

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

A

**P-glikoprotein expressziójának és működésének vizsgálata
lymphomás és mastocytomás kutyák esetén**

PhD értekezés

Dr. Dékay Valéria

2023

Témavezető:

.....

Dr. Vajdovich Péter
Állatorvostudományi Egyetem
Kóréletani és Onkológiai Tanszék

Készült 8 példányban. Ez asz. példány

.....

Dr. Dékay Valéria

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Összefoglalás	7
2. Bevezetés.....	9
3. Irodalmi áttekintés.....	11
3.1. Kutyák lymphomás megbetegedése.....	11
3.1.1. Általános jellemzők, epigenetikai háttér	11
3.1.2. Lymphoma klasszifikációja.....	13
3.1.3. Kutyák nodális lymphomáinak megjelenése a klinikumban	15
3.1.3.1. Tünetek	15
3.1.3.2. Diagnosztika.....	17
3.1.3.3. Terápia	18
3.2. Kutyák mastocytomás megbetegedése	20
3.2.1. Általános jellemzők	20
3.2.2. Klasszifikáció	21
3.2.3. Kutyák mastocytomáinak klinikai megjelenése,.....	23
3.2.3.1. Tünetek	23
3.2.3.2. Diagnosztika.....	25
3.2.3.3. Terápia	26
3.3. Terápiarezisztencia.....	27
3.3.1. A P-glikoprotein jelentősége kutyák lymphomáiban és mastocytomáiban.....	29
4. Célkitűzések.....	31
5. Anyag és módszer.....	32
5.1. A vizsgálatban szereplő lymphomás betegek.....	32
5.1.1. Mintavétel lymphomás betegekből szövettani vizsgálatra, immunfenotipizálás immunhisztokémiai vizsgálattal.....	35
5.1.2. Lymphomás betegek immunfenotípus meghatározása áramlási citometriával	38
5.2. A vizsgálatban szereplő mastocytomás betegek.....	40
5.3. P-glikoprotein expresszió szövettani vizsgálata lymphomás nyirokcsomó, illetve mastocytoma mintákon	41
5.4. P-glikoprotein funkcionális vizsgálata lymphomás nyirokcsomó és mastocytoma mintákon áramlási citométer segítségével.....	42
5.5. Statisztikai vizsgálatok	44
6. Eredmények	46
6.1. Lymphomás betegek klinikai vizsgálati eredményei	46
6.1.1. A P-glikoprotein expresszió értékelése	49

6.1.2. A P-glikoprotein funkcionalitás vizsgálatának értékelése.....	54
6.2. B-sejtes lymphomás páciensek klinikai vizsgálati eredményei.....	58
6.2.1. P-glikoprotein expressziójának kórszövettani vizsgálata B-sejtes lymphomás betegek esetén	62
6.2.2. P-glikoprotein funkcionális vizsgálata B-sejtes lymphomás betegek esetén.....	66
6.3. T-sejtes lymphomás betegek klinikai vizsgálati eredményei.....	73
6.3.1. P-glikoprotein expressziójának kórszövettani vizsgálata T-sejtes lymphomás betegek esetén	76
6.3.2. P-glikoprotein funkcionális vizsgálata T-sejtes lymphomás betegek esetén.....	79
6.4. Mastocytomás betegek klinikai vizsgálati eredményei	82
6.4.1. P-glikoprotein expresszió vizsgálata a mastocytomás betegek szövettani mintáin.....	82
6.4.2. P-glikoprotein funkció vizsgálata mastocytomás betegek szövettani mintáin....	85
6.4.3. Túlélési adatokkal végzett összehasonlító vizsgálatok a mastocytomás betegek esetén.....	86
7. Megbeszélés	89
7.1. Konklúzió a lymphomás betegek eredményei kapcsán	89
7.2. Konklúzió a mastocytomás betegek eredményei kapcsán	98
8. Új tudományos eredmények.....	101
9. Irodalomjegyzék	102
10. A doktori kutatás eredményeinek közlései.....	113
10.1. Lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk.....	113
10.2. Konferencia prezentációk.....	113
11. Köszönetnyilvánítás	114

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés angolul	Jelentése angolul	Rövidítés magyarul	Jelentése magyarul
7-AAD	7-Aminoactinomycin		7-Aminoaktinomycin
ABC proteins	ATP-binding cassette proteins	ABC fehérjék	ATP-kötő kazetta fehérjék
AgNOR	Argyrophilic nucleolar organizing regions		Ezüsttel festődő magvacska szervező régió
ALC	Anaplastic large cell lymphoma		Anaplasztikus nagy sejtés lymphoma
ATP	Adenosine triphosphate		Adenozin trifoszfát
BCRP	Breast cancer resistance protein		Emlődaganat rezisztencia fehérje
CD	Cluster of differentiation		Differenciáláshoz használható celluláris markerek csoportja
CHOP	Ciklofoszphamide (C), doxorubicin (H, hydroxydaunorubicin), vincristine (O, Oncovin), prednisone (P)		Ciklofoszfamid (C), doxorubicin (H, hydroxidaunorubicin), vinkrisztin (O, Oncovin) és prednizolon (P)
c-kit gene	Gene that encoding the receptor tyrosine kinase protein	c-kit gén	Tirozin kináz receptort kódoló gén
CLL/SLL	Chronic lymphocytic leukemia/ Small lymphocytic lymphoma		Krónikus lymphocytás leukémia/kis lymphocytás lymphoma
CT	Computed tomography scan		Komputer tomográfia
DLBCL	Diffuse large B cell lymphoma		Diffúz nagy B-sejtés lymphoma
DNA	Desoxyribonucleic acid	DNS	Dezoxiribonukleinsav
FACS scan	Fluorescence-activated cell sorting scan		Fluoreszcencia aktivált sejtválogató és analizátor
FL	Follicularis lymphoma		Follicular lymphoma
GNB 1	Guanine nucleotide-binding protein, subunit beta-1		Guanin nukleotid-kötő fehérje béta-1 altípusa
HL	Hodgkin lymphoma		Hodgkin lymphoma
KIT	Tyrosine kinase receptor		Tirozin kináz receptor
L-CHOP	L-asparaginase (L), ciklofoszphamide (C), doxorubicin (H, hydroxydaunorubicin), vincristine (O, Oncovin), prednisone (P)		L-aszparagináz (L), ciklofoszfamid (C), doxorubicin (H, hydroxidaunorubicin), vinkrisztin (O, Oncovin) és prednizolon (P)
LOPP	Lomustine (L), vincristine (O, Oncovin), procarbazine (P), prednisolone (P)		Lomusztin (L), vinkrisztin (O, Oncovin), prokarbazin (P), prednizolon (P)
MAF	Multidrug resistance activating factor		Multidrogrezisztencia Aktivitási Faktor
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase		Mitogén-aktivált protein kináz
MCL	Mantle-cell lymphoma		Köpeny sejtés lymphoma

MDR	Multidrug resistance		Multidrog rezisztencia
MOPP	Mechlorethamine (M), vincristine (O, Oncovin), procarbazine (P), prednisolone (P)		Meklóretmain (M), vinkrisztin (O), procarbazin (P), prednizolon (P)
MRI	Magnetic resonance imaging		Mágneses rezonanciás képalkotás
MRP1	Multidrug resistance associated protein 1		Multidrog rezisztencia asszociált fehérje 1
NBD	Nucleotide binding domain		Nukleotid-kötő domén
NHL	Non-Hodgkin lymphoma		Non-Hodgkin lymphoma
NMZL	Nodal marginal zone lymphoma		Nodalis marginális zóna lymphoma
OST	Overall survival time		Teljes túlélési idő
PARR	PCR for antigen receptor rearrangements		Antigén receptorok átrendeződésének PCR vizsgálata
PCN	Plasma cell neoplasia		Plazma sejt neoplázia
PCR	Polymerase chain reaction		Polimeráz láncreakció
PET	Positron emission tomography		Pozitron emissziós tomográfia
P-gp	Permeability glycoprotein		Áteresztő glikoprotein
PTCL- NOS	Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified		Perifériás T-sejt lymphoma, más típusba nem sorolható (v. tovább nem osztályozható) típusa
PTEN	Phosphatase and tensin homolog		Foszfatáz és tenzin homológ
RFP	Relapse free period		Recidívmentes túlélési idő
RNA	Ribonucleic acid	RNS	Ribonukleinsav
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative real-time PCR		Reverz transzkripció quantitativ polimeráz láncreakció
TKI	Tyrosine kinase inhibitor		Tirozin kináz inhibitor
T-LBL	T-cell lymphoblastic lymphoma		T-sejt lymphoblastos lymphoma
TMD	Transmembrane domain		Transzmembrán domén
TZL	T-zone lymphoma		T-zóna lymphoma
VCOG	Veterinary Cooperative Oncology Group		Állatorvosi Onkológiai Együtműködési Csoport
VEGF	Vascular endothelial growth factor		Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2		Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor 2
WHO	World Health Organization		Egészségügyi Világszervezet

1. Összefoglalás

Az állatorvosi klinikumban a kutyák klinikailag leggyakrabban előforduló tumorai közé tartoznak a lymphomás és mastocytomás megbetegedések. Ezekben a daganatsejtek jól differenciálható, viszonylag homogén morfológiájú proliferátumot alkotnak. A multicentrikus nodalis lymphoma esetében a kórjóslatot, azaz a várható túlélési időket jelentősen befolyásolja a klinikai stádium, a kórszövettanilag meghatározható immunfenotípus, az alkalmazott kezelési protokoll, valamint az egyidőben előforduló egyéb megbetegedések. Ugyanígy befolyásoló tényezők mastocytómák esetén is a stádium, a malignitás kórszövettanilag meghatározott foka, az alkalmazott kezelések, és az esetleges egyidejű egyéb megbetegedések. A korábbi tanulmányok alapján létfontosságú tényező a gyógyszerrezisztencia, amely idővel a kezelés sikertelenségéhez vezet. Az ABC (ATP-binding cassette) szupercsaládba tartozó P-glikoprotein (P-gp) által közvetített gyógyszerkiáramlás számos malignus daganat rezisztenciáját okozza. A P-gp expresszióját, aktivitását számos korábbi szakirodalom vizsgálta a kutyák lymphomás és mastocytomás megbetegedései esetén.

Vizsgálataink célja volt a szóban forgó fehérje százalékos előfordulásának és funkcionális aktivitásának feltérképezése a két tumortípus esetén, továbbá a két módszer összehasonlítása. Ezekon felül szándékunkban állt a kemoterápiás kezeléseket megelőzően a P-gp prediktív értékének a meghatározása.

Kutatásunk során 95 lymphomás és 31 mastocytomás kutya adatait dolgoztuk fel mintegy 7 évet felölelő időtartam alatt. Mindegyik beteg átesett a diagnózishoz és stádiumba soroláshoz elengedhetetlen vizsgálatokon. A lymphoma betegek CHOP vagy L-CHOP kezelésben részesültek első ciklusban. A mastocytoma betegek mindegyike műtéten esett át, majd 16 esetben részesültek kemoterápiás utókezelésben. A P-gp százalékos meghatározásához immunhisztokémiai jelölést használtunk, funkciójának megítéléséhez áramlásos citométerrel detektálható Calcein tesztet alkalmaztunk. A funkció számszerűsítéséhez a multidrogrezisztencia aktivitási faktort (MAF) használtuk. A vizsgálatokból kapott adatokat alapul véve összehasonlítottuk a teljes túlélési időket (overall survival time, OST) és recidívamentes túlélési időket (relapse free period, RFP). A lymphoma csoportban a B-sejtes páciensek (n=79) kissé alacsonyabb P-gp expressziót produkáltak, míg átlag MAF értékük kissé magasabb volt a T-sejtes populációhoz (n=16) képest. A P-gp pozitivitás és MAF értékek mindkét altípus esetében egyértelműen pozitívan, szignifikánsan korreláltak egymással. A teljes betegpopulációban a túlélési idők tekintetében a következő megállapítások tehetőek. Az OST adatok negatív, nem szignifikáns korrelációt mutattak a P-gp expresszió mértékével, míg a MAF értékeket vizsgálva a korreláció pozitív volt, szintén nem szignifikáns mértékben.

Ezzel szemben RFP értékelésekor mind a P-gp expresszió, mind a MAF értékek nem szignifikáns, pozitív korrelációt produkáltak. A B-sejtes lymphomás betegek közül nem mindegyik esetben volt a halál oka lymphoma (27/79). Ebben a csoportban a mellékhatások figyelembe vételekor tapasztalható volt azok erős befolyása. Azon csoportban voltak a leggyakoribb és legsúlyosabb mellékhatások, amelyek alacsony MAF mellett rövid túlélési időket produkált. Ugyanezen csoportban kellett a leggyakrabban elhalasztani a mellékhatások miatt a kezeléseket. A T-sejtes páciensek esetén mind a P-gp expresszió, mind a MAF negatívan korreláltak az OST és RFP adatokkal. Tehát minél magasabb volt a P-gp százalékos értéke és a MAF, annál rövidebb volt a túlélési idő. A P-gp expresszió és MAF a mastocytomák esetében is erősen, pozitívan korrelál egymással. A P-gp százalékos kifejeződése és a MAF pozitívan korrelál az OST-vel a mastocytomás betegeknél. Ezzel szemben a MAF és az RFP között negatív korrelációt tapasztaltunk.

Következtetéseink szerint a két vizsgálati módszer, a P-gp meghatározására szolgáló immunhisztokémia és áramlási citometria jól összehasonlítható mind a lymphomák, mind a mastocytomák esetében. A MAF érték megfelelő mutató a P-gp aktivitás meghatározásához. A lymphomához köthető haláloknak nagy szerepe lehet a vizsgálati populáció heterogenitásában. A B-sejtes lymphomás betegek csoportjában számos adatot cenzorálni (hiányzó adatként kezelni) kellett a túlélési eredmények vizsgálatakor, mivel sok esetben nem lymphoma miatt következett be a betegek halála. Ezen probléma kiküszöbölésére megfelelőbb mutató lehet a RFP, mivel azt nem befolyásolja a halálok. Ezen felül a túlélést és kemoterápiarezisztenciát meghatározó kulcsfontosságú tényező, hogy az adott beteg meg tudja kapni időben és megfelelő dózisban a citosztatikus gyógyszert.

Kutatásunk alapján azonban a P-gp funkció nem mondható a terápia szempontjából prediktív mutatónak. Vizsgálataink rámutattak arra, hogy a gyógyszerrezisztenciát kialakító tényezők rendkívül összetettek. Számos befolyásoló körülménnyel kell számolni, nem csak biológiailag, hanem a külső környezet tekintetében is.

2. Bevezetés

A humán medicinában tapasztaltakhoz hasonlóan, a kutyák tumoros megbetegedéseinek előfordulása is egyértelmű növekedést mutat a rendelkezésre álló adatok alapján (Priester és McKay, 1980; Bronden és mtsai, 2010).

A GLOBOCAN becslései alapján 2012-ben világszerte 14,1 millió új daganatos megbetegedést és 8,2 millió halálesetet regisztráltak (Torre és mtsai, 2015). Azonban 2020-ban világszerte 19,3 millió új daganatos megbetegedés és csaknem 10,0 millió tumor okozta haláleset fordult elő (Sung és mtsai, 2021). Az arány 100.000 emberre vonatkoztatva azonban, csökken az emberi populáció intenzívebb növekedése miatt.

Kutyák esetében egy Svájcban végzett vizsgálat szerint, az adatbázisukban feldolgozott kutya populációban a daganattal diagnosztizált esetek előfordulása 1955-ben 13 volt 100.000 kutyára vetítve, míg 2008-ban az előfordulási arány már 695/100.000 páciens volt (Grüntzig és mtsai, 2015). Ugyanakkor Olaszországban az előfordulási arány 804/100.000 volt a rosszindulatú daganatok esetében és 897/100.000 volt a jóindulatú daganatok esetében 2001 és 2008 között évente (Baioni és mtsai, 2017).

Meglepő azonban, hogy az Amerikai Egyesült Államokban a becslések szerint az emberekben évente mintegy 500 új neoplasztikus betegséget diagnosztizálnak 100.000 lakosra vetítve, míg a kutyák esetében a tulajdonosok megkérdezése alapján, mintegy 5300 daganat diagnózis született 100.000 kutyára vetítve. Ez azt jelenti, hogy a kutyákban 2-10x gyakoribb lehet a daganatos megbetegedés, mint az emberekben (Davis és Ostrander, 2014).

A daganatok kialakulása mögött többnyire epigenetikai rendellenesség keresendő, amelyek az élet során alakulnak ki. Sorozatos genetikai mutációk által megszűnnek a normális proliferációs és regenerációs korlátok, melyek által a sejt képessé válik további számbeli gyarapodásra, és fent tudja tartani a túléléshez szükséges alapfolyamatokat, továbbá biztosítja a szervezeten belüli tovább terjedést is. A mutációk kialakulását segíthetik különböző külső mutagének (pl. táplálkozási, belégzési vagy kontakt kémiai ágensek, pl. dohányfüst, tartósítószer, rovarirtók, az UV- és Gamma-sugárzás) és belső mutagének (pl. DNS replikációt szabályozó enzimek hibaaránya) (Vail és mtsai, 2019). A környezeti hatások társállatainkat is egyre inkább érintik a közös élettér következtében. A legtöbb mutáció csendes és nem akadályozza a sejt működését, mások azonban proto-onkogének, és ezzel a tumorszupresszor gének gátlása (Tomasetti és Vogerstein, 2015), vagy a proliferációs gének aktiválódása következhet be (Tomasetti és Vogerstein, 2017). A daganat megjelenésének kockázata az életkorral növekszik. Bizonyos vizsgálatok szerint a kutyák esetében egyes replikációhoz kapcsolódó faktorok jelenléte alapján még erősebb a

korreláció a kor és egyes ráktípusok megjelenése, progressziója között, mint emberben (Peto, 2015).

A tumorprogressziót előidéző események számos mechanizmus útján történnek, ideértve az öröklődő tényezőket, környezeti elemek okozta károsodást, a genetikai instabilitást. A daganatos megbetegedések valószínűleg a magasabb rendű gerincesek esetében az evolúció elkerülhetetlen következményei (Modiano és Breen, 2008). Fontos az alapvető mechanizmusok megértése, melyek felelősek a malignus transzformációért és tumor progresszióért. Ezen információk lehetővé teszik az életminőség javítását célzó stratégiák kidolgozását, a hatékonyabb gyógykezelést. Az emberek és kutyák tumorai között számos egyezés van, amely lehetőséget ad összehasonlító vizsgálatok elvégzésére (Modiano és Breen, 2008). Ezenkívül a társállatok daganatainak vizsgálata, kezelése nem csak tudományos, de tulajdonosi igény is, melyhez elengedhetetlen a klinikai állatorvosi szakterület fejlődése.

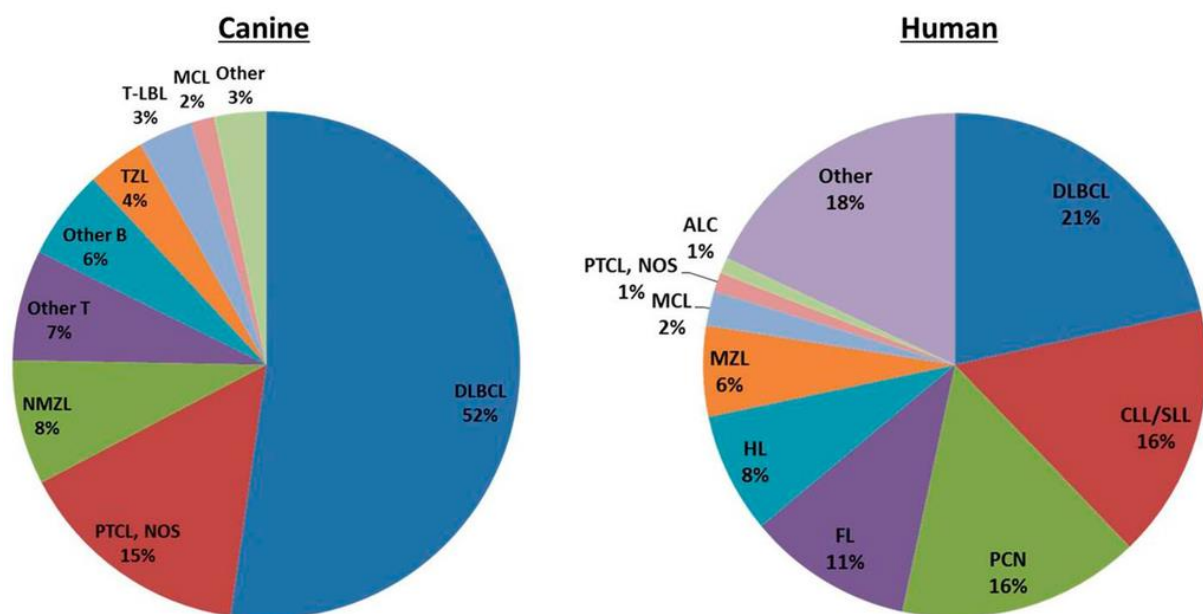
3. Irodalmi áttekintés

3.1. Kutyák lymphomás megbetegedése

3.1.1. Általános jellemzők, epigenetikai háttér

A „lymphoma” kifejezés egy heterogén betegségcsoportot jelent, mely képviselői malignus transzformáción átesett lymphocyták monoklonális proliferátumai. A humán medicinában, 2020-ban 544.000 új non-Hodgkin lymphoma (NHL) megbetegedést diagnosztizáltak, és 260.000 halálesetet dokumentáltak Világszerte (Sung és mtsai, 2021). Míg 2014-ben 71.000 NHL diagnózis történt (Siegel és mtsai, 2021), kutyák esetében ugyanebben az időszakban 250.000 lymphomás beteget jegyeztek fel (Richard és Suter, 2015). A diagnosztizált betegek száma hozzávetőlegesen 20-110 között változó 100.000 kutyára vonatkoztatva, és évről évre emelkedik ez a szám (Zandvliet és Teske, 2015).

Igen fontos megfigyelés, hogy az emberben előforduló lymphoid tumorok teljes spektruma kutyában is megtalálható (Seeling és mtsai, 2016) (1. ábra).



1. Ábra. Lymphoid tumorok előfordulási aránya kutyában és emberben

DLBCL: diffúz nagy B-sejtes lymphoma; PTCL-NOS: perifériás T-sejtes lymphoma, más típusba nem sorolható; NMZL: Nodális marginális zóna lymphoma; TZL: T-zóna lymphoma; T-LBL: T-sejtes lymphoblastos lymphoma; MCL: „Mantle-cell” lymphoma; CLL/SLL: Krónikus lymphocytás leukémia/kis lymphocytás lymphoma; PCN: plazma sejtes neoplázia; FL: follicularis lymphoma; HL: Hodgkin’s lymphoma és ALC: anaplasztikus nagy sejtes lymphoma (Seeling és mtsai, 2016)

Ezen kórképek a két fajban nemcsak morfológiai és biológiai viselkedés szempontjából hasonlóak, hanem egyes esetekben molekulárisan is egyező jegyeket hordoznak, mely

ideális lehetőséget teremt kettős célú kutatásokhoz. A kutya modellek előnyei közé tartoznak például a spontán megbetegedések, a közös környezet, az életkorhoz köthetőség, és a bizonyos fajtákra jellemző genetikai homogenitás (Ito és mtsai, 2014).

A kor tekintetében leggyakrabban átlag 6-9 éves kutyákat érint a megbetegedés, habár a T-sejtes lymphomás betegek gyakran fiatalabbak. (Ernst és mtsai, 2016). Ivar tekintetében nincs egyöntetű megállapítás, egyes tanulmányok szerint intakt nőstényekben alacsonyabb az előfordulási kockázata a megbetegedésnek (Willamil és mtsai, 2009). Ha a kutya fajtákat tekintjük, bizonyos prediszpozíciók megfigyelhetők. Egy tanulmány szerint, Európa szerte, 1529 egyedből álló populációban a legtöbb eset doberman, rottweiler, boxer és berni pásztor fajták képviselőiből került ki (Comazzi és mtsai, 2018). T-sejtes lymphoma altípusok a boxer fajtában voltak a leggyakoribbak, míg a legtöbb B-sejtes beteg rottweilerek között volt detektálható. Korábbi, Európán kívüli vizsgálatokkal ellentétben az európai golden retriever populáció nem mutatott kiemelkedő hajlamot magára a lymphomás megbetegedésre vagy bármelyik altípusára. További, precízebb és altípusokra is terjedő megállapításokhoz a jövőben olyan prospektív vizsgálatok szükségesek, mint például a hajlamosító gének azonosítása (Comazzi és mtsai, 2018).

Epigenetikai szempontból a kutyák lymphomájának kialakulása multifaktoriális, és megértéséhez számos vizsgálat szükséges még. A genetikai kutatási eszközök fejlődésével lehetőség nyílt egyes alap molekuláris faktorok megismerésére is. A kutyagenom felderítése alapot teremtett bizonyos gének deregulációjának megismerésére lymphomák esetében (Lindblad-Toh, és mtsai, 2005). Egy 61 lymphomás kutyából álló vizsgálat például azt mutatta, hogy azon betegek (a vizsgált egyedek 25%-a) prognosztikai szempontból előnyt élveznek, ahol a 13-as kromoszóma triszómiája detektálható, melyet az első recidíváig tartó idők (RFP) és a teljes túlélési idők (OST) bizonyítanak (Hahn és mtsai, 1994). A humán medicinában több olyan fertőzési faktort azonosítottak, mely a lymphomák patogenezisében szerepet játszik, azonban ezekről az állatorvoslásban még kevés információ áll rendelkezésünkre (Farinha és Gascoyene, 2005). A környezeti tényezők közül emberekben bizonyos herbicidek - különösen a 2,4-diklórfenoxi-ecetsav - esetében igazolódott, hogy lymphomát indukálnak, melyre kutyákon végzett vizsgálatok során is találtak bizonyítékot (Takashima-Uebelhoer és mtsai, 2012). Egyéb környezeti faktor, mint például a dohányfüst lymphoma-keltő hatása szintén felmerült (Pastor és mtsai, 2009). Egyes immunológiai tényezők szintén köthetők lymphomás transzformációhoz. Kutyák esetében olyan immunbetegségek, mint az immunmediált trombocytopenia, kortól és nemtől függetlenül a lymphoma kialakulásának magasabb kockázatát hordozta magában összehasonlítva a normál populációval (Keller, 1992; Fosten és mtsai, 2000). Egy másik tanulmány összefüggést mutatott az atópiás dermatitisben szenvedő kutyáknál használt immunmoduláns kezelés és az epitheliotrop T-sejtes lymphoma kialakulása között (Santoro

és mtsai, 2007). A kutyák lymphomájának genetikai hátteréről sok ismeret áll rendelkezésre, de jelentősen kevesebb, mint emberek esetében (Luethcke és mtsai, 2022; Sheet és mtsai, 2022; Sirivisoot és mtsai, 2022).

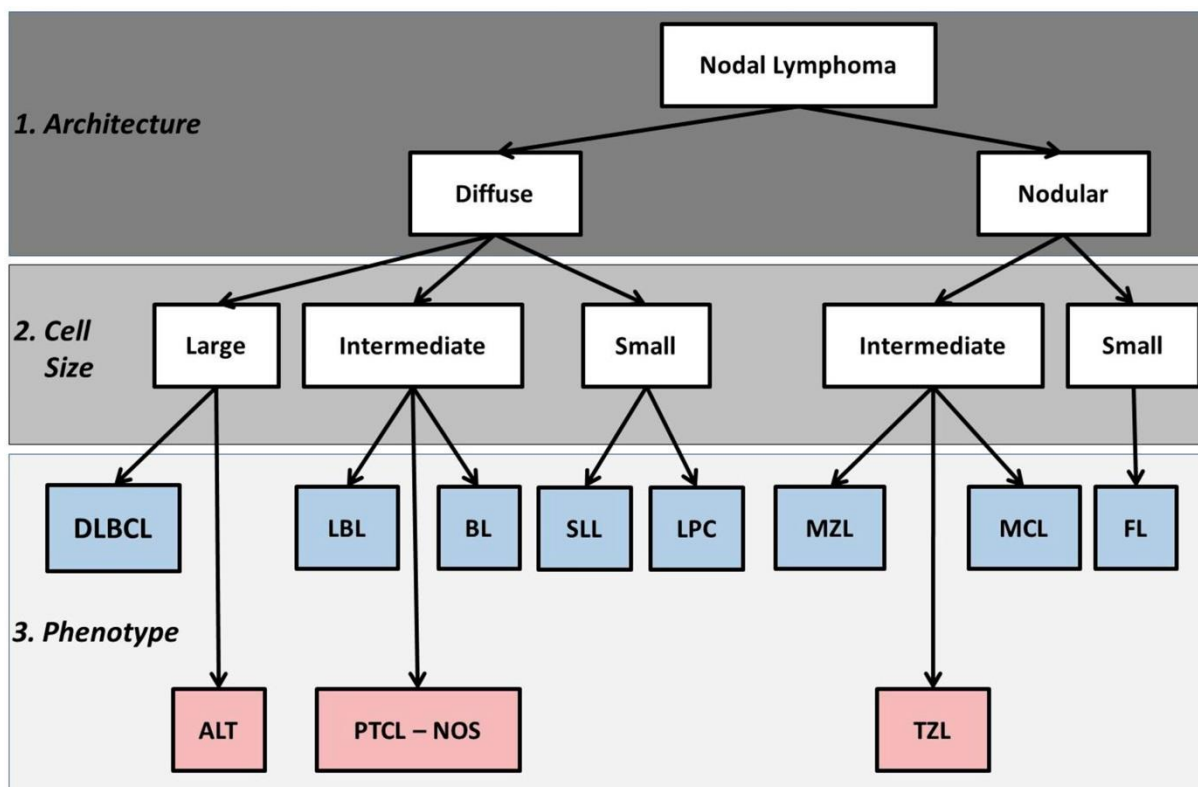
3.1.2. Lymphoma klasszifikációja

A kutyák lymphomáinak klasszifikációja a betegség által érintett anatómiai régión, szövettani megjelenésen és immunfenotípuson alapszik.

Az anatómiai helyeződés tekintetében a leggyakoribb a *multicentrikus* forma, mely a perifériás nyirokcsomók generalizált duzzanatával jár, a betegek mintegy 80%-a ettől a tünettől szenved (Madewell, 1978). A második leggyakoribb lokalizáció a gyomor-bél rendszer, ám az *alimentáris* lymphomák így is átlagosan csupán a betegek 5-7%-át jellemzik. A máj, lép és regionális nyirokcsomók gyakran másodlagosan érintetté válnak a progresszió folyamán (Ozaki és mtsai, 2006). Az alimentáris formához hasonló arányban, mintegy 5%-ban találkozhatunk a klinikumban *mediastinalis* megjelenési formával. Ezt a típust a mediastinalis nyirokcsomók és a thymus duzzanata jellemzi (Rosenberg és mtsai, 1991). A lymphoma bőrben manifesztálódó formája a *bőr- (cutan) lymphoma*, mely lehet szoliter vagy generalizált (Moore és mtsai, 2013). Atipikus lokációként említendő a *hepatosplenikus* forma, mely során nyirokcsomó megnagyobbodás nem jellemző, azonban a malignus T-sejtek infiltrálják a májat, lépét és a csontvelőt (Fry és mtsai, 2003). Az *intravasculáris* lymphoma egy igen ritka, atipikus forma, mely során a neoplasztikus lymphoid sejtek az erek falán belül proliferálnak, és nem detektálható extravasculáris szövetszaporulat vagy leukémia. Ez a forma gyakran érinti a központi idegrendszert és a szemet (Ridge és Swinney, 2004).

A nodális lymphomák kórszövettani megjelenése, immunfenotípusok

A nodális, nyirokcsomókban manifesztálódó lymphomák szövettani klasszifikálása, a lymphoma típus ismerete kiemelten fontos a prognózis meghatározásához, kezelési protokollok készítéséhez. A jelenleg kutyáknál használatban lévő és elfogadott szövettani besorolás az Egészségügyi Világszervezet, a World Health Organization (WHO) által meghatározott, mely figyelembe veszi az anatómiai, morfológiai és immunfenotípus jegyeket (**2. ábra**) (Valli és mtsai, 2011; Seeling és mtsai, 2016).



2. Ábra: Kutya nyirokcsomóban manifesztálódó lymphomák szövettani besorolása
DLBCL: diffúz nagy B-sejtes lymphoma; PTCL-NOS: másképpen nem meghatározott perifériás T-sejtes lymphoma; MZL: marginális zóna lymphoma; TZL: T-zóna lymphoma; BL: Burkitt lymphoma; LBL: lymphoblastos lymphoma; MCL: mantle-cell (köpenysejtes) lymphoma; CLL/SLL: krónikus lymphocytás leukémia/kis lymphocytás lymphoma; LPC: lymphoplazmocytás lymphoma; FL: folliculáris lymphoma; ALT: anaplasztikus nagysejtes lymphoma.

Az excíziós mintákban először is azonosítható a lymphoma diffúz vagy follicularis mivolta. Ezt követően a vörösvértestek vagy kis lymphocyták méretét alapul véve vizsgálható a daganatos sejtpopuláció mérete, ez alapján kicsi, közepes és nagy sejtes formákat különítünk el. Végül további sejt- és nucleáris jellemzők alapján állítható fel a végső konklúzió, amely magában foglalja az immunfenotípust és a mitotikus alakok számát (Seeling és mtsai, 2016). A kutyák esetében az összes lymphomát tekintve, körülbelül 60-70% B-immunfenotípus, 30-40 % T-fenotípus és 1 % alatti azon típusúak aránya, melyek nem expresszálják sem a B-, sem a T-sejt markereket, tehát null-sejtes típusúak. Ezen felül átlagosan 75% magas malignitási fokozatú, 25% alacsony malignitási fokozatú típus (Ponce és mtsai, 2010). Szövettani típust tekintve a leggyakrabban, az esetek mintegy 50%-ban diffúz nagy B-sejtes lymphoma diagnosztizálható (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL), ettől ritkábban, átlag 15%-ban perifériás T-sejtes lymphoma, másként nem meghatározott (peripheral T-cell lymphoma-not otherwise specified, PTCL-NOS) típusal találkozunk.

Gyakorisági sorrendben a következő a T-zóna lymphoma (T-zone lymphoma, TZL) 3-15%-ban, és a marginális zóna lymphoma (marginal zone lymphoma, MZL) 5-10%-os előfordulási aránnyal (Ponce és mtsai, 2010; Valli és mtsai, 2013). Bár nem feltétlenül manifesztálódik nyirokcsomóban, de gyakorisági sorrendben meg kell említeni a T-sejtes bőrlymphomát, mely egyes tanulmányok szerint 12% előfordulás gyakorisággal rendelkezhet. A többi lymphoma típus 5% alatt képviselteti magát (Ponce és mtsai, 2010; Valli és mtsai, 2013).

A nodális lymphomák immunfenotípus meghatározása

Az immunfenotípus meghatározása több módszerrel is lehetséges. Az immunhisztokémiai vizsgálat, az áramlásos citometria és a klonalitás vizsgálat (PARR) alkalmasak az adott lymphomás nyirokcsomó B- vagy T-sejtes mivoltának elkülönítésére (Vail és mtsai, 2019). A klinikai gyakorlatban leginkább az indirekt jelölést alkalmazó immunhisztokémiai vizsgálat terjedt el, melyben különböző CD (cluster of differentiation) markereket, antitesteket alkalmaznak. Az immunfenotípus meghatározás lényege, hogy a vizsgálni kívánt antigénhez specifikusan és erősen képes kötődni a használt antitest (D'Archangelo és mtsai, 2011). Hazánkban a fenotípus meghatározáshoz leggyakrabban használt ellenanyagok a T-sejtes lymphoma esetében a CD3, B-sejtes típusnál pedig a CD20 és a CD79a.

Az immunhisztokémiai vizsgálattal szemben az áramlásos citometria előnye a gyorsaság, mely bizonyos esetekben a korai diagnózis felállításához és a terápia mielőbbi megkezdéséhez nyújt segítséget. Megfelelő számú antitesttel az immunhisztokémiához hasonlóan gyakran a szubtípus is meghatározható (Godlewski és mtsai, 2017; Pasechnikov és mtsai, 2014). A citometria gyorsabb és kevésbé invazív beavatkozást igénylő mintavételi eljárás, mivel a vizsgálat elvégezhető a tűaspirációs technikával nyert tumormintából (Comazzi és Gelain, 2011). Direkt jelölt ellenanyagok közül a leggyakrabban alkalmazott a T-sejtes lymphoma karakterizálásához a CD3, CD5, CD4 vagy CD8. A B-sejtes lymphoma meghatározásra alkalmazott a CD20 és a CD79a marker (Vail és mtsai, 2019).

