

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

***KÓRJELZŐ MUTATÓK ÉS PROGNOZTIKAI
FAKTOROK VIZSGÁLATA KUTYÁK
DAGANATOS BETEGSÉGEIBEN***

Dr. Koltai Zsófia

Témavezető: Dr. Vajdovich Péter



**ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

Budapest, 2020.

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

1.1. Bevezetés

A lymphoma és az emlődaganatok a kutyák leggyakoribb daganattípusai közé tartoznak. A terápia rezisztencia különösen nagy jelentőségű klinikai faktor, főként a nyirokszervi daganatok esetén, mivel döntően ez felelős a kemoterápiás kezelés kudarcáért. Bár az emlődaganatok terápiaja elsősorban sebészi, főleg a high-grade, előrehaladott formák esetén indokolt lenne az adjuváns kezelés is, azonban ez jelenleg nem megoldott, mivel ezek a daganatok nem reagálnak megfelelően a hagyományos citosztatikus kezelésre.

Régóta ismert tény, hogy bizonyos típusú daganatok esetén a citosztatikus terápia a tumorsejtek kialakuló vagy *ab ovo* rezisztenciája miatt nem kellően hatékony. Multidrog rezisztenciának (MDR) nevezzük ezt a jelenséget, melynek lényege, hogy az adott szövetek vagy sejtek nem reagálnak az alkalmazott gyógyszerekre. Az MDR napjainkban az egyik legfontosabb probléma a daganatos betegek kezelésében, hiszen döntően ez felelős a kemoterápia sikertelenségéért. A sejtszintű MDR kialakulásának több mechanizmusa is ismert, de kutyák esetében a leggyakrabban megfigyelt formája a P (permeability)-glycoprotein túlzott expressziója miatt következik be. Ez egy, az ABC (ATP-binding cassette, azaz ATP-kötő kazetta) transzporter főcsaládba tartozó, 160–180 kDa tömegű ATP-függő pumpafehérje, melynek klasszikus formája az MDR-1 gén terméke. A Pgp hidrofób molekulákat juttat ki a sejtől, és a citosztatikumok jelentős hányadát is kipumpálja, emiatt nem tud kialakulni a daganatellenes hatáshoz szükséges intracelluláris gyógyszerkoncentráció. Kutyák kemoterápiájában használt leggyakoribb szerek közül eddig a következőkkel szemben mutatták ki a Pgp hatását:

vincristin, doxorubicin, actinomycin-D, mitoxantron, etoposid, vinblastin. Komoly gyakorlati probléma, hogy ezekkel a szerekkel szemben keresztrezisztenciát is leírtak, vagyis amennyiben az itt felsorolt vegyületek valamelyikével szemben kialakul a rezisztencia, a daganatsejt a többi Pgp-szubsztrát citosztatikumra is rezisztens lesz, függetlenül attól, hogy azt a terápiában addig használták vagy sem. A lymphomás kutyák többsége az első kemoterápiás ciklus után visszaesik és a kiújult daganat általában az eredetinel rezisztensebb a citosztatikumokra, amelynek oka az eredeti daganatsejteknel rezisztensebb, ún. MDR-klónok megjelenése.

A Pgp kutyák és emberek lymphomája esetében régóta ismert negatív prognosztikai faktor, amely rövidebb recidívamentes és teljes túléléssel jár együtt. A kezelés előtti Pgp-meghatározás fontosságát mint prognosztikai faktort, Bergmann (1996) és Lee (1996) korai vizsgálatai egyértelműen bizonyították, de későbbi publikációkban ennek ellentmondó eredmények is születtek, illetve a szakirodalmi adatokban kifejezetten eltérő Pgp-expressziós százalékok szerepelnek. Feltételezésünk szerint ezeknek az eltéréseknek részben metodikai okai vannak, mint például a festődés eltérő kiértékelése, vagyis a vizsgálók szubjektivitása. Emiatt a prognosztikai érték erősítése céljából javasolt a különböző módszerek validálása. Így lehetőség nyílhat arra, hogy a kezelés megkezdése előtt információkat szerezzünk a várható terápia rezisztenciáról és ezekben az esetekben a nem Pgp-szubsztrát kemoterapeutikumokat preferáljuk az olcsóbb, hagyományos szerekkel szemben.

A nők terápia rezisztens emlőrákjának emelkedett Pgp-expressziója is ismert tény, kutyák esetében eddig azonban csak limitált számú vizsgálat állt rendelkezésre, ezek a daganatos emlőszövet emelkedett Pgp-expresszióját mutatták.

A p53 tumorszupresszázó gén a leggyakrabban mutálódott gén a humán daganatokban, mutációját az emberi tumorok több mint 50%-ában kimutatták. A gén által kódolt fehérje egy sejtmagban található foszfoprotein, amely részt vesz a sejtciklus szabályozásában és az apoptózis beindításában. Működése fontos részét képezi a sejtek azon szabályozási mechanizmusainak, amelyek gátolják a daganatos mutációk okozta tumorigenezist a PCNA (proliferating cell nuclear antigen) és az MDR gének expressziójának csökkentése révén. A p53 gén ún. germ-line mutációja különböző daganatos betegségekre hajlamosít, mivel ennek következtében a termelt fehérje inaktívvá válik, azonban a sejtek citoplazmájában, esetleg magjában fokozott expresszió tapasztalható, ugyanis a kimutatásuk alapját képező hapténben a mutáns fehérje megegyezik az ép fehérjével. Mind kutyák, mind emberek emlődaganatai esetén leírták a p53 germ-line mutációját és a fehérje növekedett expressziója negatív prognosztikai faktornak számít.

A ciklooxygenázok (COX, Prostaglandin Endoperoxid synthase) a prosztoglandinok biokémiai szintézisének kulcsenzimeik. Két izoenzimük ismert, a COX-1 és COX-2. Előbbi homeosztatis cellulas funkciókat lát el, míg a COX-2 kóros folyamatokban vesz részt, úgymint gyulladás, hyperalgesia, tumorigenezis. Fontos szerepet játszik a daganat saját érhálózatának kialakításában és a daganatok növekedésében, valamint a malignitás fokának növekedésével a COX-2-expresszió is emelkedik. Számos daganat (pl. humán colorectalis tumorok, méhnyakrák, kutyák emlődaganatai) esetén szignifikáns kapcsolat van a magas COX-2-expresszió, valamint a távoli metasztázisok kialakulása között. Ez rövidebb túlélést eredményez, a COX-2 magas szintje tehát bizonyos daganattípusok esetén negatív prognosztikai faktor, amelynek gátlása klinikai előnyökkel járhat.

A humán emlődaganatok 40–50%-a magas COX-2-expressziót mutat, valamint az emlőrák előfordulási valószínűsége, illetve a nők esetében a nemszteroid gyulladáscsökkentők (NSAID-ok) használata közötti fordított összefüggés is régóta ismert. A humán medicinában tapasztaltaknak megfelelően kutyák egészséges emlőszövege nem vagy csak minimális mértékben mutat COX-2-expressziót. Ezzel szemben az emlődaganatok többségénél emelkedett COX-2-expresszió detektálható, amely negatív prognosztikai faktorként összefüggést mutat a malignitás fokával, a recidívára való hajlammal, valamint a metasztatikus potenciállal. Számos tanulmány igazolta a COX-2 emelkedett expresszióját kutyák rosszindulatú emlődaganatai esetén, az agresszívebb besorolású, anaplasztikus formák esetén pedig kifejezetten magas értékeket tapasztaltak. Az utóbbi években egyre több olyan publikáció áll rendelkezésre, amelyek megerősítik a COX-2-gátlók használatából származó terápiás előnyt kutyák high-grade emlődaganatai esetén.

