

A zárójelentést tematikus formában készítettem el. Ebben két fő- és egy altéma szerint állítottam össze a 2001-2004-ig terjedő időszakban a 35246 sz. OTKA-pályázatban végzett munkáról szóló beszámolót. A beszámolóban szereplő témák nagy része közlésre került, részben szakcikk, részben konferenciákon előadás, ill. poszter formájában. A beszámoló terjedelméül, ezért köztes megoldást választottam, ugyanis nem minden részlet került publikációra a korábbiakban.

## **A SEJTEK MAGVACSKA SZERVEZŐ RÉGIÓJÁNAK (NUCLEOLARIS ORGANISER REGION, NOR) EZÜSTKOLLOIDOS FESTÉSÉVEL (AGNOR) SZERZETT TAPASZTALATOK**

A kutatási tervünkben szerepelt egy olyan festési eljárás alkalmazása, amellyel megbízhatóbban tudjuk elkülöníteni a daganatos sejteket a nem daganatos sejtektől. Terveink szerint a kutyák ún. non-Hodgkin típusú lymphomájának esetében és a testúri gyülemek sejtjeinek esetében végeztünk vizsgálatokat. Az AgNOR-módszer egy ezüstnitrát-reagenst tartalmazó koloidos festési eljárás, amellyel a sejtmagokon belül a magvacska szervező régió (nucleolaris organiser region, NOR) láthatóvá válik. A NOR a daganatos sejtekben nagyobb kiterjedésű és több számban fordul elő, mint az egészséges sejtekben. Az ún. AgNOR-módszerrel kapcsolatban tapasztalatokat gyűjtöttünk a módszer alkalmazhatóságáról, valamint kifejlesztettünk egy módosítást e festési módszerben, amellyel megbízhatóbban különíthetjük el a sejteket. Az említett vizsgálataink eredményeit az alábbiakban ismertetjük.

### *Az AgNOR-módszer alkalmazása testúri folyadékgyülemekből és nyirokcsomókból származó citológiai minták vizsgálatára*

Munkánk során a Crocker és munkatársai által kidolgozott ezüsttel festődő nucleoláris organizátor régió (AgNOR)-módszert vizsgáltuk. Célunk az volt, hogy az AgNOR-festés segítségével elkülönítsük a daganatos proliferációt mutató sejteket az élettani és reaktív eredetűektől.

Összesen 51 betegből származó mintát vontunk be kísérletünkbe, amelyek közül 21-et nyirokcsomókból, 30-at pedig testúri folyadékgyülemekből nyertünk. A mikroszkópos bírálat során két paramétert vettünk figyelembe: az AgNOR-ok egy sejten belüli átlagértékét (amelyet kenetenként minimum 100 sejt figyelembevételével kaptunk) és az AgNOR-ok sejttagon belüli eloszlását. Ez utóbbi elbírálását a Crocker (1988) által leírt osztályozás szerint végeztük (1 – egy AgNOR-szemcse csak a magvacskában, illetve a magban több magvacska észlelhető, és azokban csak egy AgNOR látható, 2- több AgNOR-szemcse a magvacskában, 3- egy, vagy több AgNOR-szemcse a magvacskán kívül is).

A nyirokcsomókból származó 21 kenetből 13 volt daganatos eredetű (12 lymphomás betegből származó és 1 karcinóma metasztázist mutató nyirokcsomó), a testúri folyadékgyülemekből származó minták esetében pedig 30-ból 13 mutatott neoplasztikus elváltozást. A daganatos proliferációt mutató nyirokcsomók esetében az AgNOR-számok átlaga 4,19, a nem daganatos esetekben pedig 1,62 volt. Ugyanezen értékeket a testúri folyadékgyülemek esetében számolva 3,98-at, illetve 2,69-ot kaptunk.

Az általunk vizsgált paraméterek és a sejtek neoplasztikus - nem neoplasztikus eredetének összefüggéseit statisztikai módszerekkel (Student-féle  $t$ -, Fisher exact-próba, valamint varianciaanalízis) értékelve szignifikáns összefüggés mutatkozott mindkét változó számértékének növekedése és a sejtek neoplasztikus eredetének valószínűsége tekintetében, ugyanakkor számos minta AgNOR-száma a határértékhez közelinek adódott. A Crocker-féle besorolás alapján az 1., 2. csoportba sorolt minták nem, míg a 3. csoportba sorolható minták daganatos eredetűek.

A nyirokcsomók esetén az 1. csoportba tartozók sejtmagonkénti AgNOR átlagértéke: 2,067, a 2. csoportba tartozó nem volt, és a 3. csoportba tartozóké 4,075-nek adódott. A testúri folyadékgyülemek esetén az 1. csoportba tartozók értéke 3,067, a 2. csoportba tartozóké 2,826 és a 3. csoportba tartozóké 4,250 volt. A nyirokcsomók esetében az 1. csoportba sorolt minták esetében kisebb, a 3. csoportba sorolható minták értékeinél, míg a testúri folyadékgyülemek esetében az 1. csoportba sorolt minták értékei nagyobbak a 2. csoportba sorolt minták értékeinél. Ez annak tudható be, hogy az 1. csoportba sorolható mintákra gyakran jellemző, hogy több magvacska van egy sejtmagban.

Arra a kérdésre, hogy daganatos eredetű-e egy minta, megbízhatóbb választ adhatunk, ha az AgNOR-ok száma mellett azok sejtmagon belüli eloszlását is figyelembe vesszük.

Az AgNOR-módszert hatékony, egyszerű módszernek tartjuk a citológiai minták elemzése céljából, ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy a hagyományos alkalmazást ellenfestési technikával módosítva még jobban értékelhető mintákat nyerhetünk.

Vizsgáltuk továbbá az AgNOR-festéssel szerzett eredményeket abból a szempontból, hogy a citológiai módszerrel vett minták esetében mennyiben térnek el azok a szövettani módszerrel vett mintáktól.

*Az AgNOR-módszer alkalmazása lymphomás kutyák nyirokcsomóinak citológiai és szövettani eljárásokkal történő vizsgálatára*

Kísérletünk célkitűzése az volt, hogy az AgNOR-módszer felhasználásával összehasonlítsuk az egészséges kutyákból származó citológiai és kimetszéses módszerekkel nyert minták eredményeit biztosan lymphomás egyedek citológiai, kimetszéses és biopsziás eljárásokkal vett mintáinak eredményeivel, illetve a kontroll és a beteg csoportokban a citológiai és a szövettani (biopszia és kimetszés) módszerekkel vett minták sejtenkénti átlagos AgNOR-számaikat egymással is összevetettük. Az eredményeket statisztikai módszerekkel (Kolmogorov-Smirnov teszt, kétmintás és páros T-próba) értékeltük ki.

