. Köszönetnyilvánítás	51
11. Függelék	52

1. Bevezetés

A daganatsejtek kemoterápiás kezeléssel szemben mutatott ellenálló képességének (rezisztenciájának) két jelentősebb tényezője az MDR1 transzporter, vagyis a P (permeability) glükoprotein (Pgp), valamint az MRP1 transzporter, vagyis a multidrug resistance-associated protein-1. Ezek a membrántranszporterek energiafelhasználásuk révén ATP-függő pumpafehérjék, amelyek a különböző sejtidegen anyagokat, mint pl. a kemoterápiás szereket a citoplazmából kijuttatják még mielőtt azok hatása érvényesülhetne. Összefoglaló nevük ABC-(ATP binding cassette-) transzporter utal az energiafelhasználásukra. A humán onkológiában tapasztaltakhoz hasonlóan, a magas Pgp-, illetve MRP1-expresszió daganatos kórképekben szenvedő lymphomás kutyák esetében is negatív prognosztikai faktornak minősül (Lee, J.J. et al.1996.; Urtti, A et al. 2004.) Az állatorvosi gyakorlatban a daganatos kórképek közül leginkább a kutyák ún. non-Hodgkin típusú lymphomájának gyógyítása kapcsán merült fel a Pgp, illetve az MRP1 fontossága, hiszen ez az a betegség, amelyet szinte kizárólag kemoterápiás kezeléssel lehet gyógyítani. Ezt több tanulmány is bizonyítja. Ezek szerint a Pgp-, valamint az MRP1-expresszió kemoterápia megkezdése előtti szintje fordítottan arányos a remissziós (a daganat visszahúzódása) és a túlélési idővel (Bergman PJ. et al.. 1996, Lee J.J. et al. 1996.) Több tanulmány alapján azt a következtetést lehet levonni, hogy a két fehérje közül az MDR1 (P-glükoprotein) számít az egyik legmegbízhatóbb önálló prognosztikai faktornak (Lee, J.J. et al. 1996, Bergman, P. J. 2000).

Vizsgálataink célja annak megállapítása, hogy a daganatos sejtekben a P-glükoprotein (Pgp) és az MRP1 fehérjék funkciója, aktivitása változik-e a kemoterápiás kezelés hatására. A vizsgálatot ún. áramlás citométerrel végeztük. Vizsgálataink során a lymphomás nyirokcsomókban, mint identikus, homogén sejtpopulációkban működő membrántranszporter-aktivitást hasonlítottuk az egyéb daganatokból nyert heterogén sejtpopuláció membrántranszporter-aktivitásához. A pumpafehérjék funkciójára utaló értéket a multidrug-rezisztencia aktivitási faktorról (MAF-értékekkel) fejeztük ki. Vizsgálataink során az említett áramlás-citometriát alkalmaztuk kiegészítve a calcein-próbával, amely együttes eljárások segítségével a vérben keringő, általunk szeparált mononukleáris sejtekben mérhető fluoreszcenciából számítottuk ki a MAF-értékeket. Mivel hasonló vizsgálatokat még csak vérmintákból végeztek a humán medicinában végzett hasonló kísérletek alapján, ezért mindenképp a már meglévő protokollt kellett átdolgozni a nyirokcsomóból, illetve egyéb daganatokból történő mérésekhez.

2. Irodalmi áttekintés

2.1.A lymphoma ismertetése és hazai előfordulása

A lymphoma (malignus lymphoma és lymphosarcoma) a daganatok egy külön csoportja, amely a lymphoreticularis szövetekből ered (nyirokcsomó, lép, csontvelő), de ennek ellenére más szövetekből is származhatnak. A lymphoma a kutyák leggyakoribb daganatainak egyike. (Vail, D.M. et al. 2001.) A daganatok nevezéktanában az „oma” kifejezés jóindulatú daganatra utal, de a lymphoma rosszindulatú lymphoproliferatív betegséget jelent. (Morris, J. et al, 2001.) A kutyák daganatos betegségeinek 7-24 %-át alkotja, ezen belül a haemopoieticus daganatos betegségek 83%-át teszi ki. Gyakorisága a hazai kutyapopulációban az utóbbi évek során folyamatosan nőtt. A lymphoid rendszer daganatos elváltozásaiban a lymphoid sejtek különböző alakjai válnak neoplasztikussá. Amikor a nagy számban osztódó daganatsejtek a nyirokszervek megnagyobbodását okozzák, akkor lymphomáról (malignus lymphomáról, régi nevén lymphoid leukosisról) beszélünk. Kutyáknál ennél jóval ritkább a daganatos sejtek megjelenése a véráramban, azaz a lymphoid leukaemia. (Kunos, V. és mtsai. 2004.) Bár többnyire az idősebb korosztálynál (6-9 év között) fordul elő, de minden életkorban, bármely ivarú illetve fajtájú állatban kialakulhat. Bizonyos fajtákban nagyobb előfordulást mutat a betegség: boxer, basset hound, bernáthegyi, skót terrier, airedale terrier, bulldog. Rottweilerben és bullmasztiffban genetikai prediszpozíciót is felfedeztek. (Vail, D.M. et al.. 2001.)

2.1.1. Oktan

A kórkép kialakulásának pontos okát, a legtöbb daganatos megbetegedéshez hasonlóan még nem tárták fel, csupán feltételezések vannak. A betegség megjelenési formája és lefolyása a viszonylag malignus emberi non-Hodgkin-típusú lymphomához hasonló, így a humán megbetegedések kapcsán felmerülő etiológiai tényezőket a kutyák esetében is vizsgálják. Egyes tanulmányok a retrovírusok, a herbicidek, a radioaktív sugárzás, esetleg a mágneses terek szerepét feltételezik a betegség kialakulásának hátterében. Lymphomás kutyákban is kimutatták a sejtnövekedésért felelős N-ras onkogén mutációját, továbbá egyes kromoszómaaberrációkat is, az emberi megbetegedésekhez hasonlóan. A nem kielégítő immunműködéssel rendelkező, például korábbi immunmediált betegekben (haemolytikus

anaemiában, thrombocytopeniában), ízületgyulladásban, allergiás dermatitisben szenvedő állatok is a veszélyeztetett csoportba tartoznak. (Kunos, V. és mtsai. 2004.)

Emberekben már bizonyított, hogy a cyclosporin adagolása növeli a lymphoma kialakulásának kockázatát, ami alapján feltételezik, hogy ez kutyákban is hasonlóképpen alakul. Egy tanulmány szerint az anilis furunculosis gyógykezelésére adagolt cyclosporin kezelés hozzájárulhat a lymphoma kialakulásához. (Blackwood, L. et al, 2004.)

2.1.2. A lymphoma megjelenési formái

A lymphoma egy vagy több nyirokcsomó, nyirokszerv (lép, csontvelő), esetenként más szervek (központi idegrendszer, bőr, szem, csont) malignus lymphoid sejtes (gyakran lymphoblastos) infiltrációval jár.

Klinikailag leggyakrabban a *multicentrikus forma*, a perifériás nyirokcsomók megnagyobbodása tapasztalható, önálló, jól körülhatárolható, nem fájdalmas, könnyen elmozdítható duzzanatok formájában. (Kunos, V. és mtsai. 2004.)

Kezdetben főleg a submandibularis és prescapularis nyirokcsomók megnagyobbodása tapasztalható. A legtöbb állatban nem jelentkeznek klinikai tünetek a betegség kialakulásakor, de körülbelül 20-40%-ban súlycsökkenésről, letargiáról, anorexiáról és lázas állapotokról számolnak be a tulajdonosok. A hasüregben leggyakrabban hepatosplenomegalia formájában jelenik meg a betegség, rendszerint előrehaladott esetekben. A mellüregben a cranialis mediastinális lymphadenopathiára utal a röntgen-felvételeken látható beszűródés a tüdőben és a mediastinumban. (Vail, D.M. et al. 2001.)

A gastroenteralis szerveket érintő *alimentáris lymphoma* szintén gyakori. Ebben a típusban a belek és a mesenterialis nyirokcsomók elváltozása miatt hasmenés tapasztalható. Gyakori, hogy malabsorptio következtében jelentősen nő a vérplazma összfehérjekoncentrációja, és a beteg súlyosan lesoványodik. (Kunos, V. és mtsai, 2004.) A primer gastrointestinalis lymphoma rendszerint multifokálisan és diffúzan fordul elő a vékonybél teljes submucosájára és lamina propriájára kiterjedően, gyakran felületes fekélyekkel és a serosa transmuralis beszűródésével. Nehéz elkülöníteni a gastrointestinalis lymphomát a lymphocyta-plazmasejtes enteritistől (LPE). (Vail, M.D. et al. 2001.)

A *mediastinális formában* többnyire a mellkasi nyirokcsomók jelentős megnagyobbodása tapasztalható. E típusban gyakori a nehezített légzés és keringés a légcső

és a nagyobb hörgők összenyomatása miatt. A tüdő lymphoid sejtes beszűrődése, lymphoblastokat tartalmazó mellkasi folyadékgyülem megjelenése is előfordulhat. (Kunos, V. és mtsai. 2004.) A mediastinalis forma hozzávetőleg az esetek 5%-ban fordul elő. Ebben a formában a craniális mediastinális nyirokcsomók mellett a thymus is megnagyobbodhat, amit a röntgenfelvételeken detektálhatunk. A hypercalcaemia a kutyák 10-40 %-ban fordul elő, leggyakrabban a mediastinális formában. (Vail, D.M. et al. 2001.)

Ha a neoplasticus lymphoid infiltráció elsősorban a lépben jelentkezik *léplymphomáról* beszélünk. Ebben a típusban az erőteljes splenomegalia a has megnagyobbodásához vezet, a lép könnyen megrepedhet, és emiatt a hasüregben vérzés következhet be.

Amennyiben a daganatos nyiroksejtek a *csontvelőben* is szaporodnak, zavarhatják annak fő funkcióját, a haemopoeticus sejtek képződését. Ez esetben anaemia, thrombocytopenia, neutropenia alakul ki, és gyakran lymphoblastok jelennek meg a véráramban, ez a leukaemiás típusa (pl. lymphoblastos leukaemia). Ugyanakkor a folyamat kezdődhet a csontvelő érintettségével is. Ebben az értelemben a lymphoma és a lymphoid leukaemia tulajdonképpen egyazon betegség különböző megjelenési formájaként is értelmezhető.

A ritkán előforduló *központi idegrendszeri daganatos érintettség* esetén agyi tünetek és/vagy gerincvelői eredetű, bénulással járó rendellenességek tapasztalhatók. (Kunos, V. és mtsai. 2004.)

A *bőrlymphoma* során változatos megjelenési formájú szoliter vagy generalizált bőrduzzanatok jelentkezhetnek, amelyek epitheliotrop (mycosis fungoides) vagy non-epitheliotrop osztályba sorolhatók. A bőrlymphoma a szájüreg mucosájában is kialakulhat, és gyakran a bőrön kívül, a nyirokcsomókban, a lépben, a májban és a csontvelőben is megjelenhet. A Kutyák epitheliotrop bőrlymphomája gyakori, és rendszerint T-sejt eredetű, az emberhez hasonlóan. A cutaneus T-sejt lymphoma ritka, jellemző vonása a generalizált bőrduzzanat és a perifériás vérben keringő malignus T-sejtek. Ezek a lymphocyták rendszerint nagy átmérőjűek (15-20 μm) és hajlott, barázdált sejtmaggal rendelkeznek. A B-lymphocytás bőrlymphoma az epidermisre és az irhára terjed ki, a bőr középső és mély rétegeit érintve. (Vail, D. M. et al. 2001.)

A *generalizált formában* a tünetek kombinálódhatnak, a perifériás nyirokcsomók duzzanatához lép- és májduzzanat, a mediastinális nyirokcsomók és a tonsillák megnagyobbodása társulhat. Az elhúzódó betegség állapotromlással, étvágytalansággal, losoványodással jár, és ilyenkor többnyire megfigyelhetők a más idült daganatos betegekre is jellemző, úgynevezett paraneoplasticus szindrómák: hypoglykaemia, hypergammaglobulinaemia, anaemia, erythrocytosis, leukocytosis, thrombocytopenia és thrombocytopathia, coagulopathia, disszeminált intravasalis coagulopathia, polyuria, polydipsia és láz. (Kunos V. és mtsai, 2004.), hypercalcaemia, neutrofilia, izomgyengeség, kóma (Vail, D.M. et al, 2001.)

Az *extranodális lymphoma* kifejezést használjuk, ha a vesében, a nasopharynxban, a szemben (ocular), illetve az idegrendszerben (neural) jelenik meg a betegség. A veselymphoma relatív gyakori, a klinikai tünetek mindkét vese érintettsége esetén kapcsolatban állnak a veseelégtelenséggel: losoványodás, anaemia, megnagyobbodott vesék. A nasopharyngeális lymphoma esetén felső légúti tünetek, orrváladékozás, tüszentés, néha orr deformitás jellemző. (Morris, J. et al, 2001.)

2.1.3. Kórjelzés

A lymphoma gyanújának kimondásához a multicentrikus formánál gyakran elegendő a fizikális vizsgálat is, különösen a testtájéki nyirokcsomók (esetleg a máj és a lép) érzékelhető megnagyobbodása esetén. A testüregekben helyeződő szervek vizsgálatához azonban rendszerint valamelyik diagnosztikai képalkotó eljárásra, így mellkasi, hasi röntgenvizsgálatra, hasi ultrahangvizsgálatra is szükség van. A csontrendszer vagy a központi idegrendszer érintettségének gyanúja esetén röntgenvizsgálat, komputertomográfia, esetleg mágnesrezonancia-vizsgálat is szóba jöhet. A lymphoma in vivo megállapításához minden esetben mintát kell venni az érintett elváltozásból citológiai vagy szövettani vizsgálatra. Az irodalmi adatok szerint a nyirokcsomók citológiai vizsgálatának érzékenysége meghaladja a 95 %-ot mégpedig nemcsak a lymphoma, hanem más típusú daganatok nyirokcsomóáttéteinek igazolásához is, feltéve, hogy a citológiai elemzést valóban hozzáértő személy végzi. Ennek alapján a citológia lymphoma esetén is többnyire elegendő a diagnózishoz. A nyirokcsomó kimetszése és az ezt követő kórszövettani vizsgálat (hemalaun-eozin festés, immunhisztokémia) azonban nélkülözhetetlen a különböző lymphoma típusok és a malignitás fokának (grade) megállapításához. Általában azt javasolják, hogy a fertőzéseknek jobban kitett (áll alatti, popliteális) nyirokcsomók diagnosztikai célra történő kimetszését

mellőzzük. A gyökérterületről származó fertőzések miatt ugyanis ezekben gyakori a gyulladásos eredetű lymphoidsejtes proliferáció, ami a kórjelzést zavarhatja. A lymphoma típusának ismerete fontos a kemoterápiás szerek megválasztásához, (Kunos v. és mtsai, 2004., Krick, E.L. et al, 2009.) valamint a túlélési idő megjósolásához. A sentinel nyirokcsomó vizsgálata mindenképpen indokolt, a rutin klinikai gyakorlat része, ami hozzájárul az állapotok pontos klinikai besorolását.(Tuohy, J.L.et al., 2009.) A hazai gyakorlatban a praescapularis nyirokcsomók kimetszését alkalmazzuk.

A vérvizsgálat csak a betegség gyakran legsúlyosabb, leukaemiás formája esetén alkalmas a lymphoma igazolására, amikor a daganatos sejtek a véráramban is megjelennek. Az elváltozott daganatos szervek működésének megítélésére el kell végezni a vérplazma biokémiai vizsgálatát. A daganatos sejtek véráramban való megjelenésének kimutatásához hematológiai vizsgálatokra van szükség, továbbá indokolt a csontvelő citológiai, esetenként szövettani vizsgálata is. (Kunos V. és mtsai, 2004.)

A csontvelő aspirációnak vagy biopsziának nagyon fontos szerepe van a betegek stádiumának meghatározásában. Ha a kutyák keringésében megjelenik néhány prolymphocytá és lymphoblast, akkor valószínűsíthető a csontvelő-érintettség. A mellkasi és a hasi röntgenfelvétel alapvető fontosságú a lymphoma belső szervekben való kiterjedésének felderítésére. Ugyancsak hasznos lehet az ultrahang-árnyékban végzett vékony-tű aspiráció vagy tübiopszia, ami segít a lép, a máj és a mesenterialis nyirokcsomók kiértékelésében. Ha lehetséges, a perifériás nyirokcsomókból való mintavételt kell előnyben részesíteni a fertőzésveszély csökkentése érdekében. (Vail, D.M. et al., 2001.)

2.1.4. Klinikai tünetek

A klinikai tünetek változatosak és nagymértékben függenek a tumor helyeződésétől és kiterjedésétől. A leggyakoribb, multicentrikus forma (80%)és a generalizált nem-fájdalmas lymphadenopathia ismerhető fel a legkövetkezetesebben. Ráadásul a hepatosplenomegalia és a csontvelő-érintettség is általában előfordul. Főként a nem-specifikus tünetek dominálnak: anorexia, súlycsökkenés, hányás, hasmenés, lesóványodás, ascites, dyspnoe, polydipsia, polyuria, láz. A mellkasi röntgenen a sternális és a tracheobronchialis nyirokcsomók megnagyobbodása, a craniális mediastinum kiszélesedése és a tüdőparenchyma interstitialis beszűrődése látható. A hasúri röntgen-felvételen a máj-és lépmeagnagyobbodás, valamint a mesenterialis és szublumbalis nyirokcsomók duzzanata észlelhető.

A gastrointestinal vagy alimentális forma esetén ugyancsak a nem-specifiku tünetek dominálnak: hányás, hasmenés, súlycsökkenés, malabsorpció.

A mediastinális formánál a craniális mediastinum struktúrái és/vagy a thymus megnagyobbodása látható, melynek következményeként precavalis szindróma, a fej, a nyak és a mellső lábak oedémás beszűrődése létható a vena cava craniális összenyomatása miatt.