A tirozin-kinázok a sejtnövekedés és -differentiálódás szabályozásában döntő szerepet játszó, specifikus jelátvivő molekulák. Receptoraik a sejtfelszínen találhatóak, foszforilációs kaszkádok indításával juttatnak el szignálokat a sejtmagig. Jelentős szerepet játszanak a daganat által előidézett neovaszkularizációban, azaz a daganat saját érhálózatának kialakításában. A kinázok megváltozott funkcióját számos folyamat okozhatja, ilyenek a mutációk, a fokozott expressziók, a fúziós proteinek, illetve az autokrin hurkok. A mutációk (pl. pontmutáció, törlődés, belső tandem duplikáció) a protein-kinázok foszforilációját okozzák a kiváltó jel hiányában is. Ezek a folyamatok egyebek mellett fokozott sejtnövekedéshez és túléléshez vezetnek. Számos humán daganatban ismert jelenség a tirozin-kinázok szabályozási zavara okozta abnormális jelátviteli utak aktiválódása, de

kutyák emlődaganatai esetén eddig csak nagyon kevés információ állt rendelkezésre. Humán emlődaganatok esetében régóta ismert tény bizonyos receptor tirozin-kinázok diszregulációja és fokozott expressziója. Ezek közül legismertebb a tumorgenezisben is szereplő HER-2 (ErbB2), amely az emlőrákok 20–30%-ában megtalálható és negatív prognosztikai faktorként rövidebb túléléssel járt. A HER-2, VEGF és EGFR célzott gátlása nők emlőrákja esetén ma már a rutin terápia része.

1.2. Vizsgálati célok

1. Vizsgálati célok kutyák lymphomája esetén: Fő célunk a Pgp-immunhisztokémia prognosztikai értékének megerősítése volt. Cékitűzéseink között szerepelt ezzel összefüggésben az is, hogy validáljuk az általunk használt festési módszert egy Pgp cut-off érték meghatározásával. Mivel a szakirodalmi adatokban eltérő Pgp-expressziós százalékok szerepelnek, a prognosztikai érték erősítése céljából javasolt a különböző módszerek validálása. Hosszútávú célunk ezzel az volt, hogy a kezelés megkezdése előtt információkat szerezzünk a várható terápiaerezisztenciáról, ezzel segítve az egyedre szabott gyógyászat megvalósítását.

Vizsgálatunk másik célja a különböző klinikai jellemzők értékelése volt, különös tekintettel a recidíva, illetve gyógyszer mellékhatások okozta halálra, valamint az ezekkel kapcsolatos prognosztikai faktorok azonosítása, továbbá az MDR-rel való kapcsolatuk vizsgálata.

2. Vizsgálati célok kutyák emlődaganatainak esetén: Cékitűzéseink között szerepelt a terápiaerezisztencia okainak vizsgálata mellett számos humán onkológiából ismert faktor prognosztikai értékének meghatározása, valamint lehetséges új terápias célpontok azonosítása

(kutyák számára törzskönyvezett szelektív COX-2-gátlók, valamint kismolekulájú tirozinkináz-gátlók megjelenése).

Az emlődaganatok Pgp-expressziójának vizsgálatával az MDR kialakulásában betöltött szerepének megerősítése kutyák esetében is, valamint a prognosztikai értékének a vizsgálata. Ugyanezeknek a mintáknak a p53-expresszióját is vizsgáltuk. Célul tűztük a p53 prognosztikai értékének megerősítését, valamint összefüggéseket kerestünk a Pgp- és p53-expresszió között.

Az emlődaganatok esetén egyik fő célunk a COX-2-expresszió immunhisztokémiai vizsgálata, prognosztikai értékének megerősítése, illetve a különböző COX-gátlók alkalmazásából származó klinikai előny igazolása és összehasonlítása volt.

Céljaink között szerepelt a tumorgenezisben szerepet játszó tirozinkinázok vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén és ezáltal új, jövőbeli terápiás célpontok azonosítása. A következő tirozin-kinázokat, valamint a VEGF-et detektáltuk realtime PCR eljárás segítségével: VEGFR1, VEGFR2, EGFR, ErbB2 (HER-2), PDGFR α , KIT, illetve MET. Az általunk vizsgált tirozin-kinázok többsége a masitinib és a toceranib targetje, ezek kutyák számára törzskönyvezett, Európában forgalomban lévő kismolekulájú tirozinkináz-gátlók.

2. Anyag és módszer

2.1. A Pgp-expresszió vizsgálata kutyák lymphomája esetén

Vizsgálatunkban 33 különböző fajtájú és korú kutya szerepelt, 18 kan, 15 nőstény, átlagéletkoruk 7,36 év volt.

A betegeket az első vizsgálatkor a következő stádiumokba soroltuk: II stádium ($n = 1$), III stádium ($n = 4$), IV stádium ($n = 22$) és V stádium ($n = 6$). A nyirokcsomóminták szövettani vizsgálata alapján 26 (78,78%) kutyának high-grade (3 B-lymphoblastos, 13 diffúz nagy B-sejtes magas mitotikus indexszel, 8 perifériás T-sejtes, 2 Burkitt-like) és 7 (21,21%) kutyának low-grade lymphomája volt (5 diffúz nagy B-sejtes centroblastos lymphoma alacsony mitotikus indexszel, egy Mantle-sejtes és egy T-zóna lymphoma).

A betegek kezelése COPA, ill. Madison-Wisconsin (MW)-protokollal történt. 10 kutya részesült mindkét protokollban (COPA elsőként, MW visszaesés után).

A kezelés során fellépő mellékhatásokat a Veterinary Cooperative Oncology Group 2011-es ajánlása alapján soroltuk be súlyosság szerint (Grade) és a számszerűsítést is ez alapján végeztük. Ezenfelül egy ún. kumulatív pontszámot is megadtunk, amelyet az egyes epizódok számából és súlyosságából kalkuláltuk.

A Pgp immunhisztokémiai kimutatását P. E. Ginn 1996-os Veterinary Pathology című lapban megjelent cikke, valamint az Országos Onkológiai Intézet munkatársainak ajánlása alapján végeztük. A minták deparaffinálását, valamint rehidrálását xilolban, majd leszálló alkoholsorban történő áztatással végeztük. Az endogén peroxidázokat 3%-os hidrogén-peroxid oldattal blokkoltuk. Az antigénfeltárást és többszöri PBS-es mosást követően a nem immuneredetű kötődéseket lószérummal blokkoltuk. C494 (Signet Laboratories) Pgp elleni egérből származó monoklonális ellenanyagot használtunk, majd az immunhisztokémiai reakciót streptavidin-biotin immunperoxidáz rendszerrel (Vectastain ABC-kit) és diamino-benzidin (DAB) segítségével tettük láthatóvá. A kontrasztfestés Mayer-féle haematoxilinnel történt.

Pozitív kontrollnak kutyából származó ép máj- és veseszövetet, negatív kontrollnak pedig egészséges kutyából származó nyirokcsomósövetet használtunk. Ezenkívül alkalmaztunk egy ún. „belső negatív kontrollt” is, ebben az esetben a primer monoklonális ellenanyagot PBS-sel helyettesítettük.

A sejtek festődésének mértékét és annak sejten belüli helyeződését fénymikroszkópos elemzéssel vizsgáltuk, double blind módszerrel két gyakorlott vizsgáló segítségével. A Pgp-expresszió mértékét 4 pontos skálán jelöltük a pozitív sejtek számának becslése alapján. A festődés intenzitását az expressziós pontrendszerrel függetlenül 4 pontos skálán vizsgáltuk.

A medián recidívamentes periódust (RFP, relapse-free period) és a medián teljes túlélési időt (OST, overall survival time) Kaplan-Meyer analízis segítségével állapítottuk meg. A különböző csoportok recidívamentes és teljes túlélési idejét Log-rank teszttel és Cox „proportional hazard” analízissel hasonlítottuk össze. A különböző változók közötti összefüggések felderítésére Fisher-féle egzakt tesztet használtunk. A specificitási és szenzitivitási értékeket a Pgp-expressziós határérték (cut-off érték) megállapításakor ROC-analízis segítségével számoltuk ki. A különböző csoportok klinikai és laboratóriumi paramétereinek összehasonlításakor kétmintás nem egyenlő varianciájú Student-féle t -próbát alkalmaztunk. A vizsgálatokat a Statistica, Microsoft Excel, illetve R program használatával végeztük. A kapott eredményeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

2.2. A Pgp- és p53-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

Vizsgálatunkban 30 különböző fajtájú és korú emlődaganatos kutya szerepelt. A daganatok rutin szövettani vizsgálatának eredményei a következők voltak: 9 tubulopapilláris carcinoma, 12 komplex carcinoma, 2 komplex adenoma, 2 benignus kevert daganat, 1 fibroadenoma, 1 ductalis papilloma, 2 carcinosarcoma, 1 lipid gazdag komplex carcinoma.