A vizsgált 10 kontrollból 10 citológia és 10 kimetszés készült, míg a 17 betegből 17 citológia, 9 kimetszés és 7 biopszia, tehát összesen 27 citológiai, 9 kimetszéses és 7 biopsziás mintát vizsgáltunk.

A mikroszkópos bírálat során a mintánként kb. 100-150 sejtben a sejtenkénti átlagos AgNOR-számra és a sejtek Crocker szerinti besorolására voltunk figyelemmel. A kapott eredményeket kiértékelve a következőket állapíthatjuk meg:

Az egészséges egyedek citológiai és kimetszéses eljárásokkal nyert mintáinak AgNOR-eredményei statisztikailag azonosnak tekinthetők, szélsőértékek: 1,129 - 1,602.

A beteg egyedek citológiai és szövettani módszerekkel vett mintáinak eredményei közötti különbség szignifikánsnak mondható, szélsőértékek: citológiai minták sejtenkénti átlagos AgNOR-számai: 2,645 - 5,897, szövettani minták sejtenkénti átlagos AgNOR-számai: 2,201 - 3,750.

A kontroll és beteg egyedek citológiai és szövettani módszerekkel vett mintáinak eredményei közötti különbség is szignifikáns.

Az előrehaladottan beteg egyedek és a többi beteg citológiai és szövettani eljárásokkal vett mintáinak eredményei közötti különbség nem szignifikáns.

A kutyák lymphomáit szövettani szempontból a REAL-klasszifikáció szerint értékeltük és két csoportot különítettünk el, a kis- és a nagymalignitású (low grade és high grade) formákat. Az AgNOR-számokat e két csoport között is összehasonlítottuk. A citológiai és a szövettani módszerrel vett minták esetében is igazoltuk, hogy a kis malignitású formákban kisebb AgNOR-számok (citológiai minta: 3,2, szövettani minta: 2,7) adódnak, min a nagy

malignitású (citológiai minta: 4,1, szövettani minta: 3,2) formáknál. A korrelációs analízissel mindkét eredetű mintában igazolható volt, hogy minél malignusabb, proliferatívabb a daganatos kórkép annál nagyobb AgNOR-számok tapasztalhatók.

A Crocker-féle besorolás 1. típusába tartozó egyedek mintái élettaninak tekinthetők, egészségesek vagy reaktívak, és nem daganatosak, míg a 3. típusba tartozó minták döntően daganatos (lymphomás) megbetegedésben szenvedő kutyákból származtak.

A fenti eredményeket összevetve megállapíthatjuk, hogy

A betegség ténye citológiai és kimetszéses technikával nyert mintákból egyaránt megállapítható.

A betegség előrehaladott (IV/b.) stádiumába sorolt betegek esetében a sejtenkénti átlagos AgNOR-számok sem a szövettani, sem a citológiai módszerrel nyert nyirokcsomó-mintákban nem mutattak szignifikáns különbséget, viszont a kismalignitású lymphomák AgNOR-számai kisebbek, mint a nagymalignitásúak.

A betegség ténye citológiai módszerrel érzékenyebben mutatható ki, mint a szövettani eljárásokkal.

A biztos diagnózis érdekében ajánlatos mind az AgNOR-szám, mind pedig a Crocker-féle besorolási szerinti tipizálás, különösen, ha az AgNOR érték az egészséges és daganatos határértékek körül mozog.

#### *Az AgNOR-felület mérése képdigitalizációs módszerrel*

Előzetes vizsgálataink alapján hat non-Hodgkin típusú lymphomában szenvedő kutya nyirokcsomójából készült citológiai mintát vizsgáltunk. A festett keneteket NIKON Eclipse 400 tip. Mikroszkóp és NIKON Coolpix 995 digitális fényképezőgép segítségével lefényképeztük, a képeket SONY PVM 1453 Mp video stúdió monitorral rögzítettük, majd IMAN képdigitalizációs software (MTA, KFKI) segítségével elemeztük.

A program segítségével a sejtek magjának nagysága és az ún. AgNOR-felület is mérhetővé vált. Az átlagértékeket felvettük, és viszonyszámokat is létrehoztunk. Az alábbi paramétereket állapítottuk meg:

átlagos AgNOR-szám digitális számolással ( $1,35 \pm 0,35$ ), átlagos magfelület ( $6,38 \mu\text{m} \pm 0,7$ ), átlagos AgNOR felület ( $0,65 \mu\text{m} \pm 0,43$ ), átlagos mag- és átlagos AgNOR-felület arány ( $12,8 \pm 6,4$ ), számolt átlagos AgNOR-szám ( $3,2 \pm 0,2$ ). A képdigitalizációs programmal számolt AgNOR-számok kisebbnek adódtak, mint a mikroszkópos számolással kapott értékek. Az átlagos szorzat  $0,41 \pm 0,13$  volt. Az értékek és a recidívmentes túlélési idő között nem volt szignifikáns összefüggés.

## **SZABADGYÖKÖS ÉS ANTIOXIDÁNS FOLYAMATOK VIZSGÁLATA LYMPHOMÁS KUTYÁK NYIROKCSOMÓ- ÉS VÉRMENTÁIBAN**

Kísérleteink megkezdése előtt irodalmi adatok alapján kívántunk egy megfelelő áttekintést adni a daganatos folyamatok és a szabadgyökös, ill. antioxidáns reakciók közötti összefüggésekről. Az irodalmi áttekintésről konferencián is beszámoltunk.

#### *Szabadgyökös és antioxidáns folyamatok szerepe a daganatos betegségek terápiarezisztenciájának kialakulásában (irodalmi áttekintés)*

Különböző daganatos megbetegedéseknél mind humán, mind állatorvosi vonalon egyik gyakran jelentkező, és eddig megoldatlan probléma, hogy a kezelések során a használt

citosztatikummal vagy a sugárterápiával szemben a daganatos sejtek ellenállóképessége megnő, és nem alakul ki bennük irányított sejthalál (apoptosis), vagy citotoxikus hatás.