A bőrlymphoma rendszerint generalizált vagy multifokális formában jelentkezik csomó, plaque, fekély, valamint erythemás vagy exfoliatív dermatitis formájában. A mycosis fungoides egy krónikus lefolyású formája, amely 3 klinikai stádiumban nyilvánul meg. Kezdetben a bőr hámlik, alopecia és pruritus a fő tünet. Előrehaladott stádiumban a bőr erythematosussá, elvékonyodottá, kifeléyesedetté és exudatívává válik. A végső stádiumra a proliferatív plakkok és csomók jellemzőek előrehaladott fekélyesedéssel. Esetenként a bőrforma az ínnyre és az ajkakra is ráterjed, ahol multicentrikus erythematosus plakk-szerű hámlások vagy csomók formájában nyilvánul meg.

A primer központi idegrendszeri lymphoma multifokális és soliter formában is megjelenhet. Rohamokban, paralysisben és paresisben jelentkezhet.

Az oculáris lymphoma fő tünete az iris elvékonyodása és beszűrődése, a hypopyon, hyphema, posterior synechia és glaukóma. Egy tanulmány szerint 94 multicentrikus lymphomában szenvedő kutya 37 %-ban (35) jelentkezett szemelváltozás a lymphomával összefüggésben.(Vail, D.M. et al. 2001.)

2.1.5. Differenciál diagnózis

A lymphadenopathia differenciál diagnózisa függ a kórelőzménytől (fertőző betegség érte-e az állatot), a daganat méretétől, konzisztenciájától, az érintett nyirokcsomó helyeződésétől. A felmerülő betegségeket az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: A lymphoma általános elkülönítő kórjelzése

Forrás: Vajdovich P.: A kemoterápiás kezelés eredményei kutyák lymphomájának gyógyításában II. Kisállatpraxis 2001. 2. (1.) 3. o.

Anatómiai forma	Differenciáldiagnózis
Multicentrikus - Generalizált lymphadenopathia	<p>Disszeminált fertőzések</p> <ul style="list-style-type: none"> • Baktériumok: streptococcosis, Lyme-kór • Vírusok: adenovírus, szopornyica • Rickettsiák: toxoplasmosis, demodicosis • Gombák: aspergillosis, candidiasis <p>Más haemopoeticus daganatok</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leukemiák • Myeloma • Szisztémás histiocytosis <p>Tumormetasztázisok</p>
Alimentáris	<p>Bél</p> <ul style="list-style-type: none"> • Infiltratív enteritisek- lymphocytás, plazmasejtes, eosinophilsejtes formák • Intesztinális neoplaziák • Granulomatosis enteritis • Gastrointesztinális hízósejtes daganat
Máj	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperæmia • Zsíros infiltráció (éhezés, hyperadrenocorticismus, diabetes mellitus) • Gyulladás-bakteriális (cholangiohepatitis), vírusos (Rubarth-kór), parazitás (toxocariózis-lárvavándorlás) • Extramedulláris haematopoesis • Cirrhosis • Más daganat metasztázis a májban
Lép	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperæmia • Hematóma • Idült gyulladás, hiperplázia • Extramedulláris haematopoesis • Hemolitikus kórképek • Szepszis • Haemangiosarcoma • Más daganat metasztázisa a lépben
Bőr	<ul style="list-style-type: none"> • Pyoderma • Immuneredetű dermatitis (pl. pemphigusok) • Bőrdaganatok
Gátorköz	<ul style="list-style-type: none"> • Thymoma • Szívbázis daganat (chemodectoma) • Ektópiás pajzsmirigydaganat • Lymphomatoid granulomatosis tüdőben • Fertőző eredetű granulomatosis (pl. blastomycosis)

2.1.6. Az anatómiai helyeződés és a betegség kiterjedtsége (fokozatba sorolás)

A lymphoma változatos megjelenési formái miatt szükségesé vált az emberi megbetegedések diagnosztikájában már alkalmazott egységes besorolás. Ez magában foglalja a betegség helyeződését, előrehaladottságának mértékét, amelyből fontos következtetéseket lehet levonni a gyógykezelésre és a várható túlélésre. A kutyák lymphomájára is kidolgozták a fokozatba sorolás rendszerét az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization-WHO) ajánlásai alapján. Ennek megfelelően A-F jelölést alkalmaznak az anatómiai helyeződés alapján, míg I-V.számmal jelölik a betegség kiterjedtségének mértékét, továbbá alosztályokat is megkülönböztetnek a klinikai tünetek súlyosságának megfelelően (2. táblázat). (Kunos V. és mtsai, 2004.)

A lymphomás kutyák fokozatbesorolása a WHO ajánlásával

(MÁL 126. (2004). 681. oldal)

5. Anatómiai megjelenés

- A. Generalizált
- B. Alimentáris
- C. Thymus
- D. Bőr
- E. Leukaemiás forma
- F. Egyéb

6. Súlyosság

- I. Csak egy nyirokcsomót vagy nyirokszervet érintő elváltozás
- II. Több, azonos régióba tartozó regionális nyirokcsomó érintettsége
- III. Generalizált nyirokcsomó-elváltozás
- IV. Máj-és/vagy lépelváltozás (± III.stádium)
- V. Vér- vagy csontvelő-érintettség és/vagy további nem lymphoid szervek érintettsége (± I-IV.stádium)

Alosztály:

- a) Szisztémás klinikai tünetek nélkül
- b) Szisztémás klinikai tünetekkel

2.1.7. A szövettani típus meghatározása

Mivel a lymphomát a fiatal lymphoidsejtek daganatosan transzformálódott eltérő klónjai okozzák, különböző sejtes eredetű formák és immunfenotípusok különböztethetők meg. Az emberi non-Hodgkin lymphomához hasonlóan a kutyák esetében is fokozott igény mutatkozott az egységesített szövettani besorolási rendszer kidolgozására. Kezdetben az ún. Working Formulation beosztást és a módosított Kiel-i osztályozást használták, ma már azonban az ún. REAL-csoport (Revisited European-American Lymphoma Study Group) osztályozását javasolják. Mindegyik rendszernél figyelembe veszik a sejtek eredetét és morfológiáját (pl. immunoblastos, lymphoblastos, lymphocytás, centrumsejtes, köpenysejtes, plazmasejtes lymphoma) és a proliferáció mértékének jeleit (grading). A Kiel-i és a REAL-csoport osztályozása emellett még az immunfenotípus alapján is különbséget tesz (B- és T-, ill. non-B, non-T sejtes formák). (Kunos V. és mtsai, 2004.)

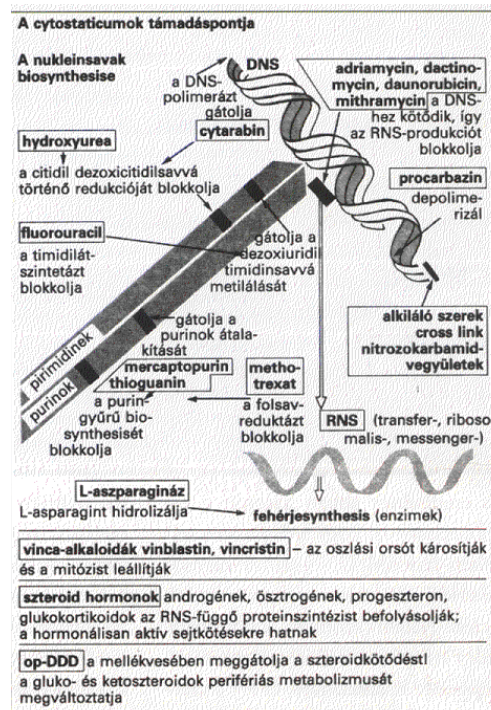
Általában a legrosszindulatúbb lymphomák B-sejt eredetűek. (Vail, D.M. et al. 2001.)

A két leggyakoribb morfológiai típus a diffúz nagysejtes (centroblastos) és immunoblastos forma. (Greenlee, P.G. et al, 1990.)

2.1.8. Kórlefolyás és gyógykezelés

Célzott terápia nélkül a lymphoma kórlefolyása többnyire gyors, a kórjóslat rossz, a betegek általában 4-6 héten belül, egyre súlyosbodó tünetek mellett elpusztulnak. Ugyanakkor a lymphoma (kevés kivételtől eltekintve) sikeresen gyógykezelhető és több hónapos vagy akár többéves túlélés érhető el, ha időben felismerik. Mivel általában generalizált formában jelentkezik, ezért terápiás célú műtéti beavatkozás nem jön szóba, hanem citosztatikus kezelésre van szükség a kóros sejtek szaporodóképességének visszaszorítására. Sokféle citosztatikus (kemoterápiás) gyógykezelési séma áll a klinikusok rendelkezésére, amelyek közül a beteg általános állapotától, a kórkép szövettani típusától és a tulajdonos anyagi lehetőségeitől függően lehet választani. Ezek egymástól a gyógyszerbeadás gyakoriságában, valamint az alkalmazott citosztatikumok számában és összetételében különböznek. Több, különböző hatásmechanizmusú gyógyszer kombinált alkalmazásakor a gyógykezelés eredményesebb. (Kunos V. és mtsai, 2004.). A kutyák jól tolerálják a kemoterápiás beavatkozásokat, az esetek többségében teljesen meggyógyulnak, klinikai tüneteket nem mutatnak, és jó életminőségben élnek le életüket. A kemoterápiás kezelés alapvető célja, hogy tartós teljes gyógyulást idézzünk elő és megmentsük a kutyákat az esetleges visszaesés után

is. A legtöbb kutya a következő okok miatt esik vissza a kemoterápia után: pontatlan adagolás, a beadás gyakorisága, a kemoterápiás ágensek ellen kialakult multidrug rezisztencia (MDR), bizonyos esetekben túl magas koncentráció alkalmazása. A kemoterápiára adott válasz számos tényezőtől függ: a betegség helyeződése, kiterjedése (klinikai stádium), a klinikai tünetek jelenléte vagy hiánya, a szövettani típus, az immunofenotípus, az előző kemoterápiára vagy kortikoszteroidokra adott válasz, a multidrug rezisztencia kialakulása, a daganat proliferációs rátája, a paraneoplasztikus tünetek jelenléte (hypercalcaemia, súlycsökkenés, májelégtelenség). A költségeket ugyancsak számos tényező befolyásolja: az alkalmazott hatóanyagok, az állat mérete, a beadás gyakorisága, a toxicitás monitorizálásához szükséges laboratóriumi tesztek. Jelenleg, a leghatásosabb kemoterápiás hatóanyagok: Doxorubicin, L-asparagináz, polyetilén-glycol (PEG)-L-asparagináz, vinkrisztin, ciklofoszfamid, prednisolon. Más hatóanyagok is aktívak, de ezeket csak másodsorban alkalmazzuk: vinblasztin, cytosin arabinosid, Actinomycin-D, mitoxantrone, klórambucil, metotrexát. (Vail, D.M. et al, 2001.) A citosztatikumok hatásmechanizmusát az 1. ábrán szemléltetem. (Függelék 1. ábra)



1. ábra A citosztatikumok támadáspontja. Az összefoglaló ábrán a citosztatikus szerek genetikai hatásmechanizmusa látható.

Forrás: Vajdovich P., Kisállatpraxis 2001. 2. (1.) 2-8.

A leghatékonyabbnak bizonyult, általunk is használt kemoterápiás eljárások a ciklofoszfamid, a doxorubicin, a vinkrisztin és a prednisolon együttes alkalmazásán alapulnak, L-aszparaginázzal kombinálva, vagy anélkül. Ezzel a kezeléssel az átlagos teljes túlélési idő 11,9 -17 hónap. A COPA kemoterápiás protokollt (1.függelék) alkalmazva (C=ciklofoszfamid, O=„oncovin”, vinkrisztin, P=prednisolon, A=adriablastina=doxorubicin) 80-90%-ban teljes remisszió (a nyirokcsomók vagy a daganatos szervek normál méretre történő visszaalakulása) és 12 hónapos átlagos túlélés érhető el (az állatok 25%-a 2 évnél tovább él). (Kunos V. és mtsai, 2004.) Csak kortikoszteroid terápiával három hónapra nyújtható ki a túlélési idő, míg kemoterápiával rendszerint 6-9 hónap.(Morris, J. et al, 2001.)

Ritkán, szoliter elváltozások esetén, a sebészi vagy radioterápiai megoldás is szóba jön, de ezt csak a biztos fokozatba sorolást követően, kizárólag I-es stádiumú betegeknél ajánlatos és etikus elvégezni. Minden más beavatkozáshoz hasonlóan, a citosztatikus terápiának is számos mellékhatása lehet. A kutyákban tapasztalt mellékhatások azonban kevésbé súlyosak, mint az emberi kezeléseknél, és az állatok jobban is tolerálják azokat. Ezek felismerése és a beteg állapotának nyomon követése lényeges a gyógykezelés teljes időtartama alatt. (Kunos V. és mtsai, 2004.) A kezelésre adott válaszreakció a nyirokcsomó és a látható daganatszövet méretének csökkenésében állapítható meg.(Morris, J. et al, 2001.)

A következőkben néhány citosztatikum *mellékhatásait* mutatom be.

Általánosan jellemző a citosztatikumokra, hogy a csontvelő és a gastrointestinalis rendszer szaporodásban lévő sejtjeire nézve is károsító hatásúak, így myeloszuppressziót és hányást, ill. hasmenést okozhatnak. Fontos megemlíteni e szerek immunszuppresszív hatását is. A kemoterápiás kezelésben részesülő betegek esetében egy egészen egyszerű, általában gyomor-bél rendszeri fertőzés is súlyos, esetenként letális kimenetelű lehet.

A doxorubicin kifejezetten myelo- és cardiotoxicus hatású lehet, ismételt alkalmazását követően túlérzékenység, a beadást követően hányás, hasmenés, pancreatitis előfordulhat.

A ciklofoszfamid is myelotoxikus hatású, továbbá hányást, hasmenést okozhat, valamint urotoxicus is. Alkalmazását követően előfordul a steril, vérzéses cystitis, amely azonos adagban adott mesna hatóanyagú készítménnyel (Uromitexan inj.) kivédhető.

A vinkrisztin esetenként neurotoxikus. Mindhárom szerre jellemző a perifériás károsító hatás, amelynek következtében paravénás applikáció esetén rosszul gyógyuló

paraphlebitis alakulhat ki. Az L-aszparagináz hypersensitivitást, pancreatitist okozhat, esetenként neurotoxikus hatású.

A gyógykezelési előírások betartásával a mellékhatások előfordulása minimálisra csökkenthető, ezáltal a legtöbb citosztatikus kezelés alatt álló beteg panaszmentes, és az egészséges állatokhoz hasonló a fizikai aktivitása. (Kunos V. és mtsai, 2004.)

2.2. A terápia rezisztencia

Minden biológiai rendszer fennmaradása szempontjából alapvetően fontos az a tulajdonság, hogy a számára veszélyt jelentő anyagcseretermékektől vagy a külvilágból bejutott káros anyagoktól különböző mechanizmusok segítségével megszabaduljon. A sejtek vagy a belőlük felépülő szervezetek ezeket az anyagokat változatlanul vagy különféle biokémiai folyamatok eredményeként megváltoztatva, esetleg részlegesen ártalmatlanítva juttatják a külvilágra.

Az evolúció során erre a feladatra önálló szervek alakultak ki (pl. máj, vese), de a fejlődés során konzerválódtak, és a legtöbb sejtben ma is szinte változatlan formában sikeresen működik. A szervezetbe juttatott gyógyszerek és egyéb, sejt működést befolyásoló anyagok hatását jelentősen csökkentheti, akár ki is olthatja a sejtnek ez az ősi és természetes védekező rendszere. Erre a jelenségre, amelyet terápia rezisztenciának neveztek el, legelőször a baktériumok antibiotikumok ellen kifejtett ellenálló képességének felfedezésekor derült fény. Újabban a daganatos betegségek kemoterápiás kezelésében okoz súlyos nehézségeket, mivel a tumorsejtben ezek a védekező mechanizmusok felerősödhetnek, amely a gyógyszeres kezelés kudarcához, így a beteg halálához vezethetnek. A rezisztencia lehet intrinszik, vagyis eredendő, más néven genuin, azaz a sejt alapvető, kezdettől fogva jellemző tulajdonsága (pl. a Gram-negatív pálcák többségének penicillin elleni rezisztenciája). Ugyanakkor számos esetben csak később alakul ki ez a tulajdonság, ilyenkor beszélünk extrinszik vagy szerzett ellenálló képességről (pl. a riboszóma-fehérje megváltozása sztreptomycin-rezisztenciát okoz).

A terápia rezisztencia lehet farmakokinetikai vagy farmakodinámiás eredetű.

Farmakokinetikai esetben az ellenálló képesség kialakulásának hátterében állhat pl. a gyógyszerek helytelen aluladagolása, a kezelések rossz időzítése (ütemezése), a szájon át beadott szerek rossz felszívódása (pl. emésztési vagy felszívódási zavarok esetén), a készítmény nem megfelelő transzportja, elégtelen átjutása a szervezet barrierein, rossz

penetrációja a célszövetbe (pl. a szövet gyenge vérellátása miatt), vagy a gyógyszer csökkent aktivációja a szervezetben.

A farmakodinámiás rezisztenciának számos oka lehet, pl. a gyógyszereket hatástalanító enzimek fokozott aktivitása, a DNS-szintézisre ható szerek esetében a fokozódó DNS-javítás (DNA-repair), a programozott sejthalált (apoptosist) előidéző gyógyszerek esetén az antiapoptotikus folyamatok felerősödése, a DNS-replikáció során nélkülözhetetlen, ún. topoizomeráz enzimeket gátló szerek (fluorokinolon, etopozid) esetén az enzim fokozott működése, valamint a szabadgyökképző xenobiotikumok ellen a sejtek redox tulajdonságaiban fontos szerepet játszó antioxidáns (főként glutation) rendszer hatékonyabb működése. (Szécsényi D. és mtsai, 2007.)