Vizsgálatainkhoz 4%-os neutrális formalin oldatban fixált, majd paraffinba ágyazott metszeteket használtunk. A p53 immunhisztokémiai kimutatását Wolf és munkatársainak 1997-ben megjelent cikke alapján végeztük. A minták deparaffinálását, valamint rehidratálását a Pgp-vel megegyező módszerrel végeztük. Az antigénfeltárást és többszöri PBS-es mosást követően a nem immuneredetű kötődéseket lószérummal blokkoltuk. CM-1 nyúlból származó primer poliklonális ellenanyagot használtunk (Signet Laboratories), majd az immunhisztokémiai reakciót streptavidin-biotin immunperoxidáz rendszerrel (Vectastain ABC-kit) és diamino-benzidin (DAB) segítségével tettük láthatóvá. A kontrasztfestés Mayer-féle haematoxilinnel történt.

A pozitív kontroll humán emlő adenocarcinoma volt, negatív kontrollnak pedig egészséges kutyából származó nyirokcsomót használtunk.

A sejtek festődésének mértékét fénymikroszkópos elemzéssel vizsgáltuk, double blind módszerrel történt két gyakorlott vizsgáló által. A p53-expresszió mértékét 4 pontos skálán jelöltük a pozitív sejtek számának becslése alapján. A citoplazma- és magfestődést nem értékeltük külön, mivel a minták 56%-ában nem tapasztaltunk magfestődést.

A Pgp-expresszió vizsgálata a 2.1. fejezetben leírtaknak megfelelően történt.

Betegeinket a daganat kórszövettani besorolása alapján 4 csoportra osztottuk: tubulopapilláris carcinoma ($n = 9$), komplex carcinoma ($n = 12$), egyéb malignus daganat ($n = 3$), jóindulatú daganat ($n = 6$). Minden csoportnál vizsgáltuk, hogy történt-e ivartalanítás az emlődaganat kialakulását megelőzően, a betegek életkorát az emlődaganat műtéti eltávolításakor, azt, hogy az általunk vizsgált daganat primer tumor volt vagy már egy recidivált daganat, nyirokcsomó-áttét vagy invazivitás meglétét, recidíva megjelenését, az állat élete során jelentkezett-e egyéb daganatos megbetegedés a műtét előtt vagy után, és azt, hogy az állat elhullását daganatos betegség okozta-e.

A különböző paraméterek különbségét Wilcoxon rank-sum tesztel és kétmintás, nem egyenlő varianciájú Student-féle t -próbával vizsgáltuk a különböző diagnózisú csoportok között SAS-STAT programmal. A paraméterek között Pearson-féle korrelációs analízist is végeztünk az SPSS 8.0 számítógép program segítségével. A kapott eredményeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

2.3. A COX-2-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

A vizsgálatainkban 42 különböző fajtájú kutya (40 nőstény, 2 hím) emlődaganat mintái szerepeltek. A betegek átlag életkora 9,17 év volt.

A műtétet követően 31 beteg részesült min. 4 hónapig tartó NSAID-kezelésben, közülük 16 beteg többféle hatóanyagot is kapott: piroxicam ($n = 23$), meloxicam ($n = 18$), firocoxib ($n = 12$), ennek magyarázata a vizsgálat hosszú lefutása és a korszerű hatóanyagok későbbi megjelenése.

Összesen 13 kutya részesült posztoperatív kemoterápiában, közülük 4-en többféle hatóanyaggal: doxorubicin ($n = 7$), ciklofoszfamid ($n = 1$), carboplatin ($n = 10$).

Az immunhisztokémiai vizsgálathoz paraffinba ágyazott metszeteket használtunk. A műtétilag eltávolított daganatok mintái 4%-os neutrális formalin oldatban kerültek fixálásra. A COX-2-expresszió immunhisztokémiai kimutatását Queiroga és mtsai. 2007-ben megjelent cikke, valamint az Országos Onkológiai Intézet munkatársainak ajánlása alapján végeztük. A minták deparaffinálását, rehidratálását, valamint a nem immuneredetű kötések blokkolását a Pgp-vel megegyező módszerrel végeztük. Ezt követően a mintákat monoklonális primer IgG1 (Rat Cox-2 aa. 368-604) ellenanyaggal inkubáltuk. A festés további folyamata megegyezett a Pgp-nél leírtakkal. A pozitív kontroll Queiroga és mtsai. által használtakkal megegyezően egészséges kutya máj- és veseszövet minták voltak.

A festődés értékelése fénymikroszkópos vizsgálattal, double blind módszerrel történt két gyakorlott vizsgáló által. A COX-2-expresszió százalékos mértékén kívül meghatároztuk a festődés intenzitását is egy 4 pontos skálán a pozitív sejtek számának, valamint a festődés erősségének becslése alapján.

28 daganatminta primer, 15 pedig recidivált tumorból származott (1 betegnek mind primer, mind recidivált daganata is volt). A betegeket a daganat kórszövettani besorolása alapján 5 csoportra osztottuk: benignus ($n = 13$), simplex és anaplasztikus simplex carcinoma ($n = 9$), komplex carcinoma ($n = 8$), tubulopapilláris carcinoma ($n = 8$), valamint carcinosarcoma ($n = 4$). A szövettani Grade alapján a malignus daganatok megoszlása a következő volt: Grade I ($n = 14$), Grade II ($n = 7$), Grade III ($n = 8$). A stádiumbesorolás eredménye a következő volt a benignus daganatokban: Stage I ($n = 10$), Stage II ($n = 3$), Stage III ($n = 0$), Stage

IV ($n = 0$). A malignus emlődaganatokban Stage I ($n = 8$), Stage II ($n = 9$), Stage III ($n = 7$), Stage IV ($n = 5$).

Összehasonlítottuk a COX-2-expressziós értékeket a különböző csoportok között, összefüggést kerestünk a COX-2-expresszió és tumorméret, illetve túléléssel összefüggő különböző paraméterek között. Vizsgálataink során Kruskal-Wallis ANOVA-t, illetve Bonferroni-tesztet végeztünk. A különböző csoportok recidívamentes és teljes túlélési idejét Log-rank teszttel és Cox „proportional hazard” analízissel hasonlítottuk össze. A specificitási és szenzitivitási értékeket a COX-2-expressziós határérték (cut-off érték) megállapításakor ROC-analízis segítségével számoltuk ki. A statisztikai analízisek során SPSS 8.0, Free Statistics Software (WESSA, 2013), Microsoft Excel 7.0 és StatsDirect 3.2.8 programokat használtunk. A kapott eredményeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

2.4. Tirozin-kinázok vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

Vizsgálatunkban 13 emlődaganatos nőtény kutya szerepelt, az állatok átlagéletkora 9,8 év volt. A daganatok szövettani besorolása simplex carcinoma ($n = 5$), komplex carcinoma ($n = 5$), orsósejtes carcinoma ($n = 1$), osteosarcoma ($n = 1$), illetve chondrosarcoma ($n = 1$) volt. Minden esetben az adott egyed egy, daganatos elváltozást nem mutató, egészséges emlője is eltávolításra került, ami a későbbiben kontrollként szolgált. Vizsgálatunk célja a kutyák emlődaganataiban a következő tirozin-kinázok, valamint a VEGF detektálása volt realtime PCR eljárás segítségével: VEGFR1, VEGFR2, EGFR, ErbB2 (HER-2), PDGFR α , KIT, illetve MET.

Mindig olyan emlőt használtunk fel, melyben nem voltak látható elhalások. Az így nyert mintákból 0,5 és 1,0 g közötti mennyiséget

távolítottunk el, majd trizol hozzáadásával homogenizáltuk és további feldolgozásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az RNS-kivonást és DNázos emésztést követően a cDNS írást RevertAid™ H minusFirst Strand cDNASynthesis Kit (Fermentas) segítségével végeztük. Az rt-PCR méréshez IQ™ SYBR GreenSupermix Kitet (Biorad) használtunk. A primereket a Primer-BLAST programmal terveztük és a Sigma-aldrich, illetve Bio-science cégektől rendeltük meg. Minden mintából két párhuzamost, bennük kilenc fehérje mRNS-ét vizsgáltuk.

