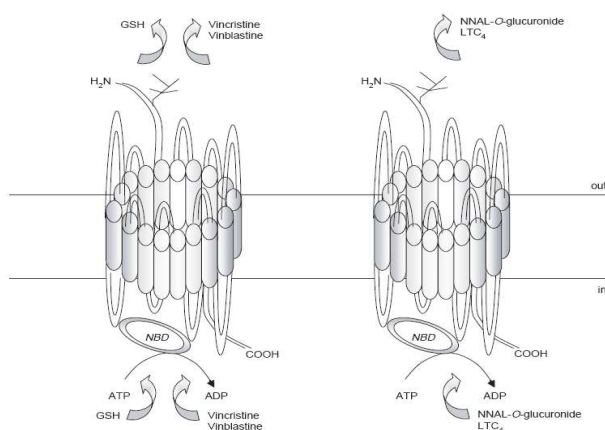


A terápierезisztencia vizsgálata kutyák daganatos, immunológiai és szívelégtelenséggel járó kórképeiben

OTKA: K 68376

Témavezető:
Vajdovich Péter, PhD
egyetemi docens



Jedlitschky et al.,; Expert Opinion Drug Metabol. Toxicol. 2. 351-366. (2006)

Tartalomjegyzék

A Pgp (MDR1) immunhisztokémiai elemzése	2
Pgp (MDR1) immunhisztokémiai vizsgálatok kutyák lymphomájában	2
Pgp (MDR1) immunhisztokémiai vizsgálatok kutyák emlődaganataiban	7
A Pgp (MDR1) kimutatása western blot-analízissel	10
Pgp (MDR1) kimutatási kutyák lymphomájában western-blot módszerrel	10
A Pgp és az MRP1 mRNS mennyiségének meghatározása.	13
MDR transzporterek mRNS mennyiségének vizsgálata lymphomás kutyákban	13
MDR-transzporterek mRNS mennyiségének vizsgálata immunmediált betegségben, és szívbetegségben szenvedő kutyákban	18
Az MDR in vitro funkcionális vizsgálata	18
Collie kutyák MDR1 hiányának vizsgálata a Calcein-teszttel	19
Lymphomás kutyák vérmintáiból szeparált lymphocytáinak membrántranszporter funkció vizsgálata a kemoterápiás kezelés hatására bekövetkező változások szempontjából	19
Lymphomás kutyák nyirokcsomójából szeparált daganatos lymphoid sejtek membrántranszporter funkció vizsgálata	20
Az MDR-funkció in vivo szcintigráfias vizsgálata	27
In vivo ^{99m} Tc MIBI wash-out szcintigráfias MDR vizsgálat az állatorvosi gyakorlatban daganatos betegek esetében	27

Kutyák lymphomájának, emlődagantának, immunhaemolyticus anaemiájának, és szívbetegségének terápiája során végeztünk vizsgálatokat.

Főként a daganatos folyamatok vizsgálata sikerült, azonban ebben a vonatkozásban széleskörű vizsgálatokat végeztünk. A kutyák immunhaemolyticus anaemiájának, és szívbetegségének terápiája során tervezett vizsgálatokat nagymértékben limitálta a kis elemszám, amely főként szervezési nehézségek miatt jelentkezett. A mintavételek klinikai körülmények között történtek, és nem azon a helyen, ahol a mintafeldolgozás történhetett, így a minták nagy része károsodott.

A daganatos betegek mintái azonban kellő számban álltak rendelkezésünkre. Az alábbiakban pontokba szedve dolgoztuk fel a munkatervben szereplő vizsgálati elemeket. A munkaterv ezekhez tartozó részeit a cím alatt dőlt betűvel jelöltük.

A Pgp (MDR1) immunhisztokémiai elemzése

Terv: Mintaként kutyákból származó daganatszövetek (lymphomás kutyák nyirokcsomója, emlődagantata, hízósejtes daganata és lágyszöveti sarcomája), immunmediált kórképben szenvedő betegek lépszöveitei, és euthanasiára kerülő kutyák szívizomszöveitei szerepelnek.

Pgp (MDR1) immunhisztokémiai vizsgálatok kutyák lymphomájában.

Lymphomás kutyák nyirokcsomó mintáiban vizgáltuk az MDR1 (Pgp) expressziót annak érdekében, hogy az egyik legjelentősebbnek talált membrántranszporter expresszió mértéke arányban áll-e az állatok terápiája során bekövetkező tumorregresszióval. Összesen 27 kutyát vizgáltunk.

A kutyák kezelés előtti vizsgálata magában foglalta a fizikális vizgálatot, a beteg stádiumának meghatározását, a daganatos nyirokcsomók rutin szövettani és immunhisztokémiai (immunfenotípus) vizgálatát, és a Pgp-expresszió meghatározását Pgp elleni ellenanyaggal (monoclonal mouse anti human C494, Signet Laboratories). Módosított COPA-protokollt alkalmaztunk a kutyák kemoterápiás kezelése során.

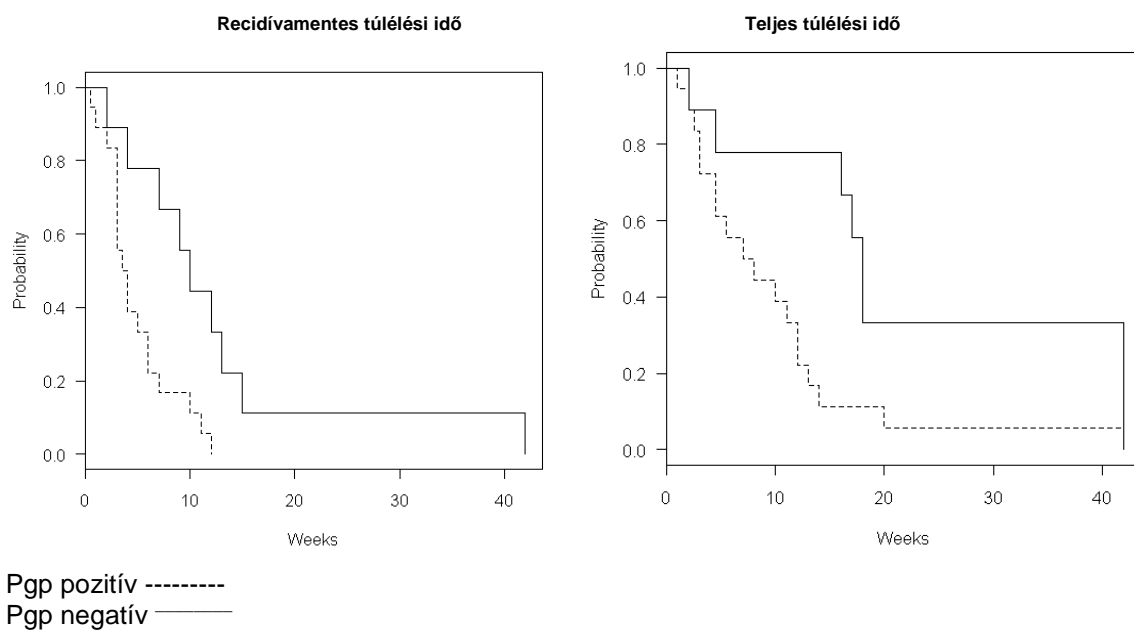
A Pgp-expresszió mértékét „score” pontozási rendszerrel végeztük, összesen 5 pontos skálán értékeltük a metszetek Pgp expresszióját az alábbi alapján: “0” 0% expresszió (festődés intenzitás ugyanolyan, mint a negatív kontrollok festődési háttere), “1” < 10% expresszió, “2” : 10-50% expresszió, “3” : 50-80% expresszió, and “4” : 80-100% expresszió. A 10%-nál nagyobb expressziót pozitívnak tekintettük. A Pgp pozitív egyedek recidíva mentes túlélési ideje (RTI), és teljes túlélési ideje (TTI) jelentősen rövidebb volt median RTI pozitívak: 3.5 [0.5-12 hét], negatívak: 10 hét [2-39 hét]; TTI pozitívak: 7.5 (1-42 hét), negatívak: 18 weeks (2-44 hét).

Kaplan-Meyer log rank analízissal a következőket találtuk: RTI és TTI esetén a rosszabb prognózisúnak bizonyultak: nemkomplett remisszió, stádium > III, Pgp pozitivitas, T-sejt típus, alsádium b, kor ≥ 7 év, nőstény ivar, nagyobb malignitású (grade) daganat (1-5. ábra).

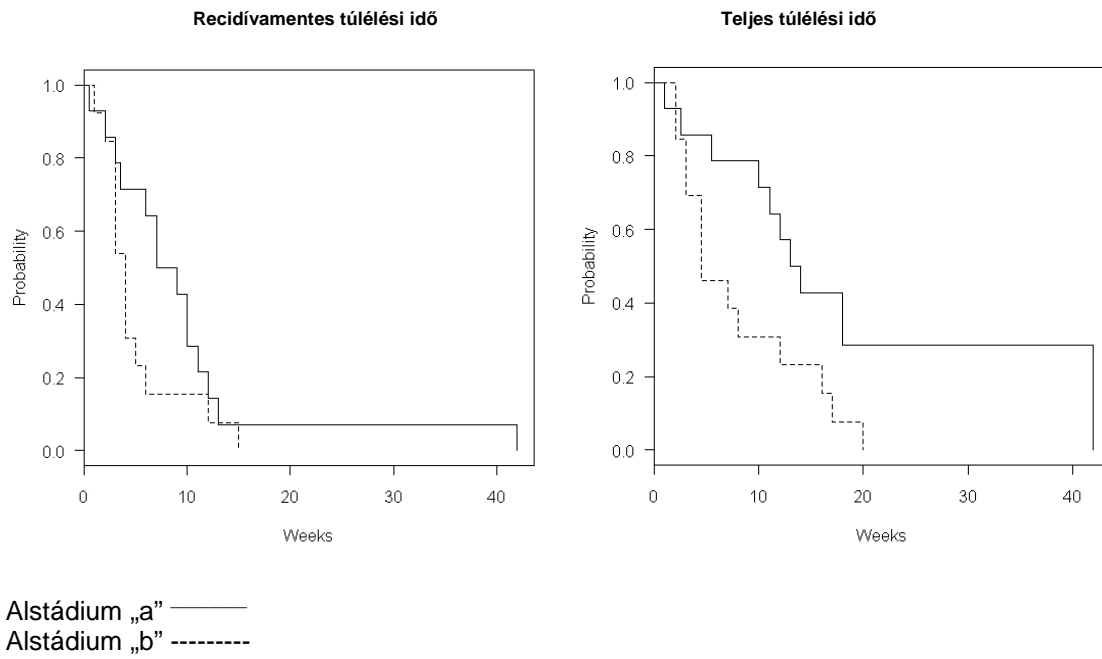
A Pgp score, és a pozitivitási vizsgálatok prognosztikusnak bizonyultak, tehát a lymphomában szenvedő kutyák esetében.