2.3. Membránpumpa-fehérjék és működésük

Az előbb említett számos mechanizmus közül talán az egyik legnagyobb a káros anyagok eltávolítását végző membránpumpa-fehérjék csoportja, amelyek gyorsan és hatékonyan kijuttatják az egyes gyógyszereket a sejtből, mielőtt azok hatásukat kifejthették volna. Ezeknek az ún. „effluxpumpák”-nak két fontosabb csoportját különböztetjük meg, az ún. „ATP binding cassette transporter”-eket (ABC-transzporterek, melyek transzmembránfehérjék) és az ún. „major vault protein”-eket (MVP-k). (Szécsényi D. és mtsai, 2007.)

A daganatok kezelése során nehézséget jelenthet, ha a daganatsejtek ellenállóak az alkalmazott gyógyszerekkel szemben. Ez a rezisztencia az adott daganattípus eredendő tulajdonsága is lehet, ugyanakkor bármilyen daganatsejtben a kezelés során is kialakulhat. A kemoterápiás készítmények elsősorban a DNS-szintézis, ill. a sejtosztódás ellen hatnak, a sejtciklus szaporodási fázisában tudják hatásukat kifejteni, ezért a nyugalmi szakaszban lévő daganatsejtek lényegében rezisztensek. Minél nagyobb arányban vannak jelen szaporodó sejtek a daganatban, annál nagyobb eséllyel hatnak a kemoterápiás készítmények. A rezisztencia kialakulásának hátterében a sejtek túlélését biztosító folyamatok aktiválódása is állhat a különböző növekedési faktorok (insulin like growth factor-IGF-1, endothelial growth factor-EG F) által.

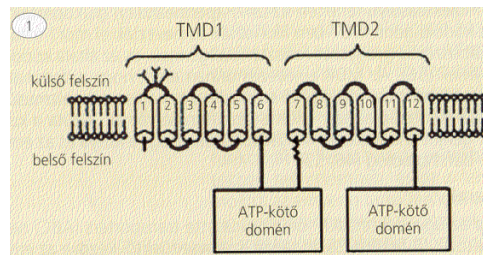
Juliano, Ling és mtsai elsőként írták le a 170 kDa molekulásúlyú fehérjét, az ún. P (permeability) glükoproteint (Pgp), amely összefüggésbe hozható a daganatsejtek több, különböző gyógyszerekkel szemben kialakult ellenálló képességével. A fehérjét kódoló gént

mdr1 (multidrug resistance 1= többszörös gyógyszer-rezisztencia) génnek nevezték el, és az általa kódolt fehérjét MDR1 fehérjének. Az MDR elnevezés onnan ered, hogy a daganatsejtek az MDR1 fehérje révén több, különböző szerkezetű és hatásmechanizmusú, hidrofób tulajdonságú kemoterápiás szer ellen is rezisztenssé válnak (vinkrisztin, doxorubicin). Az mdr1 gén klónozása során megállapították, hogy a kutya és az ember mdr1 génje 93%-ban homológ. (Szécsényi D. és mtsai, 2007.)

2.3.1. Az ABC-transzporterek

A Pgp az ATP-binding cassette transporters (ABC) fehérjecsaldába tartozik. A fehérjecsald tagjai az egysejtűektől kezdve az emberig minden élőlényben megtalálhatók, nélkülözhetetlen védelmi feladatokat látnak el. A legtöbb ABC-fehérje aktív membrántranszporter, amely az ATP energiájának felhasználásával, koncentrációgradiens ellenében képes különféle anyagok (hidrofób molekulák: citotoxikus anyagok és festékek) membránon keresztül történő szállítására. Az ABC-transzporterek családján belül 7 alcsald létezik (ABCA-tól ABCG-ig). (Szécsényi D. és mtsai, 2007., Karászi, É. et al. 2000)

- **A Pgp** (vagy más néven MDR1 fehérje) 160-180kDa molekulatömegű membránfehérje, mely a sejthártyában és a sejten belüli vakuolumok membránjában is megtalálható. A membránban elhelyezkedő Pgp 6-6- szegmensből felépülő két transzmembrándoménből (TMD) áll. (2. ábra) Mindkét TMD-hez 1-1 ATP-kötő domén csatlakozik. A molekula működésekor, a szubsztrát megkötésével együtt ATP-hidrolízis következik be. Ennek felszabaduló energiája olyan konformáció-változást okoz, amely a szubsztrátot a membránon kívülre juttatja. Ahhoz, hogy a Pgp-molekula visszatérjen eredeti, szubsztrátmegkötésre alkalmas állapotába, a másik ATP-kötő helyen bekövetkező újabb ATP-hidrolízis energiája szükséges. (Szécsényi D. és mtsai, 2007.) A szövetekben jelenlévő MDR1 legfőbb feladata az abszorpció és a szekréció. (Glavinas, H. et al. 2004.) Minden multidrug transzporter túlnyomórészt a plazmamembránban helyeződik. Az MDR1 a polarizált sejtek apikális (luminális) oldalán található úgy, mint a bél epithelsejtjeiben, a vese proximális tubulusaiban és a hepatocyták canaliculáris membránjában. Ezzel szemben az MRP1 kizárólag a polarizált sejtek basolaterális membránján helyezkedik el. (Glavinas, H. et al. 2004.)



2. ábra A Pgp-molekula szerkezete

Forrás: MÁL 129. (2007.) 300.o.

- A kemoterápia rezisztencia kialakulásában egy másik, az ABCC alcsaládba tartozó fehérjecsoportnak is fontos szerepe van, ezek az ún. MRP-k (multidrug resistance associated proteins). Az **MRP1** az ABCC alcsaládba tartozó 190kDa molekulatömegű membránfehérje (ABCC1). Az MRP1 a Pgp-hez képest további 5 transzmembrán-szegmenst tartalmaz (transmembrane domain zero-TMD0), amelyek a molekulának a Pgp-hez hasonló felépítésű magjához egy kapcsoló-(linker-) régió segítségével csatlakoznak. Feltehetően ez az ún. TMD0-régió felelős a molekula szervesanion-affinitásáért. Szubsztrátspecificitása hasonló a Pgp-éhez, de fontosak a következő különbségek: a Pgp-vel szemben az MRP1 nem hat a taxánokra, viszont amíg a metotrexátot a Pgp nem képes kipumpálni a sejtekből, addig az MRP1 igen. Az MRP1 a különböző xenobiotikumokkal szemben mutatott rezisztencián kívül a gyulladásozó folyamatok szabályozásában is részt vehet a leukotrién C4 szekrécióján keresztül. A szervezetben általánosan előfordul, a hámsejtek basolaterális részén expresszálódik.

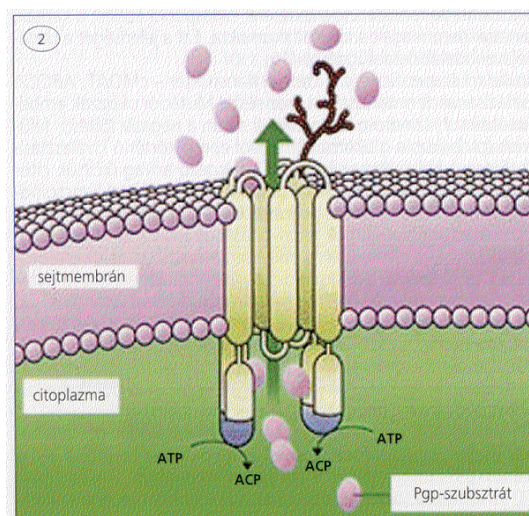
Az **MRP2** (canalicular multispecific organic anion transporter-cMOAT, ABCC2) a szervezet homeosztázisának fenntartásában vesz részt. Számos külső és belső eredetű mérgező anyag (köztük citosztatikumok) semlegesítődik glutationnal, glükuroniddal vagy szulfáttal kapcsolódva, melyeket az MRP2 választ ki az epébe és a vizeletbe. Ez az ABC-transzporter különféle gyógyszerek és antibiotikumok felszívódását akadályozza, ill. kiválasztását növeli. Az MRP2-fehérje elsősorban a máj epecsatornáiban és a vese proximális tubulusában, a hámsejtek (pl. bélhám) apicalis membránjában fejt ki hatását. (Szécsényi D. és mtsai, 2007.)

Úgy tűnik, hogy az MDR1 vagy P-glükoprotein és az MRP1 a leggyakoribb és a legjobban jellemzett oka a terápiarezisztenciának. Mind az MDR1 /Pgp/, mind az MRP1 transzmembrán glikoproteinek, amelyek szubsztrát-specificitása hasonló, annak ellenére, hogy csak 15%-ban tartalmaznak azonos aminosavakat. (Glavinas, H. et al. 2004.)

2.3.2. A Pgp általános biológiai szerepe

A daganatok egyik legjelentősebb tényezője az MDR1 transzporter, vagyis a Pgp működése. Ez a fehérje kipumpálja a sejtekből a mérgező citotoxikus anyagokat, koncentrációjukat a hatásos szint alá csökkenti még mielőtt ezek a sejtmagba vagy annak közelébe jutva, hatásukat kifejthetnék. (3. ábra) Élettani feladatuk pontosan nem ismert, de feltehetően fontos szerepük van a sejtek, ezáltal a szervezet különféle mérgező anyagokkal szembeni védelmében. Jelen vannak többek között a bél, a máj, a vese hámsejtjeiben, a mellékvesében, a placentában, a tüdőben, a perifériás vér sejtjeiben, a csontvelőben, számos endokrin és exokrin szekréción végző szövetben. Ezekben a helyeken akadályozzák a gyógyszerek felszívódását, számos anyagot pumpálnak ki az epébe és a vizeletbe, védik a magzatot az anya vérében található káros anyagoktól. Részt vesznek a vér-agy és a vér-here gát felépítésében és működésében is.

A skót juhászutyák (és keverékeik) jól ismert ivermektin-érzékenységét a Pgp-t kódoló *mdr1* gén deléciós mutációja okozza. Az ilyen állatokban megváltozott szerkezetű, kisebb méretű Pgp termelődik, amely nem képes ellátni szerepét a vér-agy gátban, nem alkalmas arra, hogy megvédje az agyszövetet az ivermektintől, így az felhalmozódik az agysejtekben, ami súlyos toxikózishoz vezet. A Pgp expresszióját vagy funkcióját befolyásoló anyagok a következők: verapamil, kinin, ciklosporin, klorokvin, trifluoroerazin, tamoxifen, surfactantok, progeszteron és egyéb szexuáliszteroidok, kortikoszteroidok, loperamid, ondansetron, doxiciklin, itrakonazol, ketokonazol, digoxin, omeprazol. (Szécsényi D. és mtsai, 2007.)



3. ábra. A Pgp-pumpa működése

Forrás: MÁL 129. (2007.) 302. o.

3.1.1. A Pgp szerepe a kutyák daganatos kórképeiben

Egyes daganatok gyakori intrinszik (eredeti, nem szerzett) kemoterápiarezisztenciája az erőteljes Pgp-(P-glükoprotein) expressziónak köszönhető pl. a hepatocellularis carcinoma és a gyomor-bél rendszer carcinoma esetén. A kutyák és macskák lymphomáinak citosztatikumokkal történő kezelése során gyakori a szerzett terápiarezisztencia. Ilyenkor a kezelés kezdetén gyors remisszió (a daganatok visszahúzódása) következik be, majd később vagy a kezelés befejezését követően, rövidesen a daganatok újra növekedésnek indulnak, relapsus(visszaesés) következik be, a daganat recidivál (visszatér). Az ilyen visszaesett beteg hatékony terápiája már sokkal nehezebb feladat, mint az eredeti daganatos betegség kezelése.

A kutyák különböző típusú daganatai két nagy csoportba sorolhatók aszerint, hogy Pgp mindig vagy csak bizonyos esetekben mutatható ki bennük. Az első csoportba tartoznak például a májdaganatok (emberekben is), a másodikba a lymphomák, a hízósejtes daganatok (mastocytomák) és a húgyhólyag-carcinomák. Számos daganat típus esetén mutattak ki Pgp pozitivitást immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével. Lymphoma esetén 27,2 %-ban tapasztalatakat pozitivitást. A Pgp fontosságát a lymphomás kutyák gyógyításában több tanulmány bizonyítja. Ezekben a tanulmányokban megállapították, hogy a Pgp-expresszió kemoterápia megkezdése előtti szintje fordítottan arányos a remissziós és a túlélési idővel, valamint a visszaeséskor mért Pgp-szint fordítottan arányos a túlélési idővel. (Szécsényi és mtsai, 2007.)

2.2. Az MDR fehérjék (Pgp/MDR1/ és MRP-k) kimutatása

Az MDR-aktivitás egy prognosztikai faktor a túlélési arány meghatározására, és alkalmas a visszaeső páciensek kiszűrésére.(Karász, É. et al. , 2000.)

Legalább három különböző megközelítés létezik a klinikai MDR meghatározására: egyrészt funkcionális tesztek, amelyek mérik a gyógyszerek és a festékek kipumpálását, illetve felhalmozódását; másrészt az expresszió mértéke monoklonális ellenanyagokkal is megállapítható; harmadrészt Northern blot analízissal vagy kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) mRNA szint meghatározható. (Karászi, É. et al., 2001.)

A. *In vivo* módszerek:

A Pgp kimutatása és mennyiségi meghatározása valójában klinikai szempontból nem ad elegendő információt, mert a kezelés kimenetelét illetően szükséges tudnunk, hogy az adott sejt esetén a jelenlevő pumpafehérjék aktivitása milyen fokú. Emiatt számos *in vivo* végezhető funkcionális tesztet is kifejlesztettek, melyek általában azon alapulnak, hogy a vizsgálandó sejtekhez valamilyen Pgp-szubsztrátot adnak, amelynek mennyisége a sejten belül mérhető. Minél több a működőképes Pgp a vizsgálandó sejt membránjában, annál több szubsztrátot pumpálnak ki, így a sejten belül annál kevesebb mutatható ki. Az ilyen rendszerek egy része alkalmas Pgp-inhibitorok hatékonyságának vizsgálatára is. Minél hatékonyabb a Pgp működését gátló anyag, annál több szubsztrát marad a sejtekben. (Szécsényi D. és mtsai., 2007.)

In vivo, a gyógyszereknek át kell jutni a farmakológiai barrieréken azzal a céllal, hogy kötődhessenek a bél epithelsejtjeihez, eloszoljanak a vér-agy gát endothelsejtjeiben vagy a hepatocytákban és a proximális tubulusok epithelsejtjeiben kiválasztódjanak. A sejten keresztüli mozgást az egyrétegű efflux próbával modellálhatjuk, melyet vektoriális transzport próbának is szokás nevezni. Létezik néhány sejtvonala, ami egy permeábilis oszlopon képes növekedni, ahol a sejtek egy összeállt réteget formálnak tight junction-nal. A sejtvonalak polarizált epitheliális vagy endotheliális sejtek, tight junction-nal. Leggyakrabban a humán intestinál epithel sejtvonalat, a kutya veséből származó sejtvonalat és a sertés vese epitheliális sejteket használják erre a célra. A tesztelt gyógyszer illeszkedni tud a sejtréteg egyik oldalára, és a sejtrétegen keresztüli transzport sebességét mérhetjük az apikálistól a basolaterális vagy a basolaterálistól az apikális irányba. Ha egy aktív transzport folyamat megváltoztatja a tesztelt hatóanyag mozgását a sejtmembránon keresztül, akkor a vegyületet különböző gyorsasággal transzportálja a két irányban. Az efflux transporterekre specifikus modulátorok a transzport sebességben felmerülő különbségeket kiegyenlítik, megerősítve ezzel a gyógyszer-transzporter kölcsönhatást. A szállított szubsztrát vagy moduláló ágens kötődése megváltoztatja a szállító fehérje konformációját, így lehetővé teszi a gyógyszer-transzporter kölcsönhatás érzékelését. Egy fluoreszcens-aktivált sejtosztályozón (FACS) alapuló próbát fejlesztettek ki, amelyben egy konformációra érzékeny monoklonális ellenanyag felismeri az MDR1 extracelluláris epitopját. (Glavinas, H. et al. 2004.)

B. *In vitro* módszerek:

In vitro próbákkal lehetséges a multidrug transzporterek és a különböző gyógyszerek és toxikus ágensek közötti interakció mérése. Ezek a próbák főleg azokat a lényeges ABC transzportereket vizsgálják, amelyek részt vesznek a daganatok terápia rezisztenciájában, a gyógyszerek metabolizmusaiban és a toxikózisok kialakításában. A funkcionális *in vitro* tesztek főleg egy szubsztrát áthelyezésének detektálásán, az ATP hidrolízisén vagy a transzporter konformációjában bekövetkező változások meghatározásán alapulnak. A gyógyszer és a transzporter közötti interakció közvetetten is meghatározható, mivel befolyásolja a reagáló szubsztrát transzportját. Másrészt az interakció közvetlenül is detektálható a próbában használt hatóanyag áthelyezésének mérésével. A direkt módszer sokkal alkalmasabb a szubsztrát kiszűrésére. (Glavinas, H. et al., 2004.)