3.1.3. Kutyák nodális lymphomáinak megjelenése a klinikumban

3.1.3.1. Tünetek

A betegek klinikai tünetei igen változatosak lehetnek a betegség megjelenésétől függően. A *multicentrikus* forma a leggyakrabban előforduló változat, és generalizált nyirokcsomó duzzanattal jár. Ezen nyirokcsomók a periférián jól tapinthatóak, megnagyobbodásuk jellemzően nem jár fájdalommal. Az előrehaladottabb esetekben tapasztalható hepatosplenomegália, valamint a csontvelő masszív érintettsége. A betegek jellemzően jó általános állapotban vannak („a” alstádium), azonban magasabb stádiumokban (IV vagy V stádium) különböző atipikus tünetek jelentkezhetnek („b” alstádium) (1. táblázat), mint

például letargia, anorexia, hányás, hasmenés. Erős csontvelői érintettség esetén anémia, thrombocytopenia miatt szuffúziók, petechek alakulhatnak ki. Neutropenia miatt láz, szepszis jelentkezhet. A betegek egyharmadánál tapasztalható diffúz pulmonáris infiltráció is (Barber és Weishaar, 2016; Vail és mtsai, 2019).

1. Táblázat. Kutya lymphomás betegek stádium és alstádium besorolása (Valli és mtsai, 2011).

Stádium	Jellemzők
I	Egyetlen nyirokcsomó érintettsége vagy lymphoid szövet érintettsége egyetlen szervben
II	Regionális nyirokcsomó duzzanat
III	Generalizált nyirokcsomó duzzanat
IV	Nyirokcsomó duzzanatokon felül a lép és/vagy máj érintettsége
V	Nyirokcsomók duzzanata mellett a vér, csontvelő, központi idegrendszer, egyéb szervek érintettsége
Alstádium	
a	jó általános állapot
b	leromlott általános állapot, rosszullét

A gyomor-bélrendszert érintő *alimentáris* formánál jellemzően hányás, hasmenés, anorexia jelentkezik. Gyakran tapasztalható a hasúri nyirokcsomók, a lép és máj érintettsége (Sogame és mtsai, 2018; Vail és mtsai, 2019).

A *mediastinális* forma esetén mellkasi nyirokképletek elváltozása tapasztalható. A mellúri nyirokcsomó és esetleg a thymus megnagyobbodása jelentkezik, mely légzési panaszokat, dyspnoét, kifejezett fáradékonyságot okozhat a betegség előrehaladásával. Mindemellett a tumoros képletek vena cava-ra gyakorolt kompressziós hatása miatt ún. „precavalis szindróma” fordulhat elő, amely a mellső végtagok, a nyak, a fej ödémás duzzanatával jár (Vail és mtsai, 2019).

A kutya pácienseknél előfordulhat úgynevezett paraneoplasztikus szindróma a lymphomás megbetegedésükkel összefüggésben. Leggyakrabban anémia tapasztalható, melyben mind a fokozott vörösvértest szétesés, mind a csökkenő vörösvértest képződés szerepet játszik egyéb faktorok mellett. Az ilyen típusú, gyakran nem regeneratív vérszegénység negatív prognosztikai tényező, a lymphomás kutyák esetében átlag 30-43%-ban írták le. Tünetei jellemzően az étvágytalanság, bágyadság, kifejezet esélettség (Miller és mtsai, 2009). Másik gyakori paraneoplasztikus szindróma a malignus hiperkalcémia, amely a kalcium anyagcsere

fokozódása okán főként az ionizált kalcium szintjének növekedését okozza. Ezt a kórképet a tumorsejtek által termelt mediátorok (például parathyroid hormon fehérjéhez hasonló proteinek) okozzák, melyek a keringésbe kerülve endokrin és parakrin utakon keresztül fejtik ki hatásukat a csontok és a vesék kalcium anyagcseréjére. A malignus hiperkalcémia jellemzően T-sejtes lymphomás betegeknél fordul elő (átlagosan 35-55%-ban), és negatív prognosztikai tényezőként szerepel. Kutyáknál a hiperkalcémia gyakran társul poliuriával/polidipsziával, ezen kívül étvágytalanság, hányás és esetenként izomgyengeség vagy izomrángások fordulhatnak elő (Schenck és mtsai, 2012; Vail és mtsai, 2019).

3.1.3.2. Diagnosztika

Lymphoma gyanú esetén a diagnózis meghozatala fizikális vizsgálattal kezdődik. A nodális forma leggyakoribb tüneteként először a nyirokcsomók duzzanata tapintható ki jellemzően. A pontosításhoz azonban legalább citológiai mintavételre szükség van, lehetőleg nem reaktív, prescapularis vagy poplitealis nyirokcsomóból. A tapasztalt citológus a sejtek mérete, morfológiája, a mitotikus ráta alapján képes meghatározni a lymphoma típusát. Azonban a precíz diagnózis meghozatalához egyéb laboratóriumi kiegészítő vizsgálatokat szükséges végezni, úgymint immuncitokémia, szövettan és immunhisztokéma, áramlás citometria, klonalitás vizsgálat; „PCR for Antigen Receptor Rearrangements” (PARR) (Vaughn és mtsai, 2016). A megbízható kórszövettani elemzéshez teljes nyirokcsomó eltávolítása szükséges. A nem nodális lymphomák esetében az elváltozást mutató szervek lehetőleg nem percutan történő szövettani biopsziás mintavétele a célszerű (például gyomor-bél rendszer). Központi idegrendszert érintő formánál a liquor citológiai elemzése javallott. Ugyanígy mellkasi folyadékgyülem esetén a szabad mellúri tartalom citológiai elemzése diagnosztikus értékű. Cutan lymphoma esetén 4-8 mm punch biopátium vétele javasolt az akkurátus szövettani vizsgálat érdekében (Vail és mtsai, 2019). A diagnózis kiegészítő vizsgálataként szintén fontosak a vérvizsgálatok, azon belül mennyiségi és minőségi vérkép elemzés, biokémiai panel vizsgálatok. A vérkép vizsgálatok tájékoztatást adnak az anémia fennállásáról, a trombocytopeniáról, és a neutropeniáról (Vail és mtsai, 2019). A perifériás vérben megjelenő atipikus lymphoid sejtek mind a csontvelői érintettségnek (V. stádium), mind a primer lymphocytás leukémiának jelei lehetnek. A szérumbiokémiai vizsgálatok rendkívül informatívak a betegség által érintett anatómiai régiók állapotának felmérésében, paraneoplasztikus szindrómák felderítésében. Például a hypoproteinaemia alimetáris lymphomára lehet jellemző, a szérumbiokémiai kalcium szint pedig malignus hiperkalcémiáról ad információt. Ezen betegadatok rendkívül lényegesek lehetnek a kórjóslat megbecsülésében és a kezelés megválasztásában.

A diagnózis pontosítását követően a klinikai stádium meghatározása szintén fontos a prognózis és a kezelésválasztás szempontjából (1. táblázat). A stádium besorolásban

segítségünkre vannak rutin gyakorlatban képző eljárások (ultrahang, röntgen, opcionálisan CT, MRI, PET/CT vizsgálatok), melyekkel belső szervek morfológiai eltéréseit vizsgálhatjuk (Yasuda és mtsai, 2004; LeBlanc és mtsai, 2009; Watton és mtsai, 2021). A multicentrikus lymphomában szenvedő betegek megközelítőleg 65-70%-ban tapasztalható a mellkasi nyirokcsomók megnagyobbodása, a mediastinum megszélesedése vagy a tüdőparenchyma beszűrődése (Geyer és mtsai, 2010). A hasüregi nyirokcsomók megnagyobbodása, a máj-, lép érintettsége az esetek circa 50%-ban detektálható (Kinns és Mai, 2007). A még precízebb stádium meghatározás érdekében csontvelő-mintavétel is javasolható. A csontvelő vizsgálatából a perifériás vértesztek eredményein túl is jelentőségteljes prognosztikai információk nyerhetők olyan betegek esetében, amelyek anémiásak, atipikus lymphocyttal rendelkeznek, vagy egyéb cytopenia igazolható a vérkenetük alapján. Ugyanakkor, a kezelés megkezdésének, megválasztásának nem előfeltétele a csontvelői biopátumban tartogatott információk ismerete.

3.1.3.3. Terápia

A lymphomát - néhány kivételtől eltekintve - szisztémás megbetegedésnek tekintjük, mely szisztémás terápiát igényel. A nodalis lymphoma kezelés nélkül jellemzően 2 hónapon belül lezajlik, és a beteg halálához vezet. A kemoterápiás kezelésekkel igyekszünk meghosszabbítani a beteg élettartamát, de emellett fontos célunk az életminőség javítása, valamint a jó életminőség fenntartása. A terápia tervezése számos tényezőtől függ. Meghatározó az azonosított típus, a stádium, az alstádium, a paraneoplasztikus kórképek jelenléte. Figyelembe kell venni továbbá a kutya fizikális állapotát, a tulajdonos anyagi lehetőségeit, valamint, hogy hogyan tudják a kezeléseket, rosszullét esetén extra állatorvosi látogatásokat beiktatni a mindennapjaikba.

A daganatos sejtek azon tulajdonsága miatt, miszerint különböző morfológiával, osztódási rátával, funkcióval rendelkeznek, hatékonyabbak azon kemoterápiás gyógyszerkombinációk, melyek hatása egyidejűleg a sejtciklus több pontján érvényesül. Ezeket a protokollokat úgy alakították ki, hogy a kezelések hatékonysága nőjön, de ne erősítsék egymás toxikus mellékhatásait, és lehetőség szerint minimalizálható legyen a rezisztencia kialakulása (Zandvliet és Teske, 2015). Az elmúlt években több kombinációs kemoterápiás protokoll is kidolgozásra került, melyek hatékonyságát és klinikumban történő használhatóságát számos tanulmányban vizsgálták kutyákban (Vail és mtsai, 2019). A leggyakrabban használatos konvencionális kezelési protokoll az ún. CHOP alapú protokoll, mely ciklofoszfamid (C), doxorubicin (H; hydroxydaunorubicin), vinkrisztin (O; Oncovin) és Prednizolon (P) gyógyszerek kombinációjából áll. Kutyákban végzett vizsgálatok során a terápia a betegek 80-95%-ban eredményez remissziót, és a túlélési idő várhatóan medián 10-12 hónap. A kezelt betegek 20-25%-a 2 éven túli túlélési időket produkálhat (Vail és

mtsai, 2019). Az alkalmazott kezelések között legalább 7 napnak el kell telnie, de a következő kezelés időpontját befolyásolják az esetlegesen előforduló mellékhatások. A várható terápiás válasz monitorozása érdekében egy nemzetközi állatorvosi onkológiai csoport, az Állatorvosi Onkológiai Együtműködési Csoport (Veterinary Cooperative Oncology Group, VCOG) létrehozott egy alaposan kidolgozott rendszert, mellyel standard módon lehet figyelni és rendszerezni a tapasztalt mellékhatásokat a klinikai tünetek és laboreredmények alapján (LeBlanc és mtsai, 2021). A mellékhatásoktól függően szükség lehet a kezelés elhalasztására vagy a dózis csökkentésére, de kevés kivételtől eltekintve a kemoterápiás kezelést a betegek jellemzően jól tolerálják, és lymphomával kapcsolatos tüneteik megszűnnek, életminőségük feltűnően javul. Az elsődleges cél a teljes remisszió, melyet visszaesés (recidíva, relapszus) esetén jellemzően a korábbi protokoll ismételt elkezdésével próbálunk megint elérni. Terápiarezisztencia esetén olyan gyógyszereket alkalmazunk, illetve olyan mentő protokollt kezdünk, amelyben szereplő készítményeket a beteg még nem, vagy nem abban a sorrendben kapott. Így remélhető a részleges vagy teljes remisszió (Vail és mtsai, 2019). Mentő protokollként alkalmazható például az L-aszparaginázzal kiegészített CHOP terápia (L-CHOP), vagy az ún. MOPP protokoll (M, meklóretamin; O, oncovin/vinkrisztin; P, prokarbazin; P, prednizolon), melyek hatékonysága között nincs szignifikáns különbség (Angelo és mtsai, 2019). Alkalmazható továbbá lomusztin (Cecenu) monoterápiaként, vagy LOPP protokoll részeként (L, lomusztin; O, Oncovin/vinkrisztin; P, prokarbazin; P, prednizolon). A leírtakon kívül egyéb gyógyszerek (például rabakfoszadin) vagy kombinációk alkalmazása is lehetséges. A mentő kezelések tekintetében a kombinációs terápiákra az esetek 40-90%-ban van terápiás válasz, habár az ismételt recidíváig eltelt medián idő 1,5-2,5 hónap csupán (Vail és mtsai, 2019).

Biológiai terápiák tekintetében a humán gyógyászatban már döntő szerepet játszik a monoklonális antitesteket tartalmazó immunoterápia alkalmazása lymphomás pácienseknél. Azonban a korábban biztató *in vitro* vizsgálatok ellenére ezen szerek kutyáknál nem voltak használhatóak az adott specifikus antigén kötődésének képtelensége miatt (Dias és mtsai, 2021). A jelenleg ismeretes kutyákra specifikus monoklonális antistestekkel végzett prospektív vizsgálatok azonban nem adtak meggyőző eredményeket (Ito és mtsai, 2015). A leírtakon felül több tumorelles vakcinával is végeztek már vizsgálatokat, melyekhez autológ elölt vagy genetikailag manipulált lymphoid sejteket, esetleg hősokk proteinekét használtak fel (Turek és mtsai, 2007; Marconato és mtsai, 2014). Ezen vakcinákkal kezelt kutyákban azonban nem tapasztalták a várható túlélés szignifikáns növekedését a kombinációs kemoterápiával kezelt páciensekhez képest.

3.2. Kutyák mastocytomás megbetegedése

3.2.1. Általános jellemzők

A mastocytoma a lymphomához hasonlóan szintén hemopoetikus eredetű megbetegedés, mely malignus transzformáción átesett hízósejtek különféle szervekben történő akkumulációját jelenti. Ez a tumor a humán gyógyászatban kevesebb jelentőséggel bír az állatgyógyászatához képest, mivel előfordulása jóval ritkább (Willmann és mtsai, 2019). Kutyák esetében azonban a mastocytoma a leggyakoribb bőrdaganat, az összes bőrdaganat átlagosan 16-21%-át teszi ki (Bostock, 1986; Vail és mtsai, 2019). Kor tekintetében jellemzően idősebb, átlagosan 8-9 éves kutyákban fordul elő, azonban egyre gyakrabban jelenik meg fiatal egyedekben is. Bizonyos fajták predispozíciót mutatnak a betegségre, így boxer, boston terrier, angol és francia bulldog, mopsz, labrador és golden retrieverek, cocker spániel, schnauzer, staffordshire terrier, beagle, vizslák, shar pei fajtákban gyakrabban találkozhatunk vele (Smiech és mtsai, 2018). Ezen fajták megnövekedett kockázati faktora lehetséges genetikai háttérre utal, melyre jelenleg is széleskörű kutatások folynak (Vail és mtsai, 2019).

A mastocytomák kialakulásának etiológiai háttere nem teljesen ismert. Megjelenésükben nagy valószínűséggel szerepet játszanak krónikus gyulladási folyamatok vagy tartós bőrirritáció. Emberben ismertek bizonyos törékeny kromoszómális lokációk, melyek egyes tumorok kialakulásának kockázatát emelik. Ezek közül néhány jelenléte boxer kutyákban is igazolt, habár ezen vizsgálat kontroll populációja fiatal, tumormentes boxerekből állt. Ennek következtében felmerül a lehetőség, hogy a törékeny kromoszómális régiók megnövekedett expressziója csak a fiatal kor miatt volt tapasztalható (Tams és Macy, 1981). Bizonyos mastocytomák esetében kimutatták a p53 tumor szupresszor gén változásait, azonosították p21 és p27 fehérjék expresszióját, melyek a sejtciklus szabályozásában játszanak szerepet (Simpson és mtsai, 2004; White és mtsai, 2011). Más tanulmány szerint a VEGF és VEGFR2 megnövekedett kifejeződése volt igazolható számos kutya tumorában, valamint a VEGFR2 aktiváció összefüggésbe volt hozható kedvezőtlenebb kimenetellel a műtéti eltávolítást követően (Scarpa és mtsai, 2012; Sledge és mtsai, 2016). A c-kit egyes mutációi és egyéb genetikai eltérések, mint pl. a GNB1 mutációk a jobb indulatú daganatokra jellemzők (Yoda és mtsai, 2014), és mások, mint pl. PTEN, MAPK3 és a c-kit egyéb mutációi a rosszabb kórjóslatú folyamatokra jellemzők (Jark és mtsai, 2017). Összességében kijelenthető, hogy genetikai változások, melyek előremutató faktorai lehetnek a kutyák hízósejtes tumorainak kórlefolyásában, még nem teljesen ismertek (de Nardi és mtsai, 2022).

3.2.2. Klasszifikáció

A mastocytomák esetében is kifejezetten fontos a diagnosztika, a kezelés és a prognózis tekintetében az adott tumor anatómiai és morfológiai jellemzőinek ismerete.

Lokáció szempontjából az érintett szervtől, szervrendszertől függően megkülönböztetünk bőr (cutan/subcutan) formát, nyálkahártya (mucosalis) formát, extracutan/extramucosalis (visceralis) formát és hízósejtes leukémiát (Willmann és mtsai, 2021). A bőrben manifesztálódó mastocytoma előrehaladottabb formái érinthetnek szisztémásan más szervrendszert is, és a metasztázisok elkülönítése a primeren extracutan típusoktól nem mindig egyszerű (Willmann és mtsai, 2021). A bőr forma tovább osztható cutan (*epidermis*-ben, vagy *dermis*-ben, ill. hámban, vagy irhában lokalizálódó) és subcutan (*subcutis*-ban, vagy *hypodermis*-ben ill. bőraljában lokalizálódó) mastocytomákra, melyek elkülönítése szövettani vizsgálattal lehetséges, és nagyon fontos a további kórjóslat szempontjából.

A diagnózis citológiai vizsgálattal jellemzően megerősíthető, de a prognózis pontosabban meghatározható a kórszövettani elemzéssel.

Bőr mastocytomák kórszövettani megjelenése

A mastocytomákra jellemző a diffúz proliferáció lokációtól függetlenül. A bőrt tekintve gyakoribb a cutan forma, mely a dermist és subcutist együtt érintheti. Ennél valamivel ritkábban találkozunk mélyebb, főleg a bőr alatti zsírszövetben helyeződő tumorról, melyet subcutan mastocytomának nevezünk. Ez utóbbi lokációban a klinikai prognózis kedvezőbb, a tumor megközelítőleg 90%-ban klinikailag benignus, sebészi kimetszéssel a cutan formához képest jobban kontrollálható a megbetegedés (Thompson és mtsai, 2011). Kórszövettanilag a két forma elkülönítése csupán a bőrben való helyeződésen alapszik.

A mastocytomákon belül a tumorsejtek elhelyezkedése, környezete igen változatos lehet. A sejtek morfológiája, mérete, cytoplasmájuk granuláltsága utalhat már a rosszindulatúság fokára. Kérdéses esetekben kifejezetten fontos a mastocytomák elkülönítése más, bőrben manifesztálódó kereksejtes daganatoktól. A sejtek változatos megjelenése – különösen a kevésbé differenciált tumorok esetében - szükségessé tehet speciális festési eljárásokat a hematoxin-eozin jelölésen túl. Giemsa vagy toluidin kék festéssel a hízósejtekben található granulomok sokkal feltűnőbbé tehetőek, mely már kisebb nagyításon lehetővé teszi az elkülönítést. A hízósejtek granulumai Giemsa festéssel metakromáziásan vagy bíborlila színben válnak láthatóvá, Toluidin kék esetén sötétkék színnel jelennek meg. A kevésbé differenciált tumorsejtek kevesebb granulomot tartalmaznak, vagy egy részük cytoplasmájából akár teljesen hiányozhatnak is ezen granulomok (Simoes és Schoning, 1994; de Nardi és mtsai, 2022). A tumorsejtek között gyakorlatilag minden esetben láthatóak eosinophil granulocyták kisebb-nagyobb mennyiségben. A daganatsejtek változó mértékben infiltrálhatják környezetüket, és előfordulhat kollagenolízis, szklerózis, ödéma, nekrozis,

másodlagos lymphocytás infiltráció (Meuten, 2016). Habár a mastocytomák nem rendelkeznek kötőszövetes tokkal, az alacsony malignitási fokozatú formák szélei jól meghatározhatóak. A tumor környezetében fentebb leírt, reaktív eltérések azonban nehezítik a sebszélek pontos meghatározását. Ezen reaktív környezetben, amely nagyobb tumorok esetén akár centiméterekre is lehet a daganattól, nemritkán reaktív hízósejt csoportok is megfigyelhetők, melyek elkülönítésére a tumorsejtektől jelenleg nincs speciális vizsgálati lehetőségünk (Meyer és mtsai, 2012).

A mastocytomák malignitási (grade) besorolása, a stádium, az anatómiai lokáció meghatározó nemcsak a beteg túlélési lehetőségeit tekintve, de a választandó kezelés tekintetében is. A kezelés megtervezése felé vezető úton az első lépés a sebszélek állapota, és a szövettani malignitási fokozat meghatározása. Patnaik hármas felosztású rendszere (grade I, II, III) 1974 óta használatban volt, és a patológiai eredmények korreláltak a klinikai kimenetellel (Patnaik és mtsai, 1984). Kiupel kettes felosztású rendszere (low grade/high grade) 2011 óta használatos, és a felmérések szerint segítségével pontosabban előre jelezhető a teljes túlélési idő és mastocytomával összefüggő mortalitás valószínűsége (Kiupel és mtsai, 2011). Kiupel rendszere azonban nem eléggé precíz a Patnaik szerinti „grade II” tumorok esetében (Sabattini és mtsai, 2015), ezért prognózis meghatározás szempontjából célravezetőbb a két rendszer együttes használata. A meghatározáshoz mindkét rendszer figyelembe veszi a sejtmorfológiát, a sejtmag morfológiát, a sejtmagvak méretét és a mitotikus alakok számát.

Az eddig leírtakon felül ismeretesek további, prognosztikai szempontból informatív kórszövettani jelölések. A proliferációs markerek lehetővé teszik a sejtek kórszövettanilag nem jól detektálható osztódási fázisaiban is az osztódás megállapítását. A Ki67 egy magban expresszálódó immunhisztokémiai marker, mely az aktív sejtciklus minden fázisában jelölődik. Az ún. AgNOR (argyrophilic nucleolar organizing regions) egy ezüst bázisú speciális festési eljárás, mely során az aktív transzkripció alatt emelkedett mennyiségű argirofil protein kimutatható. A proliferációs markerek emelkedett százalékos értéke arányos a várható prognózissal (Webster és mtsai, 2007; Smith és mtsai, 2015). Az eddig tárgyaltakon felül, a tirozin kináz (KIT) receptorok mutációi összefüggésben lehetnek agresszívabb viselkedésű, rosszabb progózisú megbetegedéssel. Az elmúlt évek tanulmányai rávilágítottak, hogy a mastocytomák esetében a KIT mutációk vizsgálata jelentős prognosztikai tényező lehet. Kórszövettanilag a KIT protein mutatható ki, és festődésének mintázata kórjóslati jelentőségű; az 1-es mintázat a membránhoz kötődő festődést jelent, amely a mastocytomák jellegzetes immunfenotípus markere, míg a 2 és 3-as mintázat (fokális és diffúz megjelenés) esetén rosszabb a várható prognózis (Kiupel és mtsai, 2004; Thompson és mtsai, 2016). A membránról a cytoplasma felé történő expresziót az ún.

„aberráns” festődésnek nevezik. Figyelembe véve egyéb receptor-aktiválódási lehetőséget, az újabb tanulmányok már a foszforilált KIT (pKIT) expressziót vizsgálják, mint prognosztikai tényezőt (Thamm és mtsai, 2019).

3.2.3. Kutyák mastocytomáinak klinikai megjelenése,

3.2.3.1. Tünetek

A szövetszaporulat leggyakrabban a dermisben és/vagy a subcutisban helyeződik. Megjelenésében jellemzően szoliter, habár statisztikai vizsgálatok alapján a betegek 11-14%-a multiplex elváltozással rendelkezik, melyek magasabb klinikai stádiumba tartoznak (Mullins és mtsai, 2006). A stádium meghatározást Blackwood és munkatársai közlése alapján a **2. a. táblázat** mutatja (Blackwood és mtsai, 2012). Idővel azonban, a klinikai tapasztalatok alapján megjelent egy más típusú stádium besorolási rend, amely a nyirokcsomók érintettségét súlyosabb beszámítása alá veszi (**2. b. táblázat**) (Horta és mtsai, 2018).

2. a. Táblázat. Kutya mastocytoma betegek klinikai stádium és alstádium besorolása

(Blackwood és mtsai 2012.)

Stádium	Jellemzők
I	Egyetlen, dermisre korlátozódó tumor, regionális nyirokcsomó érintettsége nélkül
II	Egyetlen, dermisre korlátozódó tumor, regionális nyirokcsomó érintett
III	Multiplex daganatok vagy nagy kiterjedésű, infiltratív tumor a regionális nyirokcsomók érintettségével vagy anélkül
IV	Bármilyen megjelenésű primer elváltozás távoli áttét jelenlétével (beleértve a csontvelő és perifériás vér érintettségét)
Alstádium	
a	jó általános állapot
b	leromlott általános állapot, klinikai tünetek

Megközelítőleg a cutan tumorok 50%-a helyeződik a törzsön és perinealis régiókban, 40%-a a lábakon, 10%-a a fejen és nyakon. Több tanulmány is rávilágított arra, hogy az anatómiai elhelyezkedésnek a cutan formákon belül is prognosztikai jelentősége van. A perineális és inguinális régióban, fejen, nyakon, hereborékon, lábujjakon és axilláris területen előforduló mastocytomák rosszabb kórjósallattal járnak (Vail és mtsai, 2019; Willmann és mtsai, 2021).

2. b. Táblázat. Kutya mastocytoma betegek klinikai stádium és alstádium besorolása (Horta és mtsai, 2018)

Stádium	Jellemzők
I	Egy daganat, regionális nyirokcsomó áttét nincs.
II	Multiplex tumor (≥ 3 cm), és regioánlis nyirokcsomó áttét nincs.
III	Egy, a dermisben lokalizálódó daganat regionális nyirokcsomó áttéttel
IV	Több bőrbeli daganat, vagy nagy infiltráló daganat(ok) (≥ 3 cm) regionális nyirokcsomóáttéttel,
V	Bármely daganat távoli metasztázissal, vér és/vagy csontvelő érintettséggel
Alstádium	
a	jó általános állapot
b	leromlott általános állapot, klinikai tünetek

A daganatok igen változatosak lehetnek. Szisztémás panaszok nélkül, alacsonyabb klinikai stádiumban sokszor összekeverhetőek nem neoplastikus elváltozásokkal vagy akár más bőrtumorokkal. A „low grade” malignitású daganatok jellemzően jól körülhatárolt, nem fekélyes duzzanatok, melyek hónapokig nyugvó állapotban vannak. Ezzel szemben a dedifferenciált tumorok gyorsan növekedőek, felszínük gyakrabban fekélyes, környezetük lehet ödémás, és előfordulhat, hogy a bőr kipirult. A subcutan helyeződő típus pedig sok esetben puha, nehezen elmozdítható környezetében, egyéb jegyei pedig nagyon változatosak lehetnek. A hízósejtek granulumaiban hisztamin, heparin és egyéb vasoaktív anyagok termelődhetnek. Ennek megfelelően fizikai behatásra vagy akár a klinikai vizsgálat során a daganatsejtek degranulálódhatnak, amelynek következtében helyi ödéma, erythema keletkezhet a környező szövetekben. A jelenséget „Darier’s sign” néven jelölik a „Bőrgyógyászok atyjáról” a francia Ferdinand-Jean Darier-ről (1856 – 1938) elnevezve. A tünetet a tulajdonosok gyakran úgy írják körül, hogy a tumor a méretét időnként változtatja, hol kisebb, hol nagyobb. A granulumból történő hisztamin-felszabadulás az páciensek egy részében gyomorfekély kialakulását, következményes hányást okozhat. Bizonyos elhatalmasodott esetekben, - például kifejezetten nagyméretű, áttétes tumoroknál, vagy szisztémás mastocytosisnál - olyan nagymértékű lehet a hízósejt mediátorok felszabadulása,

hogy hirtelen rosszulleset, hányást, hasmenést, lázat, ritkán elhullást is okozhat (de Nardi és mtsai, 2022).

A 2009-es IV. stádiumban lévő betegek klinikai tüneteinek progressziója megtévesztő lehet, hasonlíthat az extracutan formához. Mindkettőre jellemző, hogy a megbetegedés disszeminált, a hasúri nyirokcsomókba történő infiltráció, a lép, máj, ritkábban a csontvelő érintettsége tapasztalható (Willmann és mtsai, 2021). A távoli metasztatikus esetek a primer mucosalis megbetegedéshez mutathatnak hasonlóságot, mely példának okáért a gastrointestinalis rendszer érintettsége esetén hányással, hasmenéssel, melénás bélsár megjelenésével jár (de Nardi és mtsai, 2022).

3.2.3.2. Diagnosztika

A klinikai stádium meghatározásához a teljes fizikális vizsgálaton túl szükség van részletes vérvizsgálatra, mely kiterjed mennyiségi és minőségi vérkép vizsgálatra, és a szervfunkciók elemzésére alkalmas biokémiai paraméterekre. Szükséges lehet továbbá vékonytű-aspirációs mintavétel citológiai vizsgálathoz a primer daganatból és regionális áttét gyanúja esetén az érintettnek vélt nyirokcsomó(k)ból. A mastocytomák jól definiálhatóak citológiai kenet alapján, de a malignitási fokozat meghatározásában pontosabb a kórszövettani vizsgálat, a cutan vagy subcutan forma elkülönítése pedig nem lehetséges nélküle. Ez annak ellenére igaz, hogy a malignitási fokozat citológiai vizsgálatokhoz adaptált formáját is megalkották (Camus és mtsai, 2016).

A diagnózis eszköze továbbá az ultrahangvizsgálat, főként a máj és a lép vizsgálata miatt, továbbá a mellkasi röntgenvizsgálat (Kiupel és mtsai, 2011; Willmann és mtsai, 2021). Az ultrahang- és röntgenvizsgálat kiváltható más képalkotóval, például CT-vizsgálattal. A mastocytoma progressziója során a tumorsejtek a bőrből az őrszem (szentinel) nyirokcsomókba adnak áttétet, melyek nem mindig egyeznek meg a regionális nyirokcsomókkal (II. és III. stádium), majd innen kerülnek tovább távolabbi szervekbe (lép, máj, egyéb viscerális szervek), esetleg csontvelőbe (IV. stádium). A vérképben jelentkező abnormalitások vagy viscerális szervi érintettség esetén javasolt csontvelő mintavétel is (Willmann és mtsai, 2021).

Diagnosztikai szempontból több prognosztikai mutató kifejezett jelentőségű, amelyek vizsgálata napjainkban is széles körben zajlik. Egyes tényezők - már a korábbi ismeretek alapján is - negatívan befolyásolják a túlélést, úgymint multiplicitás, regionalis vagy távoli áttétek jelenléte. Ezek hiányában is azonban rosszabb túlélés mutatkozott azon betegek esetében, amelyek tumora magasabb malignitási fokozatot mutatott, magasabb volt a mitotikus ráta, a Ki-67 expresszió, 3-as típusú KIT mintázattal bírtak, és exon 11-en volt igazolható *KIT* mutáció (Horta és mtsai, 2018). Moore és munkatársai (2020) ugyanakkor azt találták, hogy a szoliter és kisméretű daganatok még Kiupel szerinti (2011) magas

malignitási fok esetén is kedvező prognózisúak lehetnek (Moore és mtsai, 2020). Ez alapján pedig a klinikai stádium, a mitotikus alakok számában való egyértelműbb különbségtétel, egyéb klinikai tünetek figyelembevétele (úgy, mint pruritus, szisztémás panaszok) szintén kiemelkedően fontosak lehetnek a kórjóslat meghatározásában. A bőr mastocytomák klinikai viselkedését előrejelző paramétereket együttesen kell értékelnünk, és még mindig nem határozható meg külön-külön ezek jelentősége (deNardi és mtsai, 2022).

3.2.3.3. Terápia

A terápia megválasztását befolyásolja a klinikai stádium és negatív prognosztikai faktorok megléte (anatómiai helyeződés, szisztémás klinikai tünetek, sebszélék állapota, kórszövettani malignitási fokozat). A cutan mastocytomák esetében az I. stádiumban az elsődlegesen választandó terápiás lehetőség a műtéti eltávolítás. A helyesen kivitelezett műtéti kimetszés történelmileg 3 cm ép szélel, egy izompólya (*fascia*) mélyen javasolt, ám több vizsgálat szerint a 4 cm átmérőnél kisebb „grade I és II /low grade” primer tumorok esetében már 1-2 cm ép szélel történő eltávolítás is elég volt a teljes gyógyuláshoz (Simpson és mtsai, 2004; Fulcher és mtsai, 2006). A terápia megtervezéséhez, prognózis megismeréséhez kimondottan szükséges a sebszélék érintettségének kórszövettani meghatározása. Az alacsony malignitású (low grade) és kisméretű tumorok szélei jobban definiálhatóak, peritumorális reaktív zónájuk keskenyebb. A daganat körüli ödéma, szklerózis vagy sejtes reakció által érintett strómába infiltrálhatnak a tumorsejtek, melyek azonosítása gyakran nehéz (Meuten, 2016). Rekurrenciának tekintjük a műtétet követően megjelenő olyan szövetszaporulatot, amely az előző műtét régiójában növekedik. A testen másutt megjelenő mastocytoma jellemzően nem metasztázis, hanem új daganat, más lokációban.

Az esetleges inkomplett kimetszést követően olyan adjuváns kezelési módok javasolhatóak, mint sugárterápia vagy kemoterápia. A sugárterápiával kifejezetten jól kezelhetők az ilyen esetek, a várható túlélés metasztázissal nem rendelkező betegek esetében (grade I vagy II szövettani besorolással) 85-95%-ban eléri a 2 évet. (Poirier, 2006)

Kemoterápiás kezelés javasolt abban az esetben is, ha a tumor kiterjedése vagy helyeződése, ismert metasztázisok miatt műtéti eltávolítás nem célravezető (II-IV. stádium), illetőleg a szövettanilag magasabb malignitású (high grade) tumorok esetében adjuváns kezelésként alkalmazható. Mind inoperábilis tumornál, mind utókezelésként használhatóak jelátviteli utakat gátló, ún. tirozin-kináz inhibitorok (TKI) is. Ezen szerek a KIT-receptort kódoló *c-kit* gén mutációja esetén a fehérje ATP-kötő helyeinek kompetitív antagonistái, így képesek gátolni a receptorok aktivitását. A hízósejtes tumorokon alkalmazható TKI szerek (masitinib, toceranib) hatékonysága főként a juxtamembranosus domén (exon 11), kisebb részben az extracelluláris domén (exon 8-9) mutációja esetén bizonyítottan bizonyult. Ezen duplikációk (internal tandem duplication; ITD) és pontmutációk kimutatása PCR tesztel

lehetséges (Ohmori és mtsai, 2008; Thompson és mtsai, 2016). Bár a kezdeti eredmények pozitív korrelációt jeleztek a mutáció jelenléte között a KIT-ben és a TKI-kezelésre adott válaszreakcióban (Weishaar és mtsai, 2017), a legújabb tanulmányok azt mutatják, hogy a kezelésre adott válasz nem függ össze a mutációs állapottal (de Nardi és mtsai, 2022). Ezen felül számtalan tanulmány vizsgálta különböző citotoxikus terápiák hatékonyságát (Vail és mtsai, 2019). Az általunk is gyakran alkalmazott vinblasztin és a prednizolon kombinációjával jelentősen megnövekedhet a teljes túlélési idő. Egy tanulmány alapján a median túlélési idő „high grade” mastocytómában szenvedő betegeknél 1374 nap volt a vinblastin/prednizolon kombinációs terápiával (Thamm és mtsai, 2006), egy másik vizsgálat szerint a betegek 70%-a 1-2 éves túléléseket produkált (Hayes és mtsai, 2007). Egyéb kombinációk, mint például vinblasztin, lomusztin és prednizolon tartalmú protokollok szintén kedvező eredményt produkálhatnak. Erre vonatkozó tanulmány szerint a metasztázisra magas kockázatot mutató betegek medián 48 hetes túlélési idővel rendelkeztek (Cooper és mtsai, 2009).