Multivariate modell (Poisson error-ral) alkalmazással megállapítottuk, hogy mely paraméterek tekinthetők alapvetően prognosztikusnak az RTI, és a TTI szempontjából (6. ábra).

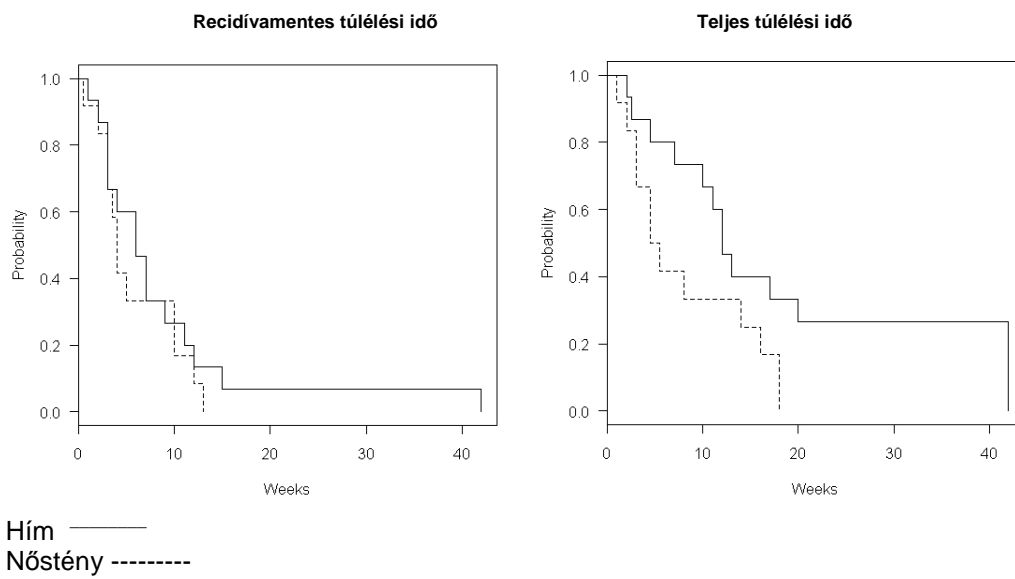
1. ábra Pgp pozitív és negatív immunhisztokémiai eredmények befolyása a recidíva mentes és a teljes túlélési időre



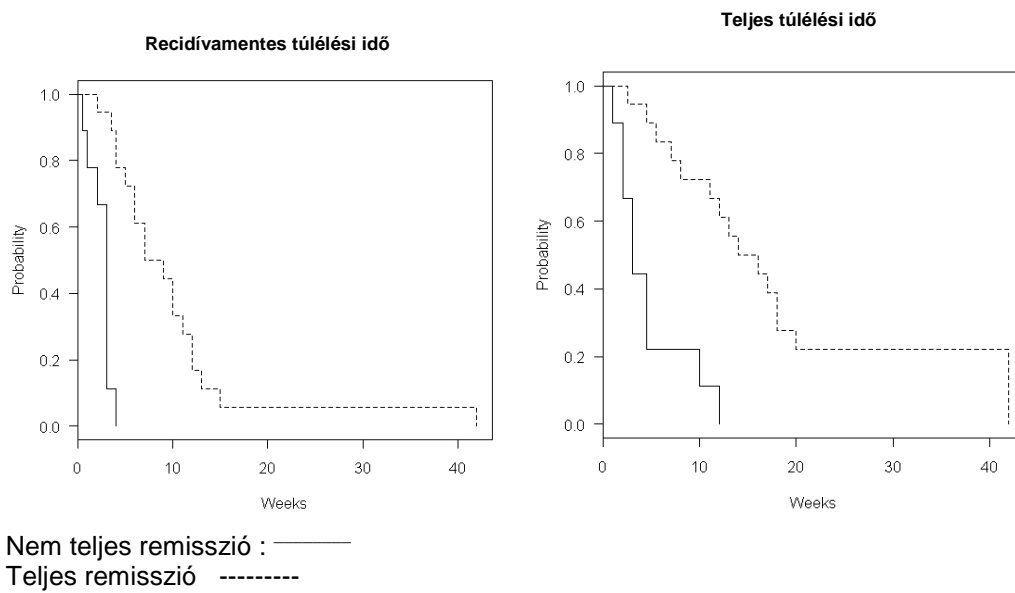
2. ábra Az alstádium befolyása a túlélési időkre.



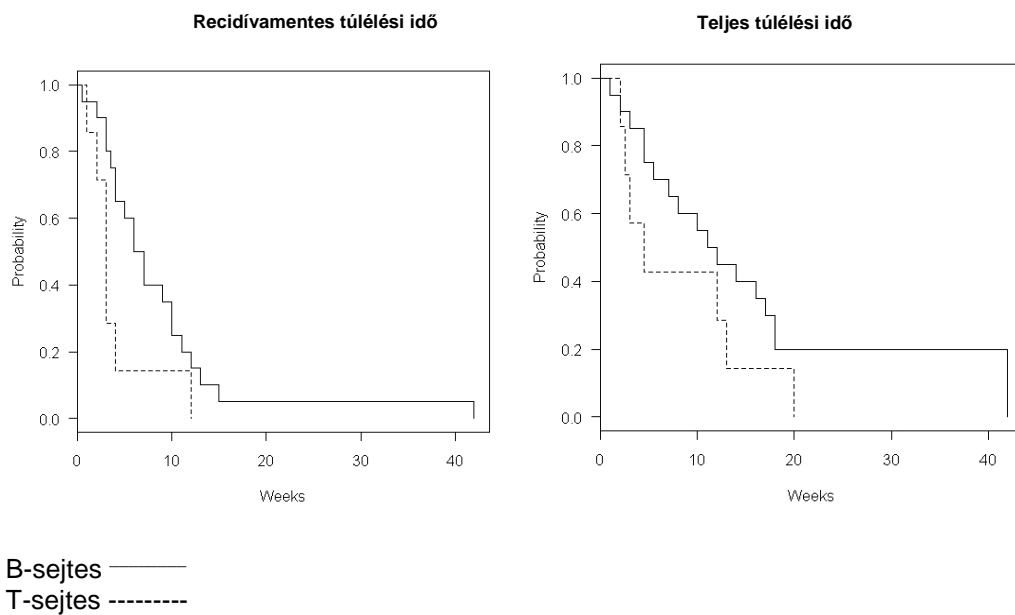
3. ábra Különböző ivarú állatok túlélési mutatói



4. ábra A teljes és a nem teljes remissziót mutató állatok túlélési idő mutatóinak változása



5. ábra A T-, és a B-sejtes immunfenotípusú lymphomák közötti túlélési mutatók változása



6. ábra Multivariate modell (Poisson-error) eredményei a túlélési időket befolyásoló tényezők vizsgálatára

Recidíva mentes túlélési idő (RTI)		Teljes túlélési idő (TTI)	
Prediktor	P-érték	Prediktor	P-érték
Remisszió %	4.38e-05	Ivar	3.66e-13
Pgp.score	0.00127	Pgp.score	8.94e-06
Ivar	0.00375	Remisszió %	1.72e-06
Alstádium	0.04234	Ht	2.61e-05
		Vvs-szám	0.000190
		Alstádium	0.014895
		Kor	0.015976

VVs: vörösvérsejt, Ht: Haematokrit,

Pgp (MDR1) immunhisztokémiai vizsgálatok kutyák emlődaganataiban

Vizsgálatra került emlődaganatos betegek Pgp, és p53 immunhisztokémiai elemzését végeztük.

Összesen 40 db emlőmintát gyűjtöttünk, amelyek esetében MDR1 (Pgp) immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk Pgp elleni ellenanyaggal (monoclonal mouse, anti human C494, Signet Laboratories). Az alábbi eredmények születtek: Szignifikáns különbség ($P < 0.05$) a tubulopapillaris carcinoma és a komplex carcinoma, illetve a tubulopapillaris carcinoma és a benignus daganatok között a Pgp-expresszió tekintetében (1. táblázat, 7. ábra). A tubulopapillaris carcinoma esetén, tehát kisebb esély a daganatot kemoterápiás kezelésére, különösen olyannal (doxorubicin, vinkrisztin, ciklofoszfamid, mitoxantron stb.), amely szubsztrátja a Pgp-nek.

Csaknem mindegyik emlődaganatos mintában mutatkozott bizonyos mértékű Pgp expresszió.

Ha egy kisebb mértékű Pgp-expressziót mutató emlődaganatot kezelnének kemoterápiával, egy idő után, valószínűleg kezdeti tumorregressziót követően,

biztosan szelektálódik egy terápiareszisztens klón, amely túlszorodva, már nem mutatna jelentősebb regressziót a gyógykezelés hatására.

A p53 kimutatását szintén elvégeztük ugyanezen mintákban (CM-1, polyclonal rabbit anti-human p53 oncoprotein, Signet Laboratories). Az alábbi eredmények születtek. Pozitív festődést tapasztaltunk a jóindulatú daganatok esetében is, bár kisebb expressziós százalékot, mint a tubulopapillaris és komplex carcinomáknál (1. táblázat, 7. ábra).

A korrelációs vizsgálattal megállapítást nyert, hogy a Pgp és a p53 expresszió mértéke egymással összefüggésben van, ami azt jelenti, hogy hasonló mértékben jelzik a rosszabb prognózist.

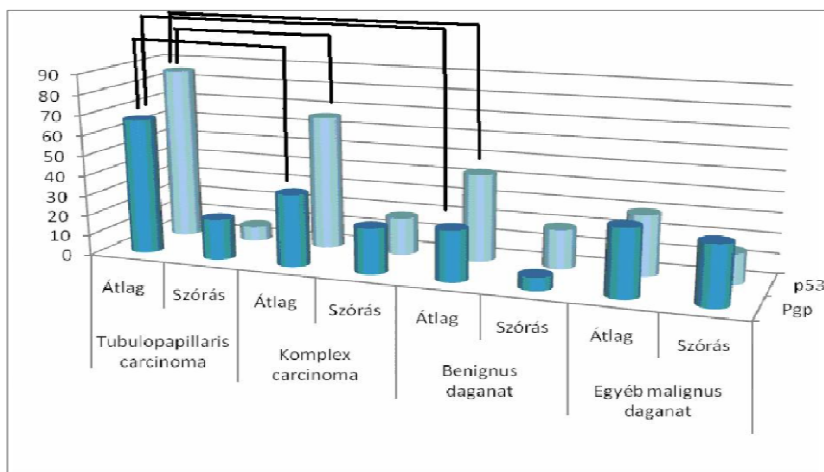
Minél nagyobb a Pgp-expresszió mértéke, annál nagyobb az esély a recidivára, prognosztikailag jó paraméter lehet a Pgp-expresszió meghatározása emlőtumorok esetén.