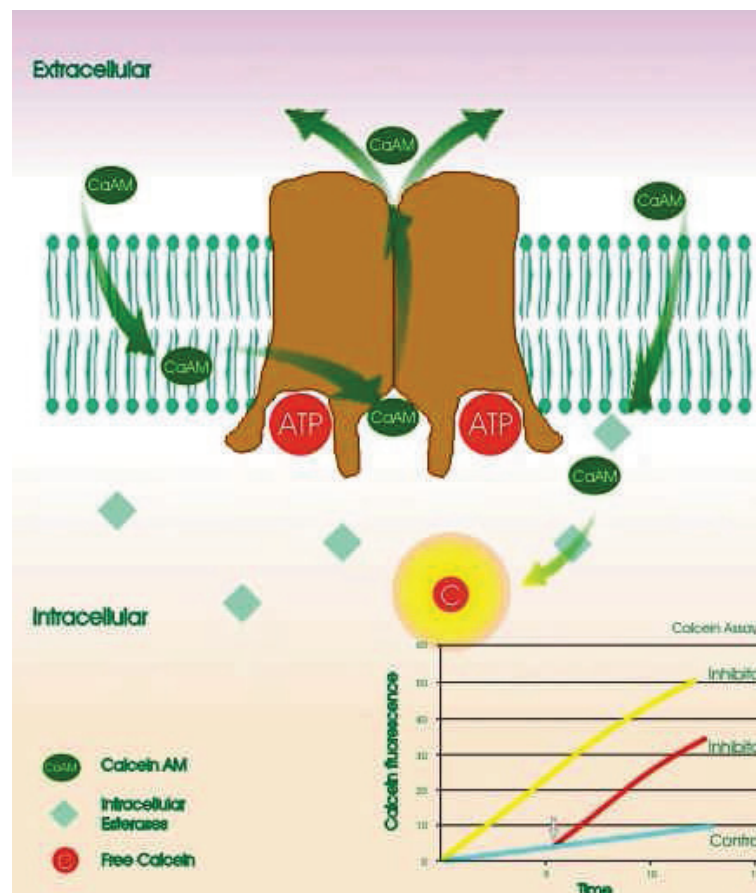
A Pgp fehérje daganatszövetből történő kimutatására és mennyiségi meghatározására többek között az immunhisztokémiai vizsgálat, a Western-blot módszer és a fehérjét kódoló génszakaszból átíródó mRNS kimutatására szolgáló valós idejű polimeráz láncreakció (RT-PCR) alkalmas. Az említett módszerek általában bonyolultak, időigényesek, valamint képzett és tapasztalt szakembereket és speciális laboratóriumi háttérrel igényelnek. Emellett mennyiségi meghatározásra kevésbé alkalmasak. (Szécsényi D. és mtsai, 2007.)

- A funkcionális MDR tesztek számos típusát írták el: ezek közül néhány gyógyszereket (daunorubicin, doxorubicin), mások festékeket (rodamin, calcein, DiOC₂) használnak, mint fluoreszcens próbát. (Karászi, É. et al, 2001.). A szállított szubsztrátokat fluoreszcens festékekkel jelölik meg. Továbbá a fluoreszcens molekulák a különböző transzporterek szubsztrátjai is lehetnek. Mivel a legtöbb teszt hatóanyaga nem fluoreszkál, rendszerint indirekt festékeket alkalmaznak fluoreszcens rodaminnal, amely az MDR1 transzporter szubsztrátja. (Glavinas, H. et al. 2004.) Az ún. CD56+ rodamin efflux vizsgálatot a természetes ölő- (natural killer-NK, CD56+) sejtek Pgp-expressziójának vizsgálatára alkalmazzák. A rodamin egy erős affinitású Pgp-szubsztrát. (Szécsényi D. és mtsai, 2007.)
- Különböző ép és daganatos szövetek Pgp-expressziójának és a Pgp-inhibitorok hatékonyságának vizsgálatára alkalmas az ún. Sestamibi-módszer. Ez egy

radionuklid alapú képalkotó diagnosztikai eljárás, amelyet emberek esetén már széles körben alkalmaznak szívfunkciós vizsgálatokhoz. Újabban a Sestamibi-molekula Pgp-szubsztrát tulajdonságát kihasználva, a daganatok Pgp-expressziójának vizsgálatára használják. (Szécsényi D. és mtsai, 2007.)

- Az ún. calceinpróba fluoreszcencián alapuló módszer, amely többek között alkalmas a terápia rezisztencia mértékének daganatsejtekben történő vizsgálatára, sőt eldönthető, hogy ennek hátterében fokozott Pgp- vagy MRP1-működés áll-e. Ez a módszer nemzetközi szabadalom védelme alatt áll. (Szécsényi D. és mtsai, 2007.). A calcein-próba egy kvantitatív funkcionális MDR próba, amely manapság már a rutin klinikai laboratóriumi eljárások közé sorolható, amely standardizált, olcsó, és megvalósítható az MDR detektálására. A próba mind a P-glükoprotein, mind a multidrug-rezisztencia protein aktivitást észleli, és meghatározza a leukémiás betegek kedvezőtlen terápiára adott válaszát. A nem-fluoreszkáló, szintelen calcein-AM képes áthatolni a sejtmembránon, amelyen keresztül ebben a formában a transzporterek kipumpálhatják a sejtéből. Ha ez a mechanizmus nem történik meg időben, akkor a citoplazmában endogén észterázok hatására hidrolizálódik, leválik a molekuláról az acetoximetil-észter csoport (AM), így fluoreszcenssé válik a vegyület, amely már képtelen a sejtmembránon való átjutásra (4. ábra). Az elpusztult sejtekben a hasító enzim már nem működik, ezért alacsony a sejtekben a fluoreszcens jel. Tehát a fluoreszcens festék felhalmozódását anélkül észlelhetjük, hogy szükségünk lenne a minta mosására, ezáltal alkalmas nagy áteresztőképességű szűrőként. Az MDR1 sejtmembránban való jelenlétekor erősen csökken a calcein felhalmozódása, az MDR1 gátlók a felhalmozódás arányát növelik, egészen a transzporter hiánya esetén tapasztalt szintig. (Glavinas, H. et al. 2004.) A calcein sejtbeli felhalmozódásának csökkenése az inhibitor (pl. verapamil) által blokkolt transzport esetén a transzportaktivitás kvantitatív méréséről nyújt információkat. A calcein-AM-t efflux inhibitorként használják, mert ez a vegyület kitűnő szubsztrátja mind az MDR1-Pgp-nek, mind az MRP1-nek; és így ideálisan tudja szűrni a két fő terápia rezisztenciát okozó fehérje funkcionális jelenlétét. (Karászi, É. et al, 2001.). A calcein fluoreszcenciája független az intracelluláris környezettől (pH-tól, calcium-és magnézium-szinttől) és a kötődéstől. Ez a próba a pumpa-

funkció kvantitatív vizsgálatára szolgál. A calcein-próba eredménye, amelyet a MAF-értékkel fejezünk ki, megbízhatóan és kvantitatívan elkülöníti az MDR-pozitív és MDR-negatív sejteket. További előnye, hogy a szelektív inhibitorok alkalmazásával képes megkülönböztetni az MDR1-Pgp vagy az MRP1 efflux pumpák által okozott terápia rezisztenciát. A klinikumban egyszerre alkalmazzák mindkét pumpafehérje aktivitásának kimutatására. Mivel az 50 μ M-os verapamil blokkolja mindkét efflux-pumpafehérjét, a teszttel szűrhető az MDR1 és az MRP1 aktivitása, és a mért értékek korrelálnak a túléléssel és a terápiára adott válasszal. Ez a megállapítás megjósolja a betegek kezelés során adott terápia rezisztenciára vagy visszaesésre való hajlamát. (Karász, É. et al, 2001.)



4. ábra A calcein próba elve és folyamata

Forrás: Current Drug Delivery, 2004, Vol. 1, No.1., 11. o.

2.3. Az effluxmechanizmus gátlásának lehetőségei

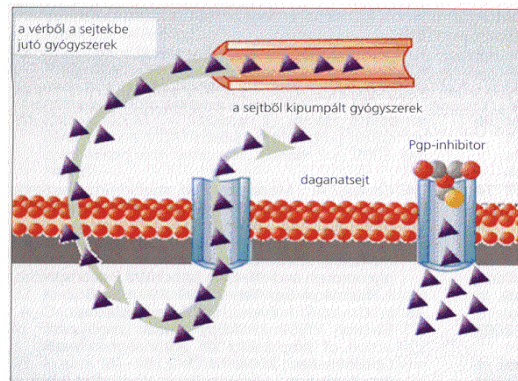
A Pgp-közvetítette MDR kivédésére vagy csökkentésére számtalan vegyületet kipróbáltak, ám ezek többsége valódi áttörést nem hozott. A Pgp-inhibitorok hatásmechanizmusát az 5. ábra mutatja. A véráramból a célsejtbe jutó gyógyszert a Pgp-molekula kipumpálhatja a sejtéből, míg a Pgp-antagonista hatására az a sejtben marad és kifejtheti a kívánt hatást.

Az első generációs Pgp-antagonistákat, mint pl. a kalciumcsatorna-blokkoló verapamil, az immunszuppresszáns ciklosporint és egyes szteroidokat olyan dózisban kellene alkalmazni ahhoz, hogy a Pgp-ellenes hatásuk érvényesüljön, amely súlyos mellékhatásokkal járna.

A második generációs – már kifejezetten a terápiarezisztencia kivédésére kifejlesztett – Pgp-antagonisták, mint a Valspodar (a ciklosporin A-nál 10-szer hatékonyabb ciklosporin D derivátum) a citosztatikumoknak a citokróm-P450 enzim által történő metabolizmusát is gátolják. Emiatt a kemoterápiás szer sokkal lassabban ürül ki a szervezetből, így annak adagját jelentősen csökkenteni lehet, de ez szükséges is a súlyos mellékhatások elkerülése érdekében.

A Pgp működésének gátlására egyéb, nem kompetitív antagonizmuson alapuló módszerek is ismertek. Ilyenek a Pgp elleni monoklonális ellenanyagok, vagy az MDR1 gén expresszióját csökkentő antiszenz-MDR1-oligonukleotidok.

A Pgp által okozott terápiarezisztenciát nemcsak kivédeni és elnyomni próbálták, hanem hasznosítani is. A kemoterápiás szerek egyik legfontosabb, a dózis emelését és a kezelés időtartamát is gyakran korlátozó, nehezen kivédhető mellékhatása a csontvelő működésének súlyos károsítása. Ezt próbálták kivédeni emberben egy génterápiás beavatkozás (géntranszfer) segítségével úgy, hogy a csontvelő sejtjeibe beültették a Pgp-t kódoló MDR1 génszakaszt. Így a kifejeződő Pgp segítségével a csontvelőt megvédték a kemoterápiás szerek károsító hatásától, azokat a daganat hatékonyabb kezelése érdekében a szokásosnál nagyobb adagban is tudták alkalmazni. (Szécsényi D. és mtsai, 2007.)



5. ábra. A Pgp-inhibitorok hatása a daganatsejtekre. A Pgp-gátlók megakadályozzák a véráramból a célsejtbe jutó gyógyszer kipumpálását.

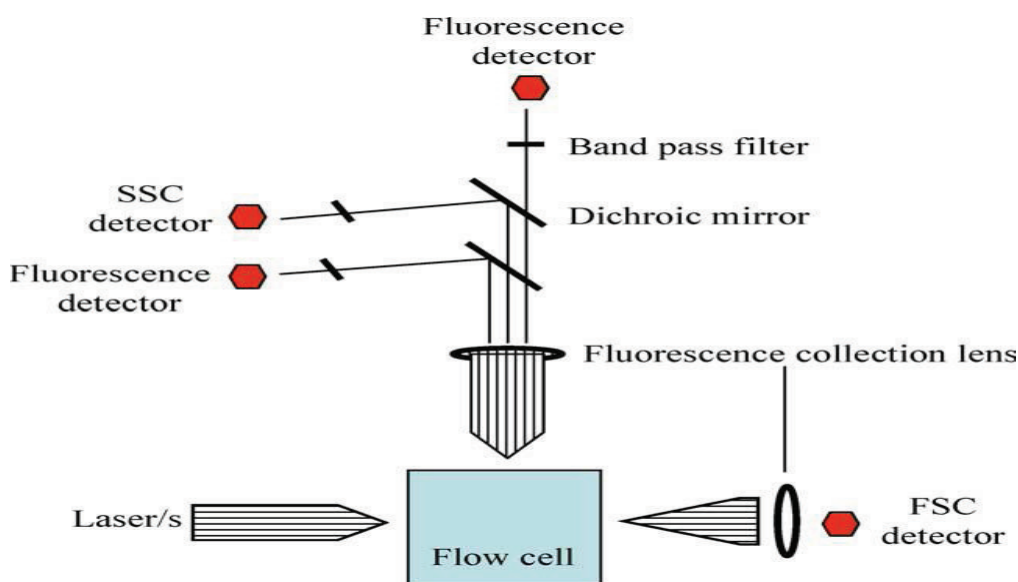
Forrás: MÁL 129. 2007. 367. o.

2.4. Az áramlás-citometria

Az elmúlt évtizedben az áramlás-citóméter (flowcytometer) rendkívül gyorsan alapvető eszközévé vált az orvosi kutatásoknak, főleg az immunológia és a hematológia területein. (Culmsee, K. mtsai. 2001.) Az áramlás-citometria a sejtek fényzórási tulajdonságainak, illetve fluoreszcenciájának mérésein alapszik, melyekből megfelelő számítógépes program segítségével számszerű adatokat kapunk. (Tarrant, J. M. 2005.) Az áramlás-citóméter egyik fontos és rendkívüli előnyös tulajdonsága, hogy képes több paraméter szimultán mérésére, úgy, mint a sejt méret, a citoplasma összetettség, a DNS vagy RNS mennyiség, valamint a membránhoz kötött, illetve sejten belüli fehérjék széles skálája. Ezen felül a módszer másik nagy előnye az, hogy a sejteket egyesével, egymástól különállóan képes elemezni, objektíven azonosítva ezzel a különböző típusú sejteket és azok funkcionális státuszát. (Culmsee, K.-Nolte, I. 2002.),

Az áramlás-citometria során alvadásban gátolt vért, valamint biopsziás lágyszöveti mintából előkészített sejtszuszpenziót egyaránt használhatunk mintaként. A műszer néhány μl -t felszív a mintánkból, majd hidrodinamikus fókuszálással és az oldatban lévő sejtek lamináris áramoltatásával azokat egy oszlopba rendezi. Ezt követően az individuális sejteket lézerténnel világítja meg, így mérhetővé válik azok fényzórása, illetve fluoreszcencia kibocsátása, amennyiben használtunk fluoreszcens reagenseket. Mindezek után két érzékelő segítségével méri a lézerténnel törési szögét. Az úgynevezett „forward scatter” detektor (FSC) a fény sugar irányának kismértékű eltérését érzékeli, mely a sejt méretéről szolgáltat számunkra információt. A fény sugar nagyobb szögű kitérését pedig a „side scatter” érzékelő (SSC) detektálja, amely a sejt belső szerkezetével fog korrelálni. Minél nagyobb a törés szöge, annál

komplexebb a sejt belső felépítése, és fordítva. A továbbiakban a fénysugár fotonjait lencsék gyűjtik össze, különböző filterek, és egy kettős tükörrendszer válogatja szét, majd az úgynevezett „foton-megsokszorozó” csövek (photomultiplier tubes-PMT) és fotondiódák érzékelik őket (6. ábra). Ezt követően a fotonok analóg feszültséggé alakulnak át, melyet a fotodetektor érzékel, és ezt az analóg jelet egy megfelelő számítógépes program számértékekké digitalizálja és fájl formájában tárolja, ami a szoftver segítségével kezelhető. Amennyiben az eljárás során fluoreszcens reagenseket is alkalmaztunk, a sejtek által kibocsájtott fluoreszcenciát további érzékelők mérik (FL). Végül az adatokat a program univariáns frekvencia hisztogramokkal, illetve bivariáns „dot plot” ábrákkal szemlélteti (Függelék 1.;2. ábra). (Tarrant, J. M. 2005.)



6. ábra. A flow cytometer optikái. A lézerefény megvilágítja az individuális sejteket az áramló sejtoszlopban. A szétszóródó fényt a forward scatter (FSC) és a side scatter (SSC) fénydetektorok érzékelik.

Forrás: The Veterinary Journal 170 (2005) 279. o.

Az eljárás számos felhasználási területe (automata hematológiai analizátorok, retikulocita és thrombocyta számlálás, DNS poidítás mérés, immunmediált anaemia és thrombocytopenia diagnózisa) közül a humán medicinában az egyik leggyakrabban használt a leukémia és a lymphoma diagnosztizálása, és a sejtek immunfenotipizálása áramlás-citóméter segítségével. Napjainkban az állatorvosi laboratóriumi diagnosztikának még nem alapvető eszköze az áramlás-citóméter, de a jövőben feltehetőleg, a módszer egyre növekvő szükségessége következtében, mind szélesebb körben fogják alkalmazni. (Culmsee, K.-Nolte, I. 2002.)

3. Anyag és módszer

3.1. A vizsgálatban szereplő állatok és azok csoportosítása

A méréseink során 12 lymphomás, illetve 6 egyéb daganatban szenvedő kutya nyirokcsomóit, illetve daganatos elváltozást mutató szövetszaporulatait vizsgáltuk. A lymphomás betegek fajtái: ónémet juhász, keverék (2), foxterrier, kaukázusi keverék, középászi husky, rhodesiai ridgeback, dogo canario, német dog, basset hound, bordeaux-i dog, boxer. A lymphomás betegek átlagéletkora 6, 58 év, az ivari megoszlása: 9 kan, illetve 3 szuka. A betegek közül két esetben recidivált a betegség és öt esetben hullott el a beteg. A túlélési idő 11 hétnél több. Az egyéb daganatos betegek fajtái: berni pásztor, bolognese, cocker spániel, keverék, wolf spitz, schnauzer keverék. Átlagéletkoruk 10, 33 év, az ivari megoszlásuk: 1 kan, illetve 5 szuka. Az egyéb daganatok csoportját a mastocytoma (2), emlődaganat, carcinoma, adenocarcinoma, átmeneti sejtes carcinoma alkotja. A túlélési idő 36 hétnél több. Az egyéb daganatos betegek közül három hullott el.

A lymphomás betegeket tovább csoportosítottuk aszerint, hogy elhullottak vagy rövid illetve hosszú túlélési időt mutattak, és minimum 15 hete kezelés alatt vannak.