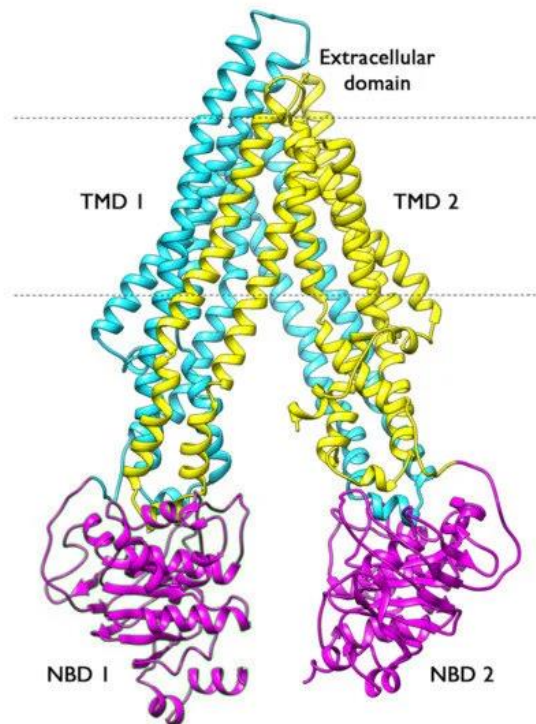
Inkomplett kimetszett tumorok esetén alternatív lokális kezelési lehetőséget adhat esetleg még a fotodinamikus terápia (Tanabe és mtsai, 2004) vagy elektrokemoterápia (Lowe és mtsai, 2017).

Inoperábilis esetekben lehetőség van bizonyos intratumorális terápiára (tigilanol tiglát, Sednai vírus injekció) (Ilyinskaya és mtsai, 2018; Reddel és mtsai, 2021), vagy a már ismertetett szisztémás TKI és kemoterápiás kezelések alkalmazhatóak, illetőleg ezeken felül paclitaxel citotoxikus készítménnyel is végeztek klinikai vizsgálatokat kutyákban is (Rivera és mtsai, 2013).

3.3. Terápiarezisztencia

A dolgozatban tárgyalt mindkét hemopoetikus tumor kemoterápiás kezelése kapcsán nagy szerepe van a terápiarezisztencia problémakörének. Lymphomák esetében szinte minden esetben az elsődleges terápiás választás a kemoterápia. Habár mastocytómák esetében a konzervatív gyógyszeres terápia nem az elsődlegesen választandó kezelési mód, bizonyos „grade II”, valamint gyakorlatilag minden „grade III” tumor esetében a hosszabb recidíva mentes túlélési idő, valamint teljes túlélési idő érdekében adjuváns módon szükség van citotoxikus terápiára. A multidrog rezisztencia (MDR) kialakulása az egyik leggyakoribb oka annak, hogy a kezdetben sikeres terápia hatástalanná válik, de nemcsak az adott kemoterápiás szerre, hanem számos szerkezetében és hatásmechanizmusában eltérő vegyületre is. A jelenség gyakorlati szempontból azt jelenti, hogy a beteg tumorát már a kemoterápiás szer változtatásával sem tudjuk megfelelően kezelni, a daganat progressziója nem, vagy csak alig lassítható (Vail és mtsai, 2019). Az MDR kialakulásának számos farmakokinetikai és farmakodinamikai oka van, és egyik leggyakoribb közöttük a

gyógyszer kijuttatásának fokozott képessége a tumorsejtből, mely képességért transzport fehérjék felelősek. Ilyenek például az ABC-membrántranszporterek (ATP-binding cassette transporters), melyek adenosin-trifoszfát (ATP) segítségével képesek különböző molekulákat átjuttatni a sejtmembránon (Lee és Rosenbaum, 2017). Ezen fehérjék leggyakrabban a külső sejthártyán helyeződnek, de megtalálhatóak a különböző sejtorganellek membránján is (endoplazmatikus retikulum, mitokondrium), és ezáltal lehetővé válik a citotoxikus szereknek nem csak a sejtből való eltávolítása, hanem a sejten belüli szekvesztrálása is (Arancia és mtsai, 1998). A 48 felfedezett ABC-transzporter közül négy felelős leginkább a gyógyszer rezisztencia kialakulásáért. A P-glikoprotein (Permeability glycoprotein/P-gp/MDR1/ABCB1), a multidrog rezisztencia asszociált fehérje 1 (MRP1/ABCC1) és 2 (MRP2/ABCC2), valamint az emlődaganat rezisztencia fehérje (Breast cancer resistance protein, BCRP/ABCG2) (Zandvliet, 2014). Ezen fehérjék két transzmembrán fehérjét tartalmazó doménből, valamint a cytoplasmában helyeződő ATP-kötő helyekből állnak. Ez utóbbi kötőhelyeken ATP hidrolizálásával biztosítják az energiát a membránon való áthaladáshoz (**3. ábra**) (Mora Lagares és mtsai, 2022). Ezeknek a fehérjéknek a vizsgálata számos módon lehetséges, mint pl. az adott protein expressziójának meghatározásával (immunhisztokémia, Western blot, áramlási citometria), valamint a funkció aktivitásának meghatározásával (jelölőanyagok kiáramlásának vizsgálatai). A gyógyszerek növekedő transzportjának megítéléséhez pontosabb vizsgálati lehetőséget biztosítanak a funkcionális tesztek. Humán onkológiai kutatások már régebb óta szolgálnak eredménnyel mind *in vitro*, mind *in vivo* vizsgálatok alapján (Kourti és mtsai, 2007; Amiri-Kordestani és mtsai, 2012). Az állatorvosi onkológiában még igencsak limitált azon eredmények halmaza, amelyek a sejtvonalakon végzett teszteken túl, leírják ezeknek a fehérjéknek az expressziója és funkcionalitása közötti kapcsolatát (Zandvliet és mtsai, 2014; Zandvliet és Teske, 2015; Vajdovich és mtsai, 2018).



3. Ábra. P-glikoprotein fehérje kristályszerkezete. TMD (transmembrane domains): transzmembrán domének. NBD (nucleotide binding domains): nukleotid kötő domének. Utóbbiak felelősek az ATP megkötésért a cytoplasmában (Mora Lagares és mtsai, 2022)

3.3.1. A P-glikoprotein jelentősége kutyák lymphomáiban és mastocytomáiban

A *multidrog rezisztencia fehérje-1 (MDR1)* génen expresszáldó P-gp az első azonosított ABC-transporterfehérje (Juliano és Ling, 1976). Fiziológiásan is jelen van számos szervben, és fontos szerepe van bizonyos molekulák sejtből történő exportjában (Zandvliet és Teske, 2015). Külső hatásra (pl. hipoxia, gyulladás, karcinogének, cytotoxikus vegyületek) fokozódhat a P-gp expressziója, aktivitása. A tumorsejtek felszínén helyeződő P-gp képes kijuttatni a számára szubsztrátként felismert cytotoxikus szerek széles palettáját, ezáltal hosszabb távon a kezelés sikertelenségét eredményezve. Tumorellenes terápiában használatos gyógyszerek közül P-gp szubsztrát molekula többek között a vinblasztin, vinkrisztin, doxorubicin, egyes glikokortikoidok (pl. prednizolon, metilprednizolon, dexametazon), valamint egyes TKI szerek, mint az imatinib és a gefitinib (Zandvliet és Teske, 2015). Sejtvonalakon felül számos daganatos kutya klinikai mintájában azonosítottak már emelkedett P-gp expressziót immunhisztokémiai és PCR vizsgálatok segítségével (Zandvliet és Teske, 2015), így lymphomákban (Ginn, 1996; Bergman, 2000; Schleis és mtsai, 2008) és cutan mastocytomákban is (Miyoshi és mtsai, 2002; Teng és mtsai, 2012).

Lymphoma tekintetében egyes, B immunfenotípusú lymphoid sejtvonalakon végzett *in vitro* vizsgálatok rávilágítottak, hogy a sejtek teljes túlélési ideje kapcsolatban áll a P-gp mRNS expresszióval (RT-qPCR), a P-gp fehérje expressziójával (immuncitokémia) és a protein funkciójával (efflux vizsgálatok) (Zandvliet és mtsai, 2014; Karai és mtsai, 2020). A klinikai betegek mintáiból készült immunhisztokémiai vizsgálatok tanulsága szerint a gyógyszeres kezelés előtt vett mintákban a P-gp kifejeződése alacsonyabb (3-33%) a recidívált esetekhez képest (Bergman, 2000; Lee és mtsai, 1996; Moore és mtsai, 1995; Zandvliet és Teske, 2015). Egyes *in vivo* vizsgálatok alapján a P-gp expresszió prognosztikai jelentősége lehet a recidíva mentes és teljes túlélést tekintve (Nakaichi és mtsai, 2007; Vajdovich és mtsai, 2018; Hyokai és mtsai, 2021), mely megállapítást későbbiekben nem minden vizsgálat tudott hasonlóan igazolni (Zandvliet és Teske, 2015).

Mastocytomák esetében cutan és extracutan mastocytoma sejtvonalakon végzett vizsgálatok alapján megállapították, hogy a *MDR1* gén kifejeződése, valamint a P-gp expressziója (Western-blot) és aktivitása (áramlási citométer) kapcsolatban áll a kemoterápia rezisztenciával (Nakaichi és mtsai, 2007). A klinikai betegek cutan tumorának P-gp expresszióját immunhisztokémiai vizsgálattal Miyoshi és munkatársai tanulmányozták különböző malignitási fokozatú formák esetén (Miyoshi és mtsai, 2002).

4. Célkitűzések

A dolgozatban tárgyalt két hemopoetikus tumor, a lymphoma és mastocytoma a kutyák leggyakrabban előforduló daganattípusai közé tartoznak, klinikai relevanciájuk nagy (Zandvliet és Teske, 2015). A recidíva mentes túlélési időt (relapse free preiod, RFP) és teljes túlélési időt (overall survival time, OST) egyik legnagyobb mértékben a gyógyszeres terápia sikeressége határozza meg. A kemoterápia sikertelenségéért leginkább a kezelések során kialakuló MDR felelős, melyben nagy szerepe van a pumpafehérjéknek (Zandvliet és Teske, 2015; Vail és mtsai, 2019). A P-gp az elsőként felfedezett és legtöbbet vizsgált transzporter, mely klinikai jelentőségére ezekben a tumorokban számos tanulmány rávilágít *in vivo* vizsgálatokkal is (Ginn, 1996; Bergman és mtsai, 1996; Lee és mtsai, 1996; Miyoshi és mtsai, 2002; Nakaichi és mtsai, 2007; Vajdovich és mtsai, 2018; Hyokai és mtsai, 2021).

Munkánk célja az volt, hogy a definitív kemoterápiás kezelés előtt álló klinikai betegekből gyűjtött minták P-gp expresszióját meghatározzuk, valamint a transzporter aktivitását vizsgáljuk. Az immunhisztokémiai vizsgálattal a fehérje kifejeződésének mértéke állapítható meg, amely nem feltétlen tükrözi az adott fehérjék aktivitását. A kifejeződő proteinek funkcionalitását áramlási citométerrel vizsgáltuk. Meg akartuk határozni konkrétan, hogy az alkalmazott módszerekkel igazolható e a P-gp fokozott kifejeződése, aktívabb működése. Tanulmányunk során a két módszer eredményeit hasonlítottuk össze. Ezen felül nagy hangsúlyt fektettünk a mérési eredmények és túlélési idők közötti kapcsolat vizsgálatára is, mely segítségével információt kaphatunk arról, hogy a P-gp expresszió és aktivitás rendelkezik-e prognosztikai jelentőséggel kemoterápiával kezelt, lymphomában és mastocytomában szenvedő kutyák esetén. Azt szerettük volna megtudni, hogy a fokozott P-gp expresszió és aktivitás rövidíti e a recidíváig, vagy az elhullásig eltelt várható időt.

5. Anyag és módszer

A vizsgált minták az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ klinikai betegeiből származtak, melyek legtöbb kezelése és nyomonkövetése is ebben az Intézetben zajlott 2014-2021 közötti időszakban.

5.1. A vizsgálatban szereplő lymphomás betegek

A betegek diagnózisát a fizikális vizsgálaton túl vérvizsgálatokkal (teljes vérkép, biokémiai profil, sav-bázis és elektrolit vizsgálat), képalkotó vizsgálatokkal (ultrahang és legalább két irányú mellkas röntgen) és mintavételekkel (citológiai vagy szövettani) erősítettük meg. A klinikai vizsgálatok az állatok tulajdonosaival egyeztetve, kérésükre és beleegyezésükkel történt. A páciensek stádium és alstádium státuszát a WHO ajánlásai alapján határoztuk meg (Valli és mtsai, 2011).

A vizsgálatban összesen 95 lymphomában szenvedő kutya vett részt. A kezeléseket megelőzően összesen 163 betegből történt nyirokcsomó mintavétel, melyek közül a további vizsgálatokból kizárásra kerültek azok a betegek, melyek lymphomája nem multicentrikus volt, nem multimodális intravénás protokollt kaptak, vagy ismeretlen okból hagyták abba a kezelési sorozatot. Statisztikai vizsgálatokban tehát a szűréseket követően 79 B-sejtes, és 16 T-sejtes lymphomás beteg vett részt.

B-sejtes lymphomás páciensek

A 79 beteg közül 44 hím, 35 nőstény egyed volt. A kutyák átlag életkora 8,2 év volt (1-5 éves korig, $n = 15$; 5-10 éves korig, $n = 48$; 10 év <, $n = 16$). A klinikai megjelenés alapján minden páciens stádiumba sorolása megtörtént. Egy beteg volt stage II ($n = 1$), a többi páciens stage III ($n = 12$), stage IV ($n = 52$) és stage V ($n = 14$) csoportokon oszlott meg. Alstádiumok szerint a betegek közül 58 kutya nem mutatott klinikai panaszokat (substage „a”; $n = 58$), azonban 21 esetben elkezdődött az általános állapot leromlása (substage „b”; $n = 21$). A kemoterápiás kezelések tekintetében első ciklusként 76 beteg kapott CHOP protokollt (**3. táblázat**), 3 beteg L-CHOP protokollt (**4. táblázat**). A CHOP protokoll 19 hete alatt 19 páciens betegsége recidivált. Az összes beteget tekintve 26 beteg részesült recidívát követően kemoterápiás kezelésekből. Ezek között voltak olyan kutyák, melyek a korábbi CHOP protokollt kapták ($n = 10$), voltak betegek, ahol L-CHOP protokollt alkalmaztunk ($n = 10$), valamint néhány esetben lomusztin és L-aszparagináz kombinációval folytattuk a kezelést ($n = 6$).

3. Táblázat. CHOP kemoterápiás protokoll

	Kemoterápia	Kiegészítő terápia
Hét 1	Doxorubicin (30mg/m ² iv.)	Prednizolon (2 mg/kg/nap po)
Hét 2	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	Predinsone (1.5 mg/kg/nap po)
Hét 3	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	Prednizolon (1 mg/kg/nap po)
Hét 4	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.) Ciklofoszfamid (250mg/ m ² po.)	Prednizolon (0.5 mg/kg/nap po)
Hét 5	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 6	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 7	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.) Ciklofoszfamid (250mg/ m ² po.)	
Hét 8	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 9	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 10	Doxorubicin (30mg/m ² iv.)	
Hét 11	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 12	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 13	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.) Ciklofoszfamid (250mg/ m ² po.)	
Hét 14	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 15	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 16	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.) Ciklofoszfamid (250mg/ m ² po.)	
Hét 17	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 18	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 19	Doxorubicin (30mg/m ² iv.)	

A betegek immunfenotipizálása minden esetben megtörtént áramlásos citométer segítségével, ezen felül 68 esetben szövettani vizsgálat és immunhisztokémia is történt. Az immunhisztokémia alapján az egyes típusok megoszlása a következő volt: diffúz nagy B – sejtes lymphoma (n = 56), ezen belül két esetben T-sejt gazdag B-sejtes lymphoma igazolódott (n = 2). További típusok B-sejtes immunoblastos lymphoma (n = 7), B-sejtes kis lymphocytás lymphoma (n = 2), valamint marginális zóna lymphoma (n = 2).

4. Táblázat. L-CHOP kemoterápiás kezelési protokoll

	Kemoterápia	Kiegészítő terápia
Hét 1	L-Aszparagináz (400 IU/kg im.) Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	Prednizolon (2 mg/kg/nap po)
Hét 2	Ciklofoszfamid (250mg/ m ² po.)	Predinsone (1.5 mg/kg/nap po)
Hét 3	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	Prednizolon (1 mg/kg/nap po)
Hét 4	Doxorubicin (30mg/m ² iv.)	Prednizolon (0.5 mg/kg/nap po)
Hét 5	Gyógyszerezünet	
Hét 6	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 7	Ciklofoszfamid (250mg/ m ² po.)	
Hét 8	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 9	Doxorubicin (30mg/m ² iv.)	
Hét 10	Gyógyszerezünet	
Hét 11	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 12	Gyógyszerezünet	
Hét 13	Ciklofoszfamid (250mg/ m ² po.)	
Hét 14	Gyógyszerezünet	
Hét 15	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 16	Gyógyszerezünet	
Hét 17	Doxorubicin (30mg/m ² iv.)	
Hét 18	Gyógyszerezünet	
Hét 19	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 20	Gyógyszerezünet	
Hét 21	Ciklofoszfamid (250mg/ m ² po.)	
Hét 22	Gyógyszerezünet	
Hét 23	Vincristin (0.75mg/ m ² iv.)	
Hét 24	Gyógyszerezünet	
Hét 25	Doxorubicin (30mg/m ² iv.)	

T-sejtes lymphomás betegek

A 16 T-sejtes lymphomás beteg között 9 hím, és 7 nőstény egyed volt. A betegek átlag életkora 10,5 év volt (1-5 éves korig, n = 4; 5-10 éves korig, n = 5; 10 év <, n = 7). stádium tekintetében a megoszlás a következő volt; stage II (n = 1), stage III (n = 2), „stage IV (n = 11), stage V (n = 2). Alstádiumok szerint a betegek közül 13 nem mutatott általános rosszullétre utaló tüneteket (substage „a”; n = 13), 3 esetben pedig leromlott az általános állapot (substage „b”; n = 3). Kemoterápiás kezeléseket tekintve első ciklusban 14 beteg kapott CHOP protokollt (n = 14), 2 beteg L-CHOP protokollt (n = 2). Ezen felül 5 beteg kapott második ciklus kemoterápiát L-CHOP protokoll formájában (n = 5). A T-sejtes lymphoma betegek közül senki nem kapott lomusztint (Cecenu készítményt) a kezelések során.

5.1.1. Mintavétel lymphomás betegekből szövettani vizsgálatra, immunfenotipizálás immunhisztokémiai vizsgálattal

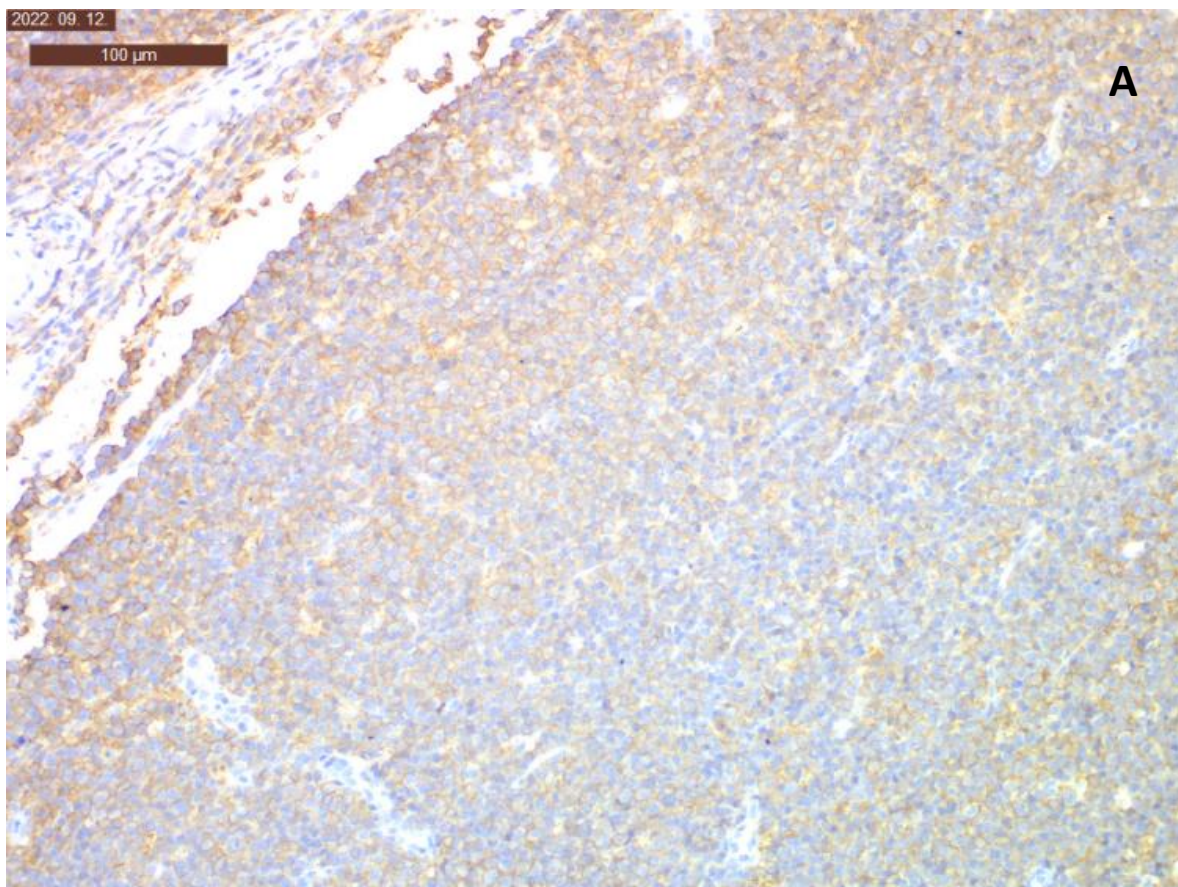
Mindegyik beteg immunfenotipizálása megtörtént legalább áramlási citométer segítségével. 14 kutya mintájából szövettan és immunhisztokémiai vizsgálat is készült. Ezek közül 7 minta esetében (n = 13) a diagnózis perifériás T-sejtes lymphoma-más alcsoportba nem sorolható típusa volt (PTLC-NOS), egy esetben (n = 1) T-sejtes lymphoblastos lymphoma volt a konklúzió.

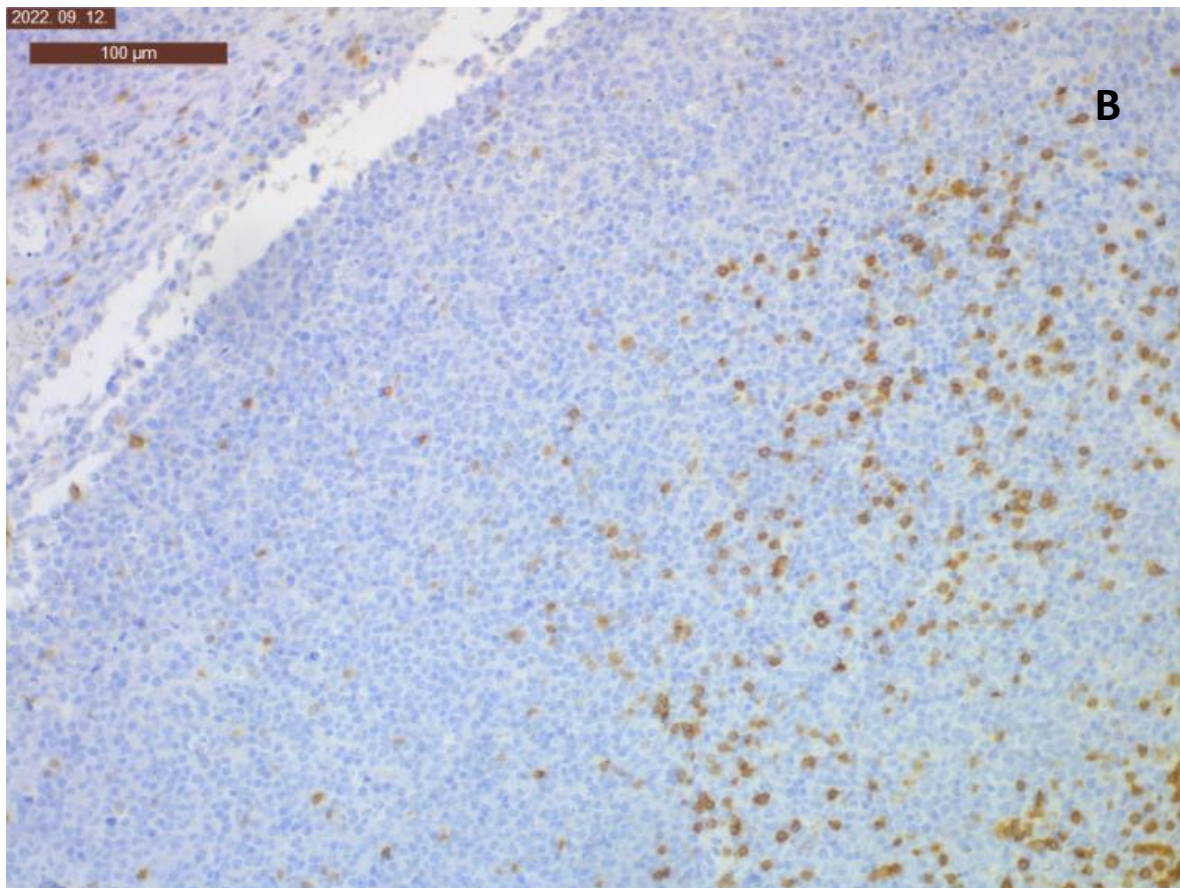
A szövettani vizsgálat elvégzéséhez általános anesztéziában összesen 76 betegből (68 B-sejtes, 14 T-sejtes lymphomás páciens) távolítottuk el az egyik prescapuláris vagy popliteális megnagyobbodott nyirokcsomót. A beavatkozást megelőzően a betegeket intravénásan fentanyl (0,003-0,005mg/kg) és propofol (5mg/kg) bolussal bódítottuk, amíg a tubálás lehetővé nem vált. A légcsőtubus behelyezését követően, az altatás – folyamatos monitorozás mellett- izoflurán (1,5-2,5 V/V%) és oxigén gáz keverékeként folyt. A duzzadt nyirokcsomó kipreparálását követően a sebet két rétegben zártuk. A varratokat műtét után 10-12 nappal eltávolítottuk. A teljes nyirokcsomót eltávolítás után 10%-os pufferolt formalinba helyeztük és külső laboratóriumba küldtük további feldolgozás céljából.

A kórszövettani vizsgálatok a Mátix Kórszövettani és Citológiai Laboratóriumában, valamint az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékének Laboratóriumában történtek. Legalább 24 óra fixálást követően a „bread loaf” módon szeletelt nyirokcsomó részletek blokkban felszálló alkoholsorban víztelenítésre, majd xilolt helyettesítő intermedierbe (Ottix plus, Diapath S.p.A, Martinengo, I) kerültek. Ezt követően a szövetek paraffin-viaszban kerültek beágyazásra, végül a 3 µm vastagságú lemezsztett szövetmintákat tárgylemezre

(Superfrost Ultra Plus, TSLabor, 37 Budapest, HU) helyezték. A minták deparaffinálása, majd rehidrálása következett.

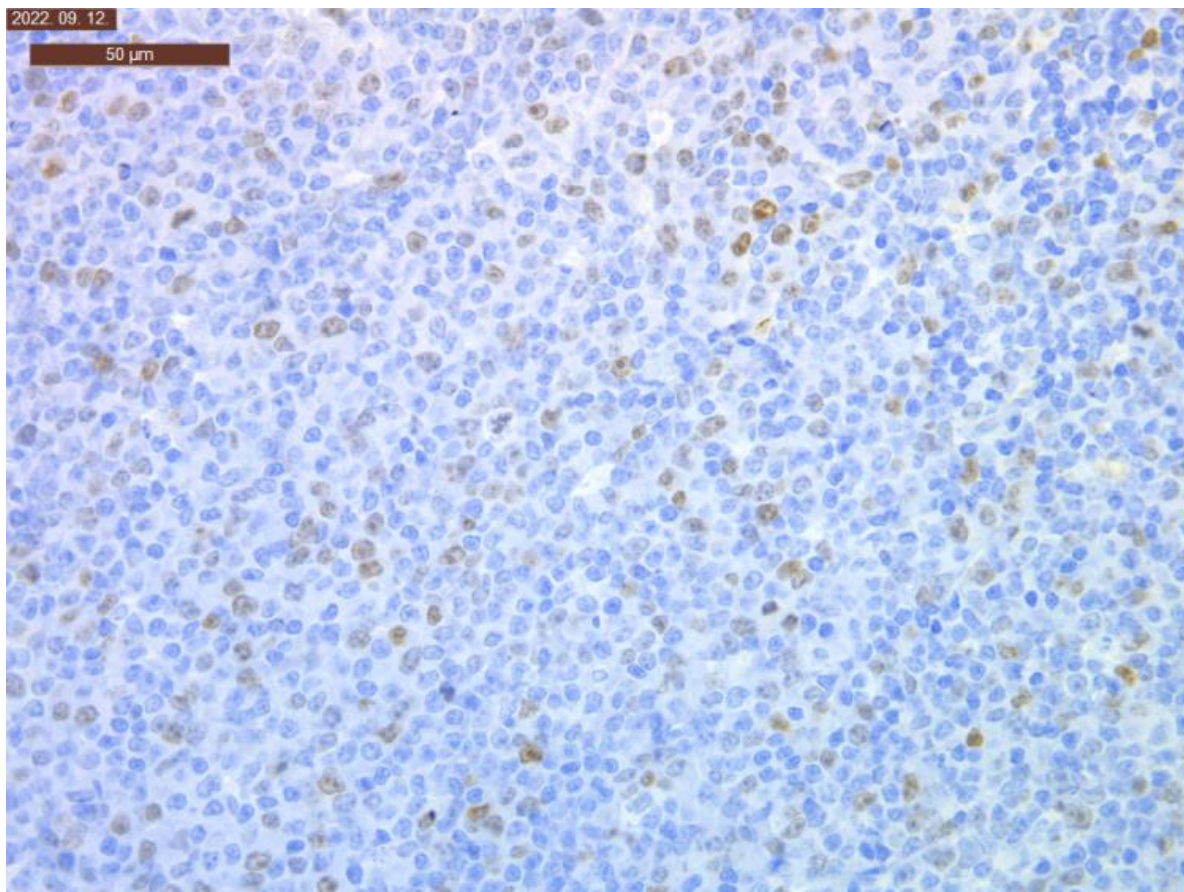
A lymphoma altípus meghatározásához elvégeztük a minták hematoxin-eosin, valamint CD markerekkel történő T és B immunjelölést, melyhez különböző poliklonális ellenanyag KIT-eket használtunk. Az antigének feltárásához hőindukált epitop kinyerési technikára volt szükség speciális feltáró oldatban. A vizsgálatokhoz szükséges CD3 (DAKO Ltd., High Wycombe, UK) feltárásához pH 9 oldatot (Dako Target retrieval solution pH9: S2368), míg a CD79a/CD20 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) feltárásához pH 6 citrátos keveréket alkalmaztunk. A feltáráshoz megfelelő hőmérsékletet mikrohullámú sütővel értük el. Ezt követően a jelölés a KIT protokoll utasításai szerint zajlott. A primer antitest megfelelő hígítása (CD3 esetén 1:100-hoz, CD79a/CD20 esetén 1:200-hoz) után a másodlagos antitestek felvitele történt (DAKO Envision Flex /HRP). Mivel az antigén-antitest reakció nem vizualizálható fénymikroszkóp alatt, a KIT protokollban leírtak szerint DAB (3,3'-Diaminobenzidine) kromogén segítségével tettük a kötődést láthatóvá (DAKO Envision Flex DAB+Chromogen). A háttérfestéshez Hematoxylin Gill II (Merck KgaA, Darmstadt, Németország) jelölést alkalmaztunk. Úgynevezett kékítést követően etanolos öblítés és xilolos fedés történt (**4. ábra**).





5. Ábra. Immunhisztokémiai festések. (A) CD79a jelölés és (B) CD3 expresszió nodális lymphoma szövetmintán, 200x nagyításon (scale bar 100 μ m)

Pozitív kontrollként kutya tonsilla szövet került vizsgálatra, a negatív kontrollhoz a primer ellenanyag felhasználása nélkül zajlott a protokoll. Az egyes betegek lymphomájának klasszifikációjához a hematoxin-eosin festett, valamint a CD3 és CD79a/CD20 jelölt metszeteket együttesen értékeltük. A pozitív reakció a sejmembránon vagy cytoplasmában barnás színben volt látható. A mintákon proliferációs marker (Ki-67) jelölés is történt (**5. ábra**). Ehhez a fentebb leírt CD jelöléshez hasonlóan első lépésként antigén feltárássra volt szükség magas hőmérsékleten, pH 9 feltáró oldatban (Dako Target retrieval solution, pH9). A primer antitest (Monoclonal mouse, anti-human Ki-67 antigen, clone MIB-1; Dako Ltd., High Wycombe, UK) 1:100 arányú hígításában történő inkubálás után szekunder antitest (DAKO Envision Flex /HRP) felvitele, majd a kromogénnel történő jelölés következett (DAKO Envision Flex DAB+Chromogen). Magfestést követően (Hematoxylin Gill II; Merck KgaA, Darmstadt, Németország) kékítés, majd a lemezek fedése történt. A festés százalékos megoszlásának mértékét a pozitív tumorsejteket legmagasabb arányban halmozó látóterekben értékeltük. Ezen régiókban 400x-os nagyításon 5 látótérben végeztük a meghatározást (Sierra és mtsai, 2018). A pozitív reakció barnás magfestődésként jelent meg.



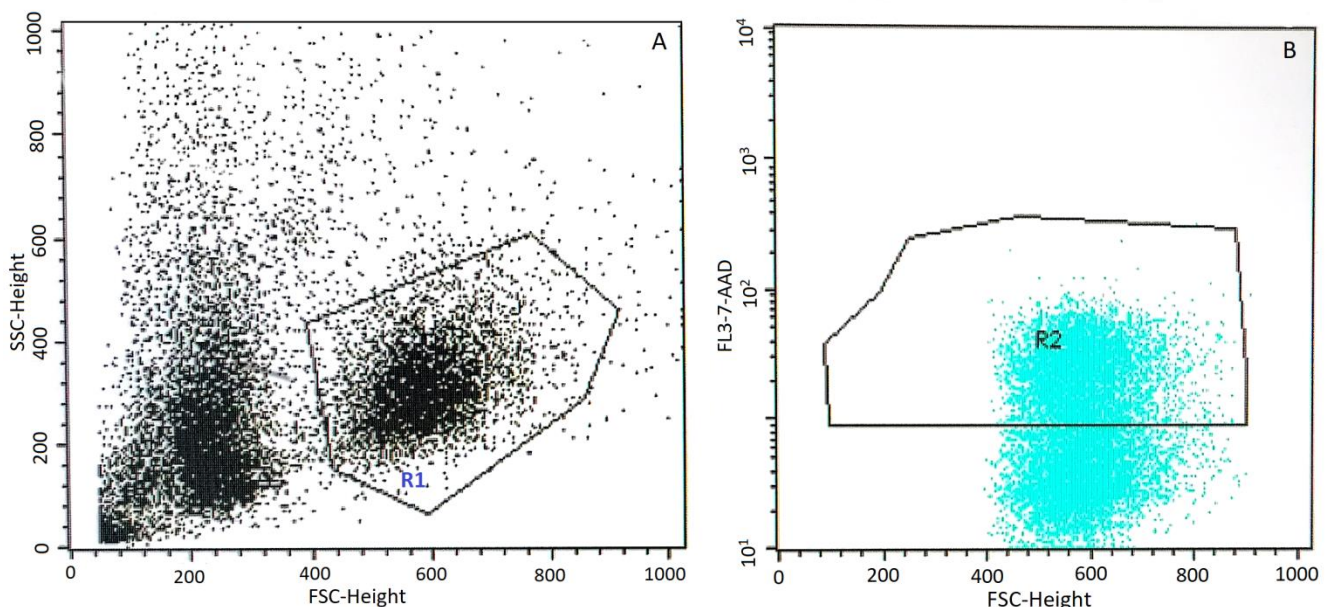
6. Ábra. Ki-67 festés nodalis lymphoma szövetmintán, 400x nagyításon (scale bar 50 μ m).