A klinikai paramétereket is összehasonlítottuk, és ezeket a 3. táblázatban foglaltuk össze. Az alábbi paramétereket hasonlítottuk össze különböző tumortípusok esetében: nyirokcsomó áttét és/vagy a tumor invazivitása (ez a klinikai malignitásnak a mutatója), a daganat, amely műtetre került recidivált-e tumor volt-e a műtétkor, jelentkezett-e később daganat-recidíva később, jelentkezett-e később más tumor, az elhullás okaként említhető-e a daganat, mekkora volt a túlélési idő. Azt találtuk, hogy a műtétkor a tubulopapillaris daganatok > 50%-át már műtötték egyszer.

1. Táblázat: a Pgp és a p53 expressziós értékek összehasonlítása a különböző daganattípusok között

	Pgp (%)	p53 (%)
I. Tubulopapillaris carcinoma	66,94 ±20,13	85,625±7,26
II. Komplex carcinoma	35,729±22,57	66,5±18,445
III. Benignus daganat	25,00±29,53	43,33±19,29
IV. Egyéb malignus daganat	33,33±29,53	30,00±15,00
Szignifikancia (p-érték)	I.-II: 0.0066 I.-III: 0.0052	I.-II: 0.0186 I.-III: 0.0173

7. ábra. A Pgp és a p53 expressziók változása különböző típusú emlődaganatok esetében. A kapcsolatot jelző jelek a szignifikáns különbségeket mutatják a különböző emlődaganatok Pgp, és p53 expressziója között.



2. Táblázat. A különböző paraméterek összehasonlítása Pearson-féle korrelációs vizsgálattal.

Összehasonlított paraméterek	Korrelációs együttható	Szignifikancia
Pgp : p53	0.55	p<0.01
Pgp : recidíva később	0.484	p<0.01
Más daganat kialakult-e később : elhullás daganat miatt	0.637	p<0.01

3. Táblázat: A különböző paraméterek változása a daganattípusok között

	Nyirokcsomó áttét/invazivi- tás („0”, „1”)	Recidivált tumor („0”, „1”)	Recidíva később („0”, „1”)	Más tumor később („0”, „1”)	Az elhullás oka daganat („0”, „1”)	Túlélési idő (év)
I. Tubulopapillaris carcinoma	0,00	0,55±0,49	0,22±0,41	0,11±0,31	0,11±0,31	1,38±0,97
II. Komplex carcinoma	0,16±0,37	0,09±0,28	0,00	0,27±0,44	0,25±0,43	2,18±1,84
III. Benignus daganat	0,00	0,333±0,47	0,00	0,33±0,47	0,5±0,5	3,2±1,98
IV. Egyéb malignus tumor	0,33±0,47	0,00	0,00	0,00	0,33±0,47	1,56±0,89
Szignifikancia (p-érték)		I-II: 0.036				
		I-IV: 0.0133				

A Pgp (MDR1) kimutatása western blot-analízissel

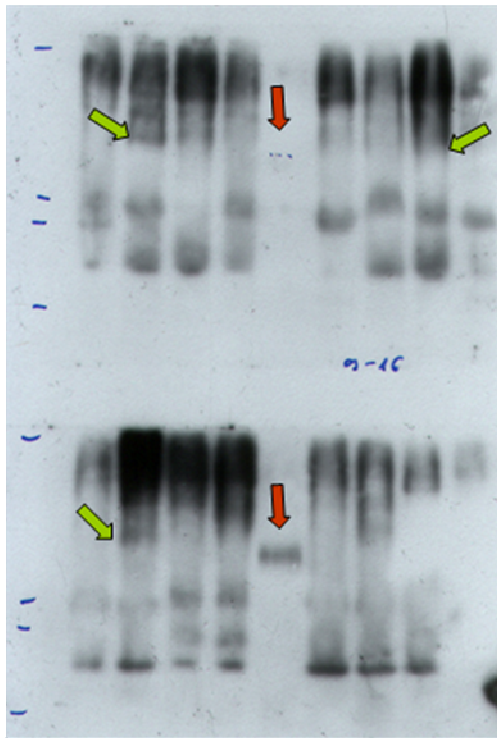
Terv: Mintaként kutyákból származó daganatszövetek, immunmediált kórképben szenvedő betegek lépszövetei, és euthanasiára kerülő kutyák szívizomszövetei szerepelnek. Az adott kórképekben szenvedő (daganatos, cardiomyopathiás és endocardosisos, immunmediált haemolyticus anaemiás, ill. –thrombocytopeniás) beteg, valamint collie fajtájú kutyák vérből szeparált mononuclearis sejtjeit is felhasználjuk.

Pgp (MDR1) kimutatási kutyák lymphomájában western-blot módszerrel

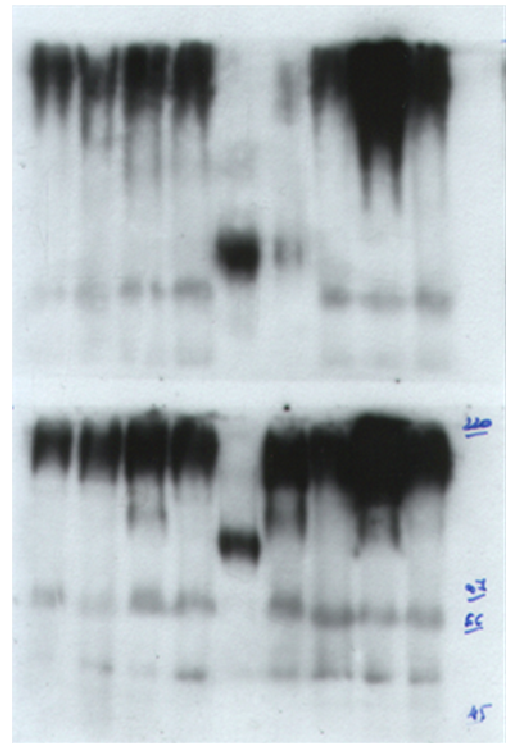
Összesen 17 lymphomában szenvedő kutya nyirokcsomóit vizsgáltuk. A kutyák életkora átlagosan 8,3 év volt. Összesen 10 kan és 7 szuka került vizsgálatra, amelyek több különböző fajtához tartoztak. Mindegyik kutya a betegségének előrehaladott stádiumában került kezelésre, mindegyiknél generalizált perifériás nyirokcsomó duzzanat, és egy kivételével valamennyi esetben lép, vagy máj, illetve hasúri nyirokcsomó duzzanat, valamint a betegséggel összefüggő mellkasi radiológiai elváltozások jelentkeztek. A kemoterápiás kezelés során a daganat visszahúzódása, vagyis a remisszió átlagosan 93%-os volt, az első kiújulásig (recidiváig) eltelt idő átlagosan 10 hónap, és az elhullásig eltelt idő átlagosan 15 hónap volt. A betegek teljes bal váll előtti nyirokcsomója műtéti eltávolításra került. A kimetszett nyirokcsomók egy része szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatra került, míg a másik részét -80 oC-on tároltuk a későbbi Wb módszerrel történő vizsgálathoz, amelynek során a humán Pgp ellen egérben termeltetett C219-es monoklonális ellenanyagot (Signet Laboratories) használtuk. A fehérjék gélben való futtatása és ellenanyaggal történő jelölése után a megjelenítést luminol felhasználásával fényemissziós módszerrel végeztük. Összesen 10 esetben mutattunk ki Pgp-t. Ezekben az esetekben a gélben futtatás és a fényemissziós eljárás után a röntgenfilmen megjelenő csíkoknak a kontrollhoz (tisztított humán Pgp) viszonyított vastagsága és denzitása alapján a fehérje mennyiségét is megbecsültük (8. ábra). A Pgp negatív és pozitív esetek különböző paramétereinek Student féle t-próbával történt vizsgálata során szignifikáns eltérést csak a remisszió %-ában találtunk. A Pgp-pozitív esetekben ez 88, míg a negatív esetekben 100% volt. Az összes beteg összes paraméterének együttes összehasonlítását Pearson-féle módszerrel végeztük. Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az 1., és a 2. recidíva megjelenésének ideje (r: 0,833) és az 1. recidíva, valamint a teljes túlélési idő között (r:0,961). Negatív korreláció jelentkezett a remisszió %-a és az állatok életkora (r: -0,549), valamint a remisszió %-a és a Pgp mennyisége (r: -0,462) között, továbbá a lépduzzanat megjelenése és a túlélési idő között (r: -0,558). χ^2 -próbával igazoltuk, hogy a Pgp pozitív egyedekben szignifikánsan több esetben jelentkezik a recidíva a kezeléstől számított 8 hónapon belül (p=0,023), mint a Pgp negatív esetekben. A Pgp kimutatására irányuló Wb-módszer specificitása 85,7 %, és szenzitivitása 70 %, pontossága 76,5 % arra

vonatkozóan, hogy az így vizsgált és pozitívnak minősített egyedekben az első recidíva a kezelés kezdetét követő 8,5 hónapon belül jelentkezik. Az eljárás 71,4 %-os specificitással, 60 %-os érzékenységgel és 64,7 %-os pontossággal jelzi előre azt, hogy a Pgp pozitív állat elhullása a kezelés kezdetétől számított 12 hónapon belül bekövetkezik (4. táblázat).

8. ábra. Gélelektroforézis eredményei. Zöld nyillal jelöltük a sok esetben halványan festődő Pgp-fehérjét.



1-16. minta



17-24. minta

4. táblázat. A western-blot technika specificitási és szenzitivitási értékei

	Remissziós idő < 8 hónap	Túlélési idő < 12 hónap
Specificitás	85,7%	71,4%
Szenzitivitás	70%	60%
Pontosság (a helyes diagnózisok %)	76,4%	64,7%

A Pgp és az MRP1 mRNS mennyiségének meghatározása.

Terv: Mintaként az előzőekhez hasonlóan kutyákból származó daganatszövetek, immunmediált kórképben szenvedő betegek lépszövetei, és euthanasiára kerülő kutyák szívizomszövetei szerepelnek. Továbbá, az adott kórképekben szenvedő beteg, valamint collie fajtájú kutyák véreből szeparált mononuclearis sejtjeit használjuk fel.