Elemzésünk nullhipotéziseként Bates (1994) állítását tekintjük át, melyben a szerző szerint a terápiaerezisztencia (multidrug resistance, MDR) kialakulása két fő mechanizmuson keresztül érvényesül. Az első a sejtek membránján egyes pumpafehérjéknek, mint pl. a P-glikoproteinek a megjelenése és annak hatása, melynek során egy ATP-függő ionpumpa-mechanizmus a sejtekből kiáramoltatja a lipofil anyagokat, pl. a citosztatikumokat. A másik fő mechanizmus a daganatos sejtek egészségesekeéhez viszonyított, illetve a terápiaerezisztens daganatos sejteknek a terápiaérzékeny sejtekhez viszonyított jobb antioxidáns tulajdonsága, amely a glutation-redox-rendszeren keresztül érvényesül. Igazolni kívántuk, hogy a témában megjelent számos tudományos közlemény alátámasztja-e ezt az állítást, illetve, hogy melyek a főbb irányvonalak a daganatok terápiaerezisztenciájának kialakulása, és a szabadgyökös, ill. antioxidáns reakciók összefüggésének kutatásában. Néhány cikkben valóban szoros összefüggést lehet találni a tumoros, ill. MDR-rel rendelkező daganatos sejtek és a jobb enzimatis, ill. nem enzimatis antioxidáns ellátottság között, ilyenek, pl. a patkányok és az egerek leukémia és lymphoma sejtvonalaiv végzett vizsgálatok, az emberek egyes leukémiás és lymphomás sejtvonalaiv, az emberek emlő, tüdő és astrocytás daganataiv végzett kutatások. Más cikkek a nullhipotézist nem támasztják alá, pl. az emberek egyes leukémia és lymphoma (pl. a non-Hodgkin-lymphoma) típusaiv, a cervicalis, a colon, az oesophagus carcinomáiv végzett kutatások. Azokban a daganatokban, amelyekben az antioxidáns rendszer hatékonyabb, elsősorban a glutation-redox-rendszer működik jobban, ezen belül is a redukált glutation (GSH), esetleg az oxidált glutation (GSSG) koncentrációja magasabb a tumoros, ill. MDR-rel rendelkező daganatos sejtekben, szövetekben. Kutatásokban foglalkoztak azzal, hogy ha a GSH-tartalom csökken a sejtek terápiaérzékenysége nő, így az apoptosis-indukció, ill. a citotoxikus hatás fokozódik. Ugyanakkor a sejtek tiol-tartalmának növelésével az apoptosis-gátlás kimutatható volt. Számos munka igazolja a NADPH, a cisztein, a glutation-S-transzferáz, a glutation-peroxidáz és az E-vitamin nagyobb koncentrációban ill. aktivitásban való jelentkezését a daganatos, ill. az MDR-rel rendelkező neoplasztikus sejtekben, szövetekben. Érdekes tapasztalat, hogy az apoptosis-rezisztenciát okozó protoonkogén Bcl2 expressziója a glutation-redox rendszer működését fokozza. Más vizsgálatok pedig, azt igazolják, hogy többek között a glutation-redox rendszer elemei (és még több vizsgálatban a szuperoxid-dizmutáz és a kataláz) csökkent koncentrációban, ill. aktivitással jelennek meg a tumoros, ill. az MDR-rel rendelkező daganatos sejtekben. A lipidperoxidációt fokozó reaktív oxigén intermedierek, pl. a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fokozta az MDR-ért felelős P-glükoprotein expresszióját a sejtekben, és ez a hatás antioxidánsok adásával (pl. C-vitaminnal) kivédhető volt. A daganatos sejtekben a szabadgyökök képződését jelző tiobarbitursav-reaktív anyagok mennyisége általában nő, kivéve néhány esetet (pl. emberi thymocyták, emlőtumor, hepatoid sejtés carcinoma). A daganatos sejtek lipidperoxidációs folyamataivak elmaradását arra vezették vissza, hogy a sejtek membránstruktúrája megváltozik, és a többszörösen telítetlen zsírsavak helyett telített, a lipidperoxidációra kevésbé érzékeny zsírsavak foglalnak helyet a membránban.

Irodalmi áttekintésünk alapján a nullhipotézisben megjelölt folyamatok nem egyértelműen igazolhatók, a szabadgyökös és antioxidáns reakciók MDR-rel való összefüggése még további alaposabb kutatásokat igényel.

Az említett irodalmi adatok vezettek arra, hogy ne csak *in vitro*, sejt kultúrákon, hanem *in vivo*, valódi daganatos elváltozást mutató betegeken végezzünk vizsgálatokat a szabadgyökös és antioxidáns folyamatok szerepének tisztázása céljából. Ezért, vizsgálatokat végeztünk a

kutyák non-Hodgkin típusú lymphomája esetében a daganatos és az egészséges nyirokcsomó-, ill. a beteg, valamint az egészséges kutyák vérmintáinak antioxidáns és szabadgyökös paramétereivel kapcsolatban. Alaptézisünk az volt, hogy jelentkezik-e fokozott szabadgyök képződés a daganatos sejtekben, ill. rendelkeznek-e a daganatos sejtek erősebb, ellenállóbb antioxidáns képességgel az egészséges nyirokcsomók sejtjeihez képest. Továbbá megfigyeléseket végeztünk azzal kapcsolatban, hogy a daganatos betegek vérmintáiban jelentkezik-e különbség az antioxidáns és szabadgyökös paraméterek tekintetében az egészséges kutyák vérmintájához képest.

*A szabadgyök-reakciók és az antioxidáns védekezés elemeinek vizsgálata egészséges és lymphomás kutyákban*

Vizsgálatunk során 11 különböző fajtájú, 3 és 8 év közötti korú, hat hím és négy nőstény ivarú generalizált multicentrikus lymphomában szenvedő és 10 egészséges 1,5-2,5 éves, négy hím és hat nőstény ivarú beagle kutya vér- és nyirokcsomó-mintái alapján kerestük az egészséges és lymphomás kutyák szabadgyökös és antioxidáns paramétereinek eltéréseit. A kutyák bal váll előtti nyirokcsomóinak műtéti eltávolítása előtt és közben vett vérmintákból rutin hematológiai és plazmabiokémiai vizsgálatokat is végeztünk.