5.1.2. Lymphomás betegek immunfenotípus meghatározása áramlási citometriával

Áramlási citometriás vizsgálattal történő immunfenotipizálást minden betegnél elvégeztük. A vizsgálathoz biopsziás vagy tűs aspirációs nyirokcsomó szövetből származó mintát használtunk fel. Biopsziás minta azon betegeknél állt rendelkezésre, melyekből nyirokcsomó eltávolítás is történt szövettani vizsgálat céljából általános anesztéziában. A tűs aspirációs mintavétel egy nem invazív és gyors lehetőség volt minden olyan esetben, ahol a betegek általános állapota miatt magas volt az altatás kockázata vagy a tulajdonosok nem vállalták. A mintavételi eljárás a citológiai mintavételhez hasonló módon végeztük, 18G tűvel.

Mind a műtéti eljárással, mind tűs aspirációval nyert mintákat disszociációs médiumot tartalmazó, ún. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) oldatban (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, USA) tároltuk 4 °C-on. A disszociációs médium 200 U/ml II-es típusú kollagenáz és 0,6 U/ml diszpáz (Life Technologies) enzimeket tartalmazott. Megadott ideig (30 perc), 37°C hőmérsékleten inkubáltuk a szuszpenziót, majd 40 μ m-es szűrővel szortíroztuk a sejteket. Ezt követően Sysmex XT2000iV™ (Sysmex) segítségével meghatároztuk a sejtszámot.

Az immunfenotípus meghatározáshoz 10^6 sejtet különítettünk el, és direkt jelölt monoklonális ellenanyagokat adtunk a mintához 1:10 hígításban a gyártó által leírt protokoll utasításai alapján. A vizsgálatban használt kétféle CD marker (CD3 klón CA17.2A12 és CD21 klón CA2.1D6, Bio-Rad Laboratories, USA), és ezek izotípus-kontrolljainak segítségével különítettük el a B- és T- sejt populációkat. A megfelelő jelölődést 30 perc alatt, 37°C vízfürdőben kívántuk elérni, majd a mintákhoz 1ml hideg (4°C) PBS-t (phosphate buffered saline) adva leállítottuk a reakciót, és 300 G centrifugálást követően 270 μl PBS-ben mértük le a sejteket FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA) áramlási citométer segítségével. A tumort alkotó, domináns sejtpopulációt ún. kapuzási technikával méret (FSC>400) és granuláltság ($200 < \text{SSC}$) alapján választottuk ki (R1) (Marconato és mtsai, 2013). Ahhoz, hogy a mérés precízen csak élő populációt tartalmazzon, az élő és holt sejtek elkülönítését 0,8 μl 7-Aminoaktinomicin D-t (7-AAD, Thermo Fisher Scientific, USA) festék hozzáadásával végeztük el. A nem életképes sejtek membránjai átjárhatóvá válnak a 7-AAD számára, mely a sejtmag kétszálú DNS-hez kötődve kifejeződik, a fluoreszcencia detektálhatóvá válik. Az élő sejtcsoport az R2 kapun belül helyeződött. A mérés befejezéséhez az R1 és R2 kapunak 10 000 darab sejtet kellett tartalmaznia (6. ábra). A mérés eredményét abban az esetben tekintettük megbízhatónak, ha a jelölt sejtpopuláció legalább 15%-a pozitív volt valamelyik markerre az izotípussal végzett kontrollhoz képest (Canioni és mtsai, 2009; Selliah és mtsai, 2019). A CD3 és CD21 markerek százalékos kiértékeléséhez a BD CellQuest (Becton Dickinson, USA) statisztikai programját használtuk.



6. Ábra. Áramlási citométer dot plot ábrák az immunfenotipizálás során (A) A lymphoid sejtek kiválasztása FSC és SSC alapján történik (R1 kapu) (B) Az életképtelen sejtek jelölésére 7-AAD festéket használtunk, és az életképes sejtpopulációt szelektáltuk (R2 kapu).

5.2. A vizsgálatban szereplő mastocytomás betegek

Vizsgálataink során összesen 31 cutan mastocytomában szenvedő kutya mintáit gyűjtöttük össze. A betegek között 16 hím és 15 nőstény egyed volt, amelyek átlagéletkora 8,3 év volt. A tumorok primer lokalizációját tekintve a daganat legtöbbször a mellkason volt található (n = 12), ezt követte a fej-nyaki régió (n = 6), majd a lágyékban (n = 4) valamint lábvégen (n = 4) és a comb lateralis oldalán (n = 4) előforduló esetek. Egy esetben pedig a vállon volt az elváltozás (n = 1).

A Klinikára érkező páciensek betegségének diagnózisát egy komplex kivizsgálást követően állítottuk fel. Ennek során történt átfogó vérvizsgálat (teljes vérkép és biokémiai panel vizsgálat), képalkotó vizsgálatok (hasi ultrahang, mellkas röntgenvizsgálat). Ez alapján került sor a stádiumba sorolásra. A Stádium és Alstádium besorolás a WHO ajánlása szerint történt (Vail és mtsai, 2019). Ezt tekintve a betegek legtöbbször stádium I (n = 17) csoportba tartozott, a többi beteg megoszlása a következő volt; stádium II (n = 5), stádium III (n = 7) és stádium IV (n = 2). A tumort tekintve műtét előtt készült vékonytű-aspirációs mintavétellel citológiai vizsgálat, majd műtétet követően minden esetben kórszövetteni vizsgálat. Az előzetes citológiai eredményre a műtéti eltávolítás megtervezéséhez volt szükséges, amellyel a tumor „low grade” vagy „high grade” mivolta, így lokalizációtól függően a szükséges sebészi szél paraméterei is meghatározhatók voltak. A sebészeti beavatkozás során a mastocytomákat a szükséges ép sebszélekkel együtt kíséreltük meg eltávolítani, majd a kórszövetteni értékelést nem befolyásoló régiókból (sebszélektől távol, a tumor centrumából) elkülönítettünk egy kis részletet a későbbi áramlásos citometriai vizsgálatra. A kórszövetteni vizsgálat során, hematoxilinnal és eozinnal festett lemezek alapján történt a mastocytomák „grade” meghatározása a mai standardnak megfelelően háromszintes (Patnaik és mtsai, 1984) és kétszintes (Kiupel és mtsai, 2011) rendszer szerint.

A betegek kezelését a klinikai megjelenés, a stádium és kórszövetteni eredmény együttes figyelembe vételével terveztük meg. Mindegyik kutya daganatát műtétilag eltávolítottuk. A 31 betegből 23 páciensnél kórszövettenilag igazoltan teljes eltávolítás történt, 8 esetben a sebszélek a tumor által érintettek voltak. Összesen 16 kutyánál történt kemoterápiás utókezelés Prednizolonnal kiegészítve (2–0,5 mg/ttkg po adagban) és 15 kutyánál nem alkalmaztunk gyógyszeres utókezelést.

A masitinib (Masivet) (AB Science S.A., Párizs, Franciaország) adagolása 9,5–12,5 mg/kg terápiás sávban történt (n=10). Olyan esetben, amikor a masitinib kezelés terápiás hatékonysága nem volt kielégítő (n=5), vagy ahol a műtéti eltávolítás nem volt sikeres, illetve eleve metasztatikus megbetegedés volt igazolható a klinikai vizsgálattal, 2–3,5 mg/m² hetente történő iv. vinblastin (Richter Gedeon, Budapest, Magyarország) kezelést alkalmaztunk (n=11). Két beteg esetében, amelyek IV. stádiumban voltak (n=2) 60–80 mg/m²

dózisban Lomustin (Cecenu) (Bristol-Myers Squibb Canada, Montreal, Kanada) kapszulával egészítettük ki a terápiát. Súlyos mellékhatás (vérképpel igazolt csontvelői funkció csökkenés, súlyos hányás és hasmenés) a dózis csökkentését vagy akár a gyógyszer elhagyását vonta maga után.

5.3. P-glikoprotein expresszió szövettani vizsgálata lymphomás nyirokcsomó, illetve mastocytoma mintákon

A P-gp immunhisztokémiai vizsgálathoz a szövetmintákat műtéti eltávolítással nyertük az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központban. A vizsgálatokhoz lymphoma páciensek közül összesen 71 esetben (B-sejtes n = 57; T-sejtes n = 14), míg mastocytoma betegekből mind a 31 esetben állt rendelkezésünkre minta. Generál anesztéziában, az 5.1.1. fejezetben leírt módon eltávolított nyirokcsomóból készültek P-gp jelölésre is a lemezek. Mastocytomák esetében az egészben eltávolított tumor széleit sebszélvizsgálat céljából még formalinba helyezés előtt festettük. Ez a sebszéljelölés a későbbi, P-gp immunhisztokémiai festést nem akadályozta.

A szövetmintákat (lymphomás nyirokcsomó, mastocytoma) 10%-os pufferolt formalinban fixáltuk átlagosan 20–24 órán át. A szövettani feldolgozás helyszíne a Mátrix Kórszövettani és Citológiai Laboratórium, valamint az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékének Laboratóriuma volt.

A fixálást követően a nyirokcsomó mintákat „bread-loaf” szeletelést követően, mastocytoma mintákat „kereszt” és „tangenciális” síkokban történő szeletelés után paraffinba ágyasztuk, majd 3–5 µm vastagságú metszeteket tárgylemezre (Superfrost Ultra Plus, TSLabor, 37 Budapest, HU) helyeztük.

A P-gp jelöléséhez C494 klón-számú egér monoklonális antitestet használtunk (Enzo Clinical Labs Inc., NewYork, USA). Az eljáráshoz a metszetek etanollal való deparaffinálását követően feltárás történt 6-os pH-jú citrát pufferben, mikrohullámú sütő segítségével 800 Watton 5 percig, illetve 180 Watt teljesítményen 10 percig. A primer antitest alkalmazása előtt szükség volt a szövetek endogén peroxidáz enzimeinek blokkolására (EnVision FLEX Peroxidase-blocking Reagent, Dako Agilent). Ezután a mintákat a monoclonalis primer ellenanyag 1:20-as hígítású oldatában inkubáltuk. A primer antitest kötődésének kimutatásához másodlagos ellenanyagra is szükség volt (Dako Envision system-HRP). A specifikusan kötődött ellenanyagokat ezután kromogénnel (Dako Envision Flex DAB) jelöltük, amely az elsődleges kötődési helyeket barna színben tette láthatóvá. Az előhívás után a magfestést hematoxilinnel (Merck KgaA, Darmstadt, Németország) végeztük. PBS öblítést (kékítés) követően a lemezeket etanollal víztelenítettük és fedtük xilolmentes fedőfolyadékkal.

A P-gp festődés ellenőrzésére pozitív kontrollként egészséges kutya májszövetet használtunk. A negatív kontrollhoz egy beteg tumormintáját vettük igénybe, amelyet nem inkubáltunk a primer antitesttel, de a jelölés többi lépése megtörtént.

A bírálathoz öt nagy nagyítású látótérben (400× nagyításon), látóterenként kb. 200 darab sejtet számoltunk meg (Hyokai és mtsai, 2021).

A pozitív sejtek aránya mellett figyeltük a festődés helyét (cytoplasma vagy sejtmembrán), valamint intenzitását. Az intenzitás mértékét három csoportba osztottuk (1. csoport: pozitív kontrollnál gyengébb intenzitás; 2. csoport: pozitív kontrollal megegyező intenzitás; 3. csoport: pozitív kontrollnál erősebb intenzitás).

5.4. P-glikoprotein funkcionális vizsgálata lymphomás nyirokcsomó és mastocytoma mintákon áramlási citométer segítségével

Az áramlásos citometriai vizsgálatot az összes, vizsgálatban szereplő lymphoma beteg mintájából (n = 95; B-sejtes n = 79; T-sejtes n = 16), és 25 mastocytomás beteg (n = 25) mintájából végeztük el. A műtéttel, valamint tűaspirációval nyert mintákat disszociációs RPMI médiumban (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, USA) tároltuk 4 °C-on. A további feldolgozást legkésőbb 48 óra múlva megkezdtük. Szükség esetén a tumor apróra darabolását követően a disszociált tumorsejtek szűrése, centrifugálása következett. A további munkához 250.000 sejtet különítettünk el.

A P-gp glikoprotein funkciójának megállapításához calcein mérést használtunk (Homolya és mtsai, 1996). A mintákat két csőbe különítettük el, egyikhez a P-gp-t is blokkolni képes 10 mmol/l verapamilt (Sigma Laboratories Ltd., Mumbai, India) és calcein-AM festéket adtunk, a másik csőben verapamil hozzáadása nélkül mértünk 0,25 mmol/l calcein-AM (Dojindo Molecular Technologies) festéket 37°C hőmérsékleten. A csövekben lévő elegyet 10 percig inkubáltuk.

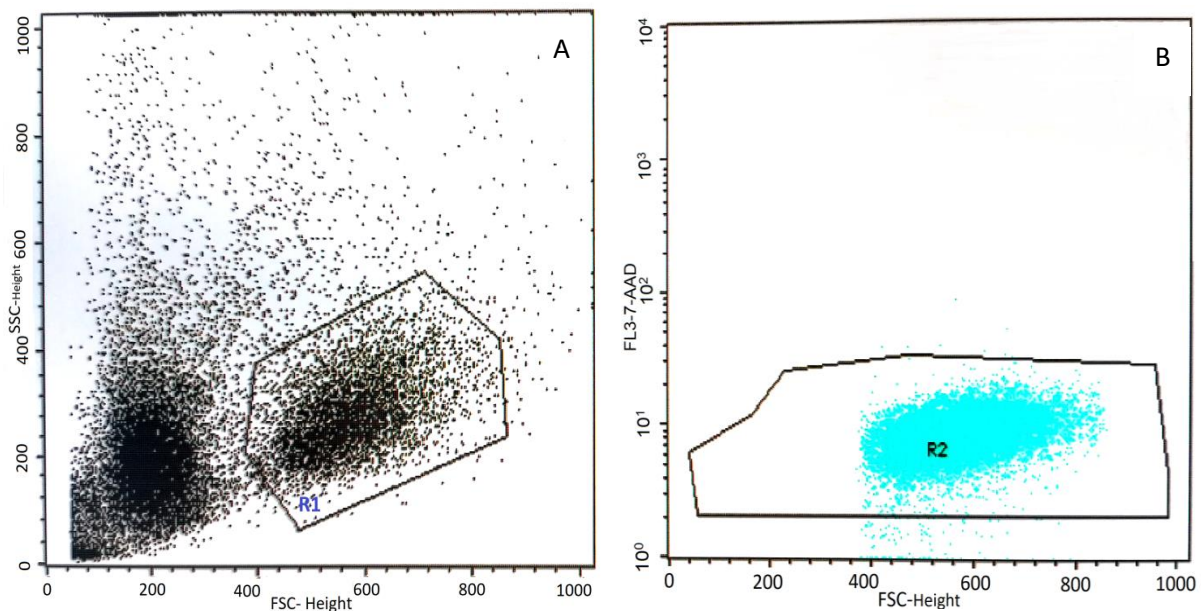
A calcein-acetoximetilészter (AM) (Invitrogen, Life Technologies, USA) egy zsíroldékony, nem fluoreszcens molekula, amely gyorsan képes penetrálni a membránon át a sejtekbe. Az élő sejtekbe jutva különböző észterázok hatására az AM-csoport leválik, és a calcein fluoreszcens molekulává alakul. A transzportfehérje hiányában felhalmozódik a sejtekben, áramlási citométerrel mérhetővé válik az intenzitása. Azonban abban az esetben, ha a transzmembrán protein mennyisége nagy a sejtek membránjában, akkor a fluoreszcens calcein az extracelluláris térbe jut, a jelintenzitás csökkenni fog a sejtekben. Amennyiben a sejtekhez P-gp-gátló anyagot, vagyis verapamilt adunk, a pumpafehérje működését akadályozzuk, így a calcein erős fluoreszcens jelét detektálhatjuk a sejtekben az áramlási citométer segítségével.

A rezisztencia kvantitatív mértékére a Multidrogrezisztencia Aktivitási Faktor (MAF) meghatározásával következtethetünk, amely a verapamillal gátolt, ill. gátlószer nélküli calcein akkumuláció arányából számítható ki (Holló és mtsai, 1994; Karászi és mtsai, 2001);

$$(IF_{\text{verapamil}} - IF_{\text{calcein}}) / IF_{\text{verapamil}}$$

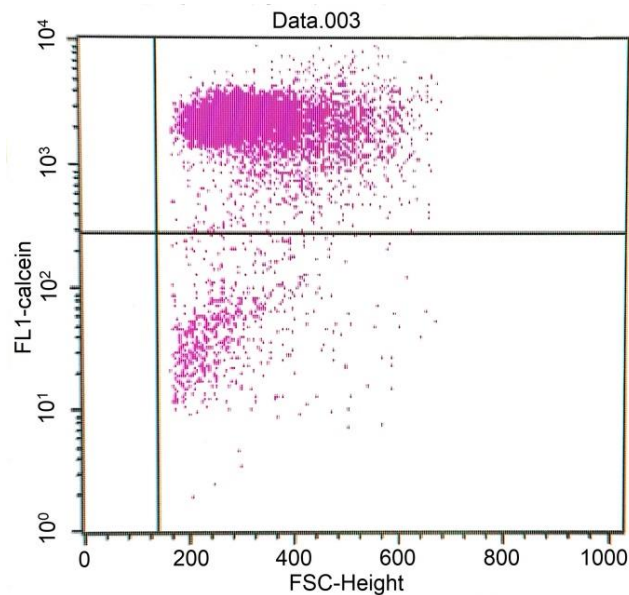
Az inkubációs idő leteltével a reakció hideg (4 °C-os) PBS-sel történő leállítása után a csövekhez a holt és élő sejtek elkülönítésére szolgáló festékanyagot, 7-AAD-t adtunk. Ezt követően a mintákat áramlások citométer segítségével vizsgáltuk.

A dot plot ábrán az immunfenotípus meghatározáshoz hasonlóan szelektálni lehet a vizsgálni kívánt sejtpopulációt a sejtek mérete (FSC) és granuláltsága alapján (SSC) (7. ábra).



7. Ábra. Calcein teszt készítése előtt megfelelő sejtpopuláció kiválasztása egy lymphoma beteg áramlási citométerrel készített dot plot ábrán. (A) Az R1 kapu jelzi a jelölni kívánt lymphoid sejtcsoportot. (B) A 7-AAD jelöléssel az élő és holt sejtek elkülönítése lehetséges. R2 kapuban az élő sejtcsoport látható.

A mintákban található tumorsejtek képesek felvenni és átalakítani a calcein-AM festéket, a létrejött fluoreszcencia pedig detektálható és mérhető az áramlás citométerrel (8. ábra).



8. Ábra. Calcein-AM detektálása egy mastocytoma betegből származó szövetmintán, az áramlási citométer dot plot ábráján szemlélítve. Az y-tengelyen a sejtek fluoreszcenciájának intenzitása van feltüntetve. A calcein-negatív, vagyis a rezisztens (festéket kipumpáló) sejtek a választóvonal alatt, a calcein-pozitív, vagyis érzékeny sejtek a választóvonal fölött helyezkednek el.

A sejtek fluoreszcenciájának mérése FACScan (Fluoreszcencia aktivált sejtválogató és analizátor) (Becton Dickinson, San Jose, USA) áramlásos citométer segítségével történt.

5.5. Statisztikai vizsgálatok

A lymphomás betegek esetében a vizsgálati csoportokat egyirányú, randomizált varianciaanalízissel hasonlítottuk össze. Szignifikáns eredmények ($p < 0,05$) esetén Bonferoni-féle összehasonlításokat végeztünk a csoportok többszöri, különféle párosításával (pl. 1-2; 2-3; 1-3). A létrehozott többszörös párokat lymphomás és mastocytoma betegek esetében is Student t-tesztel is összehasonlítottuk. A túlélési analízisekhez Log-rank, „Cox-proportional hazard” regressziós és Kaplan-Meyer analíziseket használtunk.

Egy adott paraméter előfordulási gyakoriságának megítéléséhez számos khi-négyzet próbát végeztünk. Az egyes csoportok recidíva mentes túlélési ideje (relapse free period, RFP), és teljes túlélési ideje (overall survival time, OST) között szignifikán összefüggéseket kerestünk (szignifikancia: $p < 0,05$).

Az ún. cut off értékek meghatározása ROC-görbék segítségével történt.

A Reference Value Advisor V2.1 (National Veterinary School of Toulouse) programmal az eloszlási görbék megalkotása, valamint a referencia intervallumok és a normál tartományok meghatározása történt.

A „halálozási kockázatnak való kitettség mértéke” (extent of exposure to risk of death) a várható halálozások számát jelenti. A „relatív arány” (relative rate) egy egészségügyi esemény (betegség, sérülés, egyéb kockázati tényező vagy haláleset) kockázatát hasonlítja össze a kockázatnak kitett (kitett) és a kockázati eseménytől mentes (nem kitett) csoport között.

Az áramlásos citometriával meghatározott MAF érték, és az immunhisztokémiával meghatározott P-gp expresszió százalékos aránya közötti kapcsolatot Pearson-féle korrelációs analízissel vizsgáltuk meg.

A statisztikai elemzésekhez a Microsoft Excel 2010 R 3.0.20-as verzióját (Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria) és a Stats Direct Statistical Software 3.0.194 (StatsDirect Ltd, Altrincham, Egyesült Királyság) és a Datatab (DATAtab Team, Graz, Austria) programot használtuk.

6. Eredmények

6.1. Lymphomás betegek klinikai vizsgálati eredményei

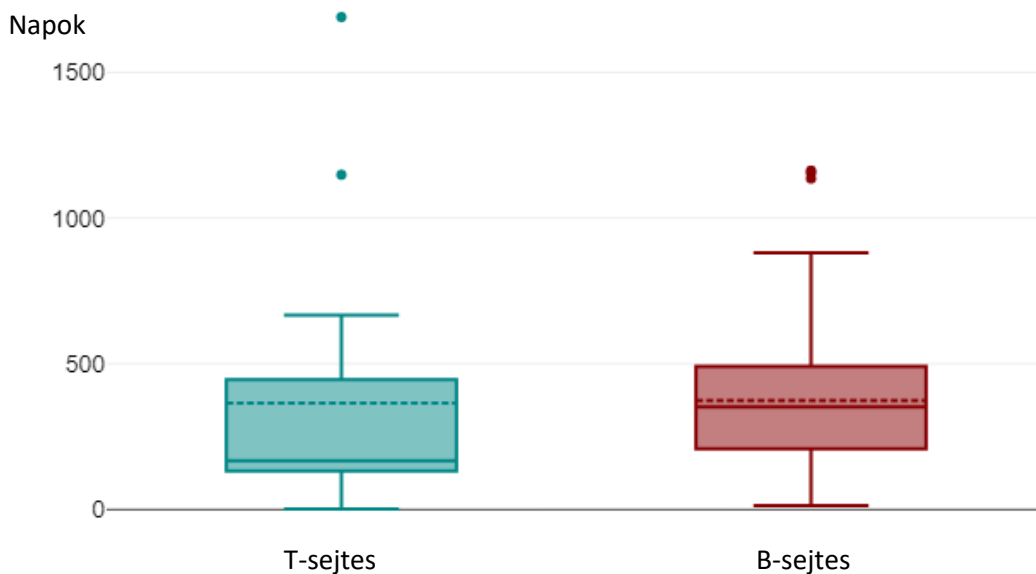
Az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ Klinikáján összesen 95 beteg mintája került véglegesen feldolgozásra. Ezen páciensek közül 79 B-sejtes, 16 T-sejtes lymphomában szenvedett.

T- és B-sejtes lymphomás betegek túlélési adatainak összehasonlító vizsgálati eredményei

A teljes túlélési idő (OST) tekintetében a B-sejtes lymphomás betegek (n = 79) medián túlélési ideje jelentősen hosszabb volt (OST = medián 352 nap) a T-sejtes lymphoma páciensekhez (n = 16) képest (OST = medián 167,5 nap) ($p = 0,0918$) (5. táblázat, 9. ábra).

5. Táblázat. A T- és B-sejtes lymphoma betegek teljes túlélési idejei (OST).

	T-sejtes	B-sejtes
Betegek száma	16	79
Átlag (napok száma)	365.63	373.86
Medián (napok száma)	167.5	352
Std. Deviation	459.25	255.48
Minimum	2	14
Maximum	1,690	1,163
P-érték	0.0918	

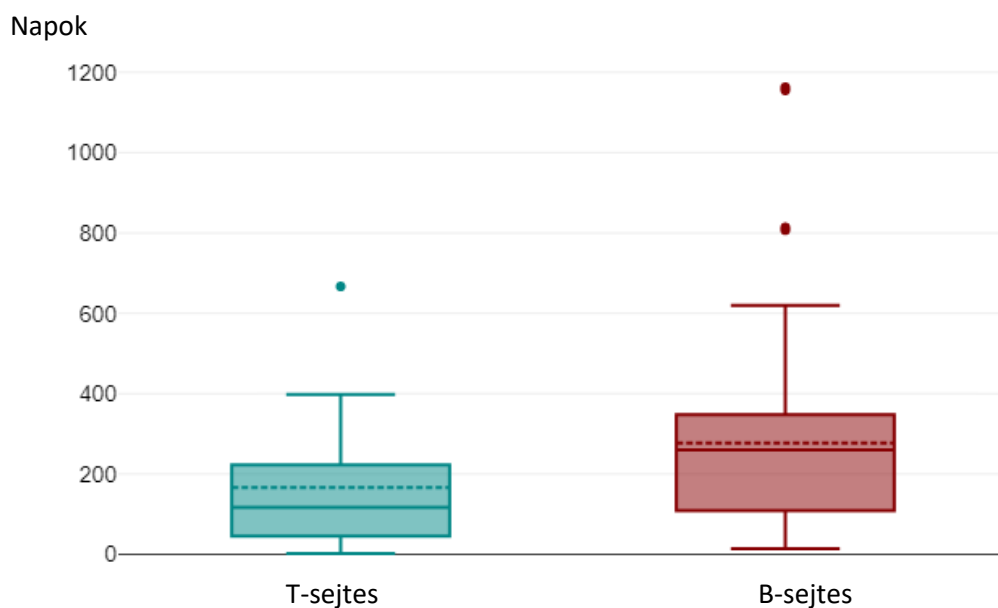


9. Ábra. T-sejtes és B-sejtes lymphomás betegek teljes túlélési idejének összehasonlítása. A B-sejtes páciensek kevéssel hosszabb ideig éltek.

A recidívamentes túlélési időt (RFP) vizsgálva a két csoport közötti különbség szignifikáns ($p = 0,014$). A B-sejtes lymphoma csoport képviselői hosszabb ideig voltak remisszióban (RFP = medián 260 nap) a T-sejtes populációhoz képest (RFP = medián 116,5 nap) (**6. táblázat, 10. ábra**).

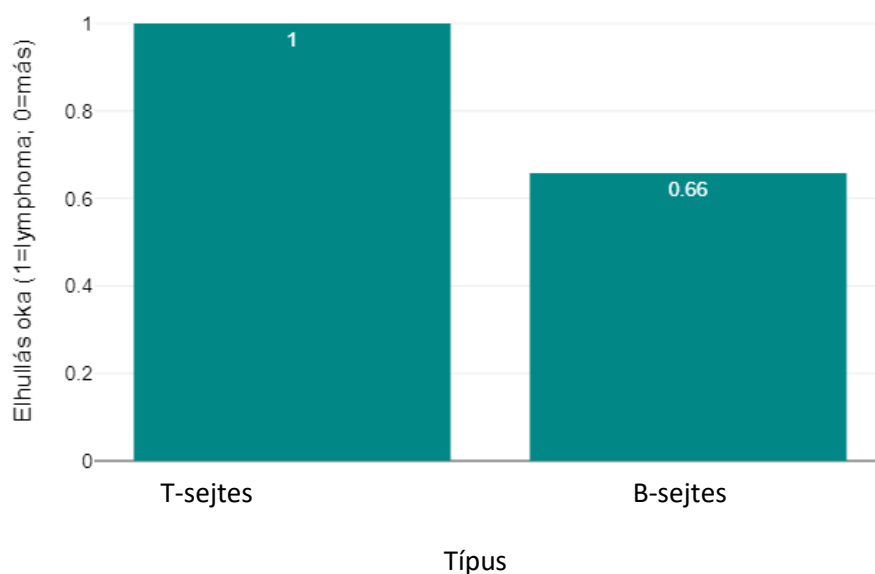
6. Táblázat. A T- és B-sejtes lymphoma betegek recidíva mentes túlélési idejei (RFP).

	T-sejtes	B-sejtes
Betegek száma	16	79
Átlag (napok száma)	166.63	276.86
Median (napok száma)	116.5	260
Std. Deviation	177.43	217.05
Minimum	2	14
Maximum	667	1,163
P-érték	0.01409	



10. Ábra. T-sejtes és B-sejtes lymphoma betegek recidívamentes túlélési idejeit összehasonlító ábra. A B-sejtes páciensek szignifikánsak később recidíváltak.

Az elhullások okát tekintve a B-sejtes páciensek esetében statisztikailag szignifikánsan kevesebb kutya pusztult el lymphoma miatt (52/79), mint a T-sejtes betegek esetén (16/16) (Mann-Whitney U teszt; $U = 416$, $r = 0,28$, $p = 0,006$). A B-sejtes betegcsoportban az elhullások egy részét (27/79) egyéb megbetegedés vagy a betegek gazdáinak a lemondó hozzáállása okozta. A T-sejtes betegek mindegyike lymphoma miatt hullott el (**11. ábra**).

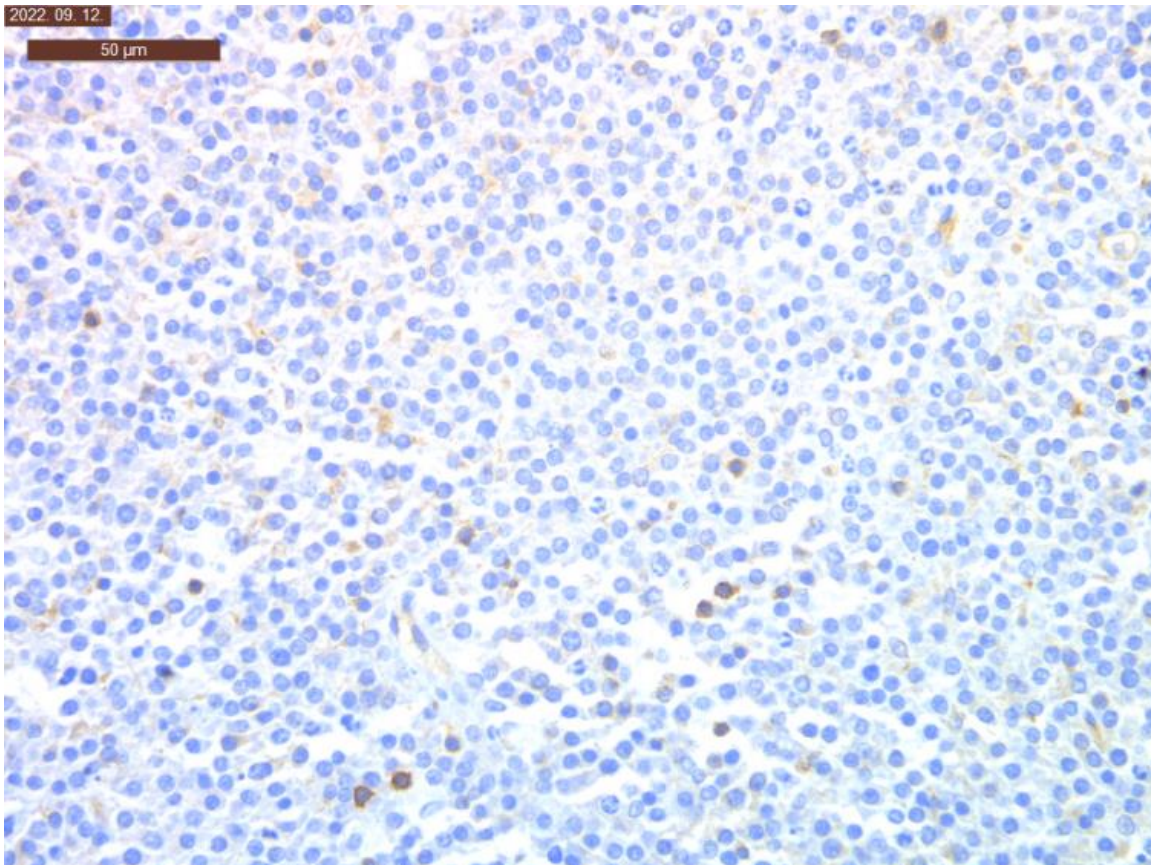


11. Ábra. Elhullás okának oszlop diagrammos ábrázolása a T- és B-sejtes lymphomás betegek esetén. (1 = lymphoma; 0 = más ok)

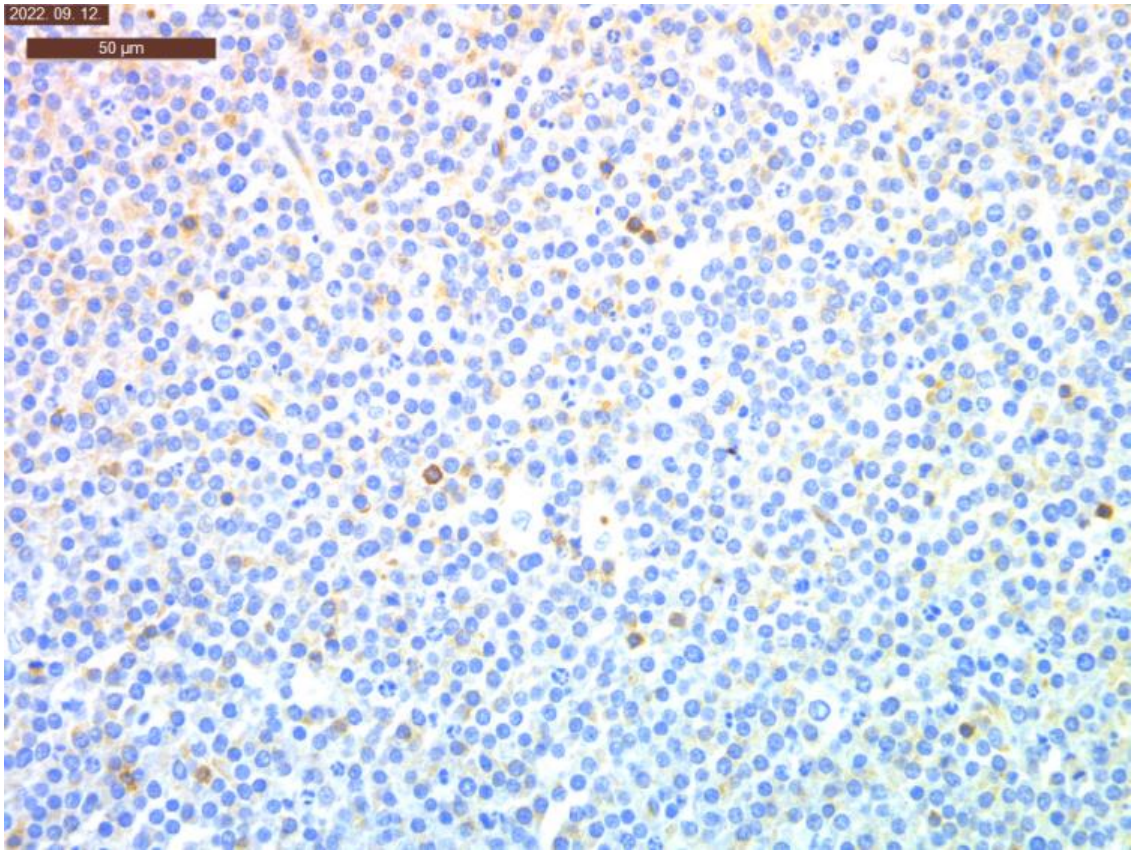
6.1.1. A P-glikoprotein expresszió értékelése

A teljes beteganyagot tekintve P-gp expresszió immunhisztokémiai vizsgálatára 71 esetben volt lehetőségünk (B-sejtes: n = 57; T-sejtes: n = 14). A jelöléseket a 5.3. fejezetben leírt módszerek megfelelően végeztük el.