3.2. Mintavétel

A lymphoma diagnózisát valamely elváltozást mutató nyirokcsomóból vett vékonytű-aspirációs citológiai mintából készített levegőn szárított, gyorsfestő oldatokkal festett kenetből és a praescapularis nyirokcsomóból vett biopsziás minta szövettani elemzése alapján mondtuk ki. A lymphomás betegek kezelését az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központban végeztük a COPA-protokoll szerint. A vizsgálathoz szükséges nyirokcsomó-mintákat a praescapularis nyirokcsomó sebészi eltávolítása útján nyertük. A kinyert nyirokcsomókat Hajdú Katalin laboráns készítette elő a vizsgálatokra. Az előkészítés lényege, hogy ki kell nyerni a daganatos sejteket a szöveti kötéllekből. Az apró darabokra vágott nyirokcsomóra 15 ml-es centrifugacsőben Ficoll-reagenst rétegeztünk, majd 1500 rpm fordulatszámra 30 percig centrifugáltuk. A centrifugából kivett minta a Ficollnak köszönhetően rétegekre tagolódik: alul helyezkednek el a vörösvérsejtek, felette a Ficoll, majd a mononukleáris sejtek és a plazma. Mi a középen lévő, mononukleáris sejtréteget izoláltuk, majd háromszor mostuk PBS-sel (foszfát puffer). A vizsgálatokig a megtisztított mononukleáris sejteket mediumba helyezve 37 °C-on tároltuk és szobahőmérsékleten szállítottuk az áramlás-citometriás mérésre, melyet a Magyar Tudományos Akadémia

Semmelweis Egyetem Membránbiológiai Kutatócsoportjában (Budapest, Diószegi út 64.) végeztünk Dr. Karászi Éva és Dr. Várady György irányításával 2009. októbere és 2010. júniusa között.

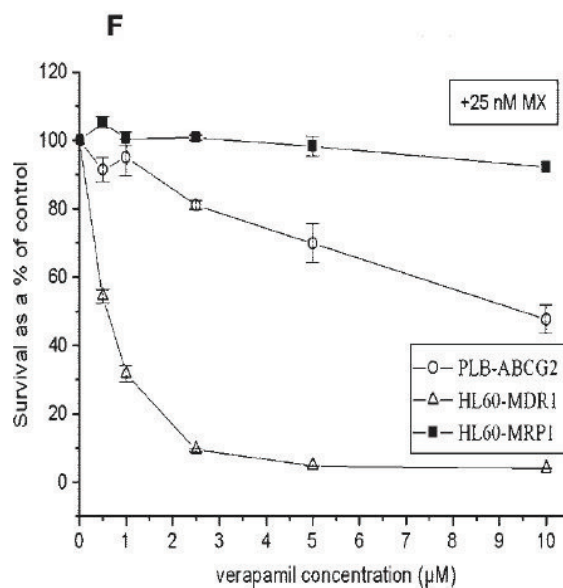
3.3. A mintafeldolgozás és előkészítés

1) A calcein-próbához szükséges oldatok előkészítése:

- **Calcein:** A calcein-AM-ből (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 50 µg-ot mértünk 500 µl DMSO-ba (dimetil-szulfoxid), így kaptunk egy 100 µM-os törzsoldatot. (A molekulatömege alapján (994,9 g/mol) számolva 50 µg-ot oldottunk fel 502,5 µl-ben.) Erre az oldószerre azért van szükség, mert apoláros közeget biztosít a hidrofób calcein-AM molekulának, amely így oldódni képes. Ezt a törzsoldatot 20 µl-enként Eppendorf-csövekbe raktuk, majd -20 °C-on tároltuk. Az így kapott reagens-oldat körülbelül egy évig tárolható ezen a hőmérsékleten (*Karászi, É. és mtsai. 2001.*)
- **Verapamil:** Ez a vegyület az MDR1 és az MRP1 pumpafehérjéket egyaránt gátolja 50µM koncentrációban (*Hollo és mtsai, 1994; 1998*). Miután legátolta mindkét fehérjét, a calcein sejtbeli szintje magasabb értéket mutat, mint a gátlás nélküli esetben, mivel a sejt nem lesz képes kipumpálni azt.

1 mg por alakú Verapamilt (494,06 g/mol, Sigma) mérünk 8,15 ml HBSS-be (Hanks' balanced salt solution, Sigma), és így kapunk egy 250 µM-os törzsoldatot. Funkcionális teszt lévén a sejteknek cukorra van szükségük az életben maradáshoz és a működéshez, melyet a HBSS-ben lévő glükóz nyújt. Az oldat + 4, illetve – 20 °C-on tárolva is több mint egy évig megőrzi az inhibitorikus aktivitását (*Karászi, É. és mtsai. 2001.*)

Az MK571 DMSO-ban oldva nem fejt ki megfelelő gátló hatást, vizes oldatban frissen feloldva jól működik, de így -20 °C-on is csak egy hétig tárolható! Mivel a rendelkezésükre álló MK571 már elég régi volt (2009. áprilisában készítették) és a nem hozta olyan szépen a várható eredményeket, ezért kezdetben lecseréltük a verapamil 10 µM-os koncentrációjára, amely csak az MDR1 pumpafehérjét gátolja (7. ábra Özvegy-Laczka, Cs. Et al, 2004.), majd a tavaszi mérések során párhuzamosan alkalmaztuk a két reagenst.



7. ábra. A 10 µM verapamil hatása: az MDR1-et gátolja.

Forrás: Mol. Pharmacology 65: 1489. o. (2004.)

Özvegy-Laczka Cs. És mtsai, 2004.

- **MK-571:** Ez a vegyület alkalmas az MRP1 pumpafehérje szelektív gátlására (Urtti, A. és mtrsa. 2004.). A gátlást követően a sejtbeli calcein szint a gátlás nélküli és a verapamillal gátolt értékek közé fog esni, ha MDR1 aktivitása is van a sejteknek, mivel az MK-571 (Cayman Chemical Company) csak az egyik fehérjét blokkolja a kettő közül. A por alakú MK-571 reagensből 5 mg-ot mérünk 1,86 ml desztillált vízbe, és az így kapott 5 mM-os törzsoldatot 200 µl-enként Eppendorf-csövekbe mértünk. A kapott oldat -20 °C-on több mint egy hétig tárolható. DMSO-val készített oldatában több mint 6 hónapig tárolható. (Calbiochem)

2) A calcein-próbához szükséges minták előkészítése:

A nyirokcsomó-szuszpenzió előkészítése az áramlási citometriai mérésekhez kismértékben eltér a vérmintáknál tapasztaltakhoz képest. Ennek legfőbb oka a minta magas sejttartalma (sűrűsége) és a nyirokcsomó feldolgozásból megmaradó nagyobb sejtaggregátumok, illetve szövetmaradványok a mintában, amelyek könnyűszerrel eltömíthetik a flow-cytométert. Ennek kivédésére többféleképpen hígítottuk a mintáinkat:

Kezdetben megpróbáltuk a vérmintákra alkalmazott protokollt követni: a mintából 15 ml-t Falcon csőbe pipettáztunk és lecentrifugáltuk, majd az üledéket HBSS-sel hígítva hozzámértük a reagensekhez. Ebben az esetben azt tapasztalattuk, hogy a mérések alkalmával az áramlási citométer eldugul, hosszasan kell öblíteni a mintafellevő kapillárist.

A következő alkalommal a láthatólag sejtgazdag mintát hígítottuk: először lecentrifugáltuk a szuszpenziót 1300 rpm, 5-6 percig, majd a felső 5-6 ml-t leszívtuk, és 10-szeresére hígítottuk, majd újra lecentrifugáltuk és a fehér üledéket (amely a lymphocytákat tartalmazza) HBSS-be felvettük. Ha láthatólag kevesebb sejt van a mintában (főleg egyéb daganatok esetén), akkor vortexelés után a nagyobb sejtaggregátumokat hagyjuk leülepedni és a felülúszót HBSS-be pipettázzuk úgy, hogy a térfogata elég legyen a 6, illetve a 8 csőbe, melyek a reagenseket tartalmazzák (kb. 3,6 -4,8 ml).

A hígítás harmadik módjaként a nyirokcsomó-szuszenziót 10 percig ülepedni hagytuk, majd a felülúszót 10-szeresére hígítottuk (1 ml felülúszó+ 9 ml HBSS) és újra ülepedni hagytuk 10 percig; az így kapott felülúszót használtuk fel a mérésekhez, ami már a nagyobb sejtaggregátumoktól mentes volt.

A következő lépésben a felhígított mintát 21°C-on, 1300 rpm-en, 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót leöntve a cső alján maradtak a mononukleáris sejtek. Ezeket a sejteket felvettük 4000 μ l HBSS-be, majd az assay-hez szükséges vegyületek törzsoldatainak kihígításához kezdtünk hozzá. A 100 μ M-os calcein-AM törzsoldatból 1,25 μ M-os oldatot kellett készítenünk. Ez 80-szoros hígítást jelent, így 20 μ l-t, egy adagot, 1600 μ l-re kellett hígítanunk. Tehát 20 μ l törzsoldathoz adtunk 1580 μ l HBSS-t. Az MDR1 és az MRP1 gátlásához a 250 μ M-os verapamil törzsoldatot (= végtérfogatra vonatkoztatva 50 μ M-os oldat) nem kell hígítani. Az MDR1 gátláshoz szükséges végkoncentrációra vonatkoztatott 10 μ M-os oldatot a 250 μ M-os oldat ötszörös hígításával állítottuk elő (100 μ l 250 μ M-os verapamil + 400 μ l HBSS). Az MK-571 törzsoldata 5 mM, melyből 50 μ M-os oldatot kellett készítenünk (100-szoros hígítás). Ezt úgy tettük, hogy 4 μ l törzsoldatot 396 μ l HBSS-sel 400 μ l-re hígítottuk. Mindezek után egy mintához 6, illetve 8 műanyag csövet készítettünk elő. Mindegyikre ráírtuk a kutya azonosítóját, majd azt a betűt,

amelyik vegyülettel a fehérjét legátoltuk. Két cső nem tartalmazott gátlóanyagot, ezekben csak HBSS-be vettük fel a sejteket, így a csövekre H betűt írtunk. Azok a csövek, amelyekben 50 μM -os verapamilt alkalmaztunk a V_1 , V_2 , amelyekben 10 μM -os verapamilt V_3 , V_4 jelzést kapták. Azok a csövek, amelyekben MK-571 inhibitor használtunk, az M jelzést írtuk. A mérések pontossága érdekében mindegyik oldatból 2-2 csövet készítettünk elő (V_1 , V_2 , H_1 , H_2 , V_3 , V_4 , M_1 , M_2), így egy kutya nyirokcsomómintájához 8 csőre volt szükségünk, melyekbe 600-600 μl -t mértünk a HBSS-es sejtszuszpenzióból. Az 3. táblázatban láthatók a csövekbe kerülő további anyagok, és azok mennyisége. A pontos mérésekhez 100-1000 μl -es pipettát használtunk.

3. táblázat Egy kutya nyirokcsomó-suszpenziójából készített 8 minta összetétele

	V1	V2	H1	H2	V3	V4	M1	M2
sejtszuszpenzió	600 μl	600 μl	600 μl	600 μl	600 μl	600 μl	600 μl	600 μl
Verapamil 250 $\mu\text{mol/l}$	200 μl	200 μl						
HBSS (kontroll)			200 μl	200 μl				
Verapamil 10 $\mu\text{mol/l}$					200 μl	200 μl		
MK-571 50 $\mu\text{mol/l}$							200 μl	200 μl
5 perc előinkubáció 37 °C-on								
Calcein-AM 1,25 $\mu\text{mol/l}$	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl
összesen	1000 μl	1000 μl	1000 μl	1000 μl	1000 μl	1000 μl	1000 μl	1000 μl
10 perc inkubáció 37 °C-on								
Végső verapamil konc	50 $\mu\text{mol/l}$	50 $\mu\text{mol/l}$			10 $\mu\text{mol/l}$	10 $\mu\text{mol/l}$		
Végső MK- 571 konc.							10 $\mu\text{mol/l}$	10 $\mu\text{mol/l}$
Végső calcein konc.	0,25 $\mu\text{mol/l}$	0,25 $\mu\text{mol/l}$	0,25 $\mu\text{mol/l}$	0,25 $\mu\text{mol/l}$	0,25 $\mu\text{mol/l}$	0,25 $\mu\text{mol/l}$	0,25 $\mu\text{mol/l}$	0,25 $\mu\text{mol/l}$

Miután belemértünk mindegyik csőbe 600 μl HBSS-sejtszuszpenziót, illetve a jelölésnek megfelelő 200 μl gátló/kontroll- oldatot, az összes csövet 37°C-os vízfürdőben 5 percre inkubáltuk. Ez alatt az idő alatt a különböző koncentrációjú verapamilok és az MK-571 kifejtették inhibitorikus hatásukat a megfelelő fehérjéken. Ezt követően mindegyik csőbe még a vízfürdőben 200 μl calcein-AM oldatot pipettáztunk, Vortex-szel megkevertük, majd ismét 37°C-os vízfürdőbe helyeztük a mintákat 10 percre. Ezzel a calcein-AM sejtmembránon át

történő mozgását segítettük elő. Miután letelt az inkubációs idő, a mintáinkat 4°C-on, 2500 rpm-en, 1 percig centrifugáltuk. A 4°C hatására az egész reakció leállt. A centrifugálást követően a felülúszót leöntöttük, így a műanyag csövek alján maradtak a mononukleáris sejtek, és néhány nemkívánatos vörösvérsejt. Mindezek után viabilitás vizsgálatot alkalmaztunk. Ezzel a módszerrel a sejteket egy olyan oldatba vesszük fel, mellyel a mérés során eddig elpusztult sejteket szűrjük ki. Erre a célra propidium-jodidot (PI) használtunk, amely a sérült sejtmembránon át képes behatolni a citoplazmába, sőt a sejtmagba is, és a DNS két szála közé interkalálódva megjelöli azt. A propidium-jodid fényérzékeny vegyület, így megfelelő hullámhosszúságú fény hatására fluoreszkál, melyet az áramlási-citóméterrel mérni tudunk. A propidium-jodid 1 µg/ ml oldatából 300-300 µl-t adtunk minden csőhöz (3 ml HBSS-be 3µl PI-t teszünk). Utolsó lépésként még enyhe Vortex-es keverés szükséges, majd jégre tesszük a csöveket a reakció leállítása érdekében, és következhet a mérés. (Karászi, É. és mtsai. 2001.)

3.4. Az áramlás-citometriás mérés

A mérések során a FacsCalibur flow-cytométert használtuk (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA). Minden általunk használt fluoreszcens festéknek van egy úgynevezett abszorpciós spektruma, amely hullámhosszon gerjeszhető. A gerjesztés hatására keletkező energiát az illető molekula adott hullámhosszon fluoreszcencia formájában fogja leadni. Ezt emittálásnak nevezzük, az adott hullámhosszúságot pedig emissziós spektrumnak. Ennek megfelelően a készülékben két lézert és négy fénydetektort találhatunk. Az egyik lézerforrás kék színű lézert fényt bocsát ki, amely 488 nm-en gerjeszti a fluoreszcenciára képes molekulákat, melyek az esetünkben a calcein és a propidium-jodid. Az energiabólus hatására ezek a vegyületek rájuk jellemző hullámhosszúságú fényt kibocsátására képesek, melyet a megfelelő detektorral mérhetünk, jelölésük: FL. Mindegyik detektor csak adott spektrumban képes érzékelni a molekulák fénykibocsátását, így ennek megfelelően a különböző vegyületek emissziójának mértékét különböző csatornákon mérhetjük. Pl. calcein esetében 520 nm-en, a propidium-jodidot 570 nm-en mérhetjük.

A gép mintát vesz a behelyezett sejt-oldat szuszpenzióból, majd a két lézersugár előtt a sejteket egyesével áramoltatja el, melyek így a fényugár haladási irányának megváltozását okozták. A lézersugár további útjának két lehetséges verziója van, az egyik az egyenes vonalban való tovahaladás (forward scatter-FSC), a másik a megtörés (side scatter-SSC). Az FSC a mérettel arányos (X-tengely), az SSC pedig a granuláltsággal (Y-tengely). A

lézerfényre merőlegesen elhelyezkedő, megfelelő sávszűrőkkel ellátott detektorok érzékelték a keletkezett fluoreszcens jel intenzitását, majd a készülék a mért értékeket külön-külön grafikusán és számszerűen is ábrázolta a Cellquest program segítségével. Minden egyes mintából 5000 sejtet kell begyűjtenie a készüléknek ahhoz, hogy az eredmény statisztikailag elfogadható legyen. Mivel azonban a mintákban a mononukleáris sejteken kívül néhány egyéb sejt is előfordult (vörösvérsejt, granulocyták, halott sejtek), melyek téves eredményeket okozhatnak, ezért ezeket négy különböző szinten ki kellett szűrniük („gating-kapuzás”).

- R1: Ezzel a kapuval a méret és a granuláltság alapján különítettük el a szükséges sejteket, a lymphocytákat és a monocytákat, valamint a nem kívánt sejteket (vörösvérsejt, granulocytá).
- R2: Ezzel a kapuval azokat a sejteket tudtuk kiszűrni, melyeknél egy bizonyos szinten felül volt az 520 nm-es emittálás, tehát viszonylag magas volt az IC calcein szintjük (mononukleáris sejtek, vörösvérsejtek, granulocyták), illetve azokat, amelyek az adott hullámhosszon alacsony szinten emittáltak, tehát nem vették fel a calcein-AM-t, többnyire az előkészítés során keletkezett „törmelék” jelentették.
- R3: Ezzel a kapuval azokat az élő sejteket válogattuk ki, amelyeknél alacsony volt a 670 nm feletti hullámhosszon történő emittálás, tehát nem vették fel a viabilitás-vizsgálathoz használt vegyületet, a propídium-jodidot, mivel ép a sejtmembránjuk. Az elpusztult sejtekben következésképpen magas emissziót mértünk ezen a hullámhosszon a membránkárosodás miatt.
- R4: Az FL2-A paraméter alapján kizárjuk a legapróbb eseményeket (FL2-area görbe alatti terület). A görbe alatti terület mérésével a sejtek közül kiszűrhetők a nagyobb méretű aggregátumok, és a legkisebb sejtörmelékek is kizárhatók a mérésből.