Az alábbi antioxidáns és szabadgyökös paramétereket vizsgáltuk:

- redukált glutation-koncentráció (GSH): vérplazmából, vörösvérsejt-hemolizátumból és nyirokcsomó-homogenizátumból
- oxidált glutation-koncentráció (GSSG): vérplazmából, vörösvérsejt-hemolizátumból és nyirokcsomó-homogenizátumból
- redukált- és oxidált glutation- arány (GSH/GSSG): vérplazmából, vörösvérsejt-hemolizátumból és nyirokcsomó-homogenizátumból
- glutation-peroxidáz-aktivitás (GSH-Px): vörösvérsejt-hemolizátumból és nyirokcsomó-homogenizátumból
- tiobarbitursav-reaktív anyagok koncentrációja malondialdehidben (MDA) kifejezve: vörösvérsejt-hemolizátumból és nyirokcsomó-homogenizátumból
- szuperoxid-dizmutáz-aktivitás (SOD): vörösvérsejt-hemolizátumból és nyirokcsomó-homogenizátumból
- vasredukción alapuló összantioxidáns-státusz meghatározás (FRAP-érték): vérplazmából, és nyirokcsomó-homogenizátumból
- E-vitamin-koncentráció: vérplazmából, és nyirokcsomó-homogenizátumból
- C-vitamin- koncentráció: nyirokcsomó-homogenizátumból
- összszabadgyök-koncentráció (TFR) meghatározás elektronspin-rezonancia-spektroszkópiás (ESR) módszerrel: nyirokcsomó-mintákból
- a nyirokcsomók sejtjeinek szabadgyöktermelő kapacitása forbol-mirisztát-acetát (PMA) indukció hatására kemilumineszcenciás módszerrel: nyirokcsomó-mintákból (iFR)

A kimetszett nyirokcsomókból szövettani vizsgálat is készült és a lymphomás kórképek besorolását is elvégeztük a REAL-féle osztályozás szerint. A lymphomatípusok pontosabb meghatározása CD79a, CD3 és Ki-67 markerek alapján immunhisztokémiai módszerrel történt.

A mérési eredmények alapján azt a következtetést vonhattuk le, hogy a betegek antioxidáns védekezése lényegesen rosszabb az egészségesekénél (1. táblázat). A beteg kutyák nyirokcsomóinak sejtjei sokkal kisebb mértékben reagáltak a forbol-mirisztát-acetát (PMA) stimulációra, mint az egészségeseké, továbbá a betegek nyirokcsomói nagyobb mennyiségű szabadgyököt és kevesebb antioxidánsot tartalmaznak, mint az egészségeseké (2. táblázat). Vizsgálataink eredményeit az alábbi táblázatban is közöljük.

1. táblázat

Szabadgyökös és antioxidáns paraméterek vizsgálata vörösvérsejt hemolizátumban kontroll egészséges és lymphomás kutyák esetében

	<b>MDA</b>	<b>SOD</b>	<b>GSH</b>	<b>GSSG</b>	<b>GSH/ GSSG</b>	<b>GSH-Px</b>
	nmol/g protein	U/g protein	μmol/g protein	μmol/g protein	μmol/g protein	U/g protein
Control n=10	415.5 ± 81.5	1185.0 ± 174.8	1858.1 ± 196.1	24.6 ± 11.9	118.3 ± 108.2	107.3 ± 32.2
Lymphoma n=11	375.0 ± 48.0	797.9*** ± 159.7	1406.8*** ± 223.3	18.39 ± 2.5	77.37 ± 13.9	97.54 ± 29.0

A statisztikai analízis Student-féle *t* próbával (\*\*\*) $P < 0.001$ ). Az eredmények átlagértékét és szórását ( $\pm$ ) tüntettük fel

## 2. táblázat

Szabadgyökös és antioxidáns paraméterek vizsgálata vörösvérsejt hemolizátumban kontroll egészséges és lymphomás kutyák esetében

	<b>MDA</b>	<b>GSH</b>	<b>GSSG</b>	<b>GSH/ GSSG</b>	<b>Vitamin E</b>	<b>Vitamin C</b>
	nmol/g protein	μmol/g protein	μmol/g protein		μg/g protein	μg/g protein
Control n=10	118.7 ± 37.7	1240.5 ± 563.8	7.52 ± 6.85	279.2 ± 171.8	29.6 ± 28.3	219.5 ± 34.1
Lymphoma n=11	119.57 ± 110.9	814.9* ± 291.8	9.98 ± 4.25	96.19** ± 57.8	34.7 ± 22.0	207.2 ± 64.6

  

	<b>SOD</b>	<b>GSH-Px</b>	<b>FRAP</b>	<b>TFR</b>	<b>iFR</b>
	U/g protein	U/g protein	μmol/g protein	nM TEMPO	fmol O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> / minute
Control n=10	69.0 ± 28.2	8.4 ± 4.4	17.3 ± 11.4	423 ± 79	499.6 ± 386.9
Lymphoma n=11	14.6** ± 8.2	10.8 ± 4.3	18.8 ± 8.9	614** ± 125	11.9** ± 3.8

A statisztikai analízis Student-féle *t* próbával (\**P*<0,05, \*\**P*<0.01). Az eredmények átlagértékét és szórását (±) tüntettük fel

Fontosnak tartottuk, hogy alaposan tanulmányozzuk a lymphomás kórképek kapcsán a terápiarezisztencia, az ún. multidrug resistance (MDR) és a szabadgyökös és antioxidáns folyamatok közötti összefüggéseket. Amint ezt megtettük az MDR és általában a tumorok összefüggésében, úgy ezt tettük speciálisan a lymphoma vonatkozásában.

*Szabadgyökös és antioxidáns folyamatok szerepe a lymphomák és leukemiák esetében (irodalmi áttekintés)*

### Proliferációs képesség

Vajon a fokozott sejtosztódás okozhat fokozott szabadgyök képződést, valamint fokozott antioxidáns védekezést a daganatos sejtekben, szövetekben?

Igen

a) Bodes és mtsai. (1999) kísérletében igazolta, hogy a proliferatív Nb2 lymphoma sejtek, malignus progressziója együtt jár fokozott antioxidáns védekező rendszerükkel, amellyel megvédik magukat az oxidatív stressz-től, amelyet az anti-neoplastikus szerek okoznak.

b) Nb2-SFJCD1 sejtek képesek több glutationt termelni, ha oxidatív stressz-nek teszik ki őket, és nagyobb ellenállóképességet tanúsítanak a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indukálta apoptózisra (Meyer TE és mtsai. 1998).

c) Plazma-membrán ektoenzim gamma-glutamyl transpeptidáz (GGT) a neoplasztikus progresszió markere számos malignus tumorban és azok metasztázisában. Ugyanakkor ez az enzim az extracelluláris redukált glutation (GSH) metabolizmusában játszik szerepet, mert prekursorokat biztosít a GSH szintéziséhez. Az U937 lymphoma sejtek, nagymennyiségű membránhoz kötött GGT-t tartalmaznak. A GGT-mediálta GSH-metabolizmus együtt jár a hidrogénperoxid extracelluláris képződésével. A GGT-aktivitás csökkenti a protein thiol-ok mennyiségét a sejtfelületen a szulfhidril oxidáció és a protein S-thioláció miatt (Dominici S et al, 1999).