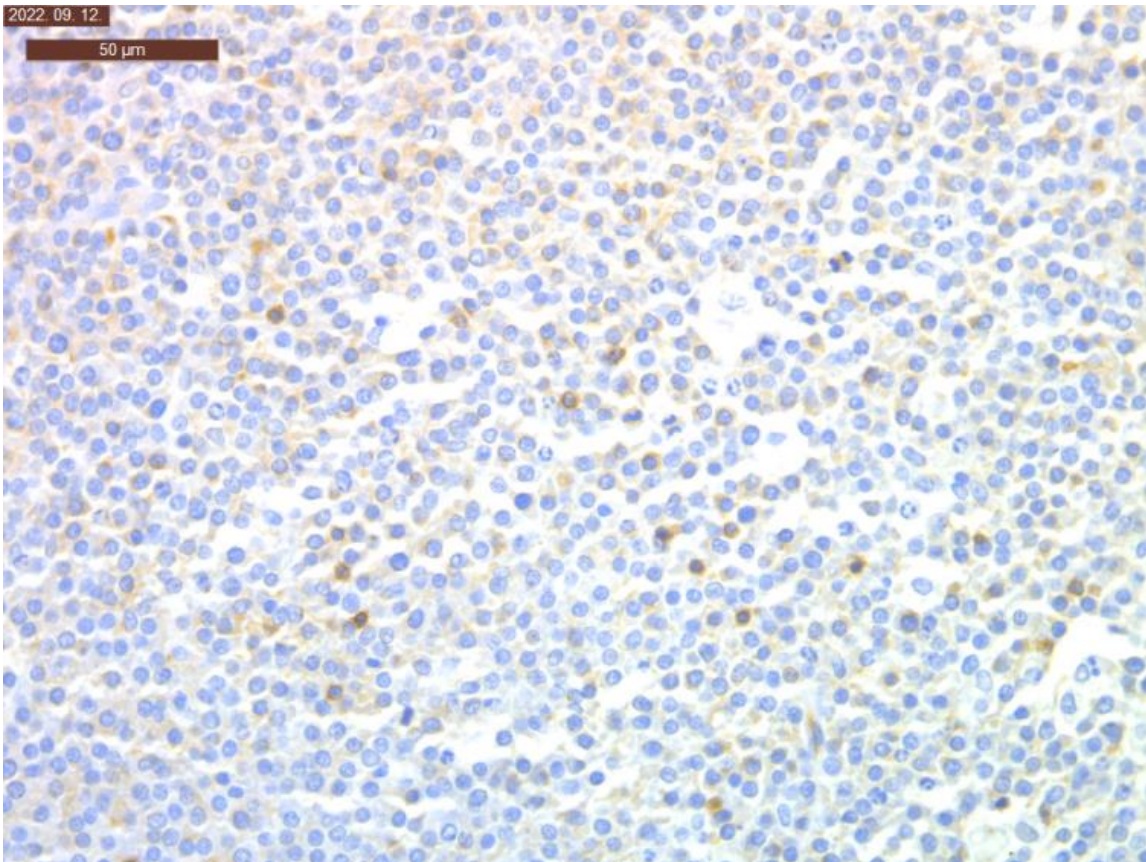
A fénymikroszkópos értékelés során meghatároztuk a festődés helyét és intenzitását (**12-14. ábra**). A festődés helyének vizsgálatakor a membránon történő expresszió esetén elsősorban a sejtmembrán barnás színreakcióját figyeltük meg, a cytoplasmában történő jelölődéskor azonban a membrán festődése nem különült el élesen. Az intenzitás, tehát a festődés erősségének számszerű vizsgálatához három csoportot hoztunk létre (1. csoport: pozitív kontrollnál gyengébb intenzitás; 2. csoport: pozitív kontrollal megegyező intenzitás; 3. csoport: pozitív kontrollnál erősebb intenzitás) (5.3. fejezet).



12. Ábra. 2% P-gp expresszió nodalis lymphoma mintában, 400x nagyításon (scale bar 50 μ m).



13. Ábra. 5-6 % P-gp expresszió nodalis lymphoma mintában, 400x nagyításon
(scale bar 50 μ m).



14. Ábra. 8-10% P-gp expresszió nodalis lymphoma szövetmintában 400x nagyításon
(scale bar 50 μ m).

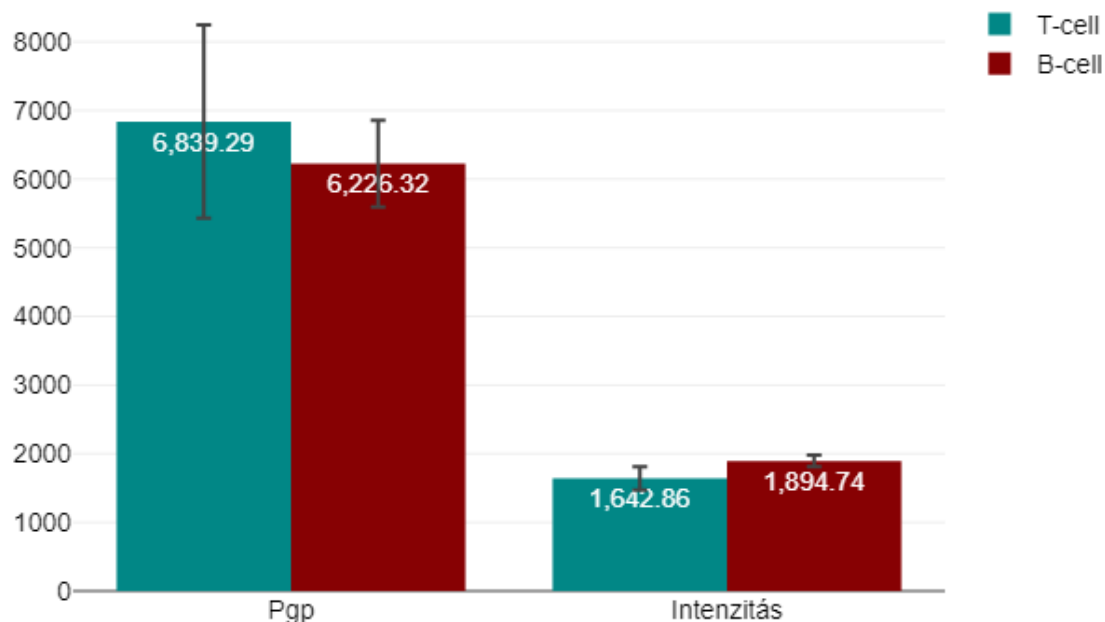
A P-gp jelölt betegpopulációt tekintve, (n = 71) a legtöbb mintában membrán festődést (n = 65) tapasztaltunk. Szignifikáns összefüggés volt felfedezhető a P-gp expresszió mértéke, és a festődés intenzitása között, tehát a magasabb P-gp expressziójú minták intenzívebben festődtek ($p < 0,001$).

A immunhisztokémiai jelölődés helyét és intenzitását külön a B- és T-sejtes csoportokban a **7.táblázat**, valamint a **15.ábra** mutatja.

A T-sejtes lymphoma betegek arányaiban magasabb százalékban festődtek (P-gp % átlag = 6,84%) a B-sejtes csoporthoz képest (P-gp% átlag 6,23%), habár ez a különbség nem volt szignifikáns ($p = 0,8$).

7. Táblázat. A P-gp immunhisztokémiai jelölés mikroszkópos értékeléséből nyert adatok (százalékos expresszió, festődés helye, festődés intenzitása) a T- és B-sejtes lymphoma típusokban külön szemléltetve.

		Pgp (%)	Helyeződés (0:membrán, 1:cytoplasma)	Intenzitás (1-3)
T-sejtes				
(n=14)	átlag	6,84	0,14	1,64
	szórás	5,08	0,35	0,61
B-sejtes				
(n=57)	átlag	6,23	0,07	1,89
	szórás	4,74	0,26	0,64
P-értékek		0,696	0,490	0,199



15. Ábra. A P-gp immunhisztokémiai jelölés mikroszkópos értékeléséből nyert adatok összehasonlító ábrája a T- és B-sejtes lymphomás betegek esetében. A P-gp expresszió átlagosan magasabb volt a T-sejtes lymphomás egyedekben, míg a festődés intenzitása a B-sejtes csoportban volt magasabb.

A T-sejtes (n = 14) és B-sejtes (n = 57) betegcsoportot külön vizsgálva szintén tapasztalható volt a P-gp expresszió (%) és a festődés intenzitása közötti szignifikáns korreláció (**8. táblázat**).

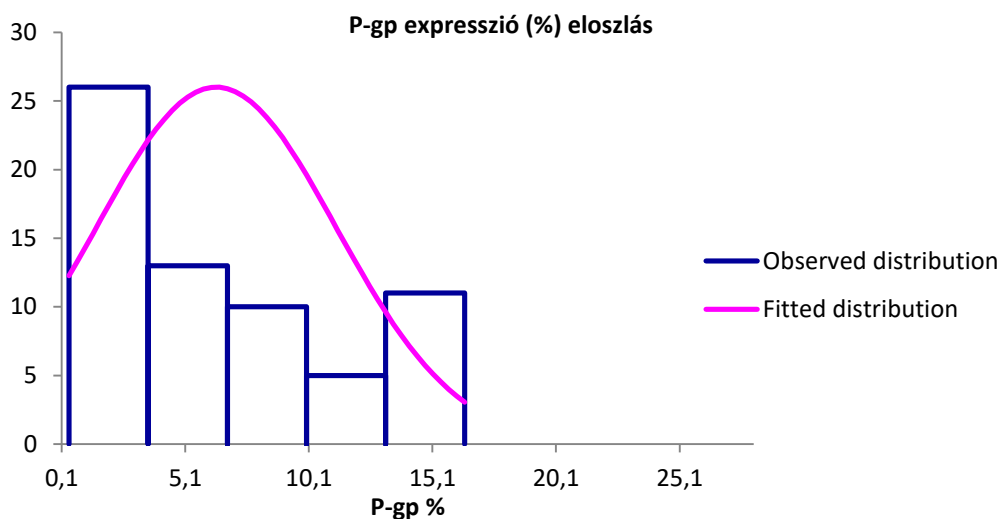
8. Táblázat. A P-gp százalékos expresszió (% átlag) és a festődés intenzitása (1-3) közötti összehasonlítások Pearson féle korrelációs analízissel.

Összes beteg (n=71)		T-sejtes (n=14)		B-sejtes (n=57)	
P-gp expresszió (%): Intenzitás (1-3)	0,445	P-gp expresszió: Intenzitás	0,561	P-gp expresszió: Intenzitás	0,434
P-érték	0,000101		0,036875		0,000744

Túlélési idők a P-gp expresszió, a jelölődés helyének és intenzitásának tekintetében az egész betegpopulációt figyelembe véve

A túlélési időket vizsgálva azon betegek, amelyek nyirokcsomójának P-gp expressziója a sejtmembránokon dominált, szignifikánsan később recidiváltak (RFP = medián 283 nap) ahhoz a betegcsoporthoz képest, melyek mintájának cytoplasmában volt tapasztalható pozitivitás (n = 6) (RFP = medián 92 nap) (p = 0,0497). Ez az összefüggés a teljes túlélési idők esetén is tapasztalható volt, de nem szignifikáns módon (p = 0,26).

A túlélési idők és expresszió mértékének összehasonlításához a P-gp kifejeződés százalékos eloszlása alapján cut off értéket határoztunk meg (**16. ábra**). Ezen cut off érték jelen esetben 6,4% volt a vizsgált populációra tekintve, és ez alapján végeztük a további túlélési vizsgálatokat.



16. Ábra. Az összes immunhisztokémiával jelölt minta (n = 71) P-gp százalékos festődésének eloszlási görbéje. A referencia intervallum alsó határa 0,53 volt, a felső határ 16,14. A 90%-os konfidencia intervallumok határai 0,4 és 0,8 értékek voltak alsó és felső határon (bootstrap módszerrel meghatározva).

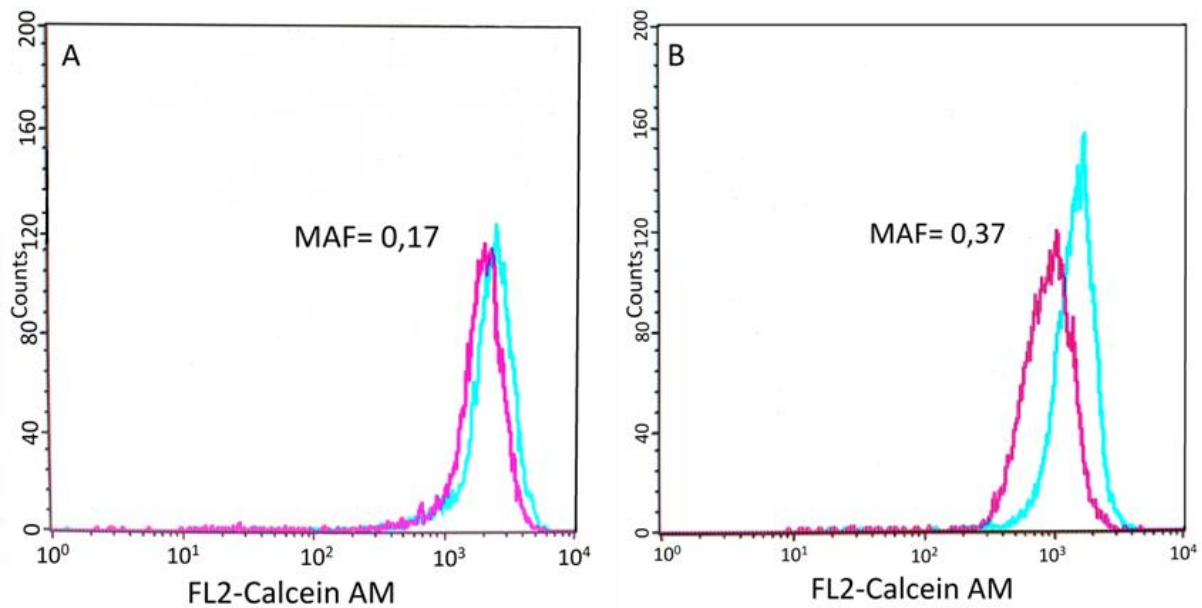
Eszerint elkülönítettük az alacsony (P-gp% < 6,4; n = 43) és magas (P-gp% > 6,4; n = 28) P-gp kifejeződést mutató csoportot. Sem az OST, sem RFP tekintetében nem igazolódott a két csoport között szignifikáns különbség. Az OST alapján a P-gp-t alacsonyabb mértékben expresszáló tumormintákhoz tartozó túlélés kissé hosszabb volt (medián: 398 nap) a 6,4% feletti P-gp festődő mintákhoz képest (medián: 351 nap) (p=0,813). Az RFP tekintetében ez a kapcsolat fordítottnak bizonyult. A 6,4% cut off alatti P-gp-vel rendelkezők kissé rövidebb ideig maradtak remisszióban (medián 263 nap) a magasabb P-gp expressziójú csoporthoz képest (medián 301) (p = 0,66) (**9. táblázat**).

9. Táblázat. A 6,4% cut off érték alapján létrehozott csoportok teljes túlélésre és recidíva mentes túlélésre vonatkozó adatai.

	P-gp < 6,4% OST	P-gp > 6,4% OST	P-gp <6,4% RFP	P-gp > 6,4% RFP
Elhullások száma (cenzorált adatok figyelmen kívül hagyásával)	33	20	31	19
Várható elhullás kockázata (Extent of exposure to risk of death)	33.818488	19.181512	29.478787	20.521213
Relatív ráta (Relative rate)	0.975798	1.042671	1.051604	0.925871
Medián túlélési idő (nap)	398	351	263	301
P-értékek				
<u>Log-rank (Peto):</u>	P = 0,8134		P = 0,6604	
<u>Generalised Wilcoxon (Peto-Prentice):</u>	P = 0,645		P = 0,8367	

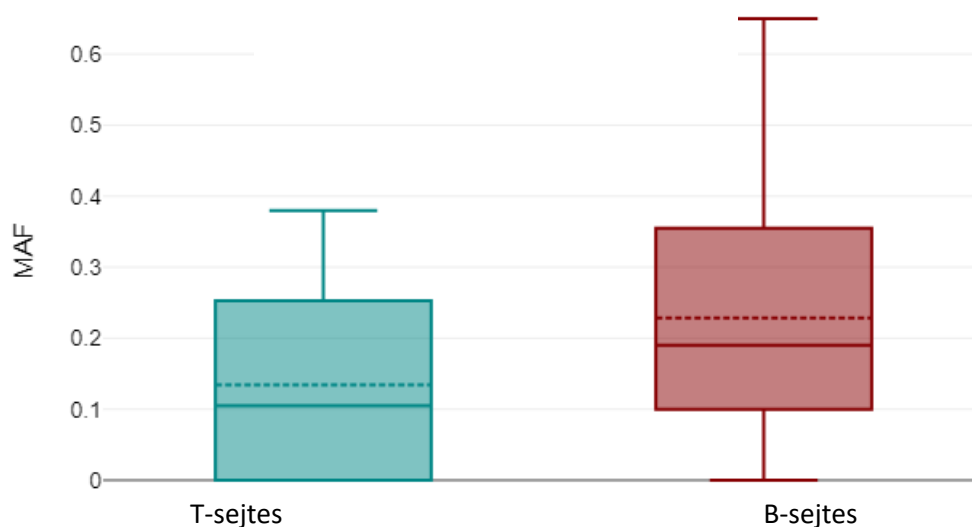
6.1.1. A P-glikoprotein funkcionalitás vizsgálatának értékelése

A teljes betegpopulációt tekintve P-gp aktivitásának áramlásos citometriai vizsgálatára az összes beteg esetében (n = 95; B-sejtes n = 79; T-sejtes n = 16) sor került. A Calcein teszttel végzett vizsgálat eredményének számszerű mutatója a Multidrogrezisztencia Aktivitási Faktor (MAF), egy dimenzió nélküli szám 0 és 1 közötti tartományban (5.4. fejezet). A verapamilal gátolt és gátlószer hozzáadása nélkül mért fluoreszcencia-különbséget hisztogrammon ábrázolhatjuk (**17. ábra**).



17. Ábra. Calcein teszt eredménye két lymphomás beteg példáján szemlélítve. A hisztogramok a verapamil jelenlétében (kék) vagy annak hiányában (lila) inkubálódott sejtpopulációk fluoreszcenciáját jelzik. (A) Ebben az esetben a P-gp aktivitás alacsonyabb volt, mint a (B) esetben. Az x-tengelyen a fluoreszcencia intenzitása, az y-tengelyen a sejtek száma látható. MAF: Multidrog rezisztencia Aktivitási Faktor.

A MAF eredmények tekintetében a T-sejtes lymphoma páciensek ($n = 16$) szignifikánsan alacsonyabb MAF értékekkel rendelkeztek (átlag MAF= 0,13) a B-sejtes csoporthoz ($n = 79$) képest (átlag MAF = 0,23) ($p = 0,037$) (**18. ábra**).



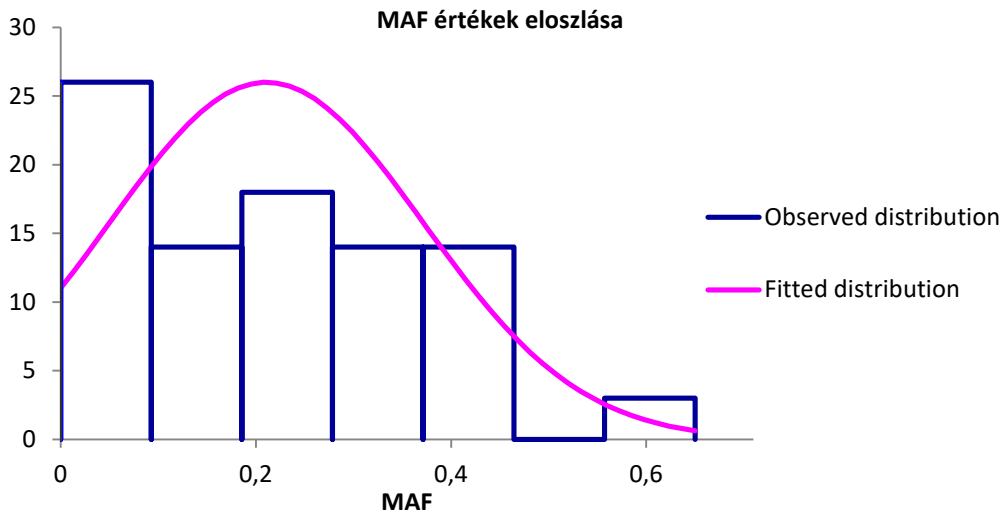
18. Ábra. A T- és B-sejtes lymphoma betegek MAF értékeit összehasonlító ábra. A B-sejtes páciensek MAF értékei szignifikánsan magasabbak voltak ($p = 0,037$).

Túlélési idők a P-gp funkció mutatója (MAF) tekintetében az egész betegpopulációt figyelembe véve

A MAF értékek eloszlása alapján a 0,19 cut off értéket határoztuk meg, mely szerint a betegeket alacsony ($MAF \leq 0,19$; $n = 49$) és magas ($MAF > 0,19$; $n = 46$) MAF értékkel rendelkező csoportokra osztottuk (**19. ábra**). OST esetében az alacsonyabb MAF csoport rövidebb túlélési idővel rendelkezett (medián 349 nap) a magasabb MAF csoporthoz képest (medián 417 nap), azonban szignifikáns összefüggés nem volt igazolható ($p = 0,457$). Az RFP értékek vizsgálatakor a cut off alatti MAF értékkel rendelkező betegek ugyancsak korábbi remissziót mutattak (medián 198 nap) a 0,19 feletti MAF értékkel bíró páciensekhez képest (medián 323 nap), de ez az összefüggés sem bizonyult szignifikánsnak ($p = 0,147$) (**10. táblázat**).

10. Táblázat. A 0,19 cut off érték alapján létrehozott csoportok teljes túlélésre és recidíva mentes túlélésre vonatkozó adatai.

	MAF < 0.19 OST	MAF > 0.19 OST	MAF < 0.19 RFP	MAF > 0.19 RFP
Elhullások száma (cenzorált adatok figyelmen kívül hagyásával)	31	37	33	34
Várható elhullás kockázata (Extent of exposure to risk of death)	28.028669	39.971331	27.219594	39.780406
Relatív ráta (Relative rate)	1.10601	0.925663	1.212362	0.854692
Medián túlélési idő (nap)	349	417	198	323
P-értékek <u>Log-rank (Peto):</u> <u>Generalised Wilcoxon (Peto- Prentice):</u>	P = 0.4569 P = 0.3787		P = 0,1473 P = 0.0647	



19. Ábra. Az összes beteg (n=95) MAF értékeinek eloszlási görbéje. A referencia intervallum alsó határa 0,0 volt, a felső határ 0,61. A 90%-os konfidencia intervallumok határai 0,0 és 0,44 értékek voltak alsó és felső határon (bootstrap módszerrel meghatározva).

P-glikoprotein expresszió valamint a mutidrogrezisztencia aktivitási faktor (MAF) összehasonítása teljes betegpopuláció esetében

Az összes beteget tekintve, szignifikánsan pozitív korreláció igazolódott a P-gp expresszió % és MAF értékek között ($r = 0,32$; $p = 0,007$), tehát minél magasabb volt a P-gp pozitív sejtek aránya a szövetmintában, annál magasabb MAF érték volt mérhető.

A MAF és P-gp helyeződése (membrán/cytoplasma) között nem volt összefüggés található ($r = 0,12$; $p = 0,307$). A MAF és P-gp expresszió intenzitásának tekintetében azonban szignifikáns pozitív korreláció volt igazolható, tehát a magasabb MAF értékkel rendelkező betegek P-gp intenzitása is magasabb volt ($r = 0,27$; $p = 0,024$).

6.2. B-sejtes lymphomás páciensek klinikai vizsgálati eredményei

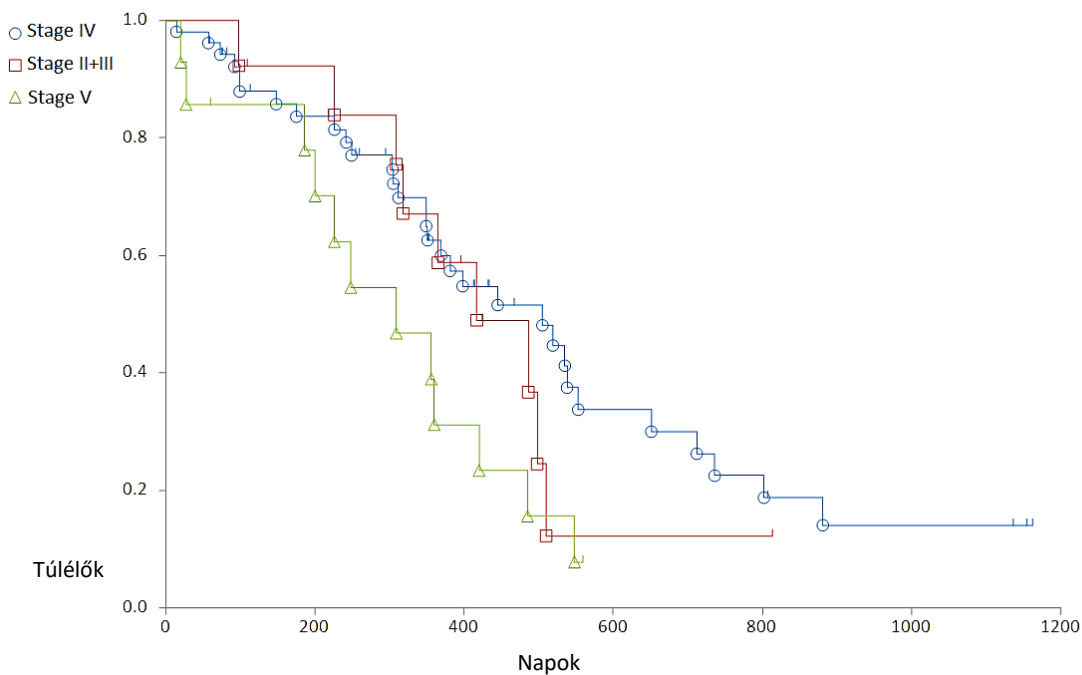
Az összes beteg klinikai stádiumba sorolását elvégeztük. A B-sejtes lymphoma betegek klinikai stádiumok szerinti csoportosítása az 5.1 fejezetben került leírásra. A későbbi vizsgálatokhoz az aránytalan megoszlás miatt a II. és III. stádiumú betegeket egy csoportba vettük. A median teljes túlélési idő (overall survival time; OST) 417 nap volt, a recidvamentes túlélési idő (relapse free period; RFP) pedig 301 nap volt. Vizsgálataink fontos részét képezték a terápia során mutatkozó mellékhatások megfigyelése. Lymphomához köthető elhalálozás 52 (65,8%) esetben volt tapasztalható, míg 27 (34,2%) olyan beteg volt, melyek más okból pusztultak el (úgy mint baleset, fertőzés, trauma, etc.). A kemoterápiát 33 esetben kellett a mellékhatások miatt halasztani. Az első protokoll során 63 beteg mutatott legalább egyféle mellékhatást a leggyakoribb négy tünet közül ($n = 63$), és 44 esetben egyszerre több tünet is jelentkezett ($n = 44$). A leggyakoribb mellékhatások a következők voltak; anorexia ($n = 48$), neutropenia ($n = 48$), hányinger ($n = 47$), hasmenés ($n = 30$), ezektől ritkábban, de nem elhanyagolható számú esetben volt tapasztalható steril vérzéses cystitis ($n = 6$). Egyéb, kevésbé markáns és ritkábban tapasztalható mellékhatások (úgy mint láz, trombocytopenia) nem kerültek feljegyzésre. Az Állatorvosi Onkológiai Együtműködési Csoport ajánlását követve, a különböző mellékhatások súlyossága szerint szintén csoportokba gyűjtöttük a betegeket; „grade 0” ($n=16$), „1” ($n=26$), „2” ($n=18$), „3” ($n=11$), „4” ($n=6$) és „5” ($n=2$). A mellékhatások átlagos súlyossága 1,63 értékpont volt. Az OST és RFP szignifikánsan negatív korrelációt mutatott ($p < 0,05$) a mellékhatások malignitási fokozatával összevetve. Azoknál a betegeknél, ahol a mellékhatások fenállása miatt halasztani kellett a gyógyszerbeadást, jellemzően egy héttel később pótolni tudtuk a kimaradt kezelést. Dózisredukcióra, vagyis a beadott gyógyszer mennyiségének 10-20%-al való csökkentésére, 16 esetben volt szükség ($n = 16$). Összességében, minden kezelést számításba véve ($n = 1501$) 48 esetben volt szükség a dózis csökkentésére (48/1501). A leírtakon felül 19 beteg ($n = 19/79$) visszaesett még a kemoterápiás protokoll befejezése előtt (19. hét előtt).

A túlélési eredmények összehasonlítása az egyes stádiumok között

OST tekintetében nagy különbségek voltak tapasztalhatóak az egyes stádiumok között (11. táblázat) (20. ábra), míg RFP tekintetében szignifikánsnak bizonyult ez a különbség némely csoportok között (12. táblázat) (21. ábra).

11. Táblázat. A B-sejtes lymphomás betegek teljes túlélési idejeinek összehasonlítása a klinikai stádiumok tekintetében a diagnózis meghozatalakor. A legmagasabb OST a IV. stádiumban lévő betegeknél volt tapasztalható.

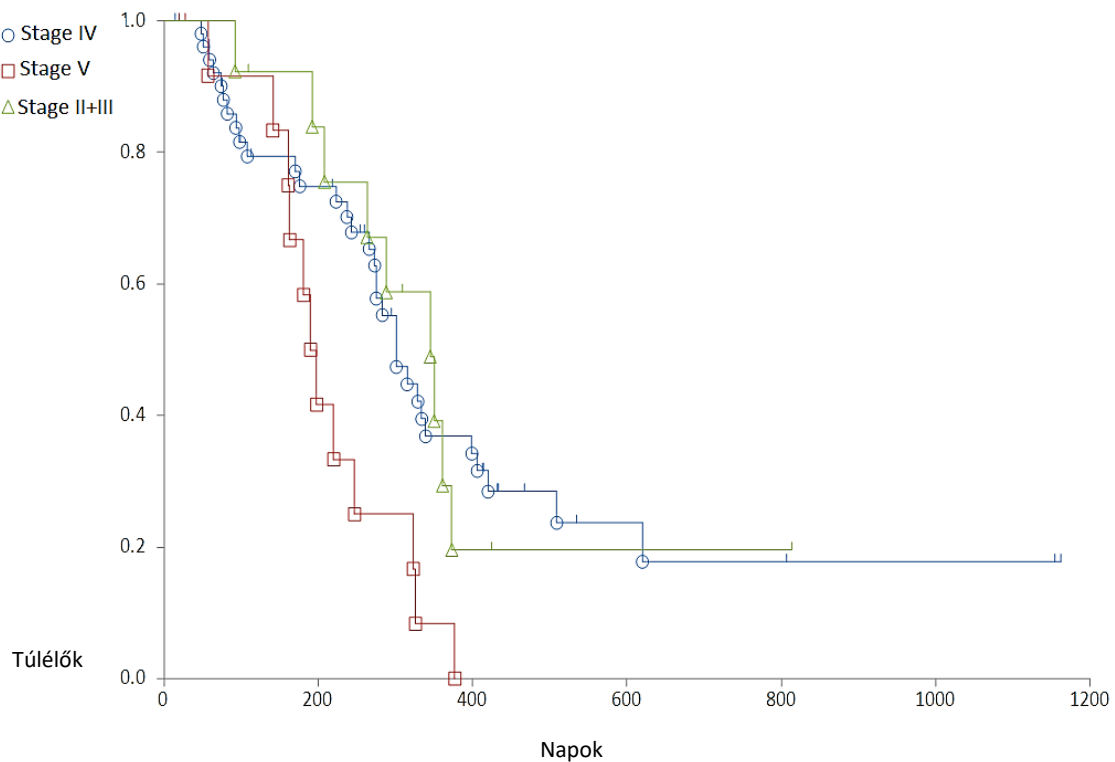
Stádium	II+III	IV	V	P-értékek
Esetszám	13	52	14	
Elhullások száma	9	31	12	
Várható elhullás kockázata (Extent of exposure to risk of death)	8.602	36.705	6.693	
Relatív ráta (Relative rate)	1.046	0.845	1.793	
Medián OST	417	505	309	
II+III vs IV				0.5159
II+III vs V				0.2356
IV vs V				0.0233



20. Ábra. Teljes túlélési idő (OST) összehasonlítása az egyes stádiumok között. stage II + III (piros négyzet), stage IV (kék kör), stage V (zöld háromszög).

12. Táblázat. A B-sejtes lymphomás betegek recidíva mentes túlélési idejeinek összehasonlítása a klinikai stádiumok tekintetében a diagnózis meghozatalakor. A legmagasabb RFP a II és III. stádiumban lévő betegeknél volt tapasztalható.

Stádium	II+III	IV	V	P-értékek
Betegszám	13	52	14	
Elhullások száma	9	32	12	
Várható elhullás kockázata (Extent of exposure to risk of death)	10.863	36.629	5.506	
Relatív ráta (Relative rate)	0.828	0.874	2.179	
Medián RFP	345	301	190	
II+III vs IV				0.8815
II+III vs V				0.0206
IV vs V				0.0062



21. Ábra. Recidívamentes túlélési idő (RFP) összehasonlítása az egyes stádiumok között. stage II + III (zöld háromszög), stage IV (kék kör), stage V (piros négyzet).

Összességében megállapítható, hogy a IV. stádium képviselői rendelkeztek a leghosszabb túlélési idővel (OST), de a II+III stádiumba tartozó betegek között a legmagasabb a recidíva mentes túlélési idő (RFP)

Az alstádiumok tekintetében a "b" (n=21) csoportban egyértelműen rövidebb túlélési idő mutatkozott (OST = 349 nap, RFP = 237 nap) az "a" csoporthoz képest (OST= 485 nap, RFP = 301 nap), ám a különbség nem szignifikáns ($p > 0,05$).

6.2.1. P-glikoprotein expressziójának kórszövettani vizsgálata B-sejtes lymphomás betegek esetén

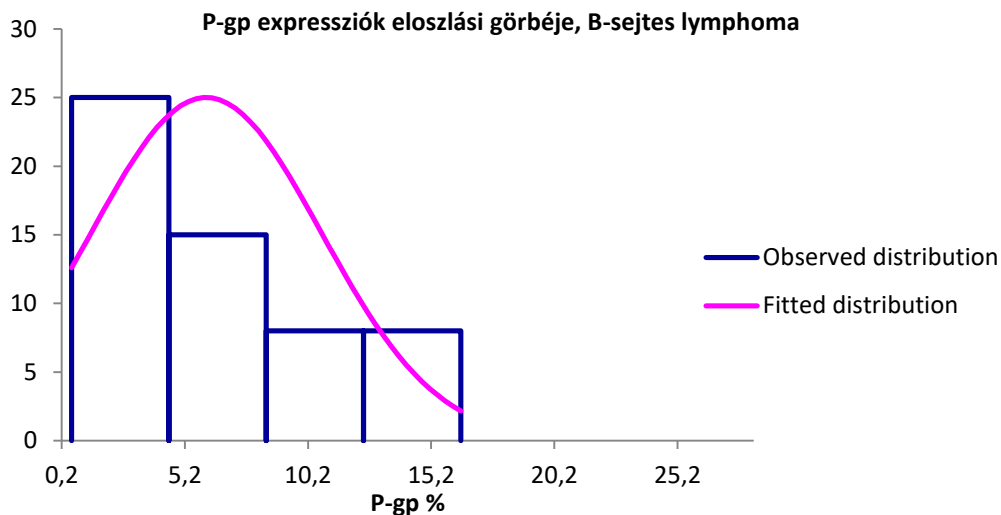
A B-sejtes lymphomás betegek esetén 57 betegből készült P-gp immunhisztokémiai jelölés az 5.3. fejezetben leírt módszernek megfelelően. Az adatokat a **13. táblázat** mutatja.