A PCR reakciót 3 perc $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os enzimaktivációval kezdtük. Ezt követte 40 ciklus az alábbiak szerint: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 mp, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 mp, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 mp. A reakció végtermékeit az oladási görbével és agaróz gélen történt futtatással is ellenőriztük.

A PCR eredmények mennyiségi értékeléséhez a relatív módszert használtuk ($2^{-\text{DDCt}}$).

Összehasonlítottuk ugyanazon állat daganatos, illetve egészséges emlőjéből származó expressziós értékeket, illetve a pácienseket csoportokra osztottuk a daganat szövettani malignitási foka alapján: Grade I ($n = 4$), Grade II ($n = 7$) és Grade III ($n = 4$). Vizsgálataink során Student-féle t-próbát, Kruskal-Wallis ANOVA-t, valamint Mann-Whitney próbát végeztünk a Statistica program használatával. A kapott eredményeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

3. Eredmények és megbeszélés

3.1. A Pgp-expresszió vizsgálata kutyák lymphomája esetén

A mintáinkban a Pgp-expresszió átlagos mértéke 34,2% volt. A betegek 54,5%-a volt Pgp-pozitív, ami az irodalmi adatok alapján magasnak számít. Az immunhisztokémiai módszerrel detektált Pgp-

festődési értékek kutyában nagy szórást mutatnak. A különböző eredményeket számtalan faktor okozhatja, pl. metodikai eltérések (az antigénfeltárás erőssége, kiértékelés folyamata stb.) vagy az eltérő beteganyag, különböző kemoterápiás protokollok, de esetünkben magyarázhatja a magasabb értéket a T-sejtes betegek relative nagyobb száma (27,7%) is. Éppen ezért szükséges a saját cut-off értékek meghatározása és a módszer validálása.

Pontrendszer használatakor szignifikáns különbséget találtunk mind a túlélésben, mind pedig a recidívamentes periódusban a különböző pontszámú csoportok között. 15 beteget tekintettünk Pgp-negatívnak (0 pont) és 18-at Pgp-pozitívnak (1, 2, 3 pont), ezek az arányok az irodalmi adatoknak megfelelőek. A Pgp-pozitív és -negatív csoport között mind a teljes túlélésben (240 nap vs. 428 nap, $p = 0,0027$), mind pedig a recidívamentes periódusban (95 nap vs. 232 nap, $p = 0,004$) szignifikáns különbséget találtunk. ROC-analízis segítségével 35%-os Pgp-expressziós cut-off értéket határoztunk meg, melynek a specificitása és szenzitivitása a túlélésre 0,75, illetve 0,7, a recidíva előjelzésére pedig 1 és 0,533 volt. Eszerint a PgP-immunhisztokémia 35% cut-off érték használatával megfelelő diagnosztikai értékkel rendelkezik.

Céljaink között szerepelt a festődés intenzitásának vizsgálata és ennek számszerűsítése. Markáns különbséget (240 nap vs. 428 nap, $p = 0,016$) találtunk a teljes túlélésben az erősen, illetve gyengén festődő minták között. Hasonló a tendencia a recidívamentes periódus összehasonlításakor is, számszerint 103 nap vs. 221 nap ($p = 0,046$). Vizsgálatunkkal megerősítettük a Pgp festődési intenzitás prognosztikus értékét. Szignifikáns különbséget találtunk a B- és T-sejtes formák festődési intenzitása között: normál és erős festődést szignifikánsan gyakrabban ($p = 0,0028$) tapasztaltunk T-sejtes lymphomáknál, ami egyben magyarázza azok terápiareszisztenciáját is.

A Pgp-immunhisztokémia prognosztikai értékét összegezve elmondhatjuk, hogy az ABC transzporterek expressziója és a betegség klinikai lefolyása közötti kapcsolat ellentmondásos. Bár a Pgp-meghatározás fontosságát (mint prognosztikai faktort) a korai vizsgálatok (Bergmann, 1996; Lee, 1996) egyértelműen bizonyították, például Zandvliet és mtsai. 2015-ben azt tapasztalták, hogy a kezelés előtti mintákban vizsgált ABC transzportergerén expresszió szintje nem volt prediktív sem a teljes, sem a recidívamentes túlélésre. Dhaliwal és mtsai (2013) immunhisztokémiai módszerrel találtak ugyan különbséget a Pgp-pozitív és Pgp-negatív csoport medián túlélésében, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. Mindezen fetételezések ellenére mi a kezelés megkezdése előtt vizsgált Pgp-expressziót megfelelő cut-off érték használatával megbízható prognosztikai faktornak találtuk. Hipotézisünkben a vizsgálatot megelőzően azt valószínűsítettük, hogy a 10%-os cut-off érték megfelelő prognosztikai értékkel bír. A vizsgálatok során azonban arra a következtetésre jutottunk, hogy magasabb cut-off érték használata esetén a túlélésbeli különbség még inkább szignifikáns.

Célkitűzéseink között szerepelt a gyógyszer mellékhatások összehasonlítása a különböző Pgp-expressziós értékekkel. Az általunk leggyakrabban megfigyelt mellékhatás a hasmenés volt. A kumulatív grading megmutatta, hogy az irodalmi adatokhoz hasonlóan a hasmenés, az anorexia és a thrombocytopenia voltak a kezelés legsúlyosabb mellékhatásai. Azt tapasztaltuk, hogy a daganatos halálozás Pgp \geq 6,5% cut-off érték használatával gyengén előrejelezhető, ahogy a gyógyszer mellékhatások okozta halálozás is.

A kutatásunk során azt is vizsgáltuk, hogy a terápia előtti, előkezeletlen daganatmintából lehet-e következtetni a későbbi, *in vivo* „normál” gyógyszerrezisztencia funkcióra. Az eredményeink szerint alacsony szenzitivitással (0,55), de magas specificitással (0,81) elő tudtuk

jelezni a gyógyszer mellékhatás miatt bekövetkezett halálozást. A daganatos betegség miatt bekövetkezett halálozást ezzel szemben magas szenzitivitással (0,87) és alacsony specificitással (0,66) tudtuk jelezni. Tapasztalataink szerint a gyógyszer mellékhatások gyakoribbak a Pgp-negatív, mint a Pgp-pozitív betegeknél, illetve $Pgp \leq 6,5\%$ cut-off értéknél a hasmenés kialakulásánál erős szignifikanciát is találtunk ($p = 0,001$). Lehetséges, hogy ennek az az oka, hogy a Pgp-negatív betegek tovább élnek, emiatt több kemoterápiás kezelést kapnak, így nagyobb eséllyel alakul ki hasmenés náluk. Úgy látjuk, hogy a gyógyszer mellékhatások kialakulása gyenge összefüggést mutat az előkezeletlen tumorok Pgp-expressziójával. A Pgp-expresszió kiértékelése csak a daganatsejtek terápia rezisztenciájáról ad releváns információt, nem pedig az egész állat terápia válaszáról (különös tekintettel a mellékhatásokra).

Vizsgálatunk legnagyobb limitáló tényezője az alacsony esetszám volt. Az eredményeink, miszerint a kemoterápia megkezdése előtt vizsgált Pgp-negatív nyirokcsomók magabb OST és RFP értékekkel járnak, megerősítik azokat a korábbi irodalmi adatokat, miszerint kutyák lymphomája esetén a magas Pgp-expresszió terápia rezisztencia kialakulásával jár, ezáltal negatív prognosztikai faktor.

Eredményeink alapján azt javasoljuk, hogy a festődés intenzitását is értékelni kell az immunhisztokémiai vizsgálat használatakor. Feltételezzük azt is, hogy nemcsak a különböző immunhisztokémiai módszerek, metodikai különbségek miatt kaptak az egyes kutatók eltérő eredményeket, hanem azért, mert a Pgp-expresszió prognosztikai értéke magasabb a főként Pgp-szubsztrátokkal kezelt betegeknél.