#### Apoptózisra való hajlam

Hipotézis szerint az apoptózisra való hajlam a szabadgyökök révén jön létre, amelyet az oxidatív folyamatok indukálnak és mediálnak.

Vajon a fokozott antioxidáns védekezéssel rendelkező tumorok antiapoptotikusak?.

Igen

a) Voehringer DW és mtsai. (2000) egy multigenetikus programot feltételezett az apoptózisra megmutatókó érzékenységgel összefüggésben. Ezen belül genetikai átalakulások vehetnek részt, pl. a mitokondriális “uncoupling”-ban és a csökkenő membránpotenciálban. Ez a program befolyásolja egyes apoptózist kiváltó faktorok kijutását a mitokondriumokból, amelyek révén az ún. kaszpáz-kaszád aktivitása indul meg és apoptózist okoz. Ezzel ellentétesen azok a sejtek, amelyek rezisztensek az apoptózisra, csökkentik ezeket a biokémiai metabolikus folyamatokat, míg azokat az utakat aktiválják, amelyek a GSH-koncentráció növelésével létrehozzák, vagy fenntartják a magas intracelluláris redox-potenciált.

b) Vlachaki MT and Meyn RE (1998) szerint az intracelluláris thiolok megvédik a sejteket az apoptózistól, minthogy a GSH- és az oxidált glutation- (GSSG) szintek magasabbak a besugárzásra rezisztens, bcl-2-expresszáló egérlymphoma sejtekben (LY-ar sejt vonal) a besugárzásra érzékeny nem-bcl-2-expresszáló sejtekhez képest (LY-as sejt vonal).

c) Mirkovic N. és mtsai. (1997) szintén úgy véli, hogy az antiapoptotikus bcl-2 fehérje a sejtekben meggátolja az apoptózist az antioxidáns rendszeren keresztül, amely a sejtekben jelenlévő thiolok részvétele révén működik.

Nem

Az oxigén-eredetű szabadgyökök hatása a környezet oxigénkoncentrációjától is függ. Így feltételezések szerint az oxigén maga is indukálhatja az apoptózis kialakulását. Muschel RJ és mtsai. (1995) kísérletében azt igazolta, hogy ez a feltevés nem egyértelműen igaz.

a) Lee Y, és Shacter E (1997) kimutatta, hogy az endogén bcl-2-fehérje nagyfokú expressziója nem védi meg a sejteket a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> által indukált sejtpusztulástól, míg ugyanezeket a sejt vonalakat az egyéb ágensek által okozott apoptózistól megvédi.

b) Shimizu S (1995) és mtsai. szerint a bcl-2 és a Bcl-xL mediálta anti-apoptotikus funkció nem az oxigén-eredetű szabadgyökök által befolyásolt mechanizmuson keresztül jön létre.

#### Terápiarezisztencia (MDR)

Vajon a terápiarezisztencia kapcsolódik-e a fokozott antioxidáns védekezési mechanizmushoz?

Igen

a) Bates SE és mtsai. (1994) jelezte, hogy a GSH, valamint a kapcsolódó enzimek fokozott jelenléte igazolódott a terápiarezisztens tumorokban.

b) Lee WP és mtsai. (1996) feltételezte, hogy a HOB1 sejtekben az adriamycin-kezelés apoptózist indukáló hatásának korai szakaszában, a glutation-S-transzferáz (GST) és a glutation-peroxidáz fontosabb szerepet játszhat, mint a P-glycoprotein hatása.



Nem

Ribrag V és mtsai. (1995) vizsgálták a fontosabb kemoterápiás szerekkel szembeni metabolikus utakat normál lymphocytákban, valamint kemoszenzitív és kemorezisztens NHL-sejtvonalakban. Egymással ellentétes eredményekre jutottak. Az eredmények azt mutatták, hogy a citokróm P-450 enzimatis rendszer hiányzott mind a normál, mind a lymphoma sejtvonalakban. A GST-aktivitás szignifikánsan kisebb volt a kemorezisztens NHL-sejtekben a normál lymphocytákhoz képest.

A kutatómunkánk során non-Hodgkin típusú lymphomában szenvedő kutyák kemoterápiás kezelése történt meg. A kezelés során szerzett tapasztalatainkat összevetettük azokkal a korábban mért paraméterekkel. Összehasonlító elemzéseket végeztünk a beteg kutyák különböző paramétereivel kapcsolatban, továbbá vizsgáltuk, hogy a paraméterek hogyan viszonyulnak az állatok kezelését követő recidívamentes túlélési idejéhez, valamint a betegség kialakulásától számított teljes élettartamához.

#### *Lymphomás kutyák szabadgyökös és antioxidáns paramétere a túlélési idő vonatkozásában*

Vizsgálatunk során 11 különböző fajtájú, generalizált multicentrikus lymphomában szenvedő kutya vér- és nyirokcsomó-mintái alapján kerestük a szabadgyökös és antioxidáns paraméterek eltéréseit a kemoterápiás kezelés hatékonysága szempontjából.

A betegek nyirokcsomóinak műtéti eltávolítása előtt vett vérmintákból, valamint az eltávolított nyirokcsomókból többek között antioxidáns és szabadgyökös paramétereket, valamint a nyirokcsomó-mintákban proliferációs markerként Ki67 expressziót vizsgáltuk. A kemoterápiás kezelés hatékonyságát a kezelés kezdetétől számított recidívamentes túlélési idővel (RMI, hónap), valamint a teljes élettartammal (É, hónap) jellemeztük. Korrelációs analízist végeztünk részben az RMI, és az É vonatkozásában, részben az antioxidáns paraméterek egymáshoz való viszonyában. Lineáris regresszió analízissel az alábbi szignifikáns ( $P < 0.05$ ) összefüggéseket tapasztaltuk.

A nyirokcsomókban elektronspin-rezonancia-spektroszkópiás módszerrel mért összsabadgyök koncentráció (ÖGy) és a nyirokcsomók proliferációs indexe (Ki67 pozitivitás) között pozitív korrelációt (korrelációs együttható:  $r$ ) ( $r=0,661$ ,  $n=15$ ) találtunk. - Ebben az összehasonlításban az egészséges kutyák nyirokcsomójából mért értékeket is belefoglaltuk az elemszám növelés érdekében. A beteg kutyák nyirokcsomójában az ÖGy és a vérplazma redukált- és oxidált glutation aránya (GSH/GSSG) között negatív korrelációt ( $r=0,718$ ,  $n=8$ ), valamint a nyirokcsomók proliferációs értéke (Ki67) és a nyirokcsomók vasredukción alapuló összantioxidáns-státusza (FRAP-érték) között negatív korrelációt ( $r=-0,682$ ,  $n=11$ ) tapasztaltunk.