A méréseinkhez azokra a sejtekre volt szükségünk, amelyek mind a négy kapuban benne voltak, tehát mononukleárisak, egy bizonyos szinten felüli IC calcein szintjük van, élnek, és közepes mérettartományba esnek. Az adatok kiértékelését a BD CellQuest Pro programmal végeztük.

A továbbiakban a bent maradt sejtek calcein tartalmát vizsgáltuk a készülékkel.

Az IC calcein szintet az 520 nm-es hullámhosszúságú kibocsátott fény mértéke alapján ítélte meg az áramlás-citóméter. Attól függően, hogy a sejtekhez adtunk-e valamilyen pumpafehérje gátlót vagy sem, más-más IC calcein értékeket tudunk mérni. Nyilvánvalóan a sejtbeli vegyületszintet a pumpafehérjék száma és a MAF érték is befolyásolta. A HBSS-es kontroll csövekben mértük mindig a legalacsonyabb IC calcein szintet, mivel ezekben nem használtunk inhibitorokat. Ezekben a sejtekben a fluoreszcencia mértéke 10^2 körüli. Az 50 μM -os verapamillal gátolt minták esetén ez az érték 10^3 , melynek oka az, hogy mind az MDR1-nek, mind az MRP1-nek inhibitora, így a calcein a sejtekben maradt. Az MK-571-gyel gátolt mintákban a kettő közé esett a mért IC vegyület szint (10^2 - 10^3), mivel csak az MRP1-et gátolta le. A 10 μM -os verapamillal gátolt mintákban is a két érték közé esett az IC vegyület szint (10^2 - 10^3), mivel csak az MDR1-et gátolja le. (Ezek mind relatív értékek, csak egymáshoz képest értelmezhetők, nem az abszolút értékük számít, hanem a kezelések között fennálló különbségek.) Az inhibitorokat (verapamil, MK-571) tartalmazó minták mért értékei és a kontroll (HBSS) mintákban mért értékek különbségei adták meg a membránban elhelyezkedő fehérjék aktivitásának mértékét, amelyet multidrug rezisztencia aktivitási faktorról (MAF-értékként) jellemezhetünk. Amennyiben a kontroll csoport (HBSS) értékeit az 50 $\mu\text{mol/l}$ -es verapamillal gátoltak értékeihez viszonyítjuk, akkor megkapjuk az MDR1 és az MRP1 együttes MAF értékét, míg ha ugyanezt az MK-571-el gátolt értékekből tesszük, csak az MDR1 aktivitására tudunk következtetni. Ha a kontroll csoport (HBSS) értékeit a 10 $\mu\text{mol/l}$ -es verapamillal gátoltak értékeihez viszonyítjuk, akkor megkapjuk az MRP1 aktivitását, mivel az MDR1-et gátolja.

3.5. Statisztikai vizsgálatok

A kapott értékeim között felmerülő esetleges kapcsolat felderítésére statisztikai módszereket használtunk. Az összes beteg összes paramétereinek együttes vizsgálatához Pearson-féle korrelációs módszert alkalmaztunk, a lymphomás és az egyéb daganatos betegek paramétereik közötti különbség megállapításához pedig kétmintás, nem egyenlő varianciájú Student-féle t-próbát.

Vizsgálati eredményeink kiértékelése céljából a vizsgált kutyákat két csoportra osztottuk: egy csoportot a lymphomás betegek, a másikat az egyéb daganatban szenvedő betegek képezték. Egy beteg nyirokcsomó-mintáinak vizsgálata során további négy csoportot hoztunk létre, aszerint, hogy adtunk-e a nyirokcsomó-szuszpenzióhoz membrán-transzport fehérje gátlót, vagy sem: HBSS-nincs gátlás, 50 μ M VP-verapamillal gátoltuk, 10 μ M verapamillal, illetve MK571-el gátoltuk.

A lymphomás és az egyéb daganatos betegek összehasonlítását F-próbával vizsgáltuk, de egyik összehasonlításban sem találtunk szignifikáns eltérést, ezért alkalmaztuk a kétmintás kétszélű nem egyenlő varianciájú Student-féle t-próbát. A kis elemszám miatt egyéb statisztikai próbát nem alkalmaztunk. Az MRP1 kétféle módszerrel történő meghatározásának kiértékelését lineáris regressziós analízissel végeztük.

Az analízisekhez a Microsoft Excel 2007. (Microsoft Corporation 1985-2001.) és Statistica (Statsoft) programot alkalmaztuk.

A különböző mért és kórelőzményi, valamint túlélési adatokat Pearson-féle korrelációs módszerrel az SPSS for Windows 12.0 statisztikai programmal hasonlítottuk össze.

4. Eredmények

Annak érdekében, hogy láthatóvá tegyük az MDR1, illetve az MRP1 aktivitások változását a beteg kutyákban, calcein próbát végeztünk. Az eljárás során mértük a nyirokcsomó-szuszpenzióból Ficoll reagens segítségével szeparált lymphocyták fluoreszcencia értékeit, amely az intracelluláris calcein mennyiségétől függ. A sejten belül maradt calcein mennyiségét elsősorban a sejtmembránban lévő multidrug-rezisztencia fehérjék aktivitása befolyásolja, így a kapott eredményekből a MAF értékeket is ki tudtuk számolni a következő egyenletek segítségével (Hollo et al. 1994.)

- $MAF (mrp1+mdr1) = \frac{IC \text{ fluoreszcencia } (50\mu M \text{ verapamil}) - IC \text{ fluorszc. (HBSS)}}{IC \text{ fluoreszc. } (50\mu M \text{ verapamil})} \times 100$
- $MAF (mrp1) = \frac{IC \text{ fluoreszc. (MK571)} - IC \text{ fluoreszc. (HBSS)}}{IC \text{ fluoreszc. (MK571)}} \times 100$
- $MAF (mdr1) = \frac{IC \text{ fluoreszc. (10}\mu M \text{ verapamil}) - IC \text{ fluoreszc. (HBSS)}}{IC \text{ fluoreszc. (10}\mu M \text{ verapamil})} \times 100$ vagy
 $= MAF (mrp1+mdr1) - MAF (mrp1)$

4.1. IC calcein szintek

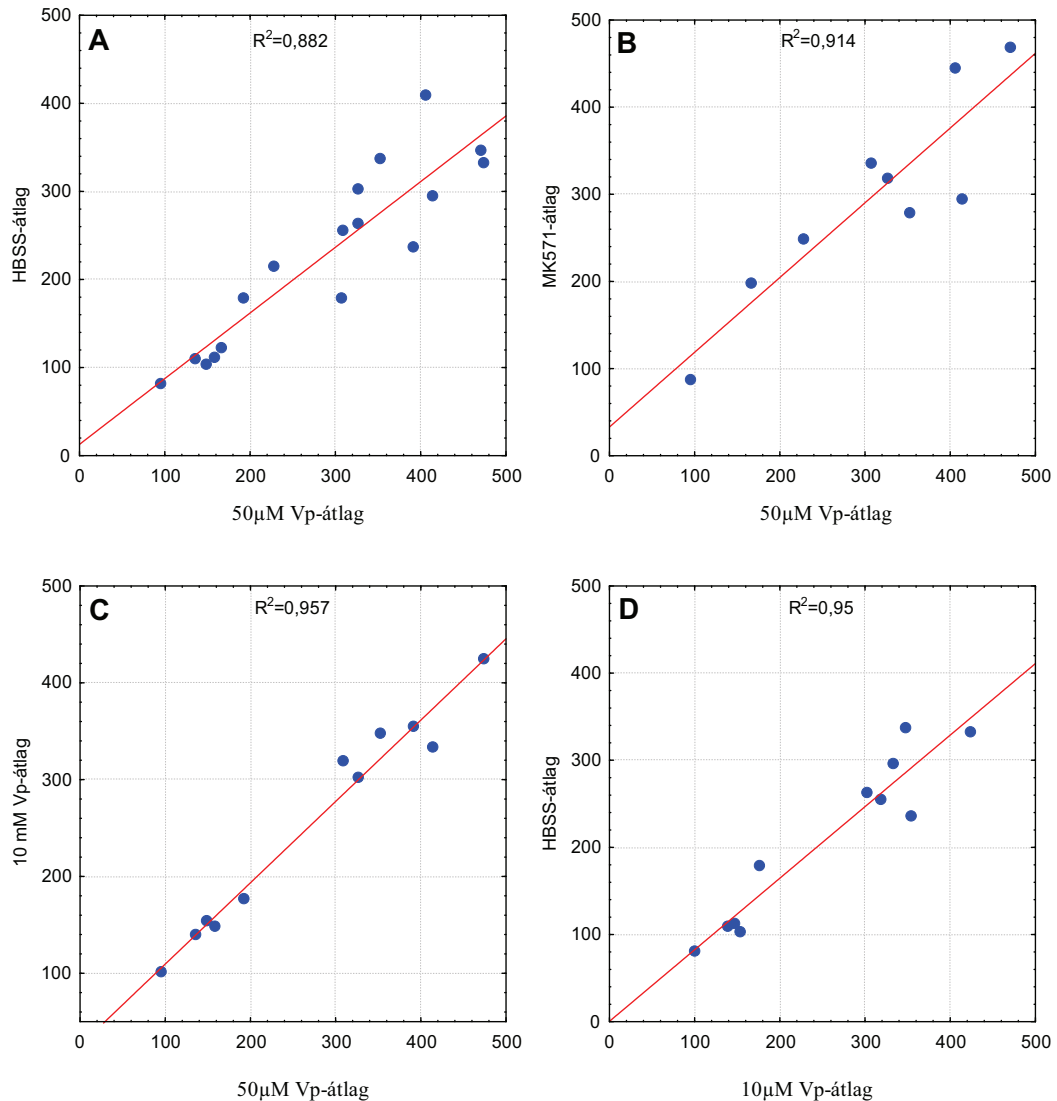
A szimplán HBSS-ben felvett, gátlószert nem tartalmazó mintákban mértük a legalacsonyabb fluoreszcenciát, tehát ezekben a lymphocytákban volt a legalacsonyabb a sejten belüli calcein akkumuláció. Azokban a mintákban, ahol az 50 μ M verapamilt (VP) használtuk inhibitorként, ott tapasztaltuk a legmagasabb fluoreszcenciát, az MK571-el és a 10 μ M verapamillal gátolt minták esetében pedig a HBSS-es és az 50 μ M verapamilos mérések értékei közötti intracelluláris calcein szinteket mértük.

Tehát:

- IC calcein (50 μ M VP) > IC calcein (MK) > IC calcein (HBSS),
- IC calcein (50 μ M VP) > IC calcein (10 μ M VP) > IC calcein (HBSS),

Az eredményeink átlagolását követően azt tapasztaltuk, hogy a lymphomás betegekben a verapamil nagy dózisának alkalmazása során nyert calcein okozta fluoreszcencia értékek korrelációt mutatnak a kezeletlen (8.A. ábra), az MK571 gátlószerral

(8.B.ábra) és 10 μ M verapamillal (8.C.ábra) végzett kezelés esetében tapasztalható értékekkel. Emellett a membrántranszporter gátló kezelésben nem részesült sejtek calcein okozta fluoreszcencia értékei korrelációt mutatnak a kisdózisú verapamilos gátlás során nyert értékekkel is (8.D.ábra).

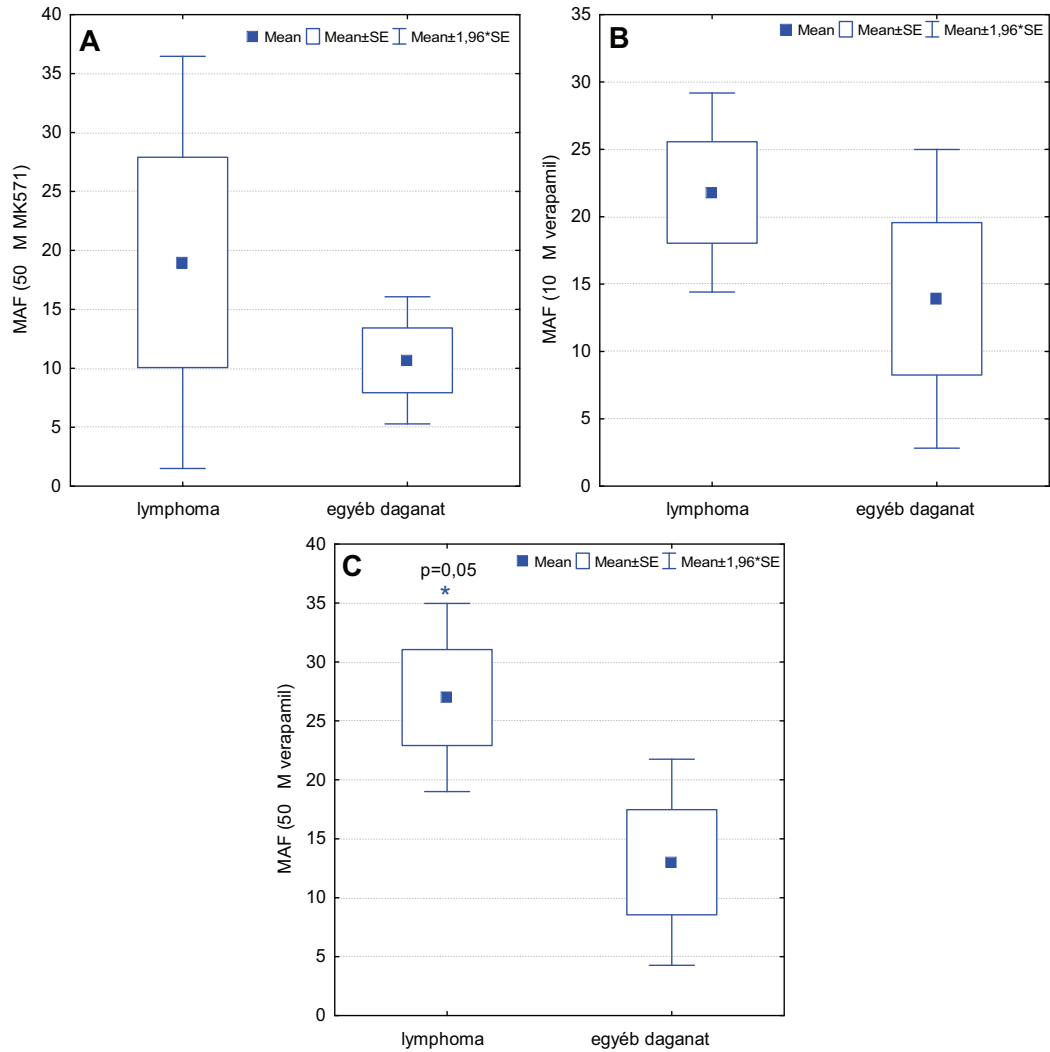


8. ábra Korrelációs vizsgálatok a vizsgált csoportok fluoreszcencia értékei között.

4.2. MAF-értékek

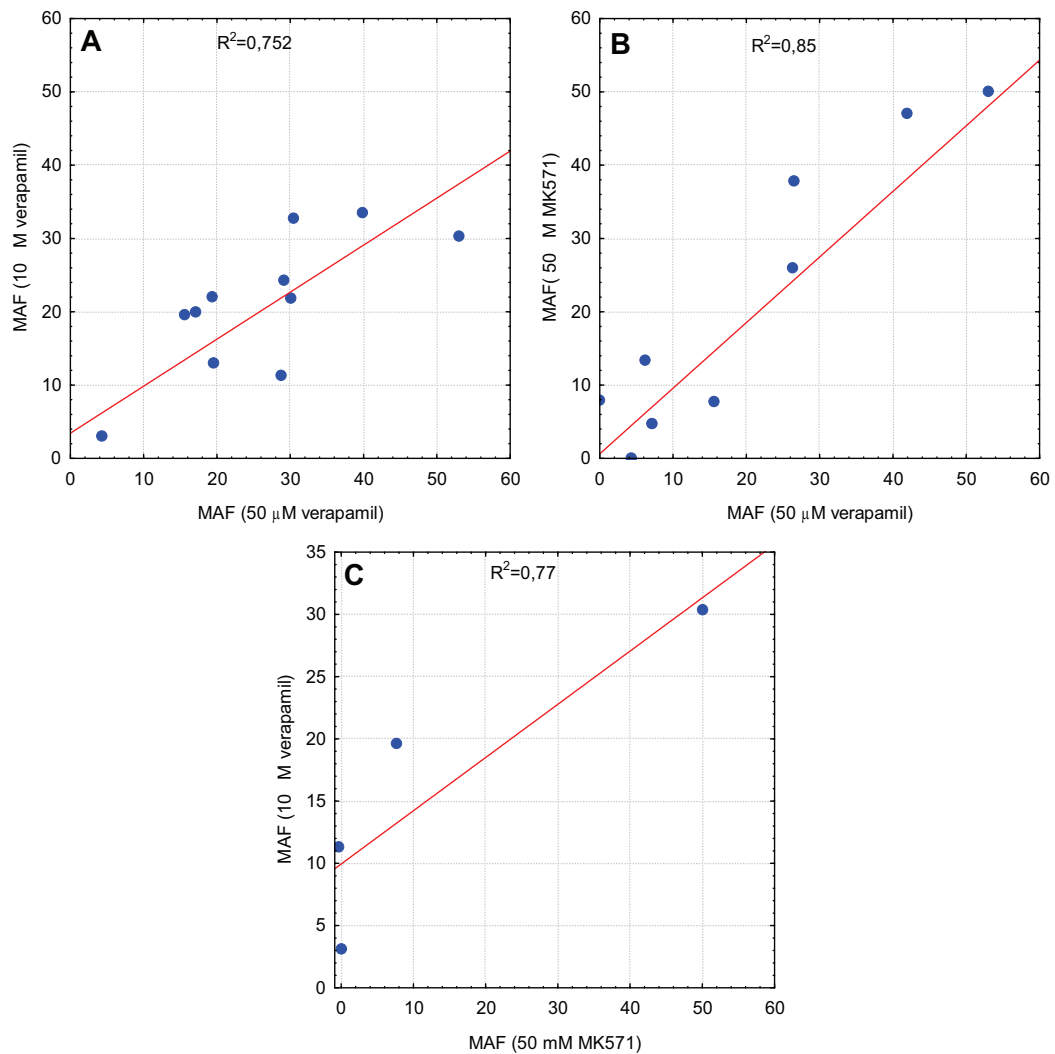
Vizsgálataink során a kapott fluoreszcencia értékek alapján egy függvény segítségével kiszámoltuk külön az MDR1 (MAF(mdr1)), külön az MRP1 (MAF(mrp1)), valamint a két fehérje együttes multidrug-rezisztencia aktivitását is (MAF (mrp1+mdr1)). A kapott eredményeket átlagolva azt találtuk, hogy a lymphomás betegek MAF-értékei nagyobbak az egyéb daganatos betegek MAF-értékeihez képest. Az erre vonatkozó eredményeket a 9. ábra

mutatja be, mind az 50 μ M MK571 (9.A.ábra), mind a 10 μ M verapamil (9.B.ábra), illetve az 50 μ M verapamil (9.C. ábra) esetében, amely szignifikánsnak adódott.