Vizsgálatunk során megállapítottuk, hogy a Pgp-immunhisztokémia megfelelő diagnosztikai értékkel rendelkezik és az egyedre szabott gyógyászat alapja lehet lymphomás kutyák esetében. Intenzív és magas

(> 35%) Pgp-expresszió esetén a kezelő állatorvosnak ugyanis a jobb terápiás válasz eléréséhez javasolt olyan szereket kell választania, amelyek nem Pgp-szubsztrátok (pl. lomustine, L-asparagianse).

3.2. A Pgp- és p53-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

Pgp-expressziót tekintve az eredményeink nagyságrendileg megfeleltek az irodalmi adatoknak: a tubulopapilláris carcinomáknál 66,94%, a komplex carcinomáknál 35,72%, a benignus daganatoknál 25%, míg a carcinosarcomáknál 33,33% expressziót tapasztaltunk.

Megállapítottuk, hogy szignifikáns különbség van a tubulopapilláris carcinoma és a komplex carcinoma, valamint a malignus és a benignus daganatok között a Pgp-expresszió tekintetében. Ez felveti annak a jelentőségét, hogy valamennyi általunk vizsgált malignus emlődaganat típus, de különösképpen a tubulopapilláris carcinoma kifejezetten terápiarezisztensnek tekinthetők. Az ilyen daganatok esetében sokkal kevesebb értelme van annak, hogy a daganatot olyan kemoterápiás szerrel kezeljük, amely szubsztrátja a Pgp-nek (doxorubicin, vincristin, ciklofoszfamid, mitoxantron, stb.). Ezek a megállapításaink megfelelnek annak a klinikai tapasztalatnak, miszerint a kutyák emlődaganatai a vénás citosztatikumok többségére (beleértve a Pgp-szubsztrátokat is) rezisztensek.

Pearson-féle korrelációs vizsgálattal megállapítottuk, hogy a Pgp-expresszió mértéke a daganat szövettani típusától függetlenül negatívan korrerál a túlélési idővel és pozitívan a recidivára való hajlammal. Emiatt prognosztikailag jó paraméter lehet a Pgp-expresszió meghatározása emlőtumorok esetén, függetlenül attól, hogy ezeket a daganatokat nem kezeljük kemoterápiával, hanem általában csak műtéten esnek át.

A p53-expresszió tekintetében pozitív festődést tapasztaltunk a jóindulatú daganatok esetében is (43,3%), bár kisebb expressziós százalékban, mint a tubulopapilláris (85,6%) és komplex carcinomáknál (66,5%). Szignifikánsnak bizonyult a különbség a tubulopapilláris és a komplex carcinoma expressziós értékeinél.

Pearson-féle korrelációs vizsgálattal megállapítást nyert, hogy a Pgp- és a p53-expresszió mértéke egymással összefügg, ami azt jelenti, hogy a terápia rezisztenciát okozó fehérjék és a mutációt mutató p53 fokozott expressziója hasonló mértékben jelzi a rosszabb prognózist. A p53-expresszió mértéke és a túlélés között ugyanakkor nem találtunk szignifikáns kapcsolatot.

Wilcoxon Log-rank analízissel összehasonlítottuk medián túlélési időt a különböző Pgp-pontszámú betegcsoportok között. Az alacsony (0, 1, 2) pontszámmal rendelkező csoportnál ($n = 25$) az OST 766 nap volt, míg a magas pontszámú (3 pont, $n = 5$) csoport esetén 36,5 nap, a különbség szignifikáns volt ($p = 0,0302$).

Wilcoxon Log-rank analízissel összehasonlítottuk a medián túlélési időt a különböző p53-pontszámú betegcsoportok között. Az alacsony (0, 1, 2) pontszámmal rendelkező csoportnál ($n = 22$) az OST 803 nap volt, míg a magas pontszámú (3 pont, $n = 8$) csoport esetén 365 nap, de a különbség nem volt szignifikáns. A p53-immunhisztokémia prediktív értékének hiányát a későbbiekben más vizsgálatok is megerősítették.

3.3. A COX-2-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

Fő célunk a COX-2-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganataiban, illetve a különböző COX-gátlók alkalmazásából származó klinikai előny igazolása, illetve összehasonlítása volt. A

hipotézisünk az volt, hogy az emelkedett COX-2-expresszió kutyák esetében is negatív prognosztikai faktor, aminek a gátlása túlélésbeli előnyhöz vezet.

A mi adataink szerint a malignus tumorok az összes daganat 69,05%-át tették ki, ez magasabb, mint az irodalomban általában szereplő kb. 50%-os arány. A malignus daganatok relatíve nagyobb számának oka lehet a korai ivartalanítás elmaradása, illetve az, hogy a betegek előrehaladottabb stádiumban, később kerülnek onkológiai vizsgálatra, így nagyobb eséllyel történik meg a kezdetben benignus elváltozások malignus transzformációja.

Vizsgálataink megerősítették azt az irodalmi adatot, miszerint a malignus emlődaganatok COX-2-expressziója a benignusakénál magasabb. A százalékos expressziós érték vizsgálatokor szignifikáns különbséget találtunk a benignus daganatok (21,96%) és a tubulopapilláris carcinomák (49,16%), a benignus daganatok és a simplex carcinomák (47,22), valamint a benignus daganatok és a sarcomák (71,5%) között.

A festődés intenzitásának vizsgálatokor 4 fokozatú (0–3) pontrendszer használatával szignifikáns különbséget találtunk a benignus daganatok (0,61) és a simplex (anaplasztikus) carcinomák (1,72), a benignus daganatok és a tubulopapilláris carcinomák (1,33), a benignus daganatok és a sarcomák (1,87), a simplex carcinomák és a komplex carcinomák (1,00), valamint a komplex carcinomák és a sarcomák festődési erőssége között. Ezek az eredmények szintén megfelelnek az irodalmi adatoknak.

A vizsgálatunkban a malignus emlődaganatos betegek medián túlélése a következőképpen alakult: simplex carcinomák esetén 181 nap, komplex carcinomák esetén 178 nap, tubulopapilláris carcinomák esetén 190 nap, sarcomák esetén pedig 152 nap.

Mi nem találtunk szignifikáns különbséget a különböző Grade-besorolású daganatok COX-2-expressziójának mértéke és intenzitása között, csupán növekvő tendenciát sikerült igazolnunk a malignitás fokának növekedésével. Ezek az eredményeink megfelelnek azoknak az irodalmi adatoknak, miszerint az agresszívebb besorolású, anaplasztikus formák esetén kifejezetten magas expressziós értékeket.

Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a COX-2-expresszió és -intenzitás mértékében a különböző stádiumokban, Stage I (3 cm átmérő alatti méretű), a Stage II (3–5 cm-es tumorok) és a Stage III (5 cm átmérő feletti méretű) tumorok, valamint azon tumoros betegek között, amelyek Stage IV fokozatúak (bármely méretű daganat nyirokcsomó áttétellel) voltak.

Pozitív korrelációt találtunk a COX-2-expresszió mértéke és a daganatméret között. Irodalmi adatok szerint az 5 cm átmérő feletti daganatok a kisméretű tumoroknál nagyobb valószínűséggel képeznek metasztázist és a betegek 7x nagyobb eséllyel pusztulnak el a műtétet követő 2 éven belül. Az itt felsorolt biológiai tulajdonságok egyik magyarázata lehet a nagyobb daganatmérettel összefüggő magasabb COX-2-expresszió.

Pearson-féle korrelációs analízissel negatív korrelációt találtunk a rosszindulatú daganatok esetében COX-2-expresszió mértéke és túlélési idő, valamint a recidívamentes periódus között. Ezek az adatok megfelelnek azoknak az irodalmi adatoknak, miszerint az emelkedett a COX-2-expresszió negatív prognosztikai faktor.

Log-rank teszt segítségével összehasonlítottuk a medián túlélési időt (OST) a különböző COX-2-pontértékű csoportok között. Az összehasonlítás során szignifikáns különbség adódott ($p = 0,002$). A magasabb (3-as és a 4-es) pontszámmal rendelkezők szignifikánsan

rövidebb ideig éltek, mint az alacsonyabb (0-s, az 1-es, és a 2-es) pontszámú csoportba tartozó betegek.