A beteg kutyák esetében az RMÉ és az É pozitív korrelációt ( $r=0,983$ ,  $n=11$ ) mutat. Az RMÉ és a nyirokcsomók sejtjeinek szabadgyök-termelő kapacitása (OB, oxidatív burst) között pedig negatív korrelációt ( $r=-0,815$ ,  $n=10$ ) találtunk. Az RMÉ és a kutyák nyirokcsomójából mért GSH/GSSG között pozitív korrelációt ( $r=0,647$ ,  $n=11$ ) mutattunk ki. Az OB és a nyirokcsomók GSH/GSSG aránya között negatív korrelációt ( $r=-0,732$ ,  $n=9$ ), az OB és a vörösvérsejtek szuperoxid-dizmutáz-aktivitása (SOD) között pedig negatív korrelációt ( $r=-0,794$ ,  $n=9$ ) tapasztaltunk.

Azt a következtetést vontuk le, hogy minél fokozottabb a sejtek proliferációjának mértéke, annál nagyobb a nyirokszövetben a szabadgyökök koncentrációja, ugyanakkor annál rosszabb az antioxidáns státusza. Továbbá minél nagyobb a nyirokszövetben a szabadgyök-koncentráció, annál rosszabb a (vérplazmában mért) szisztémás antioxidáns státusz is.

A betegek akkor élnek hosszabb ideig, ha a recidíva később jelentkezik. Minél nagyobb a daganatos sejtek indukcióra bekövetkező gyöktermelő képessége (OB), annál hamarabb esik vissza (recidívál) a beteg. Ez a beteg szövetben annak következtében alakulhat ki, hogy romlik a szövet antioxidáns védekezése, ugyanis fordított arányosság van a gyöktermelő képesség (OB) és a nyirokcsomók GSH/GSSG aránya között. A daganatos szövet gyöktermelő képességének fokozódásával romlik a vörösvérsejtek SOD-aktivitása is, tehát ez a folyamat a szisztémás antioxidáns védekezését is rontja.

#### *Rutin és antioxidáns vérparaméterek összehasonlítása lymphomás kutyákban*

Korábbi vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a kutyák multicentrikus lymphomája során oxidatív stressz alakul ki. Jelen kutatásunkban összefüggéseket kerestünk 11 lymphomás és 10 egészséges beagle kutya vér- és nyirokcsomó-paraméterei között. Ezen kívül a beteg kutyák paramétereit egymáshoz viszonyítva is megvizsgáltuk

A thrombocytaszám 42%-kal, a lymphocytaszám 45%-kal, az albumin koncentráció 12%-kal, a vörösvérsejtek redukált glutation (GSH) koncentrációja 31%-kal, a vörösvérsejtek szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitása 33%-kal bizonyult nagyobbak a kontrollokban a betegekben mértekhez képest. Néhány paraméter változása azonban ellentétesen alakult. Az alkalikus-foszfátáz (ALKP) aktivitás 622%-kal, a laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás 111%-kal, a kreatininkoncentráció 38,2%-kal bizonyult nagyobbak a betegekben.

A betegek néhány paraméterében jelentős összefüggés is mutatkozott. Szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) negatív korrelációt találtunk a plazma alanin-transzamináz- (ALT-) aktivitása és GSH-koncentrációja között, a plazma összefehérje koncentrációja és a vörösvérsejtek malondialdehid-koncentrációja között, a plazma anorganikus foszfátkoncentrációja és a vörösvérsejtek GSH/oxidált glutation aránya között, az összfehérvérsejtszám (fvs-szám) és a hematokritérték között, valamint az fvs-szám és az albuminkoncentráció között. Szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) pozitív korreláció jelentkezett az fvs-szám és a neutrophil granulocyták száma, a plazma összkalcium koncentrációja és LDH-aktivitása, valamint a nyirokcsomók proliferációs markere, Ki67 %-a és a plazma ALT-aktivitása között.

A lymphomás kutyák vörösvérsejtjeiben az antioxidáns paraméterek értékeinek (GSH, SOD) csökkenése, az egészségesekéhez képest, rosszabb antioxidáns védekezésre utal. A korrelációs vizsgálatok alapján a szabadgyökök, illetve a nem megfelelő antioxidáns védekezés hatása gyanítható a plazma ALT-aktivitásának, anorganikus foszfát- és összfehérje-koncentrációjának változásában is. Bár ez a hatás a lymphoma előrehaladott stádiumaiban kialakuló másodlagos gyulladásos mechanizmus miatt is kialakulhat, mégis feltételezzük, hogy a daganatos proliferáció részben közvetlen módon, részben a szervezet antioxidáns védekező mechanizmusát befolyásolva közvetve is felelőssé tehető a kóros állapotokat, illetve egyes szervfunkciókat jelző paraméterek értékeinek változásáért.

#### *CHOP-terápia hatása non-hodgkin lymphomák oxidációs vérparamétereire kutyákban*

Biooxidációs paraméterek változását vizsgáltuk 22 non-Hodgkin lymphomás kutyánál. Célul tűztük ki a cyclophosphamid – doxorubicin – vincristin – prednisolon (CHOP) terápia kimenetelének becslését, mért oxidációs paraméterek alapján.

A mintavételek során 13 lymphomás kutyánál sikerült vérmintát venni nem csak a terápia előtt, hanem a terápia folyamán is, ami egy esetben a 30. hetet is elérte. A rutin laborvizsgálatokban mért adatokon kívül, a következő paramétereket határoztuk meg vérből: all-trans-retinol, DL-alpha-tokoferol, retinol-palmitát, aszkorbinsav, redukált és oxidált glutation aránya, glutathion-peroxidáz, szuperoxid dizmutáz, malondialdehid (MDA). Ezeket összevetettük a kutyák életkorával, szövettani típusával és a tumorok remissziós idejével. A visszaeső kutyák remissziós idői 6-37 hetes intervallumban mozogtak. A vitamin méréseket

normál fázisú ill. RP-HPLC-s elválasztással, valamint UV- és fluoreszcenciás detektálással végeztük. A további oxidációs paramétereket Ransel-kitekkkel mértük. A szignifikáns változást mutató MDA-t tiobarbitursavas meghatározással becsültük meg.