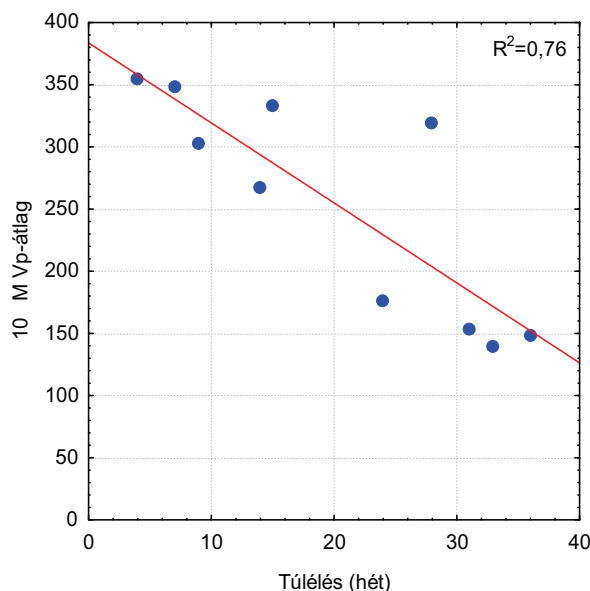
9. ábra. A MAF-értékekkel elvégzett Student-féle t-próba eredményei a lymphomás és az egyéb daganatos betegeket tekintve.

Ha a membrántranszporter aktivitási funkciókat külön elemezzük, akkor az előző eredményekhez hasonlóan a nagy dózisú verapamil alkalmazásával nyert értékek korrelációt mutatnak a kis dózisú verapamil okozta aktivitási értékekkel (10.A. ábra), és az mrp1 specifikus gátlása (MK571) során nyert értékekkel (10.B. ábra), illetve összefüggést mutat, ha a verapamil kis dózisát (MDR1 gátlás) és az MK571 gátlót (mrp1 gátló) vetjük össze (10.C. ábra).



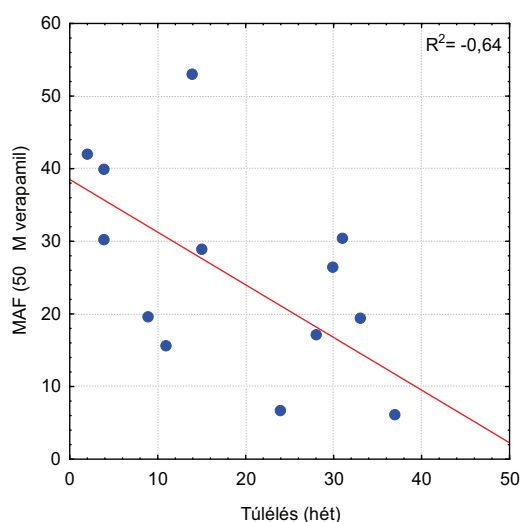
10. ábra Korrelációs vizsgálatok a vizsgált csoportok MAF-értékei között

A verapamil kis dózisa, ami az MDR1 gátlását jelenti, fordított korrelációt mutat a túlélési idővel a lymphomás betegpopulációban (11. ábra) A calcein okozta fluoreszcencia növekedéséből arra következtetünk, hogy nagy mennyiségű MDR1 pumpafehérje van a sejtekben. A beteg kutyákban jelenlévő nagy mennyiségű pumpafehérje képes kipumpálni a kemoterápiás szereket, amely csökkenti a túlélési időt.



11. ábra Összefüggés a 10 μ M verapamil és a túlélési idő között.

A vizsgált beteganyagot tekintve a MAF (50 μ M verapamil), amely mindkét pumpafehérjét gátolja, fordítottan arányos a túlélési idővel. A nagyobb elemszám érdekében a heterogén populáció adatait használtuk fel számításainkhoz, melyekből levonható, hogy azoknak a betegeknek, amelyeknél a két transzporter nagyobb mennyiségben expresszálódik, kisebbek a túlélési esélyei. (12. ábra)



12. ábra Összefüggés a MAF (50 μ M verapamil) és a túlélési idő között.

5. Megbeszélés

5.1. Célkitűzéseink megvalósulása

Célkitűzésünk az, hogy a különböző tumoros szövetekből nyert biopsziás mintákból szeparáljunk el daganatosan elfajult sejteket, melyekben ezt követően vizsgálhassuk a membrán-transzport fehérjék funkcióját a calcein-próba segítségével. Ezen fehérjék kimutatásához a már előzetesen vérmintákra kialakított protokollt alkalmaztuk, amely a nyirokcsomó esetében némi változtatásokra szorult. Ilyen változások: a mérések előtt a szuszpenzió hígítása a benne lévő nagy mennyiségű sejt miatt, ami könnyűszerrel eltömíti a Facs Calibur áramlás-flowcytométert. A méréseinkből arra következtethetünk, hogy bár nagy mennyiségű mononukleáris sejt szabadult fel a Ficoll reagenssel való kezelés során; a humán mintákhoz hasonlóan szóba jön a nyirokcsomók aprítása utáni tripszin/pepszinnel végzett emésztése a szöveti kötélék minél hatékonyabbi felbontása érdekében. A Ficollal kezelt mintákban rendszeres volt az összetapadt sejtaggregátumok jelenléte, amelyeket precízen el kellett különíteni a mononukleáris sejtektől.

A vizsgálatainkat nyirokcsomóból Ficoll-reagenssel szeparált mononukleáris sejtekből végeztük. Így mondhatjuk, hogy a daganatos sejtekből vizsgáltuk azok MDR funkcióját. A kísérletben arra voltunk kíváncsiak, hogy a betegek daganatsejtjeinek MAF értéke a kemoterápiás kezelés hatására változott-e, illetve a MAF-értékekből előrejelezhető-e a betegek túlélési ideje.

5.2. Eredményeink értelmezése

A calcein-próba során a HBSS-es mintáknál kaptuk a legalacsonyabb intracelluláris fluoreszcencia értékeket. Ennek oka, hogy ezekben az esetekben nem használtunk effluxpumpa inhibitorot, így a sejtmembránban expresszáldott összes transzport fehérje működőképessége révén kipumpálta a mintához hozzáadott, és a sejtek által diffúzióval felvett fluoreszcens calcein molekulákat. A legmagasabb sejten belüli fluoreszcenciát az 50 μ M verapamillal gátolt mintáknál mértünk, mivel ez a vegyület együttesen az MRP1-et és az MDR1-et is képes gátolni ilyen koncentrációban, így a pumpafehérjék gátlása következtében a sejtbe bejutott calcein mennyisége teljes egészében bent is maradt. Amennyiben az MK571-et alkalmaztuk, mint membrán-transzport fehérje gátlót, akkor a kapott fluoreszcencia érték az előző kettő közé esett. Ez annak köszönhető, hogy az MK571 csak az MRP1-et gátolta, míg az MDR1-et nem, így a továbbra is funkcionáló MDR1 az

intracelluláris calcein bizonyos részét a sejten kívülre jutatta. Nyilvánvalóan a fluoreszcencia csökkenés mértéke, tehát a kipumpált calcein mennyisége, az MDR1 mennyiségétől és aktivitásától függött.

A 10 μ M verapamil, mint membrán-transzport fehérje gátló alkalmazása esetén is a HBSS-sel és az 50 μ M verapamillal mért érték közé esik a kapott fluoreszcencia érték, mivel a verapamil 10 μ M-os koncentrációban csak az MDR1-et gátolja, míg az MRP1-et nem, így a tovább funkcionáló MRP1 az intracelluláris calceint a sejten kívülre juttatja. Tehát a fluoreszcencia csökkenés mértéke, a kipumpált calcein mennyisége, az MRP1 mennyiségétől függ. A 10 μ M verapamil értékek közvetetten alkalmasak (az MK571 által közvetlenül meghatározható) MRP1 aktivitásának meghatározására.

Az MDR pozitivitás függ azoktól a különbségektől, amelyek a minta elkészítése, típusa, a használt antitest kötődése, és az MDR1 és MDR3 fehérjék közötti lehetséges keresztreakció során adódnak. (Karász, É. et al., 2001.)

5.3. Az eredményeikből levont következtetések

- Azon egyedek sejtjei mutatnak nagyobb fluoreszcencia értékeket calcein hatására bármely kezelés során, amelyek eleve jobban veszik fel a calceint, vagy kevésbé pumpálják ki magukból. Ugyanezen megállapítás igaz a kezeletlen sejtek esetében is, vagyis az egyedek sejtjei arányaiban hasonlóan mutatnak fluoreszcenciát a calcein hatására. A membrántranszporter funkció jelzi a valós pumpa-aktivitást. A MAF érték azt a valós fluoreszcenciát mutatja, amelyet az adott pumpa gátlásával elérünk. A pumpafunkcióban gátolt sejtekben mért fluoreszcencia értékekből kivonjuk azon sejtek értékeit, amelyeket nem gátoltunk (tehát, amelyekben mégis maradt calcein annak ellenére, hogy a membrántranszportereit nem akadályoztuk működésükben, így spontán megtartják a calceint). (Hollo, Z. et al, 1994.)
- A nagy dózisú verapamil hatására nyert aktivitás szoros korrelációt mutat azon értékekkel, mint amikor csak az MDR1-et, vagy csak az MRP1-et gátoljuk, illetve a két specifikus gátlás is egyenes arányosságban áll egymással. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az általunk vizsgált lymphomás nyirokcsomók felszínén mindkét transzporter expresszálódik, illetve a nagy dózisú verapamil valóban mind az MDR1, mind az MRP1 fehérjét gátolja. (Karászi, É. et al, 2001.)

- A 10 μM verapamil esetén tapasztalt fluoreszcencia érték fordított arányban van a túlélési idővel. Ez azt jelenti, hogy több calcein maradt a sejtekben, tehát nagyobb fluoreszcencia érték esetén jobban gátlódik az MDR1. A korrelációs adatokból (8. ábra) adódóan valószínűsíthető a transzporter nagyobb mennyisége, az MDR1 okozta *in vivo* terápia rezisztencia miatt pedig a betegek daganatai kevésbé mutatnak remissziót (gyógyulást) a kemoterápiás szerek hatására. Bár a korreláció nem a MAF-értékben mutatkozott, mégis fontos kiindulópontot jelenthet a későbbi nagyobb populációban végzett vizsgálatok számára. (Bergman, P.J. et al, 1996). A MAF (50 μM verapamil) értékeket alapul véve elmondható, hogy azok a daganatos sejtek, amelyek felszínükön mindkét rezisztenciafehérjét expresszálják, kevésbé reagálnak a daganatellenes kezelésre, ami a túlélési idejüket rontja. (Szécsényi, D. és mtsai, 2007.)

6. Összefoglalás

A „flow”, vagy áramlás citometria lényege, hogy folyadékfázisban ultravékony tubusban áramló sejteket lézertény segítségével világítjuk meg, és a fénytörésük jellemzői alapján számítógép segítségével virtuálisan el tudjuk különíteni őket egymástól. Így hasonló tulajdonságú sejteket a más tulajdonságú sejtektől elkülönítetten tudjuk vizsgálni. Ilyen műszer alkalmas a rutin hematológiai vizsgálatok elvégzésére, de más célból is használható. Ha a sejteket immunológiai módszerrel fluoreszkáló anyag kapcsolásával jelöljük, akkor az adott sejt fluoreszkáló tulajdonsága megváltoztatja a lézertény törését, így a sejt elkülönítetten vizsgálható. Ez az ún. FACS (fluorescence activated cell sorting) eljárás. Ez a módszer alkalmas arra, hogy a sejtek membrántranszporter funkciója vizsgálható legyen. Ha a sejtekhez fluoreszkáló molekulát (calcein) adunk és inkubáljuk, akkor ez az anyag a sejtekbe jut. Amennyiben a sejt rendelkezik membrántranszporter fehérjékkel (P-glikoprotein /Pgp/, multidrug resistance associated protein-1 /mrp1/) és ún. „multidrug” rezisztencia funkcióval, akkor a calceint a sejtek kipumpálják magukból.

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a kemoterápiás kezelésben részesülő 12 lymphomás és 6 egyéb daganatos betegek daganatsejtjeinek membrántranszporter funkciója között van-e különbség.

A kutyák nyirokcsomójának, illetve szövetszaporulatainak lymphoid sejtjeit szeparáltuk, majd azok egy részét membrántranszporter gátló anyag hozzáadása nélkül calcein-nel inkubáltuk, egy másik részéhez 50 μ M-os verapamil-t adtunk, amely a Pgp és az mrp1 gátlója, harmadik részéhez ún. MK571 molekulát adtunk, amely az mrp1 gátlója, negyedik részéhez 10 μ M-os verapamil-t adtunk, amely az MDR1 /Pgp/ gátlója. Végül a három gátlóanyagot tartalmazó sejtszuspenzióhoz is calceint adtunk. A FACS vizsgálat során mértük a sejteken belüli fluoreszcenciás aktivitás mértékét. Agátlás nélküli és a gátlóanyagokat tartalmazó sejtek eltérő fluoreszcenciás aktivitásának kifejezéséhez kiszámítottuk az ún. MAF-(multidrug rezisztencia aktivitási faktro-) értékeket. Ezek jelzik a sejtek Pgp és mrp1 funkcióját.

7. Summary

Principles of flow cytometry is the illumination of cells by laser light, which are flowing in an ultrathin tube. These cells can be separated virtually according to their light scattering by computerised technique. Thus the similar cells can be examined separately from cells with other character. Such an instrument is suitable for routine haematology examinations, but can be used for other purposes. If the cells are signed with fluorescent molecules by immunological methods, the cell will change its light scattering, so it can be examined separately. This called as FACS (fluorescence activated cell sorting). This method can be used to detect the membrane transporter function of the cells. If we add fluorescent molecule (calcein) to the cells, and incubate them, then this molecule will penetrate into the cells. If the cells have membrane transporter proteins (P-glycoprotein /Pgp/, multidrug resistance associated protein-1 /mrp1/) and multidrug resistance function, than the cells will efflux calcein.

In our study we were interested in whether the membrane transporter function of separated lymphoid cells of 12 dogs with lymphoma receiving chemotherapy is different from the same function of lymphoid cells of 6 dogs with other tumors.

Lymphoid cells from lymphonodes samples of dogs were separated into four parts. One was incubated with calcein without inhibitors. Second part was inhibited by 50 μ M verapamil, which inhibits both, Pgp and mrp1. The third part was inhibited by MK-571 molecule, which inhibit mrp1 only. The fourth part was inhibited by 10 μ M verapamil, which inhibit mdr1 only. All inhibited cell solutions were then incubated with calcein. We analysed the intracellular fluorescence of the cells by FACS method. In order to express the fluorescent activity of the inhibited and non inhibited cells we calculated the MAF-(multidrug resistance activity factor-) values. These will characterize the Pgp and mrp1 function of the cells.

8. Rövidítések jegyzéke

ABC-ATP binding cassette transporter
ATP- adenzin-trifoszfát
Calcein-AM- calcein acetoximetil-észter
DNS- dezoxi-ribonukleinsav
FACS- Fluorescence activated cell sorting
FL- fluoreszcencia detektorok
FSC-„forward scatter”
GSH-redukált glutation
GST-glutation-S-transferase
HBSS- Hanks’ balanced salt solution
kDa- kilodalton
LTC4-leukotrién C4
MAF-multidrug rezisztencia aktivitási faktor
MDR-multidrug rezisztencia
MDR1-Pgp
mRNS- messenger RNS
MRP- multidrug resistance-associated protein
MVP- major vault prozein
PBS-foszfát puffer
Pgp- permeability glükoprotein
PI-propídium-jodid
PMT-„ photomultiplier tubes”
RNS-ribonukleinsav
RT-PCR- real time polymerase chain reaction
SSC- „side scatter”
TMD-transzmembrán domén
VP-verapamil

9. Irodalomjegyzék

1. Bergman, P. J.-Ogilvie, G.K.-Powers, B. E. : Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: Sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma.
Journal of Veterinary Internal Medicine, Vol 10, No 6, 1996. 354-359.
2. Blackwood L. – German A.J.- Stell A. J. and O’neill T.: Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy. *Journal of Small Animal Practice (2004) 45: 259-262.*
3. Chan H. S. L.- Haddad G.- Zheng L.- Bradley G.- Dalton W. S.- Ling V.: Sensitive immunofluorescence detection of the expression of P-glycoprotein in malignant cells.
Cytometry 29: 65-75 (1997)
4. Cui, Y.-König, J., Buchholz, U. -Spring, H. –Leier, I. –Keppler, D.: Drug resistance and ATP dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells.
Molecular Pharmacology 55: 929-937. (1999)
5. Culmsee, K. - Nolte, I.: Flow cytometry and its application in small animal oncology.
Methods in Cell Science 24: 49–54 (2002).
6. Culmsee, K.- Simon, D.- Mischke, R.- Nolte, I.: Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma.
Journal of Veterinary Medicine 47. (2001.) 199-206.
7. Fournel-Fleury, C.- Magnol, J. P. et al.: Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas : comparison with human non-Hodgkin’s lymphomas.
J. Comp. Pathol. 117. (1997) 35-59.
8. Ginn, P. E.: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin embedded normal and neoplastic canine tissues.
Veterinary Pathology 33: 533-541 (1996)
9. Glavinas H.-Krajcsi P.-Cserepes J.- Sarkadi B.: The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity.
Current Drug Delivery, 2004, Vol.1, No 1,1-16
10. Greenlee, P. G. – Flippa, D. A. et al.: Lymphomas in dogs: A morphologic, immunologic and clinical study. *Cancer 66. (1990) 480-490.*
11. Hollo, Z.-Homolya, L.- Davis, C.W.-Sarkadi, B.: Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter.
Bioch. Biophys. Acta 1191. (1994.) 384-388.
12. Karászi Éva és munkatársai: Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia.
British Journal of Haematology, 2001, 112, 308-314.