13. Táblázat. A B-sejtes lymphomás betegek daganatos mintáin elvégzett P-gp immunhisztokémiai jelölés eredményei.

A beteg sorszáma	P-gp expresszió (%)	P-gp mintázat	P-gp intenzitás	A beteg sorszáma	P-gp expresszió (%)	P-gp mintázat	P-gp intenzitás
1	15,0	membrán	3	29	6,0	cytoplasma	3
2	1,0	membrán	2	30	1,6	membrán	2
3	5,0	membrán	2	31	6,0	membrán	2
4	14,8	membrán	2	32	16,4	membrán	3
5	2,2	membrán	2	33	3,0	membrán	2
6	3,4	membrán	2	34	16,0	membrán	3
7	10,6	membrán	2	35	10,2	membrán	1
8	1,8	membrán	1	36	6,8	membrán	1
9	2,4	membrán	2	37	1,8	membrán	2
10	7,0	membrán	3	38	0,8	membrán	1
11	1,0	membrán	2	39	1,2	membrán	1
12	9,8	membrán	3	40	6,4	membrán	2
13	3,2	membrán	2	41	0,8	membrán	1
14	3,0	membrán	1	42	6,0	membrán	2
15	14,0	cytoplasma	2	43	13,8	membrán	1
16	2,4	membrán	1	44	1,2	membrán	2
17	2,3	membrán	2	45	13,8	membrán	2
18	0,8	membrán	1	46	4,0	membrán	1
19	2,0	membrán	2	47	4,6	membrán	2
20	0,6	membrán	1	48	9,8	cytoplasma	1
21	5,0	membrán	2	49	4,4	membrán	2
22	14,4	membrán	2	50	1,6	membrán	1
23	5,6	membrán	1	51	10,6	membrán	3
24	4,8	membrán	2	52	12,0	membrán	3
25	14,4	cytoplasma	2	53	5,4	membrán	2
26	11,0	membrán	2	54	7,0	membrán	2
27	8,0	membrán	3	55	8,6	membrán	2
28	1,8	membrán	2	56	5,0	membrán	2
				57	2,8	membrán	2

Az 57 B-sejtes lymphomás betegek P-gp jelölt mintáiban átlag 6,23 %-os pozitívitas volt tapasztalható. Az immunhisztokémiával meghatározott egyes lymphoma altípusok között az aránytalan megoszlás miatt a P-gp értékek összehasonlítása nem volt lehetséges. A P-gp-vel is jelölt szövetminták altípusai a következők voltak; diffúz nagy B-sejtes lymphoma (n = 51), follicularis B-sejtes lymphoma (n = 2), nagy sejtes immunoblastos lymphoma (n = 2), marginális zóna lymphoma (n = 2). Érdekesség azonban, hogy az immunoblastos lymphoma betegek P-gp értéke átlag 9,6 %, míg a marginális zóna lymphoma betegek mintáin az expresszió jóval alacsonyabb, átlag 2,4 %.

A százalékban meghatározott értékek eloszlása alapján a cut off P-gp érték a B-sejtes lymphomás csoportban 6% lett. A későbbi túlélési adatok összehasonlításához a betegeket ezen cut off érték szerint két csoportra osztottuk az alapján, hogy a P-gp expresszió 6% alatti (P-gp % < 6; n = 32) vagy 6% feletti (P-gp % > 6; n = 25) (**22. ábra**).



22. Ábra. Az B-sejtes lymphoma betegek immunhisztokémiával jelölt mintáin (n = 57) a P-gp százalékos festődésének eloszlási görbéje. A referencia intervallum alsó határa 0,69 volt, a felső határ 16,23. A 90%-os konfidencia intervallumok határai 0,69 és 14,4 értékek voltak alsó és felső határon (bootstrap módszerrel meghatározva).

A túlélési eredmények összehasonlító vizsgálata a P-gp értékek tükrében a B-sejtes lymphomás betegcsoportban

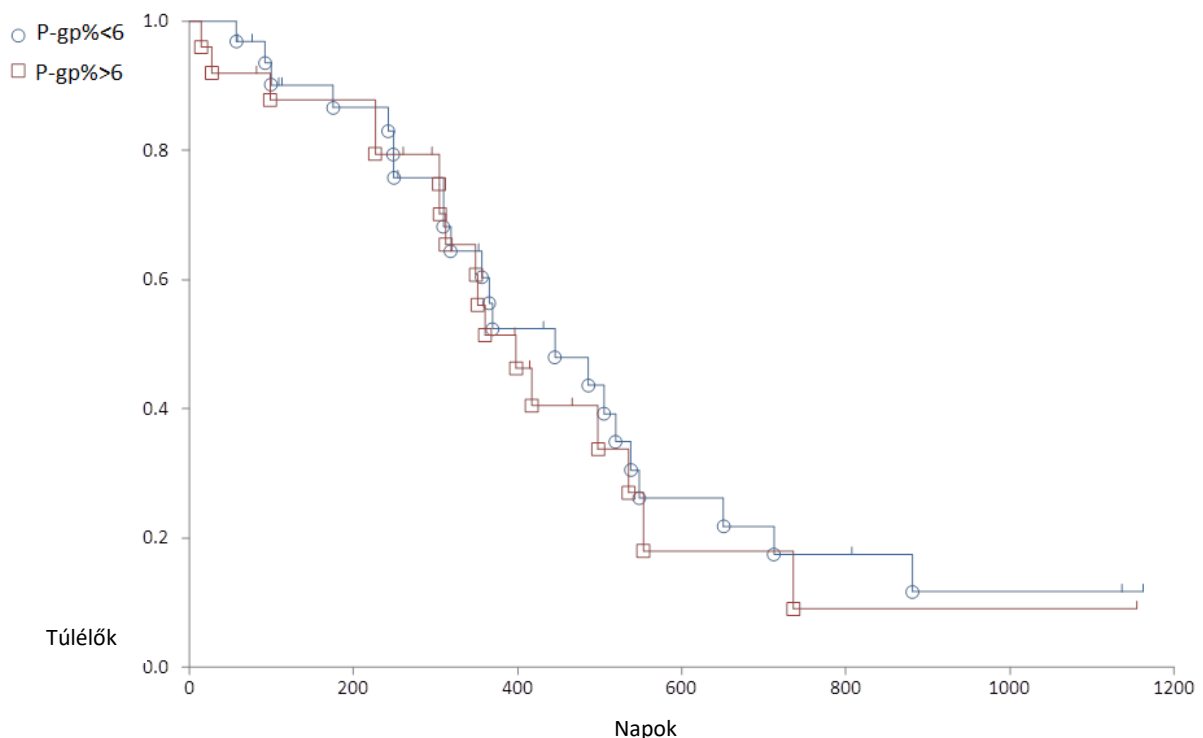
Az eloszlás alapján létrehozott csoportokat összehasonlítva az OST és RFP tekintetében nem volt igazolható szignifikáns különbség. A cut off érték szerint meghatározott magas és alacsony P-gp csoportokat a **14. táblázat** mutatja.

Az alacsony, tehát 6% alatti P-gp expresszióval rendelkező csoportban a medián teljes túlélés 445 nap volt (medián OST = 445 nap), míg a magas P-gp csoportban medián 398

nap (medián OST = 398 nap) (**23. ábra**). Az alacsonyabb P-gp csoport kevésbé hosszabb medián túlélési időket produkált, a különbség azonban nem volt szignifikáns ($p = 0,659$).

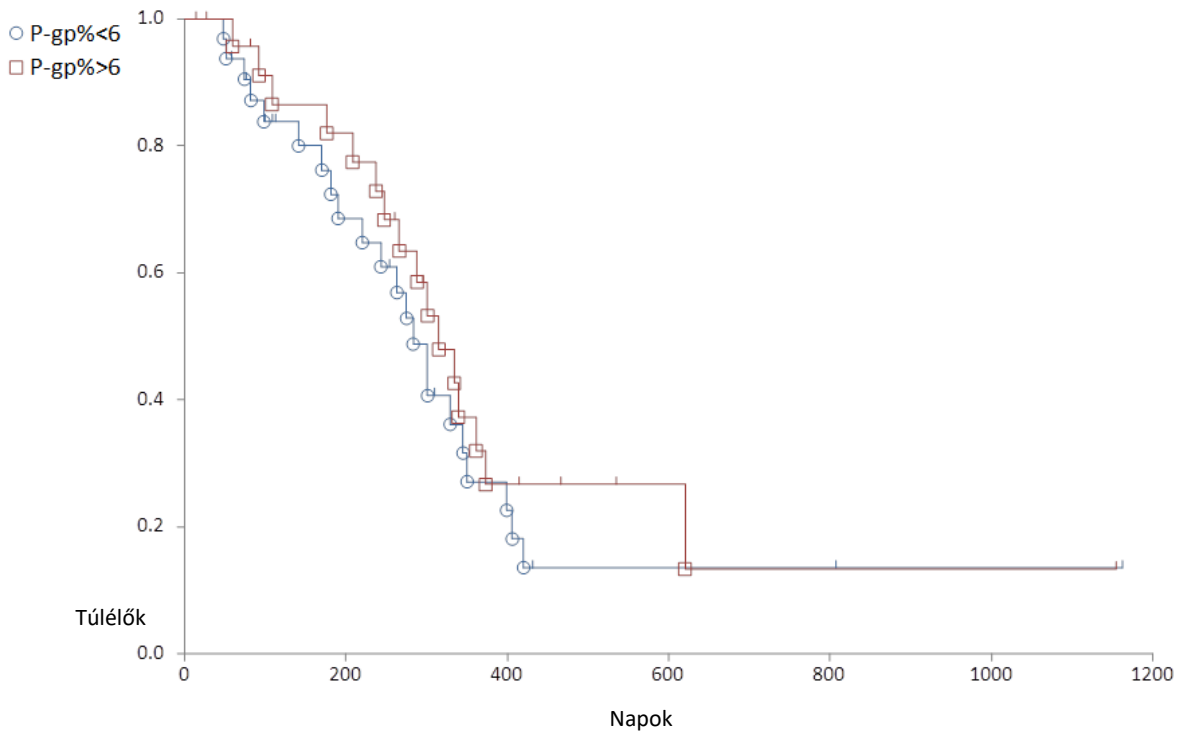
14. Táblázat. A 6% cut off érték alapján létrehozott csoportok teljes túlélésre és recidíva mentes túlélésre vonatkozó adatai B-sejtes lymphoma páciensekben.

	P-gp < 6% OST	P-gp > 6% OST	P-gp < 6% RFP	P-gp > 6% RFP
Elhullások száma (cenzorált adatok figyelmen kívül hagyásával)	22	17	22	16
Várható elhullás kockázata (Extent of exposure to risk of death)	23.380767	15.619233	19.706344	18.293656
Relatív ráta (Relative rate)	0.940944	1.088402	1.116392	0.87462
Medián túlélési idő (nap)	445	398	283	315
P-értékek	0.659		0.4541	



23. Ábra. A teljes túlélési idők (OST) összehasonlítása a B-sejtes lymphomás betegcsoportban a 6% a P-gp expresszió, mint cut off érték figyelembe vételével (kék kör: P-gp < 6 %, n = 32; piros négyzet: P-gp > 6 %, n = 25).

A recidíva mentes túlélési időket összességében tekintve a P-gp expresszió és a RFP pozitívan korrelálnak egymással ($r = 0,154$). Az alacsony P-gp csoport medián RFP 283 nap ($n = 32$), míg a magas P-gp csoportban az RFP medián 315 nap volt ($n = 25$) (**24. ábra**). Az alacsonyabb P-gp csoport rövidebb recidíva mentes túlélési időt mutatott a magasabb P-gp-vel rendelkező csoporthoz képest ($p = 0,45$).



24. Ábra. A recidíva mentes túlélési idők (RFP) összehasonlítása a B-sejtes lymphoma csoportban a 6% a P-gp expresszió, mint cut off érték figyelembe vételével (kék kör: P-gp < 6 %, $n = 32$; piros négyzet: P-gp > 6 %, $n = 25$).

6.2.2. P-glikoprotein funkcionális vizsgálata B-sejtes lymphomás betegek esetén

A P-gp funkcionális vizsgálatát a 79 B-sejtes lymphoma beteg nyirokcsomó mintájából áramlásos citométerrel végeztük az 5.4. fejezetben leírtaknak megfelelően.

A **15. és 16. táblázatban** a MAF értékeket összehasonlítottuk az egyes stádiumokban szereplő betegek között.

15. Táblázat. MAF értékek összehasonlítása az egyes stádiumok között.

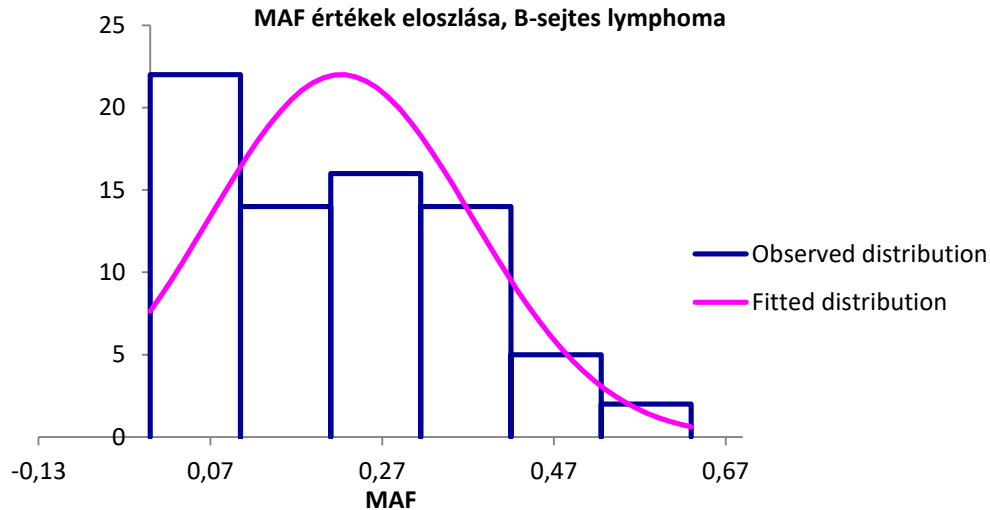
	Stádium II+III	Stádium IV	Stádium V
Esetszám	13	52	14
Átlag MAF	0.205	0.236	0.233
SD (standard deviáció)	±0.109	±0.175	±0.133
P-érték	One way ANOVA global test: P = 0.8231		

16. Táblázat. MAF értékek összehasonlítása az egyes alstádiumok között.

	Substage "a"	Substage "b"
Esetszám	58	21
Átlag	0.235	0.216
SD	0.164	0.149
P-érték	One way ANOVA, global test: = 0.6559	

Az diagnóziskor megállapított IV. stádiumban lévő betegek esetében volt megfigyelhető a legmagasabb MAF átlag, de szignifikáns különbségek egyik csoportok közötti összehasonlításban sem voltak (14. táblázat). Hasonlóképpen az egyes alstádiumok MAF értékei között sem volt jelentős különbség (15. táblázat).

A betegek eredményeiből kapott MAF értékek megoszlását a **25. ábra** mutatja.



25. Ábra. Az B-sejtes lymphomás betegek Calcein vizsgálata alapján számított MAF adatok ($n = 79$) eloszlási görbéje. A referencia intervallum alsó határa 0,0 volt, a felső határ 0,588. A 90 %-os konfidencia intervallumok határai 0,0 és 0,44 értékek voltak alsó és felső határon (bootstrap módszerrel meghatározva).

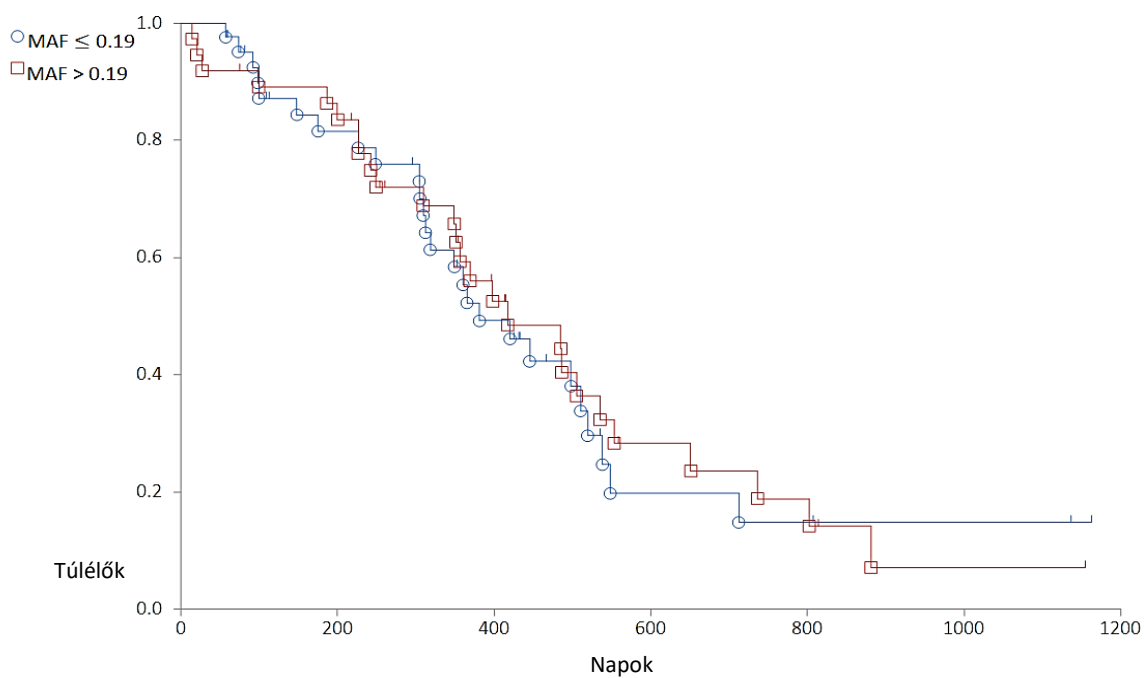
A MAF értékeken alapuló összehasonlító vizsgálatokat az eloszlás szerinti 0,19 cut off érték használatával végeztük el. A túlélési adatok vizsgálatához a betegeket két csoportra osztottuk, az alapján, hogy MAF értékeik 0,19 alattiak ($MAF \leq 0,19$; alacsony MAF; $n = 42$) vagy 0,19 fölöttiek ($MAF > 0,19$; magas MAF; $n = 37$).

A túlélési eredmények összehasonlító vizsgálata a MAF értékek tükrében

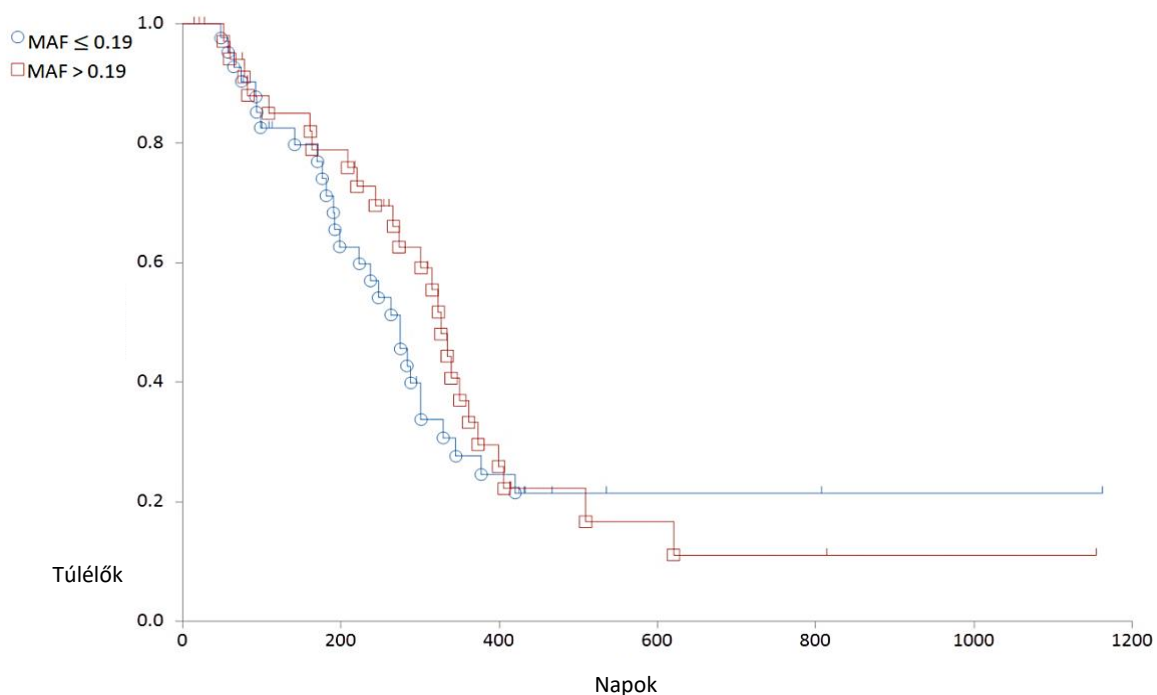
A B-sejtes lymphomás páciensek túlélési eredményei és a MAF értékek között pozitív korreláció volt tapasztalható, tehát magasabb MAF értéknél hosszabb túlélést tapasztaltunk ($r[OST] = 0,18$; $r[RFP] = 0,202$) (táblázat). Az alacsony, illetve magas MAF csoport között a túlélési időket tekintve nem volt tapasztalható jelentős különbség az OST tekintetében ($p = 0,8897$). Az alacsonyabb MAF-al rendelkező csoport medián OST = 381 nap, magas MAF csoportban medián OST = 417 nap volt (**26. ábra**). Az RFP értékeket illetően azon betegek csoportja, amelyek MAF értéke a cut-off értékkel volt egyenlő vagy alatta volt, korábbi relapszus jellemezte őket (medián RFP = 275) a másik csoporttal szemben (medián RFP = 326 nap) ($p = 0,5878$) (**27. ábra, 17. táblázat**).

17. Táblázat. A B-sejtes lymphomás páciensek túlélési idejei a 0,19 cut off érték alapján elosztva.

	OST (napok)	RFP (napok)
MAF\leq0,19 (n=36)	381	263
MAF > 0,19 (n=43)	485	326
P-értékek	0.8823	0.2735



26. Ábra. B-sejtes lymphomás betegek teljes túlélési idejeinek összehasonlítása 0,19 cut off MAF figyelembe vételével (kék kör: MAF \leq 0,19, n = 42; piros négyzet: MAF > 0,19, n = 37).



27. Ábra. B-sejtes lymphomás betegek recidívamentes túlélési idejeinek összehasonlítása 0,19 cut off MAF figyelembe vételével (kék kör: MAF \leq 0,19, n = 42; piros négyzet: MAF $>$ 0,19, n = 37).

További összehasonlítások a B-sejtes lymphomás páciensek esetén

A P-gp és MAF értékek erősen pozitívan korrrelálnak egymással a B-sejtes lymphoma betegek mintáinak vizsgálata alapján ($r = 0,455$). Tehát minél magasabb volt egy beteg szövetmintájának P-gp expressziója, annál magasabb volt a MAF érték is abban az 57 beteg esetében, amelyből mindkét vizsgálatot elvégeztük.

Annak érdekében, hogy a MAF értékek és a túlélési idők kapcsolót befolyásoló tényezőket keressük, további csoportokat hoztunk létre a medián MAF (0,19) és az összes B-sejtes lymphomás beteg medián RFP (301 nap) alapján (**18. táblázat**).

Összesen 34 beteg esetében a MAF prediktivitása ráillett a betegek kórtörténetére. Ezek a betegek alkották az 1. csoportot. Képviselőik a 0,19 MAF értéke alatt szignifikánsan hosszabb (1a. csoport; n = 13) vagy 0,19 MAF-érték felett felett szignifikánsan rövidebb (1b. csoport; n = 21) ideig éltek.

A 2. csoportot azok a betegek alkották (n = 29), melyek rövidebb túléléssel együtt (< 301nap) alacsony MAF értéket (\leq 0,19) mutattak (n = 29).

A 3. csoportba azok a betegek kerültek, amelyek a várhatónál hosszabb túlélést mutattak (> 301 nap), magasabb MAF értékkel (> 0,19) (n = 16).

Az egyes csoportok közötti túlélési összehasonlítások csaknem minden esetben szignifikánsnak bizonyultak.

18. Táblázat. Az 1-3 csoportok közti túlélési idők összehasonlítása. Cs: Csoport

	1a Cs (n=13)	1b Cs (n=21)	1 Cs (n=34)	2 Cs (n=29)	3 Cs (n=16)	P-érték (Cs 1a vs Cs 1b)	P-érték (Cs 1 vs Cs 2)	P-érték (Cs 1 vs Cs 3)	P-érték (Cs 2 vs Cs 3)
medián OST	538	279	398	312	553	<0,0002	0,1298	0,0464	0,0012
medián RFP	484	220	301	192	399	<0,0001	0,0002	0,2021	< 0,0001

A fentebb meghatározott csoportokat összehasonlítottuk a terápia során megjelenő mellékhatások, valamint a kezelések kényszerű halasztásainak figyelembe vételével. A gyógyszer-mellékhatások, nem kívánatos tünetek az ún. Veterinary Cooperative Oncology Group common terminology criteria (VCOG-CTC) útmutatásai alapján lettek súlyosság („grade”) szerint rangsorolva (1-5) (lásd 6.1.1 fejezet). A leggyakrabban előforduló mellékhatások közül (hányás, hasmenés, neutropénia, vérzéscystitis) aszerint határoztuk meg a „grade”-t, amely a legsúlyosabb volt. A megjelenő mellékhatások súlyossága kedvezőtlenül korrelált a várható túlélési idővel. Ugyanakkor a MAF értékek is szignifikánsan negatív korrelációt mutattak a mellékhatások súlyosságával ($r = -0,349$, $p < 0,05$), és a megcsúszott kezelések alkalmával ($r = -2,23$, $p < 0,05$) (**19. táblázat**). Tehát a betegek mutattak egy mintázatot, miszerint minél alacsonyabb MAF értékkel rendelkeztek, annál súlyosabb mellékhatások jelentkeztek, és annál gyakrabban kellett miattuk a kezeléseket halasztani. Ez pedig összefüggést sejtet azzal, hogy az alacsonyabb túléléssel rendelkező betegek, alacsonyabb MAF értéke ($\leq 0,19$) összefüggésben lehet a gyógyszerek okozta fokozottabb toxicitással.

19. Táblázat. A mellékhatások súlyosságának és megcsúszott kezeléseknél összehasonlítása a MAF értékekkel és túlélési időkkel.

Változó 1	Változó 2	Pearson R-érték	Lineáris regresszió, Korrelációs együttható (Kendall's)	P-értékek
MAF	Mellékhatások súlyossága	-0,3347	-0,258	0,0025
MAF	Megcsúszott kezelések a mellékhatások miatt	-0,2734	-0,264	0,0052
OST	Mellékhatások súlyossága	-0,3019	-0,235	0,0052
RFP	Mellékhatások súlyossága	-0,2232	0,214	0,0111

Amennyiben az egyes csoportokat külön tekintjük, a 2. csoportban gyakrabban volt szükség a kemoterápiás kezelés halasztására (58,6%), mint az 1. (35,3%), és a 3. csoportban (25%). A mellékhatások súlyossága tekintetében az 2. csoportba tartozó betegek szignifikánsan súlyosabbak voltak (átlag grade: 2,21), mint a 3. csoport (átlag grade: 1,13) vagy az 1. csoport tagjainál (átlag grade: 1,38). A mellékhatások miatt több esetben szükség volt dózisredukcióra, mely mindhárom csoportot hasolóképp érintette (**20. táblázat**).

20. Táblázat. Az egyes csoportok közötti összehasonlítás, figyelembe véve a kezeléseknél kényeszerű csúsztatását, a dózisredukciót, a mellékhatások súlyosságát, és az anorexiát. Cs: csoport, SD: standard deviáció

Figyelembe vett paraméter	1 Csoport	2 Csoport	3 Csoport	P-érték
Megcsúszott kezelés				
Előfordulás/Összes eset	12/34	17/29	4/16	
%	35,3	58,6	25,0	
Cs 1 vs. Cs 2				0,0641
Cs 1 vs. Cs 3				0,4667
Cs 2 vs. Cs 3				0,0304
Dózisredukció				
Előfordulás/Összes eset	6/34	8/29	3/16	
%	17,64	27,58	18,75	
Cs 1 vs. Cs 2				0,344254
Cs 1 vs. Cs 3				0,924557
Cs 2 vs. Cs 3				0,509106

Mellékhatások súlyossága	1 Csoport	2 Csoport	3 Csoport	P-érték
Esetszám	34	29	16	
Átlag	1.38	2.21	1.13	
± SD	1.26	1.35	0.78	
Cs 1 vs. Cs 2				0,0173
Cs 1 vs. Cs 3				0,3925
Cs 2 vs. Cs 3				0,0018
Étvágytalanság				
Előfordulás/Összes eset	18/34	21/29	9/16	
%	52.94	72.41	56.25	
Cs 1 vs. Cs 2				0,1126
Cs 1 vs. Cs 3				0,8266
Cs 2 vs. Cs 3				0,2708

A 79 betegből 76 beteg kapott első kemoterápiás protokollként CHOP protokollt, 3 beteg pedig L-CHOP protokollt. A CHOP protokoll 19 hete alatt a 2. csoport képviselői között jóval gyakrabban (48,3%) mutatkoztak ismét a lymphoma tünetek (recidíva) a protokoll befejezése előtt, mint a többi csoport betegeinél (**21. táblázat**)

21. Táblázat. Az egyes csoportok közötti összehasonlítás a korai (kezelés első 19 hete alatt) visszaesések figyelembevételével.

Recidíva a kezelés első 19 hetén belül	1 Csoport	2 Csoport	3 Csoport	P-érték
Előfordulás/ Összes eset	4/34	14/29	1/16	
%	11.7	48.3	6.25	
Cs1 vs. Cs2				0,0014
Cs1 vs. Cs3				0,5443
Cs2 vs. Cs3				0,0042

A szövetszövetmintákon meghatározható Ki-67 pozitivitás (%) tekintetében nem volt felfedezhető szignifikáns különbség az egyes csoportok között. A legmagasabb expressziót a 3. csoport képviselői mutatták (n = 11; 44,77 %), míg az 1. (n = 20; 40,25 %) és 2. (n = 20; 40,7 %) csoportok képviselőinél kissé alacsonyabb volt a jelölt sejtek aránya.

6.3. T-sejtes lymphomás betegek klinikai vizsgálati eredményei

A T-sejtes lymphomás betegek klinikai stádiumok szerinti csoportosítása az 5.1 fejezetben került leírásra. Ebben a csoportban a medián OST 168 nap, a medián RFP pedig 117 nap volt.

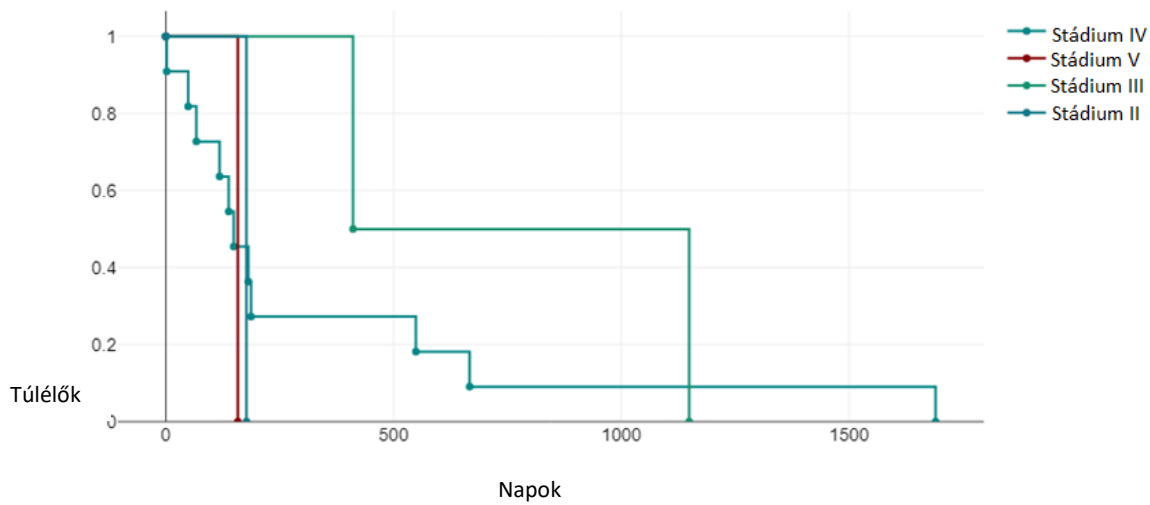
A páciensek mindegyike (n = 16) lymphomához köthetően hullott el (recidíva, terápiaerezisztencia). A kemoterápiás kezeléseket összesen 48 alkalommal kellett elhalasztani a mellékhatások miatt. A dózis redukálására összesen 8 alkalommal volt szükség. Ezen esetekben a beteg a gyógyszeradag 80 vagy 90%-át kapta meg az adott héten. Azon betegek, amelyenél a gyógyszerhatások miatt halasztani kellett a következő kezelést, jellemzően további 7 napos regenerációs időt követően kapták meg a következő dózisukat. Az első kemoterápiás ciklus alatt 14 betegnél jelentkeztek mellékhatások a kezeléseket követően. A mellékhatások előfordulása gyakorisági sorrendben a következő volt; anorexia (n = 10), hasmenés (n = 9), neutropénia (n = 8), hányinger (n = 5), steril vérzéses cystitis (n = 2). A mellékhatások súlyosságát a 6.1.1. fejezetben említett súlyossági rendszer alapján határoztuk meg a következő képpen; „grade 0” (n = 2), „1” (n = 1), „2” (n = 8), „3” (n = 4), „4” (n = 1) és „5” (n = 0). A mellékhatások súlyosságának átlagértéke 2,36 értékpont volt. Az OST és RFP is negatív korrelációt mutatott a mellékhatások súlyosságával. Recidíva, tehát a tünetek ismételt jelentkezése 9 esetben volt tapasztalható az első cikluson (19 héten) belül (9/16).

A túlélési eredmények összehasonlítása az egyes stádiumok között

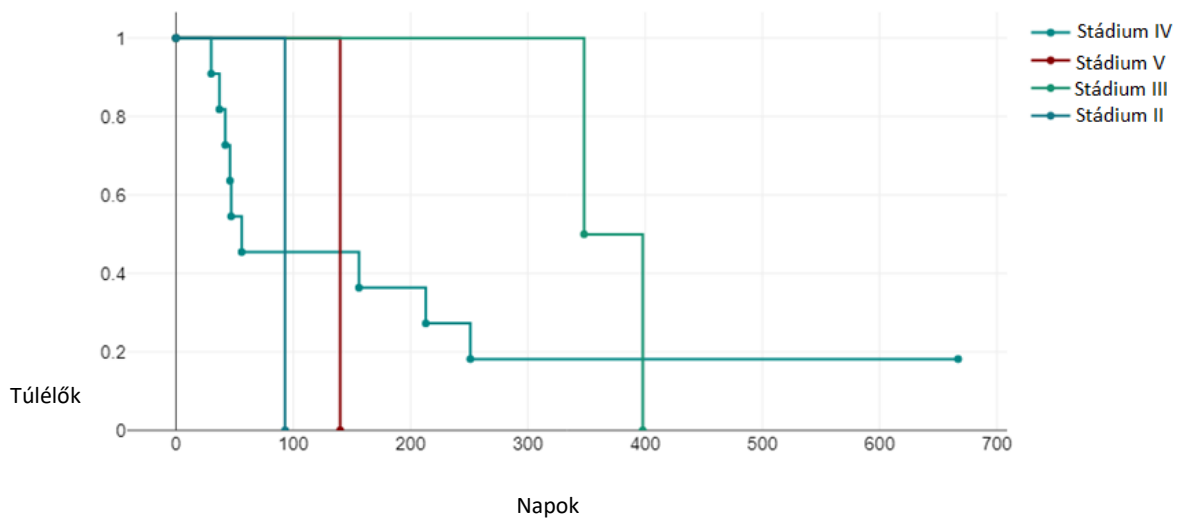
A T-sejtes lymphoma betegek túlélését először Stádiumok szerint hasonlítottuk össze. A kis elemszám miatt nem voltak radikális különbségek. A III. és IV. stádiumú betegek túlélési idejei között szembetűnő, hogy a magasabb stádiumú betegek rövidebb ideig voltak remisszióban, illetve rövidebb ideig éltek (**22. táblázat és 28, 29. ábra**).

22. Táblázat. A T-sejtes lymphomás betegek túlélési idejeinek összehasonlítása a klinikai stádiumok tekintetében a diagnózis meghozatalakor.

	medián OST (napok)	medián RFP (napok)
Stádium II (n=1)	177	93
Stádium III (n=2)	780	398
Stádium IV (n=11)	149	56
Stádium V (n=2)	158	140
Log rank	0.698	0.739



28. **Ábra.** A T-sejtes lymphomás betegek teljes túlélési idejei (OST) stádiumonként Kaplan-Meier túlélési görbén ábrázolva.

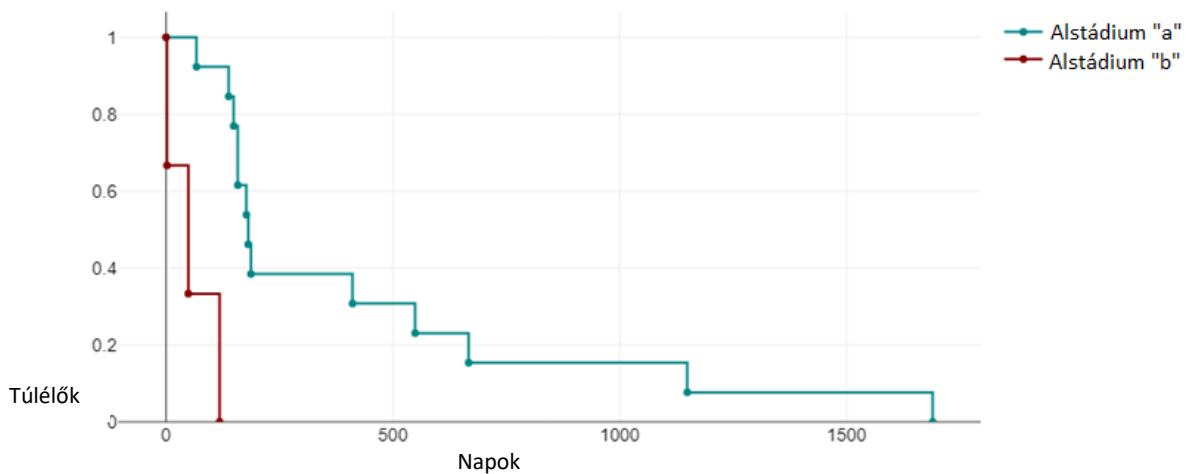


29. **Ábra.** A T-sejtes lymphomás betegek recidívamentes túlélési idejei (RFP) stádiumonként, Kaplan-Meier túlélési görbén ábrázolva.