MDR transzporterek mRNS mennyiségének vizsgálata lymphomás kutyákban

Vizsgálataink célja annak megállapítása volt, hogy a nyirokcsomók lymphoid sejtjeinek egyes membrántranszportereinek (MDR1, az mrp1, az mrp2 és a Bcrp) mRNS expressziójának mértékében van-e különbség a kontroll egészséges és a betegek között, valamint az mRNS-expresszió mértéke hogyan korrelál a lymphomás betegek klinikailag is megfigyelhető terápiás válaszával.

Vizsgálatunkban 44 lymphomában szenvedő kutya szerepelt, köztük 30 kan és 14 szuka. A vizsgált betegek átlagéletkora 7,0 év volt. A kontroll nyirokcsomók 8 beagle fajtájú kutyából (4 kan, 4 szuka, átlag életkor: 7 év) származnak. A műtét során a popliteáris nyirokcsomók kerültek kimetszésre az Országos „Frédéric Joliot-Curie” Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet Izotóp-alkalmazási és Állatkísérletes Osztályán.

A vizsgálat folyamatát itt részletesen közöljük.

Mintaelőkészítés

A nyirokcsomó-mintákat a fent említett módon, egy elváltozást mutató nyirokcsomó teljes kimetszésével nyertük (az esetek többségében a bal oldali praescapularis, a kontroll minták esetében a popliteális nyirokcsomóról van szó). A kimetszett nyirokcsomókat izotóniás infúziós oldatba (0,9% NaCl oldat) helyeztük, majd azon részét, mely nem került szövettani vizsgálatra, félretettük és további feldolgozás céljából -80°C -on tároltuk. A mintákból 0,5 és 1,0 g közötti mennyiséget vágunk le, majd Potter-Elvehjem-féle homogenizátorba tettük, és 1 ml Trizol reagens (Total RNA Isolation reagent, Invitrogen) hozzáadása után homogenizáltuk. További feldolgozásig -80°C -on tároltuk.

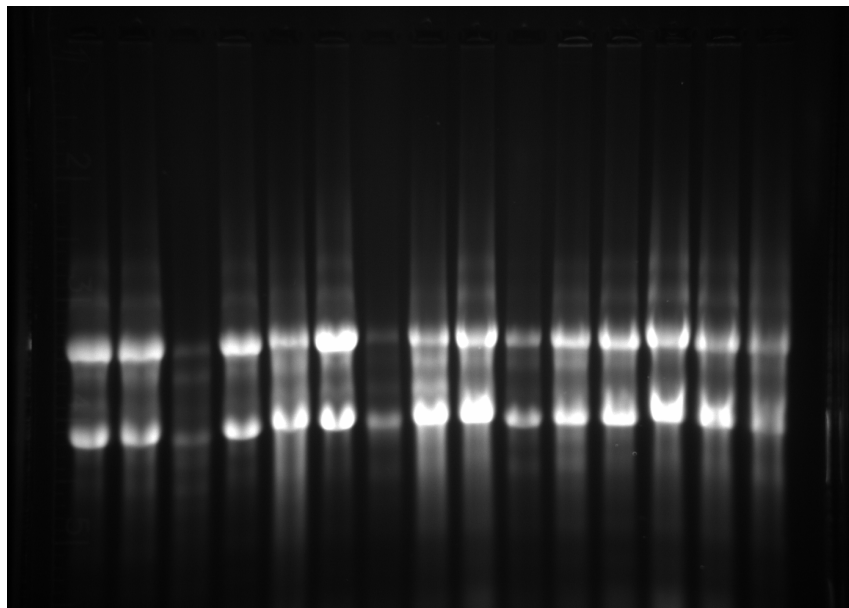
RNS-kivonás, DNázos emésztés

A Trizol oldatban homogenizált mintát először 4°C -on inkubáltuk 5 percig, majd hozzáadtunk 0,2 ml -20°C -os kloroformot, alaposan vortexeltük (15 másodpercig). Ezután újra inkubáltuk 4°C -on 5 percig, majd centrifugáltuk 4°C -on, 12000 g-vel, 15 percig. Az RNS a felső vizes fázisba kerül a centrifugálás után, így óvatosan leszívtuk a felső fázist és egy új, steril Eppendorf csőbe pipettáztuk, vigyázva, hogy se az alsó réteget, se az interfázist ne szívjuk fel. Ezt megismételtük, hogy végül még tisztább oldatot kapjunk. A következő lépés az RNS kicsapása volt. Az előbb kapott oldathoz 1:1 arányban hűtött izopropil alkoholt (Merck 100995.1000) kevertünk, alaposan vortexeltük, majd 4°C -on 5 percig inkubáltuk. Ezután újra 4°C -on centrifugáltuk 12000 g-n 10 percig.

Végül leöntöttük a felülúszót és megtisztítottuk az RNS-t. Ennek során először hozzáadtunk 1 ml 75%-os -20°C -os etanolt (Merck 100971.1000), vortexeltük, majd centrifugáltuk 4°C -on, 7500 g-n 5 percig, végül az utóbbi két lépést megismételtük. Az RNS újrafeloldása során lepipettáztuk a folyadékfázist, 5-10 percig még levegőn szárítottuk a pelletet. A szárítást követően feloldottuk 50 μl RNáz-mentes vízben (Merck).

A minták tisztaságát OD méréssel, NanoDropTM 1000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific) és agaróz gél-elektroforézissel ellenőriztük (9. ábra).

Az OD mérés során a fehérje:nukleinsav arány vizsgálható. A fehérjék elnyelési maximuma 280 nm-nél, az RNS és a DNS maximuma 260 nm-nél van. Ha a 260 nm-nél mért érték és a 280nm-nél kapott érték hányadosa nagyobb, mint 1,6, akkor a fehérjeszennyezés mértéke az elfogadható határon belül van.



9. ábra agaróz gél-elektroforézis képe UV fényben vizsgálva

A futtatást 1,5 %-os agaróz gélen végeztük. A gél készítéséhez 1,5 g agarózt, 10 ml 10x TRIS (TBE) puffert, 91 ml dietil-pirokarbamáttal kezelt (DEPC)-vizet és 5 μl ethidium-bromidot használtunk. A mintából 2 μg -ot mértünk a zsebekbe.

A futtatás során DNS szennyezést tapasztaltunk, így az oldat tisztítása érdekében DNázos emésztést végeztünk AMPD1-1KT, DNase I kit (Sigma) felhasználásával, az alábbiak szerint: 8 μl RNS-hez 1 μl reakció puffert és 1 μl DNázt adtunk, majd 25 percig 25°C -on inkubáltuk, végül 1 μl Stop Solution hozzáadása után 70°C -on 10 percig inkubáltuk, leállítva ezzel a DNáz enzimet. A mintát további vizsgálatokig -80°C -on tároltuk.

Az ellenőrző lépések során az is kiderült, hogy 12 mintából nem sikerült használható RNS-t izolálni. Ennek oka az lehet, hogy a tárolás alatt lebomlott az RNS a mintákban.

cDNS írás (Revert AidTM H minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas)

A cDNS íráshoz az alábbi mixet készítettük elő: 1µg az RNS mintából, random hexamer primerből 1µl, hozzá DEPC-kezelt vizet mértünk úgy, hogy a végtérfogat 12µl legyen. Ezeket jól összekevertük, majd centrifugáltuk. Ezután 70° C-on 5 percig inkubáltuk, 4° C-ra hűtöttük, majd a cső falára ragadt cseppeket összegyűjtendő, centrifugáltuk újra. Az elkészült mixhez (folyamatosan jégen dolgozva) 4 µl ötszörös töménységű reakciópuffert, 20U/µl ribonukleáz inhibitort és 2 µl 10mM dNTP mixet adtunk. Összekevertük az oldatot, centrifugáltuk. 25° C-on 5 perces inkubáció után hozzáadtuk a reverz transzkriptáz enzimet (200 U/µl) úgy, hogy a végtérfogat 20 µl legyen. Ezután 10 perc 25° C-os és 60 perc 42° C-os inkubáció következett, majd az enzim inaktiválására 10 percig 72° C-on tartottuk az oldatot. Az elkészült cDNS-t további feldolgozásig –20° C-on tároltuk.

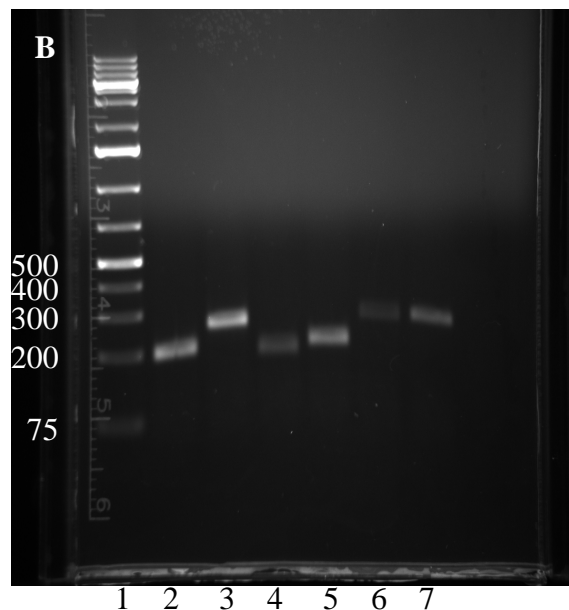
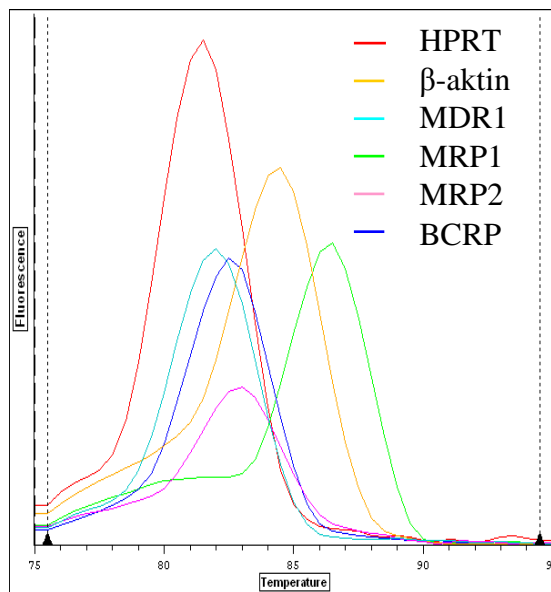
Real-time PCR reakció

A PCR (polymerase chain reaction) reakcióhoz Mini Opticon™ (Biorad) típusú PCR műszert használtunk. A primereket a Primer-BLAST programmal terveztük és a SIGMA céggel szintetizáltattuk meg (5. táblázat). Minden mintából két párhuzamost, bennük hat fehérje mRNS-ét vizsgáltuk: HPRT (194 bp), β-aktin (243 bp), MDR1 (176 bp), MRP1 (192 bp), MRP2 (255 bp), BCRP (260 bp) (6. táblázat). A reakcióban 25 µl IQ™ SYBR Green Supermixet (Biorad), 18 µl DEPC-vizet, 1-1 µl primer-párt használtunk 5 µl cDNS-hez.