A COX-2-expresszió prognosztikai értékének növelése céljából meghatároztunk egy 50%-os cut-off értéket, aminek használatával szignifikáns és markáns különbséget találtunk a rosszindulatú daganatok esetében a túlélésben, valamint a recidívamentes periódusban. Az 50%-os határérték kb. 1 éves túlélésre vonatkozóan alacsony szenzitivitással (0,357), de magas specificitással (1) és a mintegy 3 hónapos recidívamentes túlélésre pedig magas szenzitivitással (0,928), de alacsony specificitással (0,333) rendelkezett. Az 50% feletti expressziós értékű csoport teljes túlélése 190 nap, míg az 50% alattié 330 nap volt ($p = 0,009$). A recidívamentes periódus a 50% feletti expressziós értékű csoport esetében 110 nap, az 50% alattinál pedig 300 nap volt ($p = 0,039$).

Kifejezetten erős negatív korrelációt találtunk a Grade-besorolás és túlélési idő ($p < 0,0001$), valamint a recidívamentes periódus között ($p < 0,0001$). Ezek a megfigyeléseink megfelelnek azoknak az irodalmi adatoknak, melyek szerint a grading kifejezetten erős prognosztikai értékkel bír.

A malignus daganatos betegek teljes és recidívamentes túlélésének összehasonlításakor a következőt tapasztaltuk: az I., a II., és a III. stádium között nem találtunk szignifikáns különbséget, de a IV. stádiumú betegek túlélése szignifikánsan elmaradt a többitől ($p < 0,0001$). Ez utóbbi megfigyelésünk egyezett más publikációkban leírt tapasztalatokkal (Rasotto és mtsai. 2017), ahol szintén azt találták, hogy a IV. stádiumú, nyirokcsomó áttétet mutató betegek túlélése jelentősen rosszabb, mint a többi stádiumú betegé.

A nemszteroid gyulladáscsökkentők kemopreventív és daganatnövekedést csökkentő hatása régóta ismert, ahogy a fordított összefüggés is a nők emlőrák kialakulási kockázata, valamint NSAID-

használatuk között. A nemszteroid gyulladásgátlók számos daganattípusnál a terápia részét képezik, függetlenül attól, hogy a tumorelleses hatás pontos sejtszintű és biokémiai mechanizmusa még csak részben ismert. Az ún. metronomicus protokollok elterjedésével a NSAID-k használata folyamatosan teret nyer a klinikai onkológiában főként az olyan daganatok esetén, amik a klasszikus vénás kemoterápiára rezisztensek. A metronomicus terápia célja a COX-2-gátlók és protokolltól függően egyéb kemoterápiás szerek kisdózisú, folyamatos adagolásával a daganat érképzésének a gátlása.

A mi vizsgálatunkban a NSAID-kezelésben részesült betegek nem reagáltak pozitívan. Ehelyett az NSAID-terápiában részesült csoport rövidebb túlélési idő mutatott. Ennek lehetséges oka a nem megfelelő kísérleti elrendezés, ugyanis az előrehaladottabb stádiumú, valamint agresszívebb daganattal kezelt kutyák közül arányaiban többen részesültek kezelésben, így a kontrollcsoportot döntően a Grade I, adjuváns kezelést nem igénylő a betegek alkották. A felhasznált szerek közül egyedül a firocoxib korrelált pozitívan a túlélési idővel. Ennek oka lehet, hogy a firocoxib az egyedüli szelektív COX-2-gátló az általunk vizsgált szerek közül. Bár más tanulmányokhoz hasonlóan (Arenas és mtsai., 2017) részben nekünk is sikerült igazolni a firocoxib hatékonyságát kutyák high-grade emlődaganatainak adjuváns kezelésben, az NSAID-használattal kapcsolatos eredményeinket limitálja az alacsony betegszám, a nem megfelelő betegszelekció és kísérleti elrendezés, valamint az utánkövetés nehézsége. Még inkább releváns eredmény eléréséhez más módon megtervezett kísérletre lett volna szükség (pl. azonos stádiumú és Grade-besorolású betegek), a mi kutatásunk fókuszában azonban a COX-2-expresszió vizsgálata állt.

Esetünkben a kemoterápiát kapott betegek nem reagáltak pozitívan (az OST a kemoterápiás csoportban 224 nap volt, szemben a

kontrollcsoport 246 napjával), a citosztatikus kezelésben részesült csoport recidívamentes periódusa pedig szintén rövidebb volt, mint a kemoterápiát nem kapott betegeké. Ezek az eredmények megfelelnek az emlődaganatok kemoterápierezisztanciájáról ismert eddigi irodalmi adatoknak. A citosztatikus csoport rövidebb recidívamentes és teljes túlélésének pedig az a magyarázata, hogy eleve a magasabb stádiumú és Grade-besorolású betegek részesültek kemoterápiás kezelésben, a kontrollcsoportot pedig döntően a kedvezőbb kórjóslatú, Grade I betegek alkották, mivel az esetükben nem volt indokolt az adjuváns kezelés. Ennek megfelelően csak a Grade II és Grade III betegeket teljes túlélési idejét vizsgálva ez a tendencia megfordult, a kemoterápiás csoport esetén az OST továbbra is 224 nap volt, de a kontrollcsoporté azonban 152 napra csökkent. Ezek az eredményeink nagyon hasonlóak Arenas és mtsai. (2016) tanulmányához, ahol a citosztatikus csoport (mitoxantron) túlélési ideje a kezelésben egyáltalán nem részesült csoporthoz képest növekedett ugyan, de hozzánk hasonlóan ők sem tapasztaltak szignifikáns különbséget.

Meg kell jegyeznünk, hogy a terápiás beavatkozások hatása nem megfelelően vizsgálható ennyire heterogén és sok változóval rendelkező viszonylag szűk populációban ($n = 42$). Ugyanakkor nem volt célunk biztos statisztikai elemzéseket adni, hiszen a kezelési csoportokba sorolás alapját az adhatja, ha a különböző kezelésekből részesülők ugyanolyan vagy nagyon hasonló stádium-, malignitási és korcsoportokba tartoznának. Sajnos nekünk erre nem volt lehetőségünk.

Általánosságban elmondható, hogy a COX-2-festődés nem daganatspecifikus tulajdonság, valamint nehezen standardizálható. A különböző minták nagyon eltérő festődését más szerzők is megtapasztalták. Ez jelentősen rontja ennek a markernek a diagnosztikában való használhatóságát. Ugyanakkor, az egyre fokozódó

COX-2-expresszió jelentős biológiai tulajdonság, amely a malignitás és a tumorterjedés velejárója lehet. Nem véletlen, hogy egészen magas (50%-os) határértéken tapasztalhatunk szignifikáns különbséget a túlélési időkben.

Összességében elmondhatjuk, hogy vizsgálatainkkal sikeresen igazoltuk a kiindulási hipotéziseinket: az eddigi kutatási eredményeknek megfelelően detektáltuk a COX-2 emelkedett expresszióját kutyák előrehaladott és nagyméretű emlődaganatai esetén, valamint egyértelmű összefüggést találtunk a COX-2-expresszió és a tumorméret között. Tendenciájában igazoltuk az emelkedett expresszió és a rosszabb klinikai kimenetel (csökkent teljes és recidívamentes túlélési idő), valamint a malignitás foka közötti összefüggést. Ezek a megfigyeléseink megfelelnek azoknak az irodalmi adatoknak miszerint a COX-2 létfontosságú szerepet tölt be a tumorgenezisben, a daganatok növekedésében, a malignitás fokában, valamint a metasztázisra és a recidívára való hajlam rizikójának kialakításában. Ezeknek a felfedezéseknek köszönhetően a nemszteroid gyulladáscsökkentők (különös tekintettel a szelektív COX-2-gátlókra) a jövőben fontos szerepet tölthetnek majd be a kutyák rosszindulatú emlődaganatainak kiegészítő terápiájában is. Hatványozottan igaz ez a magas COX-2-expressziót mutató high-grade formákra. Ez utóbbit egyébként a firoxocib pozitív terápiás hatásának megerősítésével nekünk is sikerült igazolni. Különösen jelentős ez annak ismeretében, hogy ezeknek a daganatoknak a kemoterápiarezisztenciája miatt eddig nem állt rendelkezésre kellően hatékony adjuváns kezelési mód.