A mért adatokat statisztikailag elemeztük, és az alábbiakat állapítottuk meg: a vizsgált állatok kora pozitívan korrelált a lymphomás állatok remissziós idejével. Vagyis, a CHOP kemoterápiára az idősebb állatok jobban reagáltak ( $r=0.42$ ,  $P<0.05$ ).

Az oxidatív stresszre jellemző lipidperoxidációs termék (vörösvértest MDA) koncentrációja a gyógyult kutyák (90 hétnél túli remissziós idő) esetében már a terápia első 3 hete alatt növekedésnek indult, míg a visszaeső kutyáknál nem változott, vagy csökkenő tendenciát mutatott. Az MDA-értékek a gyógyult betegeknél több időpontban bizonyultak szignifikánsan ( $P<0.05$ ) nagyobbak a visszaeső betegekhez képest (adatok közötti különbségek: 1-3. hét 62 %, 4-7. hét 111 %, 9-11. hét 111 %, 12-30. hét 73 %). A gyógyult illetve a visszaeső kutyák esetében ez a különbség független volt a betegek korától, fajtájától, illetve a szövettani eredményeiktől. Az MDA változások különbségének igazolásához paraméteres és nem paraméteres próbákat, valamint csúszóátlagokat egyaránt használtunk. Ennek oka, hogy a rendelkezésre álló esetek száma alacsony volt, ezért több statisztikai módszer alkalmazásával ellenőriztük a szignifikanciát. A gyógyult és a visszaeső kutyák MDA értékei közötti megfigyelt különbség jelentőségének alátámasztására azonban több esetre lenne szükség. Ennek fontossága, hogy a kemoterápia korai szakaszában meg tudjuk becsülni annak kimenetelét, illetve hogyha szükséges, időben kezelést tudjunk változtatni.

#### *A szabadgyök-reakciók és az antioxidáns védekezés elemeinek vizsgálata lymphomás kutyák citosztatikus kezelése során*

Vizsgálatunkban vérvételek alapján 41 különböző fajtájú, 2-11 év korú, 21 nőstény, és 20 hím lymphomás betegek vér-mintái alapján kerestük a lymphomás kutyák szabadgyökös és antioxidáns paramétereinek változását a kezeléseik során. A kutyák közül tizenhatnak diffúz folliculáris centrum sejtes lymphomája, tizenkilencnek diffúz nagy B-sejtes lymphomája, egynek enteralis lymphomája, négynek praecursor T-lymphoblastos lymphomája, kettőnek B-sejtes lymphoid leukaemiája volt. Ezek közül négy a III/a stádiumba, három a III/b stádiumba, tizennégy a IV/a stádiumba, tizenhat a IV/b stádiumba, kettő az V/a stádiumba és kettő az V/b stádiumba tartozott. A paramétereket a kezeléseik előtti, és a kezeléseik során vett vérmintákból határoztuk meg.

Az alábbi antioxidáns és szabadgyökös paramétereket vizsgáltuk:

- redukált glutation-koncentráció (GSH): vérplazmából, vörösvérsejt-hemolizátumban
- oxidált glutation-koncentráció (GSSG): vérplazmában, vörösvérsejt-hemolizátumban
- redukált- és oxidált glutation- arány (GSH/GSSG): vérplazmában, vörösvérsejt-hemolizátumban
- glutation-peroxidáz-aktivitás (GSH-Px): vörösvérsejt-hemolizátumban
- tiobarbitursav-reaktív anyagok koncentrációja malondialdehidben (MDA) kifejezve: vörösvérsejt-hemolizátumban
- szuperoxid-dizmutáz-aktivitás (SOD): vörösvérsejt-hemolizátumban
- vasredukción alapuló összantioxidáns-státusz meghatározás (FRAP-érték): vérplazmában
- C-vitamin- koncentráció: plazmában

I. Az első vizsgálati sorozatban összehasonlítottuk a lymphomás kutyák kemoterápiás kezelésének hatására a vér antioxidáns és a szabadgyökös paramétereiben bekövetkező változásokat az idő függvényében a kezelés 10-12. hetéig.

A plazmában mért szabadgyökös és antioxidáns paraméterek közül a lymphomás kutyák mintáiban a GSH, a GSH/GSSG, FRAP és a C-vitamin értékei között találtunk szignifikáns eltérést. A GSH-koncentrációban szignifikáns eltérések voltak az alap és az 5. heti értékek

között, az ötödik heti GSH-érték 26,8%-al kisebbnek adódott, mint az alapérték. Az 1. és a 2. heti GSH-koncentrációknál az 5. heti értékek 30,9 és 29,05%-kal voltak kisebbek. A GSH/GSSG-értékekben az alapértéknél szintén az 5. heti értékek bizonyultak szignifikánsan kisebbeknek (55,5%-ban). A FRAP értékek pedig harmadik héten 26,55%-al szignifikánsan kisebbnek mutatkoztak az alapértékeknél. A C-vitamin koncentrációk az alapértékekhez viszonyítva az első héten 93,98%-kal szignifikánsan kisebbek voltak, valamint az első heti értékekhez viszonyítva a 3.heti értékek mutattak szignifikáns (64,2%-os) emelkedést.

A vörösvérsejt-hemolizátumokban mért szabadgyökös és antioxidáns paraméterek közül a lymphomás állatok mintáiban a GSH-Px és a GSH/GSSG értékei között találtunk szignifikáns eltérést. A GSH-Px-aktivitási értékek esetében az alapértékek az 1. heti értékeknél 20,7%-kal szignifikánsan kisebbek voltak. Az első heti aktivitásoknál a 2., a 3. és a 10.hetiek 24,4%-kal, 33,66%-kal és 12,77%-kal nagyobbaknak adódtak. Szignifikáns eltérés mutatkozott még a GSH/GSSG koncentrációkban is. Ennél a paraméternél az alapértékhez viszonyítva az 5. heti értékek 53%-kal bizonyultak kisebbnek.

II. A második vizsgálati sorozatban összehasonlítottuk a vér antioxidáns és szabadgyökös paramétereit az alapértékek és a kezelés 2-3. hetének értékei között. A kezelés előtti értékek átlaga és a kezeléseket alatt mért értékek átlaga között t-próbával nem mutatható ki szignifikáns eltérés a plazma antioxidáns paramétereit között.

III. A harmadik vizsgálati sorozatban összehasonlításokat végeztünk az alap és a kezelés 2-3. hetében mért paraméterek között jelentkező lineáris összefüggésekkel kapcsolatban. A vörösvérsejt-hemolizátumban az alap és a kezelés 2-3. hetében mért SOD és MDA értékek között lineáris összefüggés mutatható ki mind a kezeletlen ( $r = 0,6989$ ,  $P < 0,01$ ), mind a kezelt ( $r = 0,537$ ,  $P < 0,001$ ) csoportban. A GSH-Px és az MDA között csak a kezeletlen egyedek csoportjába mutatható ki lineáris összefüggés ( $r = 0,65$ ,  $P < 0,01$ ).