5. Táblázat Az alkalmazott primerek szekvenciái

Primer	Szekvencia
HPRT Forward	5'-GACCAGTCAACAGGGACAT-3'
HPRT Reverse	5'-ACACTTCGAGGGGTCCTTTT-3'
Beta-aktin Forward	5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3'
Beta-aktinReverse	5'-CTTCTGCATCCTGTCAGCAA-3'
MDR1 Forward	5'-TGGAAGCTAACCCCTTGTG-3'
MDR1 Reverse	5'-TGTCCTCAAAGGCAAT-3'
MRP1Forward	5'-TGGAATACCAGCAACCC-3'
MRP1 Reverse	5'-GCAGACGATCCATAGCA-3'
MRP2 Forward	5'-CGTGCCTTTGAGCATC-3'
MRP2 Reverse	5'-CATCCTCACTAGCCAGT-3'
BCRPFoward	5'-TAGATGTCTTAGCTGCAAGG-3'
BCRP Reverse	5'-GGAATCTGCCACTTTATCC-3'

A PCR reakciót 3 perc 95° C-os enzimaktivációval kezdtük. Ezt követte 40 ciklus az alábbiak szerint: 95 °C 10 mp, 56 °C 15 mp, 72 °C. A reakció végterméketit az olvadási görbével és agaróz gélen történt futtatás során ellenőriztük (10. ábra).



10. ábra. Egy tipikus RT-PCR futtatás végtermékeinek ellenőrzése.

(A) A felvett olvadási görbén látható a hat különböző fehérje egyedi lefutási görbéje a cDNS olvadási pontjának függvényében. Minden egyes cDNS meghatározott olvadási ponttal rendelkezik a nukleozid összetételétől függően. Az egyedi csúcsok a végtermék tisztaságáról adnak információt (szennyezés esetén többszűcsös spektrumok jelennek meg). (B) Az agaróz gélen megfuttatott minták ugyancsak a termékek tisztaságát mutatják be (1-DNS létra, 2-HPRT, 3- β -aktin, 4-MDR1, 5-MRP1, 6-MRP2, 7-BCRP).

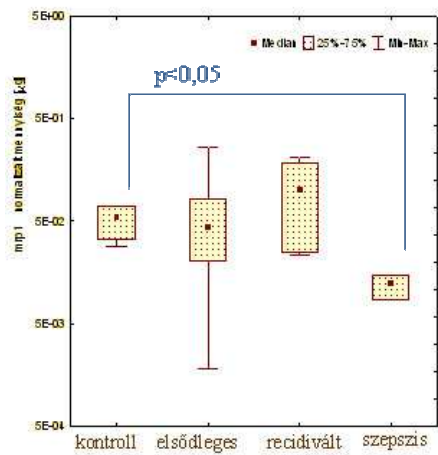
A vizsgálatokhoz 4 csoportot alakítottunk ki: elsődleges, recidivált, szepszisben elhullott és kontroll csoportot. Vizsgálati eredményeink kiértékelése céljából a betegeket négy csoportra osztottuk: lymphomás betegek az első kezelés megkezdése előtt ($n=36$), szepszisben elpusztult kutyák ($n=3$), recidivált állatok ($n=7$) és a kontroll egészséges kutyák csoportja ($n=7$).

MRP1 esetében szignifikáns különbség adódott a kontroll és a szepszises csoport között ($P<0.05$) (11. ábra). BCRP esetében a recidivált és szepszises csoportban találtunk jelentős különbséget a kontrollhoz képest ($P<0.05$) (13. ábra). A kontrollhoz képest mRNS szintű transzporter csökkenést találtunk az MDR1 szintjében mind az elsődleges daganatok mind a recidivákat tekintve, sőt azon nyirokcsomómintákban, amelyek szepszisben elhullott betegekből származtak ($P<0.05$) (14. ábra). Az MDR1 expresszió a kontrollhoz képest a recidivált csoportban szignifikánsan nagyobb volt, abban az esetben, amikor azonos állatok nyirokcsomóit hasonlítottuk össze ($P<0.05$) (14. ábra).

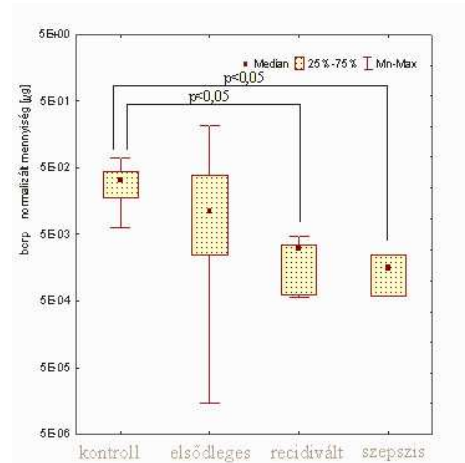
Minél korábban jelentkezett az első recidíva annál rövidebb időn belül esett újra vissza az állat és annál hamarabb következett be az állat elhullása. A korrelációs vizsgálat szerint az életkor növekedésével a MDR1 expressziója is nő ($r=0,43$).

Az MDR1 szoros negatív korrelációt mutatott a recidívamentes túlélési idővel és a teljes túlélési idővel. ($r=-0,62$). A BCRP mRNS expressziója a teljes túlélési

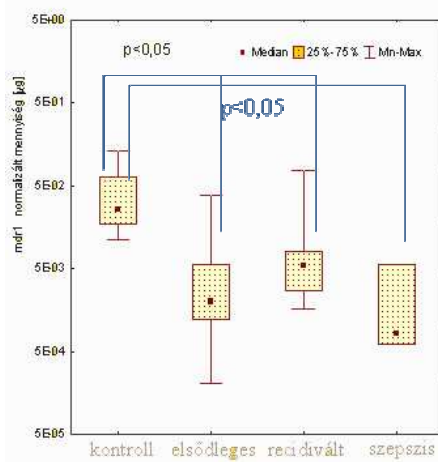
idővel fordítottan arányos ($r = -0,55$). A recidívamentes túlélési idő (RTI) az MDR1 mennyiségével mutatott szignifikáns összefüggést ($r = -0,59$) (15. ábra).



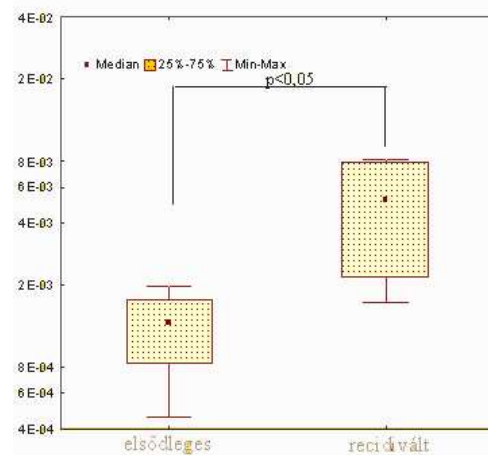
11. ábra MRP1 eredmények csoportok között



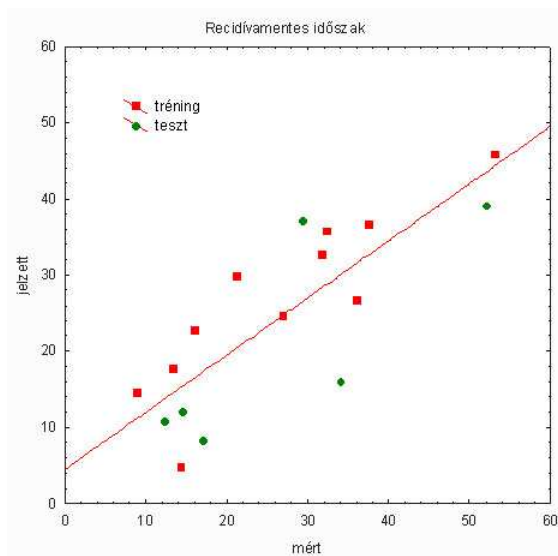
12. ábra. BCRP eredmények a csoportok között



13. ábra. MDR1 eredmények elsődleges, a csoportok között



14. ábra. MDR1 eredmények az és recidivált daganatok között



$$R^2 = 60\%$$

15. ábra. Többszörös lineáris regressziós modell által meghatározott recidivámentes túlélési idők az MDR1 (Pgp) mRNS mennyisége szempontjából

MDR-transzporterek mRNS mennyiségének vizsgálata immunmediált betegségben, és szívbetegségben szenvedő kutyákban

Számos mintát gyűjtöttünk szívbeteg (n=12), és immunrendszeri betegségben szenvedő kutyákból (immunmediált haemolyticus anaemia (n=5) MDR1, mrp1, mrp2, és BCRP mRNS kvantitatív elemzés céljából. A szívbeteg kutyák esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a transzporterek szintjében, a kontroll kutyák értékeihez képest. Az immunmediált haemolyticus anaemiás kórképben szenvedők mintáiban eddig szignifikáns különbséget találtunk az MDR1, és az mrp1 szintekben a kontroll kutyák értékeihez képest (a beteg kutyák értékei magasabbak voltak), azonban ezek az eredmények nem kerültek még bemutatásra a kis elemszám miatt.

2008.

Az MDR in vitro funkcionális vizsgálata.

Terv: Mintaként az adott kórképekben szenvedő betegek, valamint collie fajtájú kutyák vérből szeparált mononuclearis sejteit használjuk fel.

Megkíséreljük ezt a vizsgálatot a szövetekből (kutyákból származó daganatszövetekből, immunmediált kórképben szenvedő betegek lépszöveiteiből) szeparált sejtekben is elvégezni.

Az MDR in vitro funkcionális vizsgálata Kárászi E. és mtsai. (2001), ill. Jakab K. és mtsai. (2005) leírása szerint történik az ún. calcein-teszttel, fluorescens áramlási citométeres (FACS) analízissel.