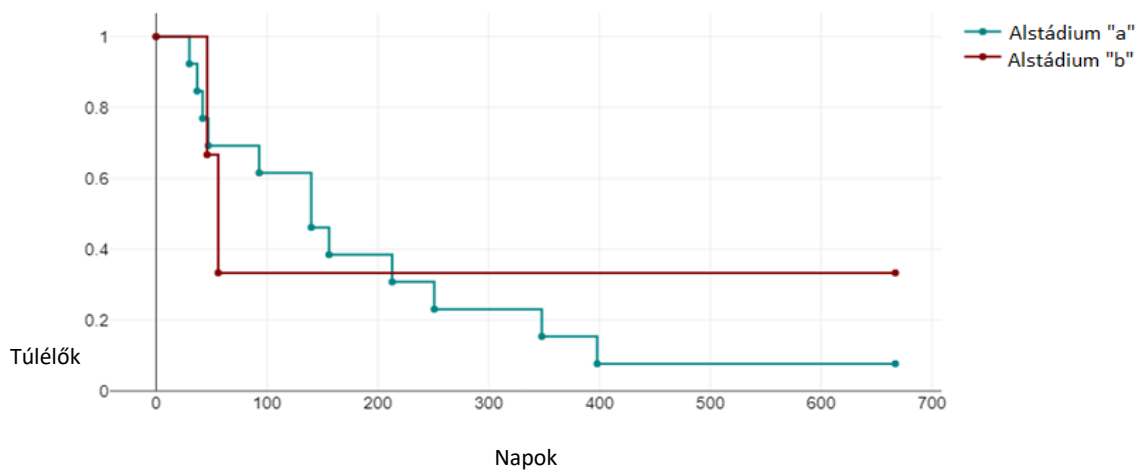
Az alstádiumok tekintetében a “b” (n = 3) csoportban egyértelműen rövidebb túlélési idők mutatkoztak az “a” (n = 13) csoporthoz képest (23. táblázat). Az OST alapján ábrázolható Kaplan-Meier túlélési görbét a 30. ábra mutatja, az RFP szerinti görbe a 31. ábrán vizsgálható.

23. Táblázat. A T-sejtes lymphomás betegek túlélési idejeinek összehasonlítása az alstádiumok tekintetében a diagnózis meghozatalakor.

	medián OST (napok)	medián RFP (napok)
Alstádium a (n=13)	181	140
Alstádium b (n=3)	49	56
Log rank	<0.001	<0.001



30. Ábra. A T-sejtes lymphomás betegek teljes túlélési idejei (OST) alstádium csoportonként Kaplan-Meier túlélési görbén ábrázolva.



31. Ábra. A T-sejtes lymphomás betegek recidívamentes túlélési idejei (RFP) alstádium csoportonként Kaplan-Meier túlélési görbén ábrázolva.

6.3.1. P-glikoprotein expressziójának kórszövettani vizsgálata T-sejtes lymphomás betegek esetén

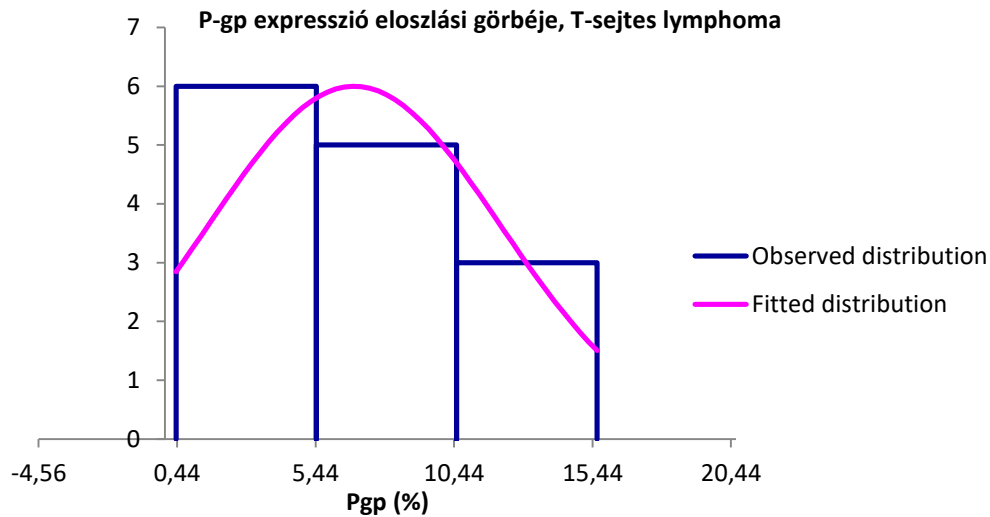
A T-sejtes lymphomás betegek közül (n = 14/16) 14 esetben volt lehetőség P-gp immunhisztokémiai jelölésre, a vizsgálat menete az 5.3 fejezetben leírtaknak megfelelően történt. A fénymikroszkópos értékelés során a B-sejtes páciensek mintáihoz hasonlóan meghatároztuk a festődés helyét és intenzitását (**24. táblázat**).

A T-sejtes lymphomás betegek mintáiban átlagosan 6,84 %-os P-gp expresszió volt tapasztalható. A kórszövettanilag értékelt altípusok a következők voltak; perifériás T-sejtes lymphoma-más alcsoportba nem sorolható típusa (n = 13), T-sejtes lymphoblastos lymphoma (n = 1). A kis elemszám miatt az egyes alcsoportok között a P-gp tekintetében nem volt végezhető összehasonlítás. Pozitív korreláció állapítható meg a P-gp pozitivitás és a jelölődés intenzitása között (r = 0,561), tehát minél magasabb volt egy minta P-gp expressziója, annál intenzívebb volt a jelölődés (p = 0,036) (8. táblázat).

24. Táblázat. A T-sejtes lymphoma páciensek szövettani mintáinak P-gp-re vonatkozó vizsgálati eredményei

Beteg sorszáma	P-gp expresszió (%)	Festődés helye	P-gp intenzitás
1	5,8	membrán	3
2	8,0	membrán	2
3	5,0	membrán	2
4	2,0	membrán	1
5	1,4	membrán	1
6	15,6	cytoplasma	2
7	2,0	membrán	1
8	15,0	membrán	2
9	0,4	membrán	1
10	9,0	cytoplasma	1
11	0,8	membrán	1
12	9,2	membrán	2
13	8,0	membrán	2
14	13,6	membrán	2

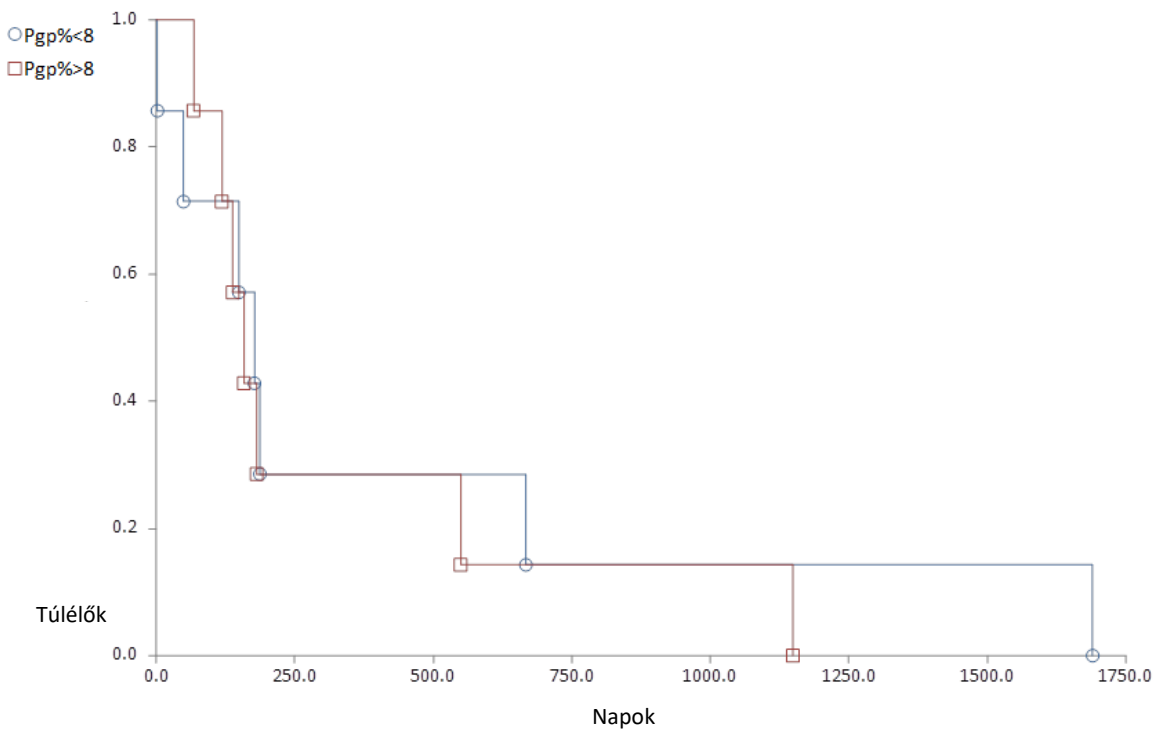
A százalékosan meghatározott P-gp jelölődést vizsgálva az eloszlás alapján a cut off érték 8 % volt a T-sejtes lymphoma betegek esetén (**32. ábra**). A későbbi ábrázolásokban a betegeket két csoportra osztottuk; alacsonyabb P-gp-vel rendelkező (Pgp % < 8) és magasabb P-gp százalékkal bíró csoportot (Pgp % > 8) különböztettük meg.



32. Ábra. Az T-sejtes lymphomás betegek immunhisztokémiával jelölt mintáin ($n = 14$) a P-gp százalékos expressziójának eloszlási görbéje. A referencia intervallum alsó határa 0, a felső határ 18,746 volt (Boksz-Cox transzformációval használt „robust” módszer). A 90 %-os konfidencia intervallumok meghatározásához a vizsgálatban használt elemszám túl alacsony volt.

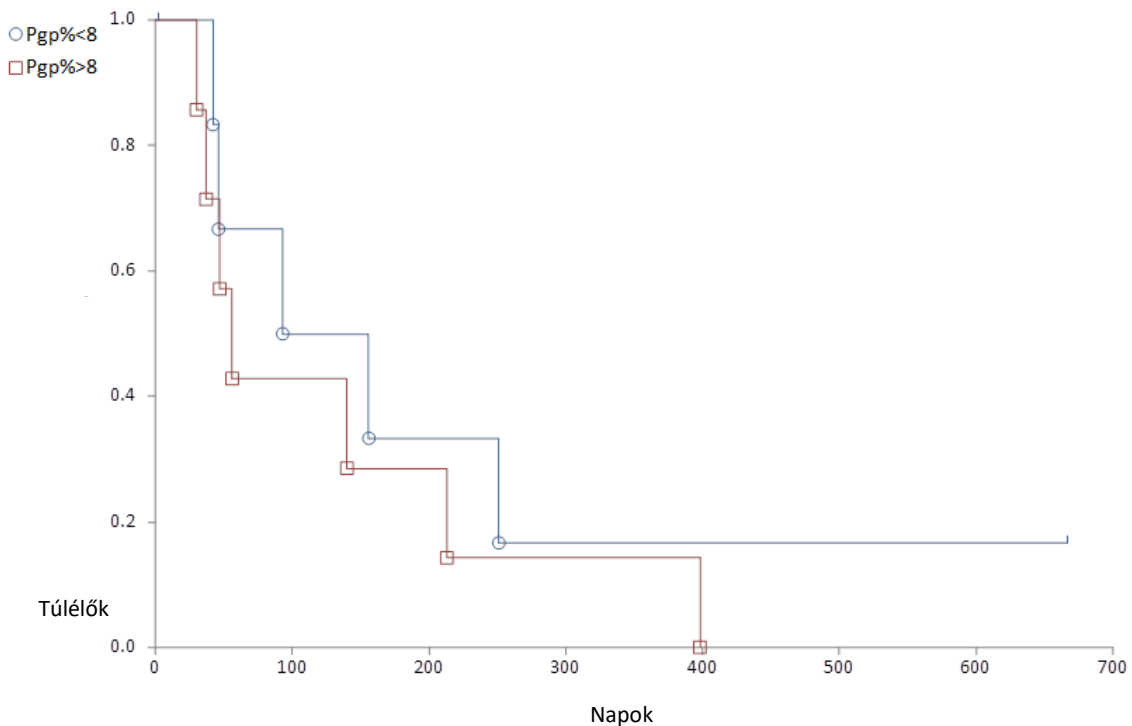
A túlélési eredmények összehasonlító vizsgálata a P-gp értékek tükrében

Az alacsony P-gp csoportban a medián teljes túlélés 177 nap volt (medián OST = 177 nap), míg a magas P-gp csoportban medián 158 nap (medián OST = 158 nap) (**33. ábra**). A P-gp pozitivitás és az OST negatívan korreláltak ($r = -0,157$), tehát az alacsonyabb P-gp csoport képviselői tovább éltek, de nem szignifikáns mértékben ($p = 0,684$).



33. Ábra. A teljes túlélési idők (OST) összehasonlítása a T-sejtes lymphoma csoportban a 8 % P-gp expresszió, mint cut off érték figyelembe vételével (kék kör: P-gp < 8 %, n = 7; piros négyzet: P-gp > 8 %, n = 7).

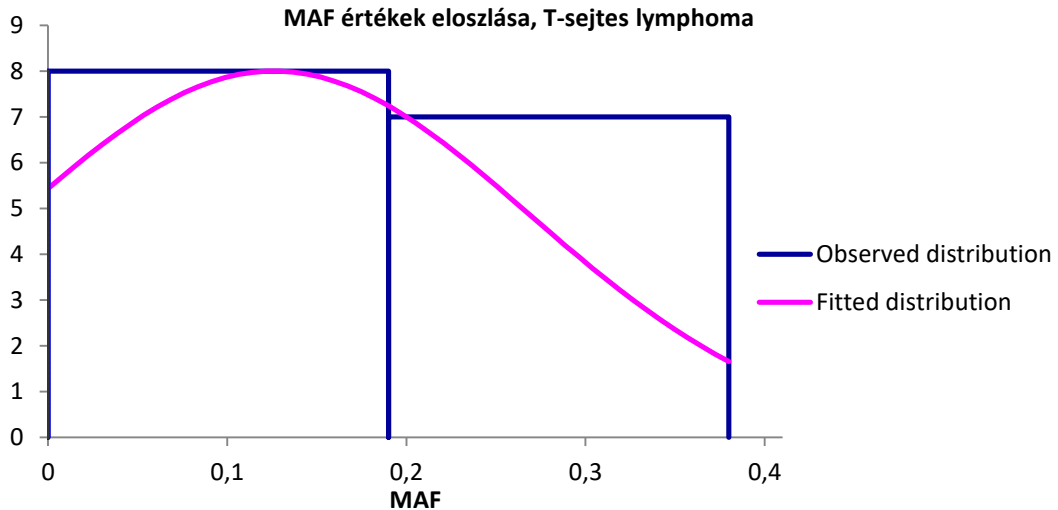
Az recidíva mentes túlélési időket tekintve a P-gp expresszió és a RFP negatívan korrelálnak egymással ($r = -0,278$; $p = 0,482$), tehát minél magasabb volt a P-gp pozitivitás, annál hamarabb recidíváltak a betegek. Az cut off alatti P-gp csoportban az RFP medián 93 nap ($n = 7$), míg a magasabb P-gp csoportban az RFP medián 56 nap volt ($n = 7$) (**34. ábra**).



34. Ábra. A recidíva mentes túlélési idők (RFP) összehasonlítása a T-sejtes lymphoma csoportban a 8% P-gp expresszió, mint cut off érték figyelembe vételével (kék kör: P-gp < 8 %, n = 7; piros négyzet: P-gp > 8 %, n = 7).

6.3.2. P-glikoprotein funkcionális vizsgálata T-sejtes lymphomás betegek esetén

Az áramlásos citométerrel végzett Calcein tesztet mind a 16 T-sejtes lymphoma páciens esetében elvégeztük. A MAF alapján végzett összehasonlításokat az értékek eloszlása alapján 0,19 cut off értéken végeztük (**35. ábra**). A cut off érték alapján meghatározott két csoport egyfelől volt az alacsony receptor aktivitással rendelkező betegek csoportja, melyek értéke 0,19 MAF, vagy az alatti ($MAF \leq 0,19$; n = 9). Másfelől a magasabb MAF-al rendelkező betegek csoportja ($MAF > 0,19$; magas MAF; n = 7).



35. Ábra. Az T-sejtes lymphomás betegek Calcein vizsgálata alapján számított MAF adatok (n=16) eloszlási görbéje. A konfidencia intervallumok statisztikai meghatározásához a vizsgálatban használt elemszám túl alacsony volt (<20).

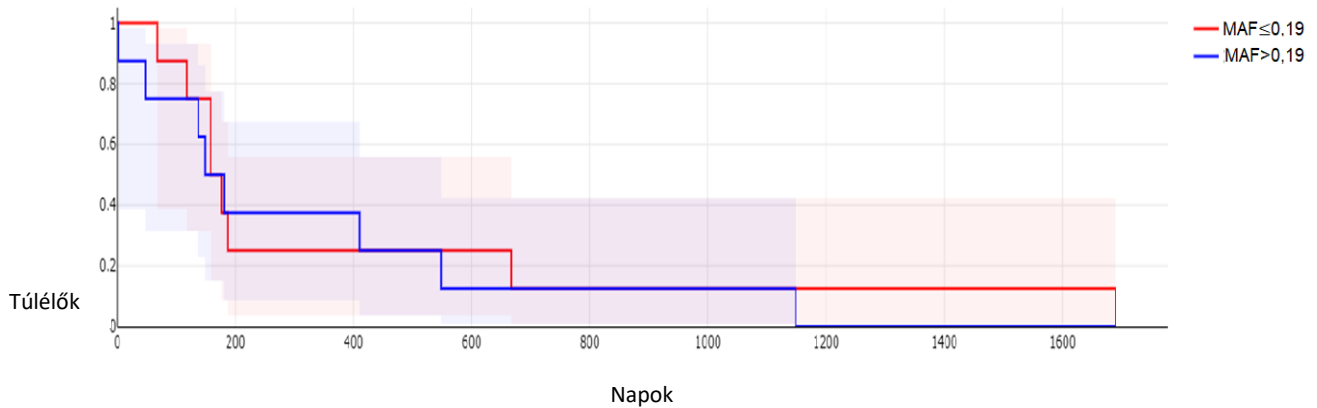
Túlélési eredmények összehasonlító vizsgálata a MAF értékek tükrében

A T-sejtes lymphoma betegpopuláció túlélési idejei negatívan korreláltak a MAF értékekkel, tehát minél magasabb volt a MAF, annál alacsonyabb túlélés volt tapasztalható (r OST = -0,089; rRFP = -0,170) A cut off MAF érték (0,19) alapján létrehozott csoportok között nem volt szignifikáns különbség a túlélési idők tekintetében. A teljes túlélés vizsgálatakor a cut off értékkel egyenlő vagy alacsonyabb MAF értékkel rendelkező csoport (n = 9) medián ideje 181 nap volt (OST = medián 181 nap), míg a magasabb MAF értékkel bíró csoport medián 158 napot élt (OST = medián 158 nap) (**25. táblázat**).

25. Táblázat. A T-sejtes lymphomás páciensek túlélési idejei a 0,19 cut off érték alapján elosztva.

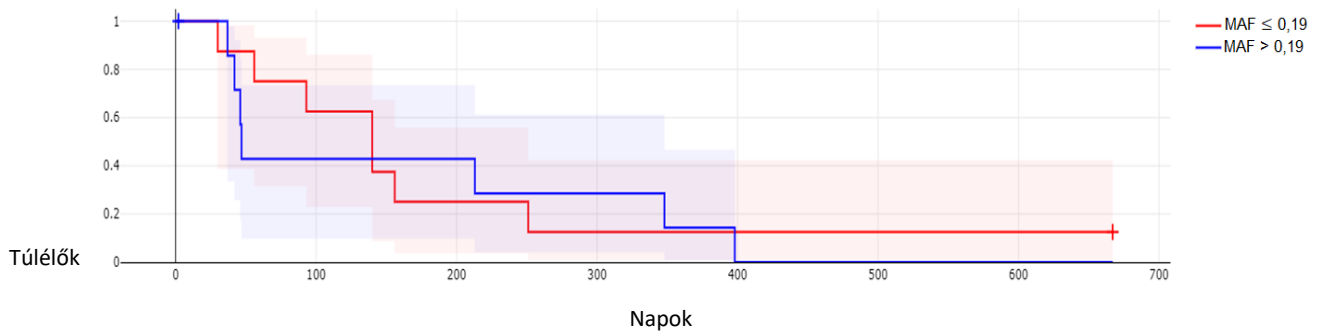
	OST (napok)	RFP (napok)
MAF ≤ 0,19 (n=9)	181	140
MAF > 0,19 (n=7)	158	47
P- értékek	0.7937	0.9733

A két csoport összehasonlítását a **36.ábra** mutatja ($p=0,642$).



36. Ábra. T-sejtes lymphoma betegek teljes túlélési idejeinek összehasonlítása 0,19 cut off MAF figyelembe vételével (piros: $MAF \leq 0,19$, $n = 9$; kék: $MAF > 0,19$, $n = 7$).

A recidíva mentes túlélés tekintetében is megfigyelhető volt a negatív korreláció. Az alacsonyabb MAF értékkel rendelkező csoportnál ($MAF \leq 0,19$) a medián RFP 140 nap volt (medián RFP = 140 nap, $n = 9$), a magasabb MAF csoport esetében ($MAF > 0,19$) RFP medián 47 nap volt (medián RFP = 47 nap $n = 7$). A két csoport közötti különbséget a **37.ábra** szemlélteti ($p = 0,722$).



37. Ábra. T-sejtes lymphomás betegek recidíva mentes túlélési idejeinek összehasonlítása 0,19 cut off MAF figyelembe vételével (piros: $MAF \leq 0,19$, $n = 9$; kék: $MAF > 0,19$, $n = 7$).

További megállapítások a T-sejtes lymphoma páciensek esetén

A P-gp expressziója és MAF értékek a T-sejtes betegek mintái esetén is pozitívan korrelálnak egymással ($r = 0,26$). Tehát a P-gp százalékos kifejeződése és a protein aktivitása együtt emelkedett abban a 14 betegben, melyek szövetmintájából immunhisztokémia és citometriai vizsgálatot is el tudtunk végezni.

6.4. Mastocytomás betegek klinikai vizsgálati eredményei

Az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ betegei közül 31 beteg vett részt a vizsgálatban. A stádiumba sorolást minden esetben elvégeztük. A legtöbb beteg az I. stádiumba tartozott ($n = 17$). Stádium II csoportban 5 beteg szerepelt ($n = 5$), míg stádium III-ba 7 ($n = 7$), IV. stádiumba 2 ($n = 2$) páciens tartozott..

Mindegyik beteg átesett műtéti beavatkozáson. Az operációt követően kórszövettani vizsgálattal, a patológiai jellemzők alapján „gradálás” történt. Ennek megfelelően 8 páciensnek „low grade/grade I” tumora volt ($n = 8$).” Low grade/grade II” besorolásba 14 beteg került ($n = 14$), míg 2 beteg „high grade/grade II” csoportba tartozott ($n = 2$). A „high grade/grade III” jellemzőknek 7 kutya mintája felelt meg ($n = 7$).

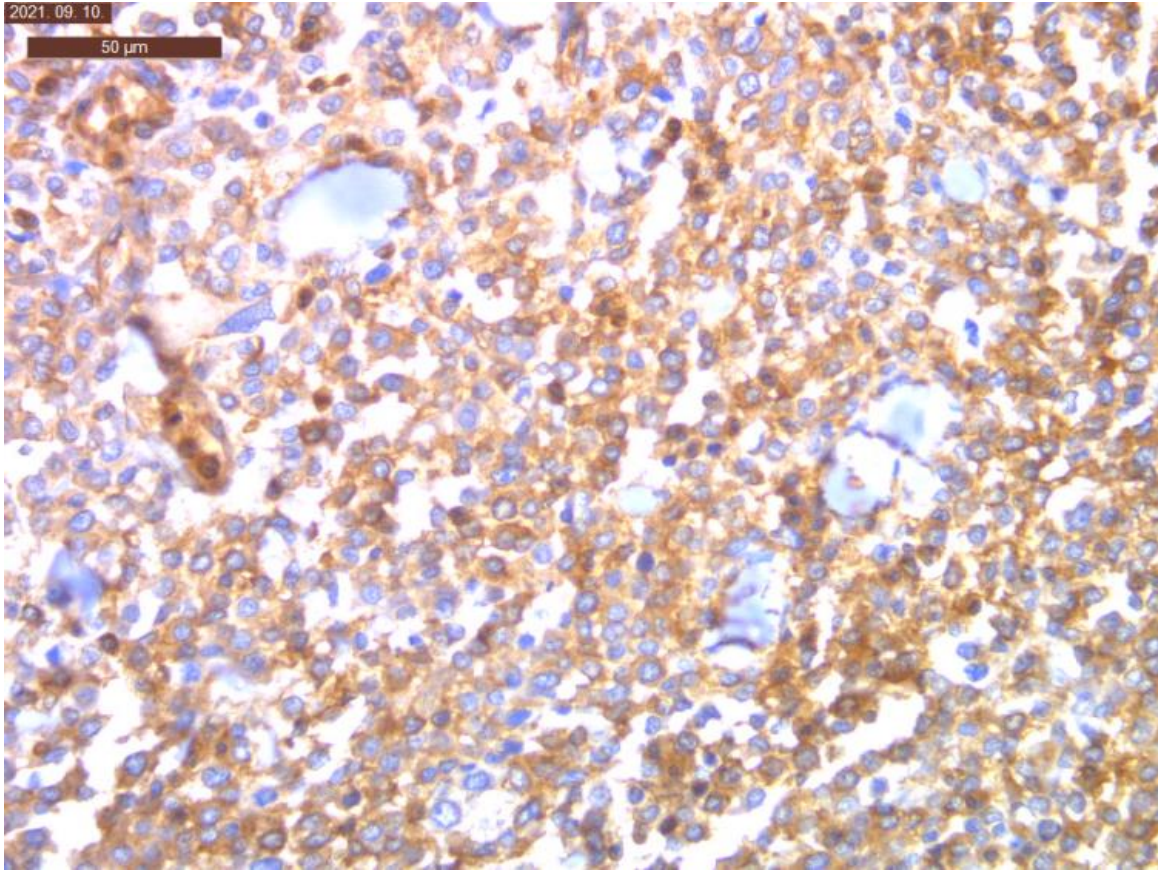
6.4.1. P-glikoprotein expresszió vizsgálata a mastocytomás betegek szövettani mintáin

A 31 betegből P-gp immunhisztokémiai vizsgálat készült. A fénymikroszkóppal történő értékelés során meghatároztuk a P-gp expresszió százalékos arányát, a pozitív reakció helyét (membrán, cytoplasma) és a festődés intenzitását (**38, 39. ábrák**). Az adatokat tételesen a **26. táblázat** mutatja.

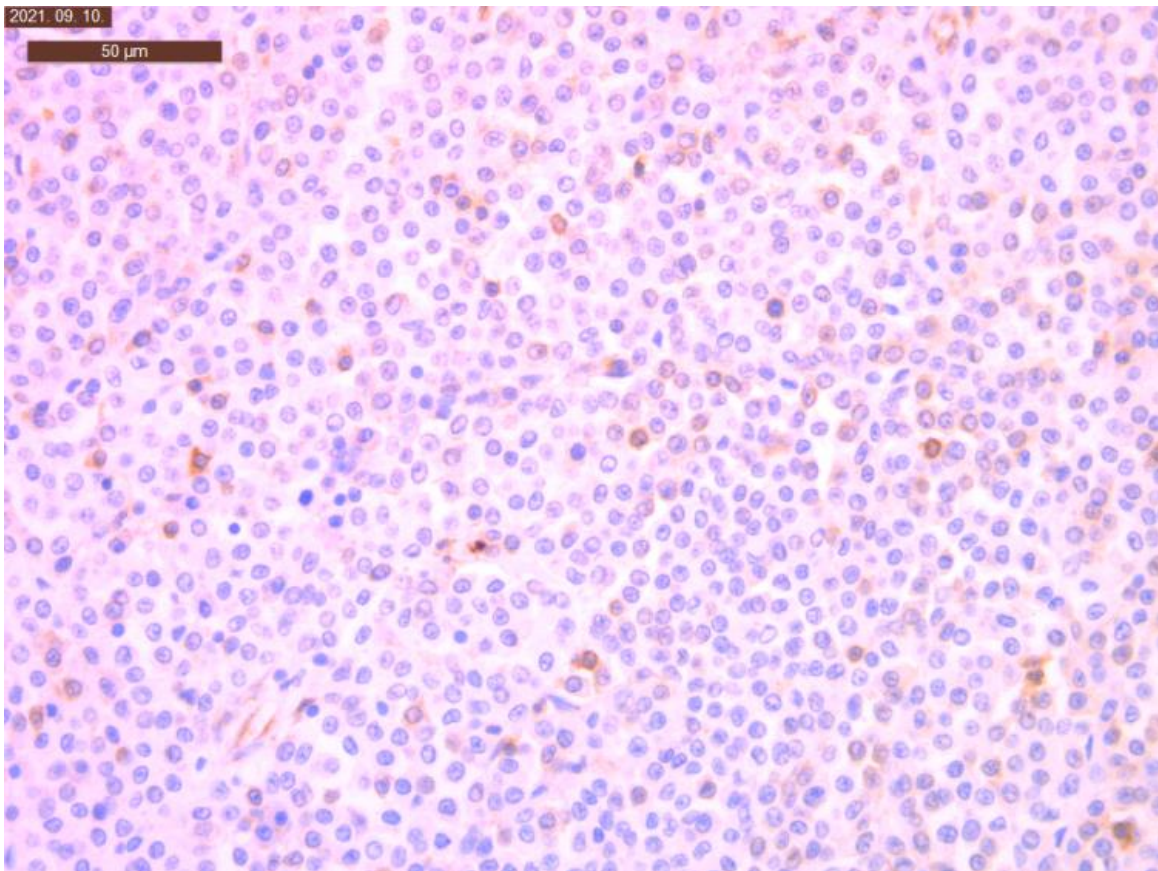
A P-gp festődés jellemzően intenzívebb volt a fehérjét nagyobb százalékban expresszáló daganatok esetében ($r=0,5374$, $p < 0,05$).

26. Táblázat. A mastocytomás páciensek mintáinak P-gp-re vonatkozó vizsgálati eredményei. A P-gp expressziót az 5.3. fejezetben leírtaknak megfelelően határoztuk meg.

A beteg sorszáma	P-gp expresszió (%)	P-gp jelölődés helye	P-gp intenzitás
1	9,4	membrán	2
2	13,1	membrán	2
3	18,7	membrán	2
4	24,3	membrán	2
5	28,1	membrán	3
6	32,8	membrán	2
7	33,7	cytoplasma	2
8	38,4	membrán	2
9	42,1	membrán	2
10	46,8	membrán	1
11	48,7	membrán	2
12	61,8	membrán	3
13	67,4	cytoplasma	2
14	71,1	membrán	3
15	84,3	cytoplasma	3
16	4,7	membrán	1
17	5,6	membrán	1
18	5,6	membrán	1
19	10,3	membrán	1
20	20,6	membrán	2
21	21,5	membrán	1
22	30,9	membrán	2
23	35,6	cytoplasma	3
24	37,4	membrán	2
25	39,3	membrán	1
26	43,1	membrán	2
27	47,7	cytoplasma	2
28	49,6	membrán	2
29	50,6	membrán	3
30	53,4	membrán	2
31	88,0	membrán	2



38. Ábra. 80 % feletti P-gp expresszió cutan mastocytomában, 400× nagyításon
(scale bar 50 μm)

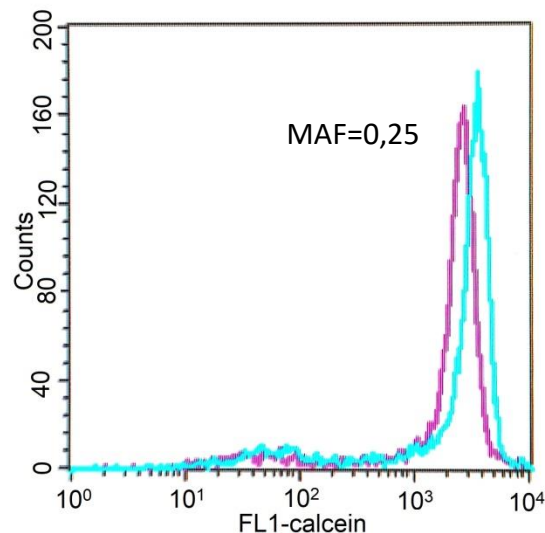


39. Ábra. 8–10 %-os P-gp expresszió cutan mastocytomában, 400× nagyításon
(scale bar 50 μm)

6.4.2. P-glikoprotein funkció vizsgálata mastocytomás betegek szövettani mintáin

A 31 betegből 25 esetben volt lehetőség P-gp aktivitásának vizsgálatára, melyet áramlási citométerrel végeztünk el az 5.4 fejezetben leírtaknak megfelelően.

Az áramlási citométerrel a dot plot ábrákon túl a lymphomás betegekhez hasonlóan hisztogram is készíthető, melyen a verapamilal gátolt valamint verapamil nélküli sejtcsoport fluoreszcencia intenzitása ábrázolható. Az x-tengelyen a fluoreszcencia intenzitása (vagyis a jelerősség), az y-tengelyen pedig a sejtek száma látható (**40. ábra**).



40. Ábra. A fluoreszcencia intenzitásának változása egy mastocytomás beteg példáján szemléltetve (kék: verapamilal gátolt; lila: verapamil nélküli sejtek fluoreszcencia intenzitása).

A fluoreszcencia-változás alapján felvett hisztogramok statisztikai értékéből kiszámíthatók voltak a MAF érték.

Az általunk végzett vizsgálatok alapján a P-gp és MAF-adatok pozitívan korreláltak egymással ($r = 0,542$, $p < 0,05$). Ezt a szignifikáns összefüggést kaptuk akkor is, ha csak a kemoterápiával utókezelt betegeket ($n = 15$) vizsgáltuk, amely azért érdemel kiemelt figyelmet, mivel prognosztikai szempontból ezeknél az egyedeknél lehet lényeges a multidrog rezisztencia jelenléte ($r = 0,55$, $p < 0,05$).

A malignitási fok (grade) és terápiareszisztencia összefüggésének vizsgálata

A kórszövettani vizsgálatnak alávetett tumorok malignitási foka (grade) és a terápiareszisztenciára utaló, általunk vizsgált paraméterek (P-gp-immunhisztokémia és MAF) között nem fedeztünk fel jelentős kapcsolatot, bár az emelkedő malignitási fokkal egyre nagyobb MAF- és P-gp-értékek tapasztalhatók leginkább a Patnaik-féle felosztás szerint.

Csaknem szignifikáns különbség adódott a MAF értékek között a „grade I”, valamint „grade II” malignitási fokhoz tartozó daganatok esetében ($p = 0,0511$) (27. táblázat).