Vizsgálatunk során megállapítottuk, hogy a COX-2-immunhisztokémia magas prognosztikai értékkel rendelkezik és az egyedre szabott gyógyászat alapja lehet az emlődaganatos kutyák esetében. Intenzív és magas (esetünkben > 50%) expresszió esetén a kezelőállatorvosnak a műtéti terápiát követően mindenképpen javasolnia

kell a COX-2-gátló terápiát, hiszen az elérhető szerek közül jelenlegi ismereteink alapján a firoxocib hatékonysága bizonyított.

3.4. Tirozin-kinázok vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

Ugyanazon állat daganatos ($n = 13$) és egészséges ($n = 13$) emlőtelepeiből származó mintákban határoztuk meg a tirozin-kinázok mRNS-expresszióját a HPRT háztartási génhez viszonyítva.

Megállapítottuk, hogy a felsorolt faktorok mindegyike szignifikánsan magasabb mennyiségben van jelen a daganatos emlőszövetben, mint ugyanazon egyed egészséges emlőjében. A magasabb Grade-besorolás szignifikánsan magasabb VEGFR1-, VEGF-, c-KIT és c-MET-expresszióval járt együtt. A VEGFR2-, PDGFR1-, EGFR- és ErbB2-expresszió tekintetében a Grade I tumoroknál volt a legmagasabb az mRNS-szint, ezt követte egyre csökkenő értékekkel a Grade II, végül a Grade III csoport.

Összehasonlítottuk a különböző Grade-besorolású csoportok saját egészséges kontroll emlőpárjukhoz viszonyított relatív expressziós értékeit. VEGFR1, c-KIT és c-MET esetén a Grade III tumoroknál szignifikánsan magasabb relatív expressziós értéket mértünk, mint a Grade I és a Grade II minták esetében. A PDGFR1 relatív mRNS-szintje Grade III tumorok esetén szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a Grade I és Grade II csoportokban.

A VEGFR1, VEGFR2, VEGF emelkedett expressziós értékeinek tekintetében eredményeink hasonlóak az irodalmi adatokhoz. Több tanulmány állapította meg a kutyák emlődaganataiban magasabb VEGF-értéket és egy autokrin hurok létét is feltételezik. A daganatsejtek képesek VEGF termelésére, ami a receptoraihoz kapcsolódva beindítja azok autofoszforilációját, ez pedig fokozott angiogenezishez vezet. A VEGF

angiogén faktorként különböző útvonalakon keresztül szabályozza az endothelsejtek differenciálódását, proliferációját, migrációját, valamint antiapoptotikus tulajdonságú. Restucci és mtsai. (2004) hozzánk hasonlóan megállapították, hogy a kevésbé differenciált (tehát magasabb Grade-besorolású) tumoroknak szignifikánsan magasabb a VEGFR1-és VEGF-szintje, mint a kevésbé malignus daganatoké. Ennek oka, hogy a magasabb Grade-besorolású tumorok agresszívebbek, emiatt növekedésük is gyorsabb, így bennük könnyebben alakulnak ki hypoxiás, illetve nekrotikus területek. Ez valószínűsíti azt, hogy a VEGF–VEGFR autokrin hurok a daganat hypoxiás stimulusra adott válasza. Ez alapján feltételezhető, hogy malignus daganatok esetén a VEGF–VEGFR-tengely kulcsszerepet játszik az endothelmigrációban, illetve -proliferációban, valamint ezzel egy időben a neoplasztikus sejtek proliferációjában és a daganat növekedésében. Emellett az emelkedett VEGFR- és VEGF-expresszió fokozhatja a metasztatikus hajlamot, részben a neovaszkularizáció, részben pedig az újonnan képződött vérerek falának megnövekedett permeabilitása által. Összességében elmondható, hogy az általunk is tapasztalt emelkedett VEGF- és VEGFR-expresszió negatív prognosztikai faktorként magyarázatot adhat a high-grade emlőtumorok néhány tipikus tulajdonságára, mint a gyors növekedés és a korai áttétképzés.

Az EGFR2 esetében nem tapasztaltunk a high-grade emlőtumorokban szignifikánsan emelkedett értékeket. Ez azt valószínűsíti, hogy a VEGFR2 kutyák emlőtumorainak esetében – pl. az agydaganatokban tapasztaltakkal ellentétben – nem játszik jelentős szerepet a daganat progressziójában és a jelátvitel ebben az esetben döntően a VEGFR1 receptoron keresztül történik.

Humán emlődaganatok esetén ismert tény a PDGFR1, EGFR és ErbB2 emelkedett expressziója. A PDGFR1/PDGFR- α emelkedett

expressziója nők emlőrákja esetén a daganat fokozott progressziójával jár együtt. Ehhez hasonlóan számos humán emlődaganat típusban leírták az EGFR és ErbB2 fokozott expresszióját is, ami nagyobb daganatmérettel, alacsonyabb differenciáltsági fokkal és rosszabb prognózissal jár. Ezekhez az adatokhoz hasonlóan kutyák esetében mi is emelkedett PDGFR1, EGFR és ErbB2 mRNS-szintet tapasztaltunk, de döntően a low-grade emlődaganatokból származó mintákban. Ezek a tirozin-kinázok az emberekben tapasztaltakhoz hasonlóan kutyákban is növelik a tumor agresszivitási fokát és a humán onkológiához hasonlóan a jövőben potenciális terápia célpontok lehetnek. Az ErbB2 (HER-2) emelkedett expressziója tekintetében eredményeink megfelelnek az irodalmi adatoknak, miszerint a nagy mintaszámon végzett immunhisztokémiai vizsgálatok a malignus emlődaganatok 29,7%-ában igazolták a HER-2 fokozott expresszióját. A kizárólag sebészi úton kezelt, fokozott HER-2 expressziót mutató kutyák egyéves és kétéves túlélési aránya, valamint a teljes túlélési ideje is jobb volt a HER-2 negatív csoportnál, bár a különbség egyik esetben sem volt szignifikáns. Ez a tény megmagyarázza azt, hogy miért nem mértünk a magasabb Grade-besorolású csoportokban szignifikánsan emelkedett expressziót.

Vizsgálataink igazolták, hogy más neoplasztikus kórképekhez hasonlóan a MET fokozott expressziója kutyák emlődaganataiban is megfigyelhető, valamint hogy a Grade III emlődaganatokban mennyisége az alacsonyabb malignitású csoportokhoz viszonyítva szignifikánsan emelkedett. Ezek az eredmények megegyeznek azokkal az irodalmi adatokkal, melyek szerint a c-met fokozott jelenléte rosszabb prognózissal jár együtt, mivel onkogén receptor tirozin-kinázként jelentős szerepet tölt be a daganatok proliferációjában, növekedésében, angiogenezisében és a metasztázisok képződésében.

Kutyák egyre több daganatos megbetegedése esetén leírták a KIT-mutációt, amely tumorsejtekben fokozott proliferációt és/vagy csökkent apoptotikus hajlamot okoz. Vizsgálataink igazolták a korábban leírt emelkedett c-kit-expressziót kutyák emlődaganatai esetén. Megállapítottuk továbbá, hogy a Grade III daganatokban a c-kit mennyisége az alacsonyabb malignitású csoportokhoz viszonyítva szignifikánsan emelkedett, amely részben magyarázhatja ezeknek a tumoroknak az agresszivitását és rosszabb kórjóslatát.

A c-KIT és c-MET jelátviteli utak nők emlőrákja esetén is rosszabb prognózishoz és tumor progresszióhoz társulnak, ami megerősíti további anti-c-KIT és anti-c-MET hatóanyagok fejlesztésének szükségességét. A mi eredményeink a Grade II és Grade III csoportokban alátámasztják ennek létjogosultságát.