Mintaként az előzőekhez hasonlóan az adott kórképekben szenvedő (daganatos, cardiomyopathiás és endocardosisos, immunmediált haemolyticus anaemiás, ill. –thrombocytopeniás) beteg, valamint collie fajtájú kutyák véréből szeparált mononuclearis sejtjeit használjuk fel.

Megvalósítás: Dr. Karászi Éva segítségével sikerült, aki az OGYK, Haematológiai és Immunológiai Intézet MTA-OGYK Membránbiológiai kutatócsoportjában dolgozik.

Ha a sejtekhez fluoreszkáló molekulát (calcein) adunk és inkubáljuk, akkor ez az anyag a sejtekbe jut. Amennyiben a sejt rendelkezik membrántranszporter fehérjékkel (P-glükoprotein /Pgp/, multidrug resistance associated protein-1 /mrp1/, stb.) és ún. „multidrug” rezisztencia funkcióval, akkor a calceint a sejtek kipumpálják magukból.

Collie kutyák MDR1 hiányának vizsgálata a Calcein-teszttel

Összesen egy olyan collie kutya mintája érkezett Angliából, amely esetében klinikailag igazolást nyert a csökkent rezisztencia a kemoterápiás szerekre nézve. Ez beteg diffúz nagy B-sejtes lymphomában szenvedett, és a vérmintáját Dr. Gerry Polton DVM, Dipl. ECVIM-Ca-onc (North Downs Specialist Referrals, The Friesian Buildings 3 & 4, The Brewerstreet Dairy Business Park, Brewer Street, Bletchingley, Surrey RH1 4QP) kezelte kemoterápiás kezeléssel Az Egyesült Királyságban. A beteg fokozott érzékenységet mutatott a kezelés során. Sok mellékhatás jelentkezett (hányás, hasmenés, leukopenia), és a gyógyszerek dózísát jelentősen csökkenteni kellett. A vérmintáját gyorspostával (DHL) szállították Magyarországra a vizsgálatok céljából. Elvégeztük a calcein-tesztet, és igazoltuk, hogy a kutya perifériás véréből szeparált lymphoid sejtek esetében az MDR1 funkció jelentősen csökkent a kontroll kutyák értékeihez képest, azonban az mrp1 funkció kismértéken nőtt.

Lymphomás kutyák vérmintáiból szeparált lymphocytáinak membrántranszporter funkció vizsgálata a kemoterápiás kezelés hatására bekövetkező változások szempontjából.

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy kemoterápiás kezelésben részesülő 9 lymphomás, ill. leukémiás kutya szeparált lymphoid sejtjeinek membrántranszporter funkciója eltér-e az egészséges, kontroll kutyák (n=6) lymphoid sejtjeinek hasonló működésétől.

A kutyák vérmintájának lymphoid sejtjeit szeparáltuk, majd azok egy részét membrántranszporter gátló anyag hozzáadása nélkül calcein-nel inkubáltuk, egy másik részéhez verapamil-t adtunk, amely a Pgp és az mrp1 gátlója, harmadik részéhez pedig, ún. MK-571 molekulát adtunk, amely az mrp1 gátlója. Végül a két gátlóanyagot tartalmazó sejtszuspenzióhoz is calceint adtunk. A FACS vizsgálat során mértük a sejteken belüli fluoreszcenciás aktivitás mértékét. A gátlás nélküli és a gátlóanyagokat tartalmazó sejtek eltérő fluoreszcenciás aktivitásának kifejezéséhez kiszámítottuk az ún. MAF- (multidrug rezisztencia aktivitási faktor-) értékeket. Ezek jellemzik, a sejtek Pgp, és mrp1 funkcióját. Vizsgálataink azt bizonyítják, hogy a beteg kutyák összesített „multidrug” rezisztencia funkciója ($p < 0,01$) és az mrp1-hez kötött membrántranszporter ($p < 0,05$) funkciója egyaránt szignifikánsan nőtt a kontroll kutyák hasonló sejtfunciójához képest.

Lymphomás kutyák nyirokcsomójából szeparált daganatos lymphoid sejtek membrántranszporter funkció vizsgálata

További 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 (16. ábra).

Vizsgálataink során a kapott fluoreszcencia értékek alapján az alábbi 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)).

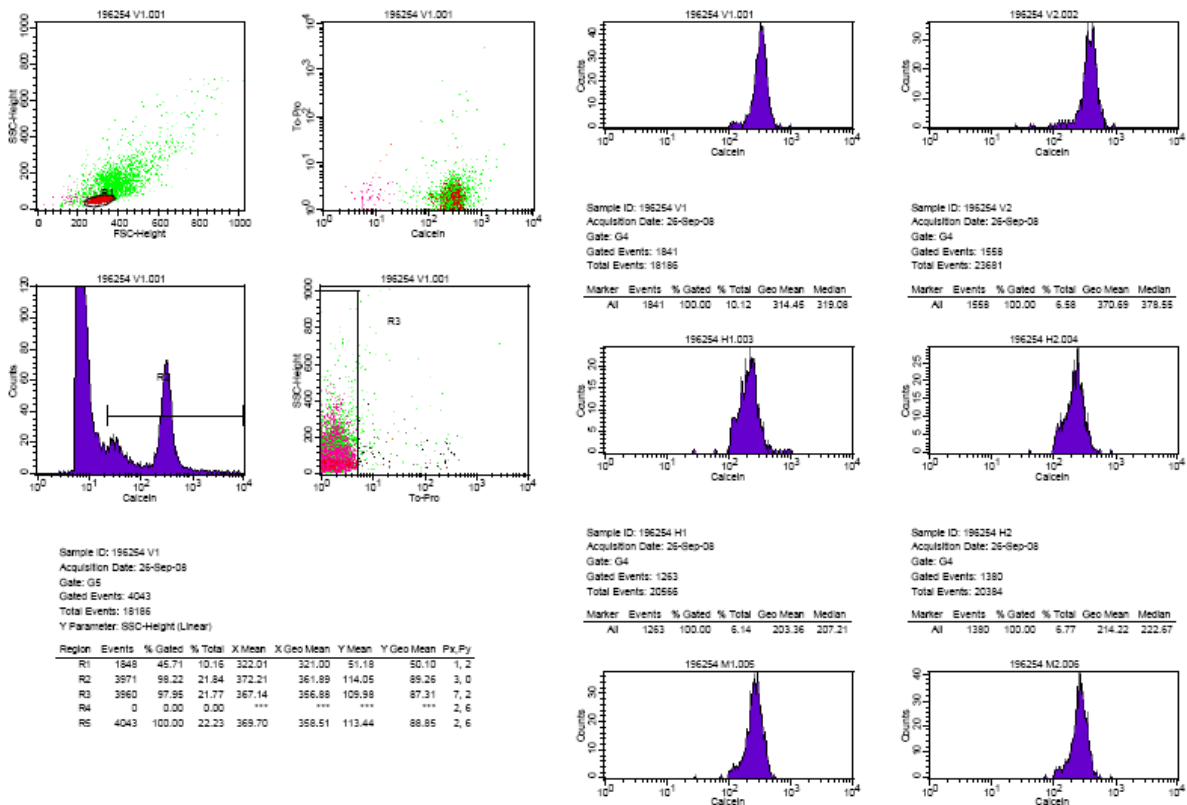
MAF (mrp1+mdr1) = $\frac{\text{IC fluoreszc. (50}\mu\text{M verapamil)} - \text{IC fluorszc. (HBSS)}}{\text{IC fluoreszc. (50}\mu\text{M verapamil)}} \times 100$

MAF (mrp1) = $\frac{\text{IC fluoreszc. (MK571)} - \text{IC fluoreszc. (HBSS)}}{\text{IC fluoreszc. (MK571)}} \times 100$

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

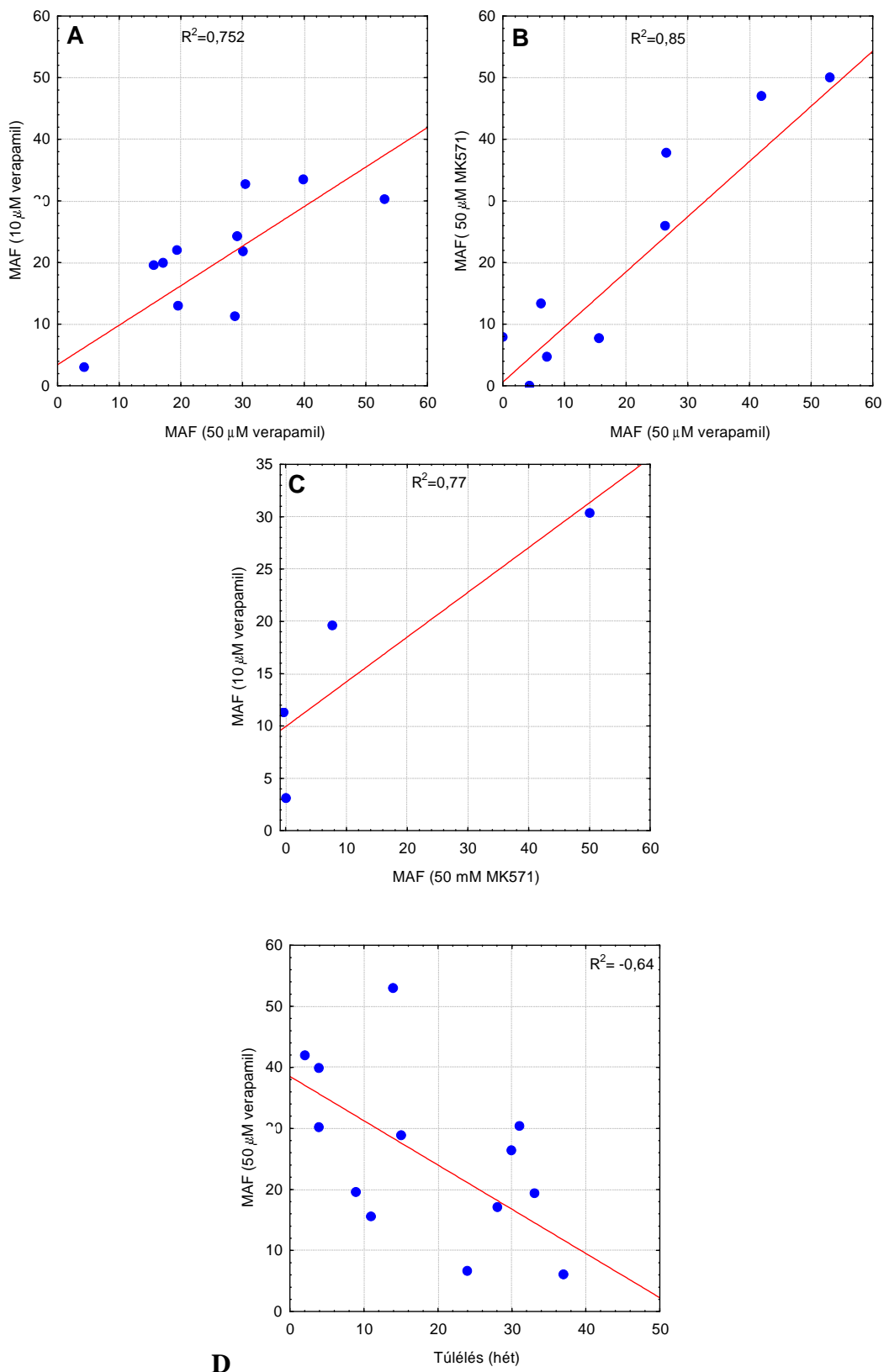
A kapott eredményeket átlagolva azt találtuk, hogy a lymphomás betegek MAF-értékei nagyobbak az egyéb daganatos betegek MAF-értékeihez képest. Az erre vonatkozó eredményeket az ábrák mutatják.