A mérési eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a kezelésekre hatására az antioxidáns védekező rendszer tagjai, a vvs-hemben a GSH-Px, a vérplazmában a FRAP és a C-vitamin értékei a kezelés első hetén csökkennek, majd ezután kezdenek újra emelkedni, ugyanakkor vvs- hemolizátumokban a lipidperoxidáció termékének, az MDA-nak a koncentrációja a kezelés 2-3. hetében, bár nem szignifikánsan, de nő. Ezeknek a változásoknak az lehet az oka, hogy első kezelésként doxorubicint kaptak a vizsgálatunkban szereplő lymphomás állatok. A glutation-redoxrendszer változása a kezelés ötödik hetében volt tapasztalható, mind a vérplazmában, mind a vörösvérsejt hemolizátumban mért paraméterek alapján. A kezelésnek ebben az időpontjában a glutation-rendszerben fokozott oxidációt igazoltunk, valószínűsíthetően a korábban adott ciklofoszfamid hatására.

Fontos tanulság, hogy a szabadgyökök elleni csökkent védekezés az állatokat hajlamosítja az egyéb fertőzőes betegségek kialakulására. A kezelés során tehát, ajánlott az antioxidáns védekező rendszert támogató szerek használata.

## **A P-GLÜKOPROTEIN (PGP) VIZSGÁLATA**

Tekintettel arra a tényre, hogy a daganatos sejtek anitoxidáns státuszát a sejtek terápia rezisztenciájának (multidrug resistance, MDR) szempontjából is érdemes vizsgálni, további megállapításokat tettünk. Korábbi tapasztalataink alapján úgy ítéltük meg, hogy a lymphomás kórképből szenvedő kutyák esetében nem jellemző a daganatsejtek fokozott antioxidáns kapacitása. Sőt, a kemoterápiára jobban reagáló kutyák nyirokcsomóiban az első vizsgálatok alkalmával nagyobb redukált glutation (GSH) és fokozott SOD-aktivitás volt megfigyelhető. Ezek alapján úgy véljük, hogy a daganatos sejtek a mi esetünkben nem azért mutattak terápia rezisztenciát, mert az antioxidáns rendszerük képes lett volna eliminálni a citosztatikumok szabadgyök képző hatását. Vizsgálni kívántuk azonban, hogy más

mechanizmus nem tehető-e felelőssé a terápiarezisztenciáért. Ennek érdekében a P-glükoprotein kimutatását is megvalósítottuk immunhisztokémiai módszerekkel nyirokcsomó mintákban. A P-glükoprotein egy ATP-függő pumpa, amely képes a hidrofób citosztatikumokat (pl. doxorubicint, vinkrisztint stb.) kijuttatni a sejtől azelőtt, mielőtt azok képesek lennének kifejteni apoptotikus hatásukat. A P-glükoprotein kimutatásával kapcsolatos eredményeinket az alábbiakban közöljük.

*P-glycoprotein kimutatása immunhisztokémiai módszerrel lymphomás kutyák nyirokcsomójában*

A P-glycoprotein (Pgp) egy transzmembrán protein, melynek funkciója lipofil molekulák kijuttatása a sejtéből. Szoros összefüggés mutatható ki a daganatokban megjelenő terápiarezisztencia (multi drug resistance, MDR) és a Pgp-expresszió között. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy Pgp-vel rendelkező sejtek fokozott mértékben juttatják ki a citosztatikus terápia során használt gyógyszereket. Kutatásaink során vizsgáltuk a Pgp expresszió immunhisztokémiai módszerrel történő kimutathatóságát lymphomában szenvedő kutyák nyirokcsomójából, valamint összehasonlítottuk, hogy van-e összefüggés a Pgp-expressziója és számos a túlélést befolyásoló tényező között.

11 különböző fajú lymphomában szenvedő kutyát vizsgáltunk. A betegség előrehaladottsági mértékének (stádium) megállapítása után a bal praescapularis nyirokcsomó eltávolításával mintát vettünk szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokra. A szövettani vizsgálatokhoz hemalaun-eosin festést, a pontos lymphoma típus meghatározásához a CD3 és a CD79a, a szaporodóképesség jelzésére a Ki67 marker immunhisztokémiai kimutatását végeztük. Hasonló módszerrel végeztük a Pgp megjelenésének meghatározását, melyhez C-219 monoclonalis ellenanyagot használtunk, kontrollként emberi daganatos szövetek szolgáltak. Meghatároztuk a mintákban megjelenő Pgp-expresszió mértékét, és vizsgáltuk ennek összefüggését az állat ivarával, korával, a betegség stádiumával, a túlélési idővel, a kezelésre adott válasszal, az MDR megjelenésével, a lymphoma szövettani típusával, valamint a Ki67 expresszió mértékével. A statisztikai vizsgálatokat korreláció analízissel és a  $\chi$ -négyzet próba segítségével végeztük.

A Pgp kimutatása során 2/11 esetben pozitív, 3/11 esetben kétes, 6/11 esetben negatív eredményt kaptunk. Szoros és statisztikailag szignifikáns ( $p < 0,05$ ) összefüggést lehetett kimutatni a terápiára adott válasz és a Pgp megjelenése között. A kezelésre mérsékelt remissziót mutató esetekben fokozott mértékű Pgp-expressziót tapasztaltunk. Kan kutyákban szignifikánsan több volt a Pgp-t expresszáló forma. Közepes mértékű, de nem szignifikáns korrelációt találtunk a betegség stádiuma, valamint a proliferációs hajlamot jelző Ki67 expresszió és a Pgp megjelenése között. Ezek alapján az előrehaladottabb beteg állatokban, és a kisebb szaporodó képességű daganat típusokban jelent meg a Pgp kifejezettebb mértékben. Nem találtunk összefüggést az állatok kora, a túlélési idő, az MDR klinikai megjelenése és a szövettani típus között.

Eredményeink azt mutatják, hogy az immunhisztokémiai vizsgálat jól használható módszer a lymphomás kutyák nyirokcsomójából történő Pgp-expresszió kimutatására. A statisztikai vizsgálatok alapján több prognosztikai szempontból is fontos tényezővel lehet szoros kapcsolatban a Pgp megjelenése, így hatással van a túlélésre is.