Vizsgálataink megerősítették azt a tényt, hogy az onkogén tirozin-kinázok fontos szerepet játszanak a daganatnövekedésben, proliferációban, angiogenezisben és metasztázisképzésben. Eredményeink kutyák esetében elsőként mutatják be a tirozin-kinázok komplex és szimultán szabályozási zavarát, nem csak egyetlen receptor, hanem gének sokaságának érintettsége révén. Eredményeink igazolták azt is, hogy a jövőben az emlődaganatok gyógykezelésekor figyelembe kell venni a tirozin-kinázok potenciális diszregulációját és a hatékony terápia tervezéséhez szükséges lehet ezek szintjének mérése, majd azok célzott gátlása.

Vizsgálatunk limitáló tényezője az alacsony mintaszám és emiatt a különböző szövettani típusú emlődaganatok alacsony száma volt. Ettől függetlenül az adataink bizonyították a VEGF, valamint számos tirozin-kináz (VEGFR1, PDGFR1, c-KIT és c-MET) fokozott expresszióját és szabályozási zavarát kutyák emlődaganatai esetén. A betegek kis száma ellenére az a tény, hogy az egészséges és daganatos mintákat ugyanattól

a betegtől azonos időben vettük, sokkal megbízhatóbbá teszi a statisztikai összehasonlítások eredményeit. Összességében elmondhatjuk, hogy a jövőben a kutyák rosszindulatú emlődaganatai a tirozinkináz-gátlókkal kapcsolatos vizsgálatok potenciális célpontjai lehetnek.

4. Új tudományos eredmények

1. Kutatócsoportunk Magyarországon elsőként vizsgálta lymphomás kutyákból származó nyirokcsomóminták Pgp-expresszióját és annak prognosztikai értékét. A vizsgálati módszerünk validálása után meghatároztunk egy Pgp-expressziós cut-off értéket (35%), amely magas prognosztikai és diagnosztikai értékkel bír, ezáltal még a kemoterápiás kezelés megkezdése előtt segítségünkre lehet a leginkább hatékony terápiás protokoll kiválasztásában (egyedre szabott gyógyászat).
2. Magyarországon elsőként írtuk le kutyák emlődaganatainak fokozott, szimultán Pgp-, ill- p53-expresszióját, ezzel részben magyaráztuk a daganattípus kemoterápia-rezisztenciáját. Az emlődaganatos minták csaknem mindegyikében mutatkozott bizonyos mértékű Pgp-expresszió. Ezek az eredményeink megfelelnek annak a klinikai megfigyelésnek, miszerint a kutyák emlődaganatai a Pgp-szubsztrát citosztatikumokra rezisztensek. Ennek magyarázata, hogy az esetleges kezdeti tumorregressziót követően az eredetileg alacsonyabb szintű Pgp-expressziót mutató tumorokban is szelektálódik egy olyan terápia-rezisztens klón, amely túlszaporodva már nem mutat jelentősebb regressziót a gyógykezelés hatására.

3. Megállapítottuk, hogy kutyák emlődaganatai esetében p53-immunhisztokémia nem rendelkezik megfelelő prediktív értékkel.

4. Detektáltuk a COX-2 emelkedett expresszióját kutyák előrehaladott és nagyméretű emlődaganatai esetén, valamint egyértelmű összefüggést találtunk a COX-2-expresszió és a tumorméret között. Tendenciájában igazoltuk az emelkedett expresszió és a rosszabb klinikai kimenetel (csökkent teljes és recidívamentes túlélési idő), valamint a malignitás foka közötti összefüggést. Megerősítettük a COX-2-immunhisztokémia prognosztikai értékét kutyák emlődaganatai esetén és meghatároztunk egy 50%-os határértéket, amely kifejezetten prognosztikai értékűnek bizonyul. Eredményeink alapján a kutyák emlődaganatai a COX-2-gátló terápia potenciális célpontjai lehetnek.

5. Vizsgálatainkkal igazoltuk számos onkogén tirozin-kináz (VEGFR1, PDGFR1, c-KIT és c-MET), illetve a VEGF fokozott expresszióját, valamint diszregulációját kutyák emlődaganatai esetében. Elsőként igazoltuk kutyák emlődaganatai esetén a felsorolt onkogének komplex diszregulációját. Eredményeink alapján a kutyák emlődaganatai a tirozinkináz-gátló terápia potenciális célpontjai lehetnek.

5. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

5.1. Lektorált, impakt faktorral rendelkező tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Koltai Zs., Vajdovich P.: **Expression of multidrug resistance membrane transporter (Pgp) and p53 protein in canine mammary tumours.** Acta Vet Hung. 62(2). 194-204, 2014., IF (2014): 0.646

Koltai Zs., Szabó B., Jakus J., Vajdovich P.: **Tyrosine kinase expression analyses in canine mammary gland tumours - A pilot study.** Acta Vet Hung. 66(2). 294-308, 2018., IF (2018): 1.059

Vajdovich P., Koltai Zs., Dékay V., Kungl K., Harnos A.: **Evaluation of Pgp (MDR1) immunohistochemistry in canine lymphoma - prognostic and clinical aspects.** Acta Vet Hung. 66(2). 309-328, 2018., IF (2018): 1.059

Koltai Zs., Vajdovich P., Dékay V.: **A ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim expressziójának jelentősége a kisállatok daganatos kórképei esetén.** MÁL. 136(10). 579-587, 2014., IF (2014): 0.185

Koltai Zs., Vajdovich P., Jakab Cs., Szabó B.: **A tirozinkináz-gátlás jelentősége a kisállatok daganatos kórképei esetén.** MÁL. 139(8). 465-472, 2017., IF (2017): 0.196

5.2. Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Dékay V., Vajdovich P., Koltai Zs.: **A COX-2 enzim expressziójának immunohisztokémiai módszerrel történő vizsgálata kutyák emlődaganataiban.** Kisállatpraxis. 13(5). 200-206, 2012.

5.3. Konferencia prezentációk

Koltai Zs., Dékay V., Vajdovich P.: **A COX-2 expressziójának vizsgálata kutyák emlődaganataiban.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2011.

Szabó B., Koltai Zs., Tóth B., Vajdovich P.: **Emlődaganatos és lymphomás kutyák betegségének lefolyását meghatározó fehérjék expressziójának vizsgálata.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2011.

Koltai Zs.: **A COX-2 és antagonistái szerepe az állatorvosi onkológiában.** Magyar Állatorvosi Onkológiai Társaság VII. konferenciája, 2012.

Szabó B., Machut J., Koltai Zs., Vajdovich P.: **Receptor tirozin-kinázok mRNS-exoressziójának változása kutyák emlődaganataiban.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2012.

Szabó B., Koltai Zs., Vajdovich P.: **Expression of receptor tyrosine kinases in canine mamary gland tumours.** ESVONC Annual Congress 2013.

Dékay V., Karai E., Verebélyi T., Koltai Zs., Vajdovich P.: **A multidrogrezisztenciafehérje (MDR1) immunhisztokémiai és funkcionális vizsgálatának összehasonlítása lymphomás, emlődaganatos és mastocytomás kutyák vizsgálata során.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2015.

6. A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk

6.1. Lektorált, impakt faktorral rendelkező tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Lehner L., Czeibert K., Koltai Zs., Jakob Cs.: **Frontalis meningeoma eltávolítása bilaterális transzfrontalis feltárással kutyában.** MÁL. 141(9). 533-545, 2019., IF (2018/2019): 0.143

6.2. Konferencia prezentációk

Szécsényi D., Vajdovich P., Koltai Zs.: **A terápia rezisztencia vizsgálata kutyák kemoterápiás kezelése során.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2006.

Vajdovich P., Besze A., Perge E., Koltai Zs.: **Lymphomás kutyák csontvelővizsgálati eredményeinek összefüggései a betegek klinikai és kórszövetani leleteivel.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2011.

Vajdovich P., Koltai Zs., Szendi E: **A doxorubicin toxikus hatásának mérséklési lehetősége retrospektív vizsgálatok alapján. Dóziscsökkenés vagy előkezelés?** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2012.

Tóth B., Koltai Zs., Szendi E., Vajdovich P.: **Tapasztalatok a SYSMEX XT-2000 IV haematológiai automatával a klinikumban.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2015.