16. ábra. A fluoreszcenciás módszer ábrázolása egy minta alapján.



Mind az 50 μM MK571 (17/A.ábra), mind a 10 μM verapamil (17/B.ábra), illetve az 50 μM verapamil (17/C. ábra) esetében, amely szignifikánsnak adódott. A vizsgált beteganyagot tekintve a MAF (50 μM 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 (17/D ábra).

17. ábra. Korrelációs vizsgálatok a daganatsejtek membrántranszporter funkciói között, és a nagy dózisú verapamilos gátlás (MDR1, mrp1) funkció MAF értéke, és a túlélési idők között.



Problémaként merült fel az, hogy nehezen összeegyeztethetőek a flow cytometriás (FACS) analizissel történő mérések. Ennek az oka, hogy a mintavétel és az analízis nagyon eltérő helyen történik. Ezért lépéseket tettünk arra, hogy sejteket szeparáljunk a daganatokból és azokat "short", ill. "long term" tenyésztéssel, és szaporításal életben tartsuk. Így lehetőség adódik arra, hogy a mintavételezés és a mérés egymástól eltérő időben történhessen. A sejszeparálásban és továbbtenyésztésben részt vett a pályázatban résztvevő Dr. Tuboly Tamás és főként a lymphoid sejtek esetében a SOTE 1 sz. Patológiai Intézet laboratóriumának vezetője, Hunyadiné Sebestyén Anna, és a PhD hallgató dr. Márk Ágnes.

Alkalmunk csak daganatos (lymphomás) nyirokcsomókból vett „tru cut” biopsziás minták felhasználására volt.

További feldolgozás is történt a biopátumokból. Ebben „short term” tenyésztésre szeparáltunk sejteket. A túlélő sejt kultúrát felhasználtuk a sejtek kemoterápiára mutatott érzékenységének (apoptosisának) mértékének vizsgálatára.

Az alábbi sejt vonalaink maradtak élők, ill. a későbbi vizsgálatokra nézve használhatóak: lymphoid daganat 5 db, mastocytoma 1 db, petefészek carcinoma 1 db. A sejtek életben maradásának idejét tripánkéék festéssel ellenőrizzük Bürker-kamrás analizissel.

A lymphomás kutyabetegek daganatsejtjeinek immunfenotipizálására is megtörtént. A sejteket "short term" sejt kultúra formájában kezeltük kemoterápiás szerekekkel, és FACS analizissel mértük a szerekre mutató apoptosis mértékét.

A lymphomás kutyák terápiájának megválasztása és prognózisa több tényezőtől is függ. Vizsgálatunkban próbáltuk ezeket a tényezőket bővíteni, hogy még specifikusabb terápiát alkalmazhassunk és még pontosabb prognózist kapjunk. Megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a lymphomás sejtek felületén expresszáldó CD-molekulák és a különböző kemoterápiás szerekre adott apoptózis között.

Összesen 6 páciens vizsgáltunk. Mindegyik esetben a klinikai vizsgálatokat, vérvizsgálatokat, csontvelő aspirátum vizsgálatot, valamint nyirokcsomó kimetszést követően rutin szövettani és immunhisztokémiai elemzéseket is végeztünk. A kutyák betegségének előrehaladottsága jelölésére minden esetben elvégeztük a stádiumok és alstádiumok meghatározását. Számos immunhisztokémiai paraméter meghatározására került sor. A lymphoma immunfenotípusát CD3, CD4, CD5, CD8, CD14, CD21, CD34, CD45 és MHC II markerekkel, a proliferációs készséget a Ki67-es fehérje expressziójának vizsgálatával határoztuk meg. A betegeket két csoportba osztottuk a lymphoma

spontán apoptózisának alapján, így lett egy 90% feletti (n=3) és egy 80% alatti (n=3) csoport.

Ennek a két csoportnak a nyirokcsomó-mintáját ötféle kemoterápiás gyógyszer kétféle dóziséval kezeltük, majd megfigyeltük, hogyan változott az apoptózisuk.

A módszer rövid leírása

A plate-ből a sejteket 2-300.000 sejt/ml) átpipettáztuk a FACS csövekbe, ezután lecentrifugáltuk 10 percen át 1000 RPM-mel. A felülúszó elöntése után csövenként 1 ml -20 °C-os, 70%-os etanolt adtunk a sejtekhez. 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintát, így fixálva a sejteket, majd 30 percen át -20 °C-on tovább inkubáltuk a mintát, hogy hosszabb ideig tárolhatóvá tegyük. A mérés előtt a csöveket még egyszer 10 percen át 1000 RPM-mel vagy 3 percen át 1300 RPM-mel lecentrifugáltuk és a felülúszót leöntöttük. Csövenként 500 µl alkalikus extrakciós puffert adtunk a mintához (200nM Na₂HPO₄, pH=7,4 és 100 µg/ml RN-áz A (Sigma)). A pufferhez a ribonukleáz A-t a mintához történő kimérése előtt adtuk 5µl/1ml mennyiségben. Ezután 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően etidium bromiddal (10 µg/ml, Calbiochem) festettük. 15 perces szobahőmérsékleten való inkubálás után áramlási citométerrel lemértük.

A sejtciklus és apoptózis detektálása FACScan áramlási citométerrel (BD Biosciences) történt, mintánként 10-20000 sejtet vizsgálva. Az adatokat Winlist (Verity Software House) programmal dolgoztuk fel. A módszer lehetővé teszi a DNS tartalom változása alapján a sejtciklus bizonyos fázisainak elkülönítését, illetve az alacsony DNS kioldódik (ezek az apoptotikus sejtek).

A FACS csövekben lévő minta egy köpenyfolyadékba injektálódik. A hidrodinamikus fókuszálás biztosítja, hogy a sejtek a köpenyfolyadék áramában és a megfelelő áramlási kamrában egyesével haladjanak el az Argon lézer (monokromatikus, $\lambda = 488$ nm) fényforrás előtt. A lézer előtt elhaladó sejtekről a fény kis és nagy szögben szóródik, melyet megfelelően elhelyezett detektorok érzékelnek. A kis szögben vagy előre szórt fény a sejt méretével arányos (Forward Scatter = FSC). A nagy szögben vagy oldalra szórt fény a sejt granularitásával arányos (Side Scatter = SCC).

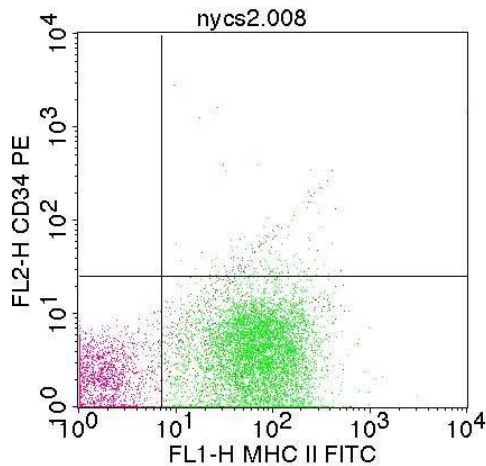
A monoklonális antitestet fluoreszcens festékekkel jelöljük. A leggyakrabban használt fluoreszcens festékek:

1. FITC: fluoreszcein izotiocianát
2. PE: phycoerythrin
3. PerCP: peridin klorofill-A protein
4. APC: allophycocyanin

A fluoreszcens festéket a lézer gerjeszti, az elektronok magasabb energiájú pályákra kerülnek ($\lambda_{exc} = 488$ nm). A fluorokróm a gerjesztési hullámhossznál nagyobb hullámhosszú fényt emittál, miközben visszatérnek az alap energiájú állapotba. Külön detektorok (photomultiplier, PMT) szolgálnak a FITC, PE, PerCP, APC festékek által emittált fény érzékelésére. A PMT-k nem fluorokróm, hanem hullámhossz érzékenyek. A spektrális átfedések

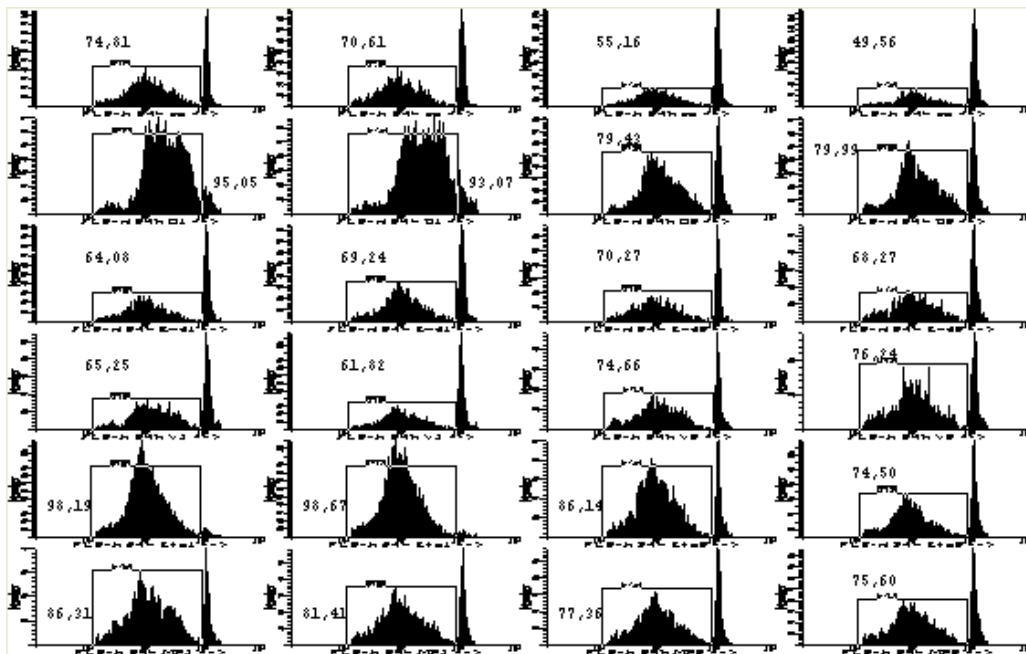
kiküszöbölésére szolgál az úgynevezett kompenzáció. A műszer 1 sejtről 5 adatot tárol (FS, SS, FL1, FL2, FL3) háromszínű analízis esetén úgynevezett list mode file-okban (18. ábra).