13. Krick E.L.- Billings A.P.- Shofer F.S.- Watanabe S.-Sorenmo K.U.: Cytological lymphonode evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival.
Veterinary of Comparative Oncology 2009. Vol 7, 2: 130-138.
14. Kunos, V.- Vajdovich, P.- Vörös, K. – Perge, E.: A lymphomas kutyák vizsgálata és gyógykezelése során nyert tapasztalatok, különös tekintettel a túlélést befolyásoló tényezőkre. I. rész. Irodalmi áttekintés
Magyar Állatorvosok Lapja, 126. (2004.) 676-686.
15. Lee J. Y.-Tanabe S.- Shimohira H.- Kobayashi Y.- Oomachi T.- Azuma S.- Ogihara K. Inokuma H.: Expression of cyclooxygenase-2, P-glycoprotein and multi-drug resistance-associated protein in canine transitional cell carcinoma.
Research in Veterinary Science 2007, 83. pp 210-216.
16. Lee, J.J.-Hughes, C.S.-Fine, R.L.- Page, R.L.: P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance.
Cancer, 77. (1996) 1892-1898.
17. Lymphoma In: Morris, J.- Dobson, J.: *Small Animal Oncology 2001. 228-239.*
18. Mealey, K. L.- Barhoumi, R.- Rogers, K.- Kochevar, D. T.: Doxorubicin induced expression of P-glycoprotein in a canine osteosarcoma cell line.
Cancer Lett, 126. (1998) 187-192.
19. Myoshi N. –Tojo E. – Oishi A.- Fujiki M. – Misumi K. – Sakamoto H. – Kameyama K. Shimizu T. – Yasuda N.: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors.
J. Vet. Med. Sci. 64 (6) 2002 Jun 531-533.
20. Myers N. C. 3rd, - Moore A. S. –Rand W. M. – Gliatto J.- Cotter S. M.: Evaluation of a multidrug chemotherapy protocol (ACOPA II) in dogs with lymphoma.
Journal of Veterinary Internal Medicine 11 (6) 1997 Nov-Dec. 333-339.
21. Özvegy-Laczka Cs.- Hegedűs T.-Várady Gy.- Ujhelly O.- Schuetz J. D.-Váradi A.- Kéri Gy. Németh K.- Sarkadi B.: High-affinity Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter.
Molecular Pharmacology 66: 1485-1495, 2004.
22. Pratt, S. E.- Ma, L. – Cao, J. Et al.: Identification and characterization of the canine multidrug resistance-associated protein. *Can. Res. Vol 1. 2002. 1335-1342.*
23. Szécsényi, D. – Vajdovich, P.- Gaál, T.- : Terápiarezisztenciát okozó pumpafehérjék szerepe különböző kórképekben. 1. rész *Magyar Állatorvosok Lapja 129. 2007. 295-305.*
24. Szécsényi, D. – Vajdovich, P.- Gaál, T.- : Terápiarezisztenciát okozó pumpafehérjék szerepe különböző kórképekben. 2. rész *Magyar Állatorvosok Lapja 129. 2007. 361-370.*

25. Tarrant, H.- Coley, H. M.: Overcoming multidrug resistance in cancer : an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer control* 10. 2003 159-165.
26. Tarrant, J. M.: The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine
The Veterinary Journal 170 (2005) 278-288.
27. Tuohy J.L.-Milgram J.- Worley D. R.- Dernell W.S.: A review of sentinel lymph node evaluation and the need for its incorporation into veterinary oncology.
Veterinary of Comparative Oncology 2009. Vol 7, 2: 81-91
28. Uozurmi, K.- Nakaichi, M.- Yamamoto, Y.- Une, s.- Taura, Y.: Development of multidrug resistance in a canine lymphoma cell line.
Research Veterinary Science 78. 2005. 217-224.
29. Urtti, A.- Vellonen, K-S.-Honkakoski, P.: Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity.
Europ. Journ. Phar. Scien. 23. (2004) 181-188.
30. Vail, D. M.- MacEwen, E. G.- Young K. M.: Canine lymphoma and lymphoid leukemias
In: Withrow, S. J. – Mac Ewen, E. G. et al.: *Small Animal Oncology*, 3rd ed.
Philadelphia, 2001. 558-584
31. Vajdovich P.: A kemoterápiás kezelés eredményei kutyák lymphomájának gyógyításában II.
Kisállatpraxis 2001. 2. (1.) 2-8.

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Vajdovich Péternek a szakdolgozatom elkészítésében nyújtott segítségével.

A minták feldolgozásához igazi csapatmunkára volt szükség, így nagy köszönet illeti:

- Dr. Mihalik Lászlót, aki a nyirokcsomók és a daganatos szövetszaporulatok sebészi eltávolítását végezte
- Hajdú Katalin laboránst, aki a kimetszett szöveteket mérésre alkalmas állapotra készítette elő
- Dr. Karászi Évát és Dr. Várady Györgyöt, akik megtanították a mérési protokollt, irányították a munkámat és a flow-citométerrel megmérték a mintáinkat.
- Szabó Bernadettet, aki a statisztikai számítások szemléltetésére ábrákat készített és segített a dolgozat összeállításában.

Munkám során a rengeteg tanácsot, segítséget, helyesírási hibáim kijavítását Schmidt Attilának köszönhettem.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönetet mondok szüleimnek tanulmányaim során nyújtott támogatásukért és biztatásukért.

11. Függelék

1. táblázat

Törzsszám	Fajta	Kor (év)	Ivar	Szöveti diagnózis
Lymphomás				
141-148	ónémet juhász	10	szuka	Marginális zóna
152-161	foxterrier	9	szuka	Diffúz nagy B-sejtes lymphoma
156-166	kaukázusi keverék	7	kan	Diffúz nagy B-sejtes lymphoma
162-172	keverék	5	szuka	Follikuláris Centrumsejtes
183-194	középázsiai husky	7	kan	Follikuláris Centrumsejtes
180-191	rhodesiai ridgeback	7	kan	Diffúz nagy B-sejtes lymphoma
212-224	dogo canario	6	kan	Diffúz nagy B-sejtes lymphoma
215-227	német dog	3	kan	Diffúz nagy B-sejtes lymphoma
361-385	keverék	6	kan	Follikuláris Centrumsejtes
393-422	basset hound	7	kan	Diffúz nagy B-sejtes lymphoma
413-443	bordeaux-i dog	6	kan	Precursor T-sejtes
427-458	boxer	6	kan	Plazmás
Egyéb daganat				
154-164	berni pásztor	6	szuka	mastocytoma
68-69	cocker spániel	8	szuka	carcinoma
172-182	keverék	10	kan	adenocarcinoma
122-127	wolf spitz	14	szuka	mastocytoma
137-144	schnauzer keverék	12	szuka	átmeneti sejtes carcinoma
3-3 Amál	bolognase	12	szuka	emlődaganat

2. táblázat

A kutyák IC fluoreszcencia értékei

Törzsszám	50 VP	HBSS	MK571	10 Vp
Lymphoma				
141-148	327,9	298,205	315,745	
152-161	324,735	307,925	320,65	
156-166	470,985	346,72	468,045	
162-172	307,165	178,11	336,2	
183-194	135,465	109,095		139,91
180-191	148,49	103,375		153,635
212-224	474,815	331,625		423,89
215-227	392,245	235,95		354,99
361-385	397,285	186,43	373	267,715
393-422	95,995	80,96	87,76	100,71

413-443	352,895	337,42	278,755	348,2
427-458	415,06	295,36	294,43	332,985
Egyéb daganat				
154-164	228,77	214,76	248,065	
68-69	192,125	179,315		176,515
172-182	327,53	263,265		302,78
122-127	308,345	255,585		319,205
137-144	157,97	111,855		147,65
Amál 3-3	406,45	409,11	444,31	

A hiányzó értékek azért láthatók, mert az MK571 hatékonyságát kifogásolva a 10 μ M-os verapamil alkalmaztuk. Mind a 3 inhibitor csak az utolsó 4 alkalommal használtuk.

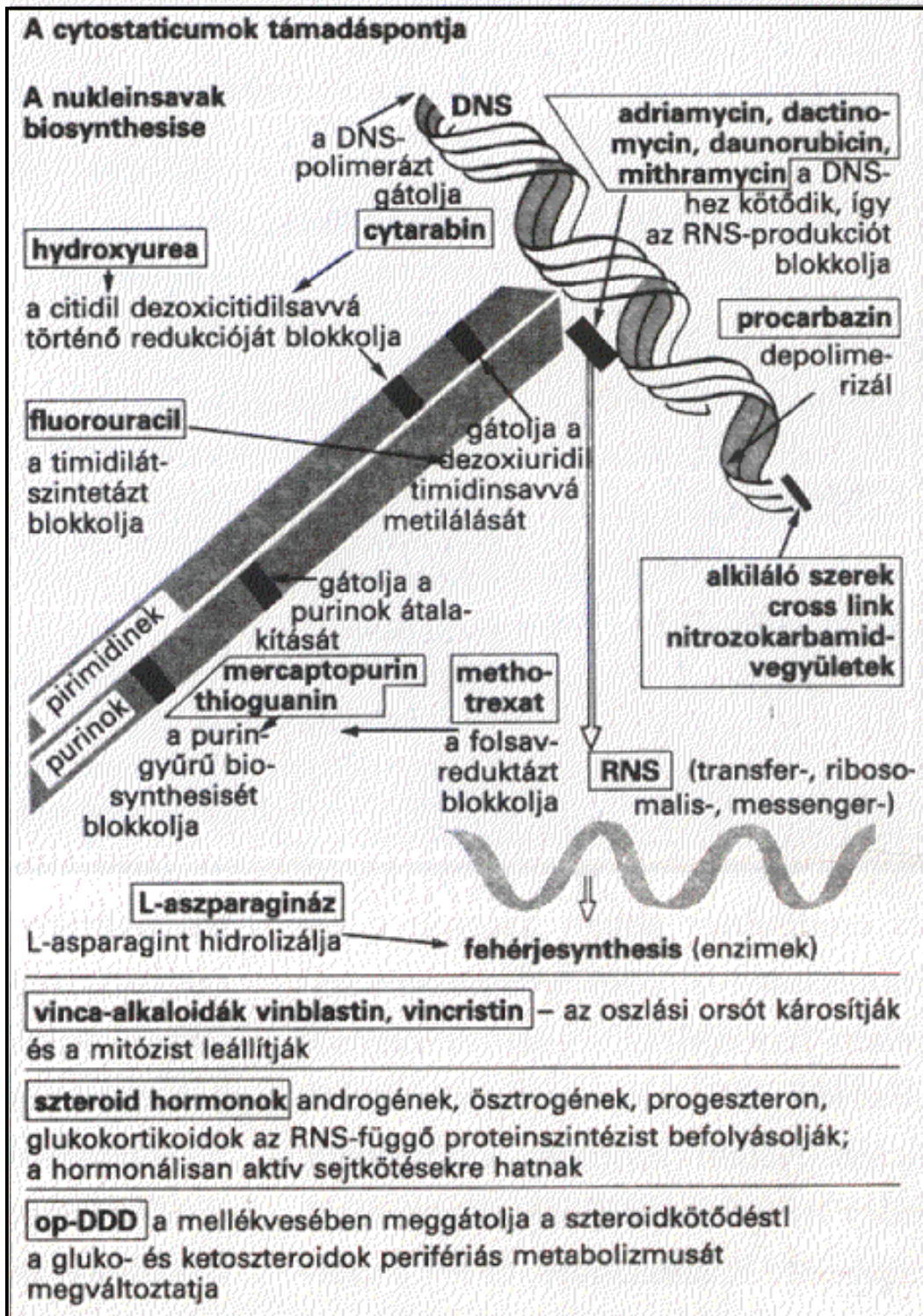
3. táblázat

A kutyák MAF értékei

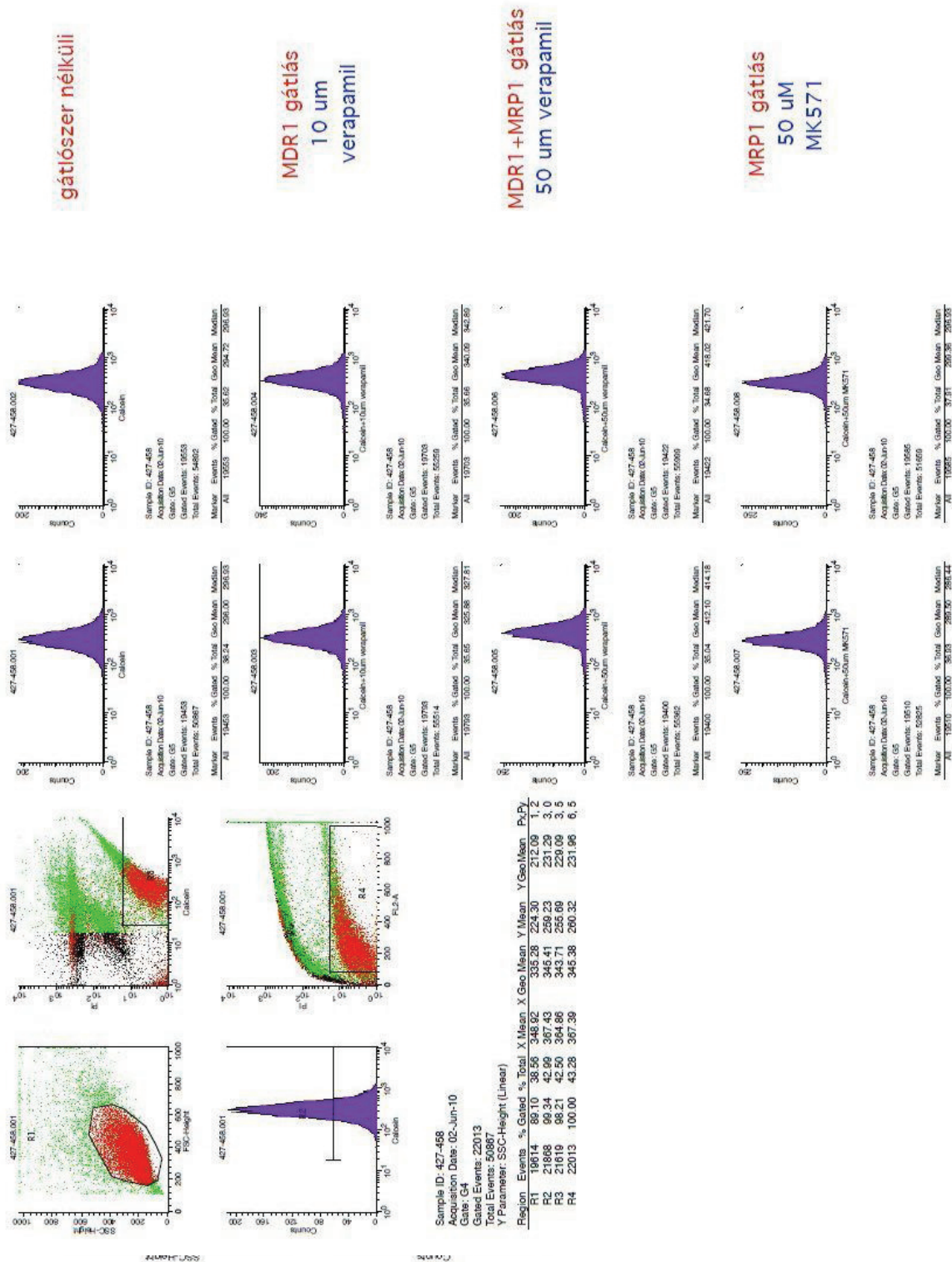
Törzsszám	MAF (mrp1+mdr1)	MAF(mrp1)	MAF (mdr1)
Lymphoma			
141-148	21,156	37,7571	
152-161	7,1163	4,7667	
156-166	26,384	25,9217	
162-172	42,0149	47,0226	
183-194	19,4663		22,0249
180-191	30,3825		32,7139
212-224	30,157		21,7663
215-227	39,8463		33,5333
361-385	53,074	50,0188	30,3625
393-422	15,6623	7,7484	19,6108
413-443	4,3851	-21,0454	3,0959
427-458	28,8392	-0,3159	11,2993
Egyéb daganat			
154-164	6,1241	13,4259	
Amál 3-3	-0,6544	7,9224	
68-69	6,6675		-1,5863
172-182	19,6211		13,0507
122-127	17,1107		19,9308
137-144	29,1923		24,2431

1. ábra A citosztaticumok támadáspontja. Az összefoglaló ábrán a citosztaticus szerek genetikai hatásmechanizmusa látható.

Forrás: Vajdovich P., Kisállatpraxis 2001. 2. (1.) 2-8.



2. ábra: 156-166 törzsszámú lymphomás beteg áramlás-citometriás mérésének eredményei



3. ábra: 427-458 törzsszámú lymphomás beteg áramlás-citometriás mérésének eredményei