Az adatok analóg-digitális konverziója után a számítógép hisztogramok vagy felhőképek formájában jeleníti meg a sejtek jellemző paramétereit a hozzájuk tartozó számszerű értékekkel (19. ábra).



18. ábra Példa a színes felhődiagramos ábrázolásra

Látható, hogy a zölddel jelölt lymphocyták pozitívak az MHC II és negatívak a CD34 markerre, míg a rózsaszínnel jelölt törmeléksejtek mindkettőre negatívak



19. ábra 24 órás kezelés utáni apoptózis mértéke áramlási citometriával hisztogrammal ábrázolva (példa)

(Az y tengely az apoptózis százalékos számát, az x tengely a fluoreszcencia mértékét jelzi.)

A kis elemszám ellenére szignifikáns összefüggéseket figyeltünk meg:

Az öt kemoterápiás szer két különböző dózisának apoptózist indukáló hatása korrelált egymással. A nagy spontán apoptózist mutató sejtek a kezelésre dózistól függetlenül a kontrollhoz hasonló százalékban apoptotizáltak. A kis spontán apoptózisú sejtek a kontrollhoz képest magasabb százalékban apoptotizáltak, a kezelési koncentrációtól függetlenül.

A kis elemszám ellenére mégis statisztikailag szignifikánsnak bizonyult az apoptózis mértéke. A nagyobb dózisú doxorubicin hatására a kis spontán apoptózist mutatók fokozottabb apoptózist mutattak. A nagy spontán apoptózisú sejtekhez képest a kis spontán apoptózisú sejtek a doxorubicin nagyobb adagjára 21,41 %-os csökkenést mutattak ($p=0,02$).

Az apoptózis mértéke a kis spontán apoptózisú esetekben az ciklofoszfamid kisebb adagjára 24,88 %-kal ($p=0,03$), az ciklofoszfamid nagyobb adagjára 24,48 %-kal ($p=0,02$), a metil-prednizolon kisebb dózisára 19,81 %-kal ($p=0,03$), a metil-prednizolon nagyobb adagjára 24,04 %-kal csökkent ($0,01$)

Ha tehát, a doxorubicin mindkét dózisa hasonló mértékű apoptózist indukál mint a ciklofoszfamid két dózisa (5. táblázat). Tehát lehetséges, hogy ha a lymphoma szegényesen reagál a doxorubicin egyik dózisára, akkor ugyanilyen szegényesen fog reagálni a ciklofoszfamid hasonló dózisára. Ezt tudva el lehetne kerülni a felesleges gyógyszeralkalmazást. Ugyanilyen összefüggést találtunk a vinkrisztin és a metilprednizolon két dózisa között (6. táblázat).

Megvizsgáltuk még az összefüggéseket a spontán apoptózis és a Ki67 expresszió mértéke, a recidívamentes túlélés, a teljes túlélés és a stádium között. Az alábbi eredményeket kaptuk:

A kis spontán apoptózisú eseteknek a Ki67%-ban kifejezett sejtproliferációjának mértéke 8%-kal nagyobb, mint a nagy spontán apoptózisú esetekben.

A recidívamentes túlélési idő jelentősen nagyobb a kis spontán apoptózisú esetekben (12), mint a nagy spontán apoptózisúakéban (0,5). A teljes túlélési idő jelentősen nagyobb a kis spontán apoptózisú esetekben (32), mint a nagy spontán apoptózisúakéban (12,5).

A nagy spontán apoptózisú esetek 16,67 %-ban magasabb stádium besorolásba estek, mint a kis spontán apoptózisú esetek.

Megfigyeltük még a CD-markerek és az apoptózis mértékének az összefüggéseit. A jellemzően T-sejt marker pozitív (CD3, CD4, CD5) sejtek kis spontán apoptózist míg a B-sejt marker pozitív (CD21), a monocyta (CD14) és a haemopoietikus őssejt (CD34) marker pozitív sejtek nagy spontán apoptózist mutattak.

A sejtfelszíni markereket tekintve a CD14 pozitív (monocyta marker) és a CD34 pozitív (haemopoietikus őssejt) sejtek egyértelműen negatívan korreláltak a

vinkrisztin és a metilprednizolon mindkét dózisában bekövetkező apoptózisra. Tehát lehetséges, ha a lymphomás betegek sejtfelszínén ezek a markerek megtalálhatók, a vinkrisztin és a metilprednizolon-kezelés nem feltétlen szükséges.

5. táblázat. A doxorubicin és a ciklofoszfamid közötti korreláció (** = Szignifikáns korreláció $p < 0.01$)

Doxorubicin, kis dózis	Ciklofoszfamid, kis dózis	0,973 (**)
Doxorubicin, kis dózis	Ciklofoszfamid, nagy dózis	0,981 (**)
Ciklofoszfamid, kis dózis	Doxorubicin, nagy dózis	0,992 (**)
Ciklofoszfamid, nagy dózis	Doxorubicin, nagy dózis	0,995 (**)

Az előzőhöz hasonló korrelációt találtunk a vincrisztin kétféle dózisa és a metilprednizolon kétféle dózisa között. Mindkét esetben a két szer két dózisa hasonló mértékű apoptózist indukált.

6. táblázat. A vinkrisztin és a metilprednizolon közötti korreláció (** = Szignifikáns korreláció $p < 0.01$)

Vinkrisztin, kis dózis	Metilprednizolon, kis dózis	0,968 (**)
Vinkrisztin, kis dózis	Metilprednizolon, nagy dózis	0,970 (**)
Vincristin, nagy dózis	Metilprednizolon, kis dózis	0,995 (**)
Vinkrisztin, nagy dózis	Metilprednizolon, nagy dózis	0,993 (**)

Az alstádium korrelációt mutat a recidívamentes túlélési idővel.

Az MDR-funkció in vivo szcintigráfias vizsgálata

Terv: Az MDR in vivo végezhető, non-invazív vizsgálatát radioaktív izonitril származék használatával szcintigráfias eljárással végezzük.

Ez a vizsgálatot csak daganatos kórképekben (lymphoma, emlődaganat, mastocytoma, lágyoszöveti sarcoma) szenvedő betegeink esetében tervezzük.

In vivo ^{99m}Tc MIBI wash-out szcintigráfias MDR vizsgálat az állatorvosi gyakorlatban daganatos betegek esetében.

A vizsgálat célja a Pgp kimutatása az in vivo ^{99m}Tc -MIBI szcintigráfias módszerrel és ennek összehasonlítása az in vitro immunohisztokémiai festéses technikával, valamint az eredmények összehasonlítása a túlélési idővel.

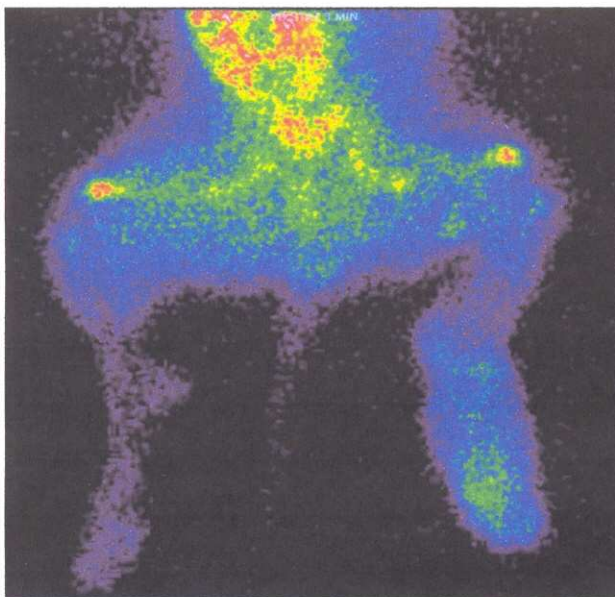
Összesen 98 malignus daganatos kórképben szenvedő kutya és macska beteg vizsgálatát végeztük. Általános anaesthesiában a 20-50 MBq/10 bwtg ^{99m}Tc -

MIBI (Cardio-SPECT®, Medi-Radiopharma Ltd, Hungary) adagolása történt. Dinamikus kiértékelés (scan) történt 0-3 percen belül, valamint statikus felvételek történtek az aplikálást követő 3., 30., és 60. percben. Összesen 76 esetben végeztünk immunhisztokémiai vizsgálatot. Ezek közül összesen 36 kutya, és 10 macska beteg kemoterápiás, sebészi, vagy radioterápiás kezelésben részesült. A betegek közül 12 esetben a nem mutatkozott szöveti ^{99m}Tc-MIBI felvétel (I csoport) ezek agyai daganatosok, lipomás és perianalis mirigy karcinómák voltak. Összesen 23 beteg (II. csoport) mutatott kevesebb, mint 10%-os „kimosást” az aplikációt követő 1 órában. Az immunhisztokémiai módszerekkel ezek között kis számú gyengén pozitív (score 1-3/5) egyed volt a Pgp festődés szempontjából. Összesen 51 esetben jelentkezett 10%-nál nagyobb immunhisztokémiai pozitivitás (III. csoport) (20. ábra). Ezekben erős izotóp washout is megfigyelhető volt. A II. csoport egyedeinek az élettartama (465 ± 168 nap) jelentősen ($p \leq 0.01$) hosszabb volt, mint a III. csoport egyedeinek az élettartama (168 ± 62 nap). Az in vivo ^{99m}Tc-MIBI wash-out vizsgálatok eredményei és a jól korreláltak a Pgp immunhisztokémiai eredményeivel ($r=0.67$, $p<0.05$).

20. ábra. Szcintigráfias felvétel egy fibrosarcoma ^{99m}Tc-MIBI „kimosási” vizsgálatáról, amely az aktív MDR pumpafunkciót mutatja.

A pumpa működik-rezisztens tumor /kutya lábvég fibrosarcoma/

Korai felvétel 3-5 perccel injektálás után.



Késő felvétel 40-60 perccel injektálás után.