27. Táblázat. A vizsgálatban szereplő mastocytomás betegek mintáinak MAF és P-gp értékei.

Patnaik	Grade I (n=8)	Grade II (n=16)	Grade III (n= 7)
MAF Átlag	0,14	0,16	0,19
MAF Szórás	0,14	0,12	0,21
Kiupel	Low grade (n=22)	High grade (n=9)	
MAF Átlag	0,16	0,14	
MAF Szórás	0,12	0,18	
Patnaik	Grade I (n=8)	Grade II (n=16)	Grade III (n= 7)
P-gp Átlag	7,18	7,35	10,54
P-gp Szórás	5,77	3,55	5,70
Kiupel	Low grade (n=22)	High grade (n=9)	
P-gp Átlag	7,45	9,44	
P-gp Szórás	4,42	5,46	

6.4.3. Túlélési adatokkal végzett összehasonlító vizsgálatok a mastocytomás betegek esetén

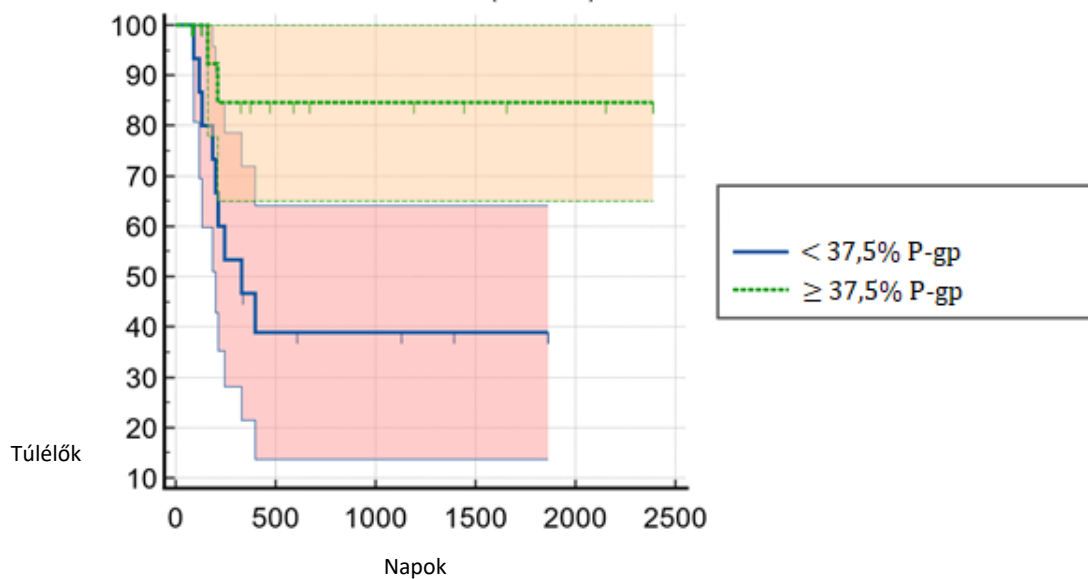
Összehasonlító vizsgálataink során a teljes túlélési időket (OST) és recidívamentes túlélési időket (RFP) hasonlítottuk össze a P-gp expressziós és MAF értékekkel a mastocytomás betegekből nyert szövetmintákon.

A P-gp expresszió valamint a MAF értékek túlélési időekkel történő összehasonlító vizsgálata a mastocytomás betegek tumor mintáin

A túlélési idők, MAF- és P-gp értékek összehasonlítását az ún. cut off érték meghatározásával kezdtük ROC-görbe alkalmazásával.

Eszerint a hosszabb túlélési időkhöz nagyobb MAF- és P-gp-érték tartozott szinte minden vizsgált összehasonlításban (pl. összes eset, csak a kemoterápiás kezelésben résztvevő betegek, különböző malignitási fokozatú daganatokkal műtött betegek stb.).

A P-gp expresszió esetében 37,5 % cut off értéknél szignifikáns különbség figyelhető meg a teljes túlélést tekintve ($p = 0,0215$). Azon betegek, amelyek P-gp százalékos értéke a cut off érték felett volt ($n = 15$), jelentősen hosszabb teljes túlélést (OST) mutattak (medián 1274 nap) azoknál a pácienseknél, amelyek mintájában a P-gp-érték kisebb volt, mint 37,5 % (OST medián 330 nap) ($n = 16$) (**41. ábra**).



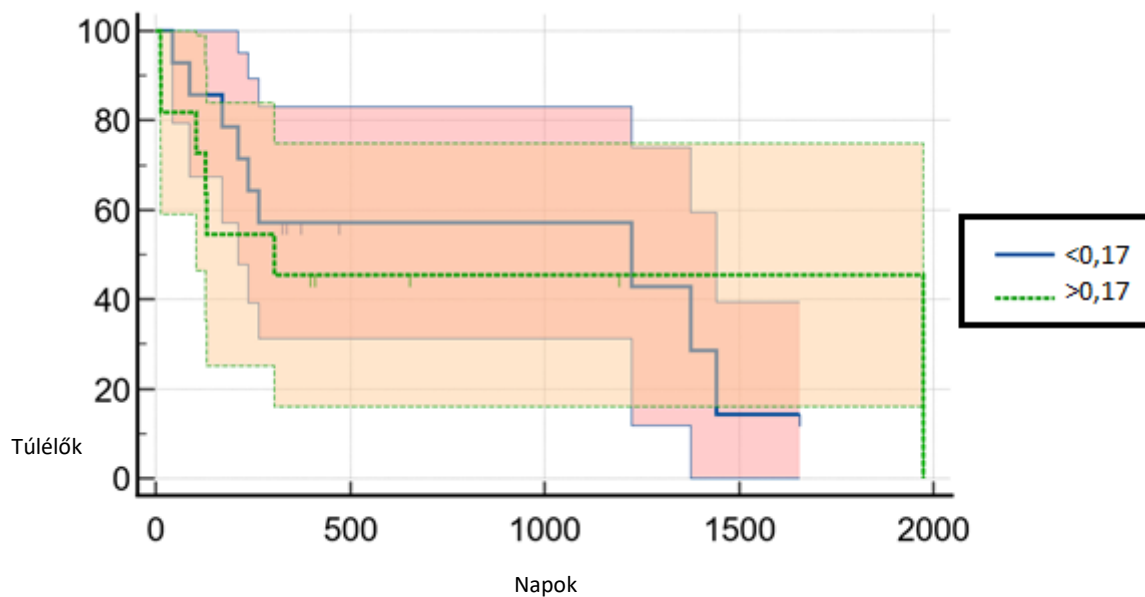
41. Ábra. A mastocytomás betegek OST adatait összehasonlító ábra cut off 37,5 % P-gp expresszió alapján (kék: P-gp < 37,5 %, $n = 16$; zöld: P-gp $\geq 37,5$ %, $n = 15$).

A betegek, amelyek tumorának P-gp expressziója 37,5% alatt volt jellemzően rövidebb ideig éltek. Ezzel szemben a 37,5%-nál magasabb expresszióval rendelkező páciensek szignifikánsan hosszabb túlélési idővel rendelkeztek.

Az OST adatokat tekintve a MAF esetében is pozitív korreláció volt tapasztalható az összes beteg vizsgálatakor és a kemoterápiával kezelt populációnál is. A teljes beteganyagot tekintve a medián OST 213 nap volt a 0,17-nél nagyobb MAF-értékkel rendelkező betegeknél ($n = 15$), és medián 200 nap a 0,17 alatti MAF-fal rendelkező betegeknél ($n = 16$) ($p = 0,803$). A kemoterápiával kezelt egyedeket figyelembe véve ugyanezen cut off értéken medián 398 nap volt a teljes túlélés 0,17 MAF-felett ($n = 7$), és medián 245 nap volt az OST a 0,17 alatti MAF-értékkel rendelkező esetekben ($n = 8$) ($p = 0,707$).

A recidívamentes túlélési időket (RFP) vizsgálva azonban 0,17 cut off MAF-értéket alapul véve negatív korrelációt fedeztünk fel. A 0,17 alatti MAF-fal rendelkező betegek (n = 18) medián túlélési ideje (212 nap) hosszabb volt azokkal az esetekkel szemben, ahol a MAF a cut off érték felett volt (n = 7) (medián 131 nap) Az eltérések nem szignifikánsak (p = 0,8214) (42. ábra).

Az összefüggést 170 napos recidívamentes túlélésre vizsgáltuk a 0,17 cut off értéken, amelyre a ROC görbe alapján 66,7% szenzitivitást, 71,4% specificitást kaptunk. A recidívamentes túlélésekre vonatkozóan ez volt a legnagyobb specificitású megfigyelés.



42. Ábra. A mastocytomás betegek RFP adatainak összehasonlítása a 0,17 cut off érték figyelembe vételével (kék: MAF < 0,17, n = 18; zöld: MAF > 0,17, n = 7).

A betegek, amelyek tumorának MAF-értéke 0,17 alatt volt (kék vonal) recidíva nélküli túlélési ideje hosszabb volt összehasonlítva azokkal a betegekkal, ahol a MAF-érték 0,17 felett volt (zöld vonal).

7. Megbeszélés

Vizsgálataink célja elsődlegesen az volt, hogy a dolgozatban tárgyalt két hemopoetikus tumor, a lymphoma és mastocytoma esetében felmérjük a kemoterápiás kezeléssorozat előtt a P-gp membrántranszporter fehérje immunhisztokémiai expressziójának mértékét, és összehasonlítsuk az áramlási citométeres eszközzel vizsgálható P-gp protein funkcióval (MAF). Ezen felül fontos célkitűzésünk volt, hogy feltárjuk az eredmények klinikumban való gyakorlati hasznát a kutyák tumorkezelése során.

7.1. Konklúzió a lymphomás betegek eredményei kapcsán

Összesen 95 kutya páciens eredményeit tudtuk figyelembe venni az összehasonlító vizsgálataink során. A betegpopulációban tapasztalható stádium és alstádium szerinti eloszlás, kemoterápiás kezelés eredményei megegyeztek a nemzetközi szakirodalomban leírtakkal (Kiupel és mtsai, 1999; Valli és mtsai, 2011; Valli és mtsai, 2013). A B-sejtes típus jóval magasabb arányban fordult elő a betegpopulációban, a kutyák több, mint 80%-a B lymphomával volt diagnosztizálva, mely kissé magasabb a nemzetközi adatokhoz képest (Ponce és mtsai, 2010).

A medián túlélési időket (medián OST [B-sejtes] = 352 nap; medián OST [T-sejtes] = 167,5 nap) (medián RFP [B-sejtes] = 260nap; medián RFP [T-sejtes] = 116,5 nap) kemoterápiás kezelés mellett a szakirodalomban is leírt túlélési időtartományban találtuk (5. és 6. táblázat) (Vail és mtsai, 2019). A B-sejtes betegek esetében több tanulmány áll rendelkezésünkre. A dolgozatban szereplő páciensek medián teljes túlélése és recidíva mentes túlélési ideje is összehasonlítható ezen tanulmányokkal. Rout és munkatársainak vizsgálatában a kemoterápiával kezelt B-sejtes lymphomások túlélési ideje medián 300 nap volt (Rout és mtsai, 2021). Egy másik vizsgálati anyagban a medián OST 292 nap, míg a medián RFP 196 volt a CHOP protokollal kezelt betegpopulációban (Benjamin és mtsai, 2021).

A stádiumokat tekintve saját tanulmányunk a B-sejtes lymphomás csoportban megfigyelhető túlélési adatok tekintetében nem mutatott szignifikáns különbségeket, ugyanakkor az V. stádiumba tartozó betegek túlélései bizonyultak a legrövidebbnek. A IV. és az V. stádiumban lévő esetek értékei között tapasztaltunk csak szignifikáns különbséget (11. táblázat, 20. ábra) Ugyanakkor, a recidívamentes túlélési idők között szignifikáns eltérések voltak, a túlélési idők egyértelműen rövidebbek voltak a magasabb stádiumok felé haladva (II-III, vs. IV vs. V) (12. táblázat, 21. ábra). A T-sejtes lymphomás betegek esetében az OST és az RFP értékek teljesen heterogén módon jelentkeztek. Az OST esetében a legmagasabb értékek a III., a legalacsonyabb értékek a IV. stádiumban jelentkeztek. Az RFP esetében megfigyeléseink hasonlóak voltak (22. táblázat, 28. és 29. ábra).

Az alstádiumok tekintetében azok a betegek, amelyeknek állapotromlással nem járt a betegségük, sokkal hosszabb ideig éltek mindkét fenotípussal (23. táblázat, 30., 31. ábra). Általánosságban, a B-sejtes fenotípusba tartozó egyedekhez képest a T-sejtes lymphomás betegek jóval rövidebb túlélési időket produkáltak (5. és 6. táblázat, 9. és 10. ábra), amelyek egyeznek a szakirodalmi adatokkal (Valli és mtsai, 2013; Vail és mtsai, 2019). Ez köszönhető többek között a T-sejtes lymphomákban tapasztalható gyakoribb és erősebb rezisztenciának, valamint a gyakrabban előforduló, kórjóslatot rontó paraneoplasztikus szindrómáknak (Moore, 2016; Vail és mtsai, 2019; Musser és mtsai, 2022).

Érdekes megállapítás, hogy a T-sejtes fenotípusú páciensek mindegyike a lymphoma tünetei miatt pusztultak el (11. ábra). Ennek egyik oka lehet a tapasztalt terápiaerezisztencia, illetve az eleve rövidebb túlélési idők mellett nem volt ideje kialakulni egyéb kórképnek. A B-lymphomás kutyák közül sok beteg nem a lymphoma miatt pusztult el. Az első recidíváig eltelt idő, az RFP jó mutatója lehet a túlélési analíziseknek, mivel nem befolyásolják a nem lymphomához közhető halálokok. Az RFP legfontosabb befolyásoló tényezői a kezelése során előforduló mellékhatások, melyek miatt a kezeléseket halasztani kényszerülünk (Rassnick és mtsai, 2017). A B-sejtes lymphomás páciensek klinikai vizsgálati eredményei azt mutatták, hogy a betegek nagy arányában jelentkeztek mellékhatások, amelyek gyakoriságának emelkedése csökkent teljes- és recidívamentes túlélési időket eredményeztek a betegekben. A T-sejtes lymphomás betegek vizsgálata során a mellékhatások súlyosságának átlagértéke 2,36 értékpont volt. Ez ez érték a B-sejtes lymphomás betegek esetében 1,63 volt.

A P-gp immunhisztokémiai vizsgálatával korábban is számos tanulmány foglalkozott (Ginn és mtsai, 1996; Lee és mtsai, 1996; Dhaliwal és mtsai, 2013; Sokolowska és mtsai, 2015; Hyokai és mtsai, 2021). A vizsgálathoz azonban műtétilag nyert szövetmintára van szükség, a minta feldolgozása hosszadalmas, a vizsgálat költséges, ezen felül a P-gp expresszió eredményét nagyban befolyásolhatja a vizsgáló szubjektív megítélése. A teljes betegpopulációban 71 esetben volt lehetőség a P-gp receptor expressziójának mikroszkópos vizsgálatára. A korábbi állatorvosi szakirodalom alapján ekkora beteganyagban még nem került sor a P-gp immunhisztokémiai jelölésére. A pozitív reakció megítélésekor fontos volt, hogy a P-gp-t kifejező egyéb sejtektől, például endothel sejtektől elkülönítsük a tumorsejteket (Hyokai és mtsai, 2021). A lymphoid tumorsejtek jellemzően erősebb színreakciót mutattak az endothel sejteknél. A P-gp expresszió magasabb volt a T-sejtes csoportban (n = 14) a B-sejtes csoporttal szemben (n = 57) (7. táblázat). A P-gp expresszió a B-sejtes lymphomákban átlagosan 6,23%-os volt, amely kisebb, mint más publikációkban (Ginn és mtsai, 1996; Vajdovich és mtsai, 2018). A hatáértékek nem kifejezetten szélesek, és 0,69 % ill. 14,4 % között mozogtak (13 és 24. táblázat, 23. ábra). A T-sejtes lymphomás betegek mintáiban

átlagosan 6,84%-os P-gp expresszió volt tapasztalható, amely a B-sejtes fenotípusú csoporthoz (Pgp %: 6,23) képest nem szignifikánsan ($p=0,6956$) magasabb.

Korábbi, saját és egyéb független tanulmányok szerint is igazolást nyert, hogy a két immunfenotípus között tapasztalható P-gp pozitivitás-beli különbség (Sokolowska és mtsai, 2015; Vajdovich és mtsai, 2018). Ez a kifejeződés-különbség kapcsolatban lehet a T-sejtes páciensek rövidebb túlélési idejével, azaz hogy korábbi és határozottabb megjelenését várjuk a terápiarezisztenciának, habár a két csoport egyedszáma között nagy különbség volt.

Az egyes szövettani alcsoportok egyedszáma nagyon alacsony volt a megfelelő összehasonlításhoz, azonban érdekes tény, hogy a B-lymphomák marginális zóna lymphoma csoportjában mennyivel alacsonyabb volt a P-gp expresszió (2,4%) a nagy sejtes immunoblastos csoporthoz (9,6%) képest. A marginális zóna lymphoma klinikailag kevésbé agresszívebbnek tekinthető, de az alacsony elemszám miatt ($n=2$ mindkét csoportban) messzemenőbb következtetés nem vonható le. Korábbi, kutya lymphomákon végzett tanulmány szintén leírta az egyes lymphoma altípusok között felfedezhető expresszió különbségeket (Sokolowska és mtsai, 2015).

A P-gp receptor a celluláris struktúráját tekintve egy transzmembrán protein, ezért a szubcelluláris jelölődés a sejtmembránon várható (Arancia és mtsai, 1998). Azonban kevés esetben (B-sejteseknél 4/57, T-sejteseknél 2/14) cytoplasma pozitivitás is megfigyelhető volt. Hasonló P-gp lokalizációt állapítottak meg a korábbi állatorvosi tanulmányok is (Hifumin és mtsai, 2010; Teng és mtsai, 2012; Campos és mtsai, 2014). A humán medicinában több betegségcsoport esetében már felderítették a rendellenes lokalizációjú pozitivitás fontosságát. Az egyes lokációkban a jelölődés elvesztése vagy társult pozitivitás például adhéziós proteinek, vagy egyes faktorok elvesztését mutatják. Így a colorectális carcinoma esetében az aberrált nukleáris béta-catenin expresszió, az emlőcarcinomákban a membrán E-cadherin pozitivitás elvesztése, vagy a bélben manifesztálódó, az enterocyták membránján kívül cytoplasmában is megjelenő CD10 pozitivitás a mikrobolyhos zárványbetegség esetén klinikai jelentőséggel bírnak (Cheuk és Chan, 2004). A Pgp sejten belüli átrendeződése a rosszabb indulatú T-sejtes lymphomában a membránról a cytoplasmában történő megjelenése hasonló a c-kit átrendeződéshez a rosszabb indulatú mastocytomákban a membránról a cytoplasma felé (Sledge és mtsai, 2016).

A P-gp és más transzporterek vonatkozásában ennek magyarázta a gyógyszer kompartmentalizációban lehet. Ennek során a citotoxikus gyógyszereket a cytoplasma organellumainak a membrántranszporterei átpumpálják a citoszolból és elkülönítik az endoplazmatikus retikulumban. Igazolást nyert például az is, hogy a ciszplatin elkülönülhet a

lizoszóma, a Golgi és a szekréciós rekeszek vezikuláris struktúráiban, majd azután a sejtől kipumpálásra kerül (Azijli és mtsai, 2015).

Saját vizsgálataink szerint az alacsonyabb túléléssel bíró T-sejtes csoportban magasabb arányban volt tapasztalható a cytoplasmában való expresszió (T-sejtes: 0,14, B-sejtes: 0,07) (7. táblázat).

Azonban a cytoplasma pozitívitásnak kevés jelentősége volt esetünkben, az előfordulás túl alacsony volt a túlélési idők összehasonlításához.

A P-gp százalékos expressziója és a festődés erőssége, vagyis intenzitása szignifikánsan, pozitívan korreláltak egymással, mely utalhat a proteinek mennyiségére a membránon. Ez az összefüggés külön a B- és T-sejtes csoportban is tapasztalható volt (8. táblázat). Korábban ilyen összehasonlítás nem történt állatorvosi tanulmányok során. Humán szövetminták értékeléséhez használt digitális képanalizáló programmal történtek vizsgálatok az antigén expresszió quantifikációjára vonatkozólag. Ezen eredmények alátámasztják azt a felvetést, hogy az intenzitás növekedésével magasabb az adott fehérjék száma (Braun és mtsai, 2013).

A P-gp expresszió és túlélési idők összehasonlító vizsgálataihoz ROC eloszlási görbék alapján cut off értékeket határoztunk meg, a teljes beteganyagra, valamint a B- és T-sejtes csoportokra (16, 22, 32. ábrák). Ezen cut off értékek használatával két összehasonlítható csoportot hoztunk létre, az OST és RFP vizsgálata során ily módon szemléltetve a különbségeket.

A B-sejtes lymphomákban 6 %-os cut off érték mellett a teljes túlélési idő esetében az alacsonyabb P-gp %-ok hosszabb túlélési időket mutattak. Ugyanakkor a recidívamentes túlélés esetében a várthoz képest fordított összefüggés volt tapasztalható, bár nem szignifikás módon (14. táblázat, 24. és 25. ábra).

A T-sejtes fenotípusú csoportban a cut off érték a 8 % volt, amely a B-sejtes lymphomások csoportjához képest (Pgp: 6 %) magasabb. A megoszlási görbe alapján számított tartomány felső határa is magasabb a T-sejtes betegeknél (18,7 %) a B-sejtes lymphomás kutyákhoz képest (16,3 %) (32. ábra). A T-sejtes lymphomás betegek esetében a sejtenyészési vizsgálatainknak megfelelően, a várt módon alakultak a Pgp 8%-os cut off érték alatti és felett az OST és RFP értékek. Tehát a nagyobb Pgp-expressziót mutató lymphomás betegek rövidebb idő alatt hullottak el, vagy tumoruk hamarabb recidivált (33. és 34. ábra), bár az eredmények nem lettek szignifikánsak.

Adott protein kifejeződésének megállapítására egyéb vizsgálati lehetőség is rendelkezésre állhat, úgymint Western blot (Moore és mtsai, 1995), áramlásos citométer (Schleis és mtsai, 2008; Pozniak és mtsai, 2015), reverz transzkripció-PCR (Culmsee és mtsai, 2004). Az áramlásos citométer vizsgálat ugyanakkor alkalmas a P-gp fehérje funkciójának felderítésére is, költséghatékony, gyors. Kutatócsoportunk által végzett, korábbi *in vitro* vizsgálatok alapján a MAF értékek kiválóan megfelelnek P-gp receptorok funkciójának statisztikai vizsgálatára (Karai és mtsai, 2020). Az Calcein tesztet az egész betegpopulációban lehetőségünk volt elvégezni áramlásos citométer segítségével (n = 95; B-sejtes n = 79; T-sejtes n = 16) (17. ábra). A MAF értékek a Pgp expressziós %-okhoz képest nagyobb intervallumban, 0 és 0,44 között mutatkoztak.

A B-sejtes csoportban a MAF értékek magasabbak voltak, mint a T-sejtes lymphomák esetében, ugyanakkor ebből egyértelmű következtetést nem lehet levonni a nagy esetszám-különbség miatt. A B-sejtes lymphomás betegek esetében a MAF értékek a stádiumok között nem mutattak jelentős különbséget, habár a legalacsonyabb stádiumba sorolt betegek (II+III) esetében bizonyultak a MAF értékek a legkisebbeknek. Ugyanakkor, az alsó stádiumok között azoknak a betegeknek voltak alacsonyabb MAF értékei, amelyek "b" alstádiumba voltak sorolva, vagyis a betegségük a diagnózis meghozatalakor klinikai panaszokat okozott (15., 16. táblázat).

Az összehasonlító vizsgálatokhoz az eloszlási görbék alapján MAF adatok esetében is meghatároztuk a cut off értékeket (19, 25, 35. ábrák). Ezen cut off értékek használatával a Pgp expressziókhoz hasonlóan hoztuk létre két összehasonlítható csoportot OST és RFP vizsgálatához. Az eloszlási görbe alapján a felső határérték 0,61, 0-0,44-es konfidencia intervallummal. Ez egy rendkívül széles intervallumot jelent. Érdekesség, hogy a megállapított cut off érték az intervallumnak közel a felénél helyeződött (0.19) (18. ábra).

A B-sejtes csoportban a felső határérték 0,588 volt 0 és 0,44 konfidencia intervallum mellett (25. ábra). A cut off érték az eloszlás alapján szintén 0,19 volt. A B-sejtes lymphomások esetében mind az OST, mind az RFP tekintetében megállapítható volt, hogy a cut off alatti MAF értékkel rendelkező betegek rövidebb túléléseket produkáltak, összehasonlítva a 0,19 MAF feletti értékkel rendelkező csoporttal (17. táblázat, 26, 27. ábrák) Ennek a sejttenyésztéses vizsgálatokkal szemben nem várt eredménynek a magyarázatára bontottuk szét a B-lymphomás (viszonylag homogén) populációt három részre az 1. (a és b), 2., 3. csoportokra, amelyek esetében az alábbi szempontokat követtük. Az alapot a 0,19-es MAF cut off érték jelentette. Az 1. csoportba azokat a betegeket soroltuk, amelyek a MAF-értékekhez képest a várt túlélési időket produkálták (n = 34). Ezen belül 1a: alacsony MAF, hosszú recidívamentes (RFP) túlélésűek (n = 13); 1b. magas MAF, rövid RFP (n = 21); 2.

alacsony MAF, rövid RFP (n = 29); 3. magas MAF, hosszú RFP (n = 16). A teljes (OST) és a recidívamentes (RFP) túlélési időket a 18. táblázat tartalmazza.

Érdekes összefüggéseket mutatott az az összehasonlításunk is, amelyben a mellékhatások súlyossága fordított arányosságot mutat a MAF, az OST és az RFP értékekkel. Ez azt jelenti, hogy minél kevésbé volt aktív a P-gp pumpafehérje, annál gyakrabban és annál súlyosabb mellékhatások jelentek meg, és a mellékhatások megjelenése a túlélési idők csökkenésével is járt. Érdekes, hogy ugyanez tapasztalható a kényszerűen elhalasztott kezelések tekintetében is. Tehát a kemoterápiás kezelést a leggyakrabban annál a csoportnál (2.) kellett elhalasztani, melyik alacsony MAF értékekkel rendelkezett. A kezelések kényszerű elhalasztása pedig rövidebb túlélési időket eredményezett (19. táblázat). Ugyanezek a mellékhatásokat jelző értékek abban a 3. csoportban voltak legalacsonyabbak, amelyeknél a cut off érték feletti ($> 0,19$) MAF értékekkel rendelkezőknek hosszú túlélése volt (20. táblázat). Fontos megjegyezni ezeken felül, hogy a 2. csoportban jelentkeztek leggyakrabban a visszaesések (recidívák) az általunk alkalmazott CHOP protokoll lezárása előtti 19 héten belül (21. táblázat). Ez nem meglepő tapasztalás, tekintve, hogy ebben a betegcsoportban kellett a legtöbb halasztást és dóziscsökkenést is elvégeznünk. Feltételezésünk szerint azért tapasztaltunk a rövidebb túlélési időket, mert a MAF-értékek nem csak a daganatsejtekben lehettek alacsonyabbak, hanem az ép szöveti sejtekben is, amelyek ezért érzékenyebbek voltak a kemoterápiás szerekre és emiatt alakulhattak ki gyakrabban és súlyosabb a mellékhatások.

A T-sejtes lymphomák esetében a MAF értékek a kis elemszám miatt kritikusan értékelhetők, a referencia tartomány 0 és 0,443 közötti (35. ábra). A cut off érték a T-sejtes lymphomák esetében is 0,19, mint a B-sejtes lymphomák esetében. A Pgp %-hoz hasonló, hipotézishez illeszkedően várt eredmények itt is teljesültek, vagyis a magas MAF értékek rövidebb túlélési (OST, RFP) időket mutattak (25. táblázat, 36., 37. ábra).

A P-gp expresszió és MAF értékek mind a B-sejtes, mind a T-sejtes lymphomás betegek esetében szignifikáns pozitív korrelációt mutattak egymással, tehát a magasabb P-gp % fokozott aktivitással járt együtt.

Összefoglaló megállapítások

A T- és B-sejtes lymphomás populáció MAF értékeinek összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy a B-sejtes csoport átlag MAF értéke szignifikánsan magasabb volt a T-sejtes csoport MAF értékeihez képest ($p = 0,037$). Azonban a B-sejtes lymphomában a betegek csaknem 5x többen voltak, mint a T-sejtes esetekben. Ezért, nem egyértelműen mondható el, hogy biztos nagyobb B-sejtes lymphomák valódi átlag és medián értéke. A P-

gp immunhisztokémiai expresszió esetében ez éppen fordítva volt, bár a T-sejt csoportban csak kicsivel volt magasabb a pozitivitás mértéke. A két vizsgálati módszerrel nyert paraméterek összehasonlításakor megállapítottuk, hogy a P-gp százalékos kifejeződés és a MAF érték egyértelműen pozitívan, szignifikánsan korreláltak egymással ($p=0,007$). Ez alapján kijelenthető, hogy a MAF arányosságban áll a P-gp expresszióval, a Calcein tesztel detektálható aktivitás emelkedése megbízhatóan mutatja a kifejeződött receptorok működését.

A korábbi tanulmányok alapján a hipotézisünk az volt, hogy az emelkedett P-gp expresszió/funkció negatívan befolyásolja a túlélési időket, legalábbis az RFP esetében (Moore és mtsai, 1995; Lee és mtsai, 1996). A T-sejtes csoport eredményei alátámasztották a hipotézist, mivel a magasabb P-gp expresszió és magasabb MAF negatívan korrelált a túlélési idővel (OST, RFP), melyet korábbi *in vitro* vizsgálatok is feltételeznek (Kurai és mtsai, 2020).

Azonban, ha összességében vizsgáltuk a dolgozatban szereplő a betegek P-gp és MAF eredményeit, a MAF nem tekinthető negatív prediktív faktornak a túlélési idők szempontjából. A B-sejtes csoportban P-gp 6%, és MAF 0,19 cut off érték mellett megállapítható volt, hogy az alacsonyabb P-gp expresszió hosszabb OST-vel és rövidebb RFP-vel járt, míg az alacsonyabb MAF rövidebb túlélési idővel (OST és RFP) járt (14, 17. táblázatok, 23, 24. és 26, 27. ábrák).

A T-sejtes csoportban a P-gp expressziónál 8%-ban, a MAF esetében 0,19 értékben állapítottuk meg a cut off értéket. A P-gp expresszió negatívan korrelált az OST és RFP esetében is, vagyis a 8% cut off érték alatti pozitivitással bíró betegek hosszabb ideig éltek, míg a cut off feletti expressziójú betegek rövidebb túléléseket produkáltak (33., 34. ábrák). A MAF tekintetében szintén tapasztalható volt ez a negatív korreláció, az OST és RFP esetén is (25. táblázat, 36 és 37. ábrák).

Felmerül számos tényező, melyek befolyásolhatják a P-gp kifejeződést és funkciót. A 18. táblázatban bemutatott összehasonlítások célja az volt, hogy megpróbáljuk felderíteni azokat a befolyásoló tényezőket, melyek a várt összefüggést előnytelenül befolyásolják. Összesen 34 beteg esetében a MAF negatív prediktív faktornak bizonyult, tehát a biológiailag magasabb MAF értékkel rendelkező betegek ($MAF > 0,19$) (1a. csoport) szignifikánsan rövidebb ideig éltek a $MAF \leq 0,19$ csoporthoz képest (1b. csoport). További 45 beteg esetében azonban éppen fordított volt az összefüggés, tehát a magasabb MAF értékkel szignifikánsan tovább éltek a betegek. A 45 beteg közül 29 esetben jelentkezett cut off érték ($< 0,19$) alatti MAF és rövid túlélés (2. csoport), valamint 16 esetben tapasztaltunk cut off feletti ($> 0,19$) MAF értéket hosszabb túléléssel (3. csoport).

Alacsony betegszám problémaköre nem merült fel, ugyanis a beteggyűjtés csaknem 7 éven keresztül zajlott, a betegek megfelelő szelekción estek át, mielőtt a vizsgálati csoportba kerültek volna (5.1 fejezet). A B-sejtes csoportban potenciális befolyásoló tényező lehetett azonban az, hogy számos kutya a tulajdonos kérésére elaltatásra került olyan esetben is, amikor ez orvosilag nem volt indokolt (például recidíva esetén). Ezen betegeket a statisztikai analízisek során cenzoráltuk. Megerősíti ezt a feltevést az a tény, hogy a T-sejtes betegek mindegyike a lymphoma miatt pusztult el, és a túlélési adatokkal várt összefüggések a T-sejtes populáció esetében a P-gp expresszió vizsgálatokor teljesülnek.

Továbbá befolyásoló tényező lehet a mintavétel, a szövet feldolgozásának, és az értékelésnek a módja. Korábbi tanulmányok alapján a C219 klón a P-gp immunhisztokémiai jelöléséhez nem bizonyult elég érzékenynek, valamint több keresztreakciót ad (Lee és mtsai, 1996), ezért választottuk a saját vizsgálatainkhoz a C494 klónt (Ginn és mtsai, 1995; Dhaliwal és mtsai, 2013). A mikroszkópos értékelés szintén manuálisan történt, mely így nagy mértékben szubjektív lehet ellentétben a képanalizáló programokkal (Dhaliwal és mtsai, 2013). Habár technikai szempontból a Calcein teszt jól standardizálható vizsgálat, a nyirokcsomóból való transcutan mintavétel során nyirokcsomó szöveten kívül hámsejtek, kötőszöveti és zsírsejtek is kerülhetnek a mintába, melyek befolyásolhatják a „kapuzás” folyamatát. Ennek eredményeképpen, a teszt eredményekre hatással lehet a tumor mikrokörnyezete (Palacios-Ortega és mtsai, 2021).

A mellékhatások következtében számos esetben szükség volt a kemoterápiás kezelés halasztására. Minden kezelés előtt elvégeztük a tulajdonos alapos kikérdezését, és a betegek klinikai vizsgálatát, melynek része egy hematológiai vizsgálat is. Amennyiben mellékhatások voltak tapasztalhatóak (LeBlanc és mtsai, 2021), és a regeneráció nem volt megfelelő, a kezelési tervet módosítani kellett. Az előforduló mellékhatások miatt szükség volt a kemoterápia dózisának csökkentésére vagy a kezelés elhalasztására, mely események elfedhetik a rezisztenciát fokozó egyes tényezők hatását (Bergman, 2000). A kezelés első 19 hetében a B-sejtes lymphómások 2. csoportjába tartozó kutyák (alacsonyabb MAF, alacsonyabb túlélés) érzékenyebbek voltak a mellékhatásokra, gyakrabban és súlyosabb panaszaiuk voltak, több alkalommal kellett dózist redukálni és csúsztatni a kezelést az 1. és 3. csoportokhoz képest (19. táblázat). A 2. csoport betegeinek alacsonyabb túlélési ideje magyarázható a citotoxikus szerekre való fokozottabb érzékenységgel. A páciensek 78,9%-a produkált „grade 3” fokozatnál is súlyosabb mellékhatást némely kezelést követően. A 19. és 20. táblázatban mutatott adatok alapján azt feltételezhetjük, hogy a mellékhatások miatti dózisredukciókkal és kezeléshalasztásokkal párhuzamosan növekedett a terápia rezisztencia, a kezelési ciklus előtt a legmagasabb a visszaesési arány ebben a 2. csoportban volt. Alátámasztja ezt a megállapítást az a tény,

hogy e csoportban a kutyák 59,26%-a (legmagasabb arányban) pusztult el lymphoma következtében. Az alacsonyabb (0,19 alatti) MAF értékkel rendelkező betegek rövidebb túlélési ideje legalább részben magyarázható a fokozott gyógyszerérzékenységgel. Korábbi, P-gp expressziót immunhisztokémiával vizsgáló kutatás szintén ezt az összefüggést találta (Vajdovich és mtsai, 2018). Egyéb tanulmány is rámutatott arra, hogy a lymphomás betegek kezelés alatti neutropeniája összefüggésben lehet a későbbi rezisztenciával. Az enyhébb mellékhatásoktól szenvedő kutyák fokozottabb gyógyszerrezisztenciát mutattak, habár a súlyosabban neutropeniás betegek később hosszabb túléléseket produkáltak (Wang és mtsai, 2015).

Korábbi publikációk alapján (Ambudkar és mtsai, 1999; Lai és mtsai, 2020) a P-gp szubsztrát szerek (vinkrisztin, doxorubicin) alkalmazása során a gyógyszerrezisztencia növekedését feltételezzük. Tehát minél többször adjuk ezeket a gyógyszereket, annál hamarabb várjuk a kemorezisztencia kialakulását. A vizsgálatunkban első vonalban alkalmazott kemoterápiás protokoll (CHOP) tartalmaz ciklofoszfamidot, amely nem szubsztrátja ennek a receptornak. Ezen felül az L-aszparagináz és lomusztin, melyeket 16 recidivált betegnél alkalmaztunk, szintén nem ismerhetők fel a protein számára. Ezen tényezők módosíthatják a várt rezisztencia kialakulását. Ezen felül, kemoterápia előtt alkalmazott egyéb, szintén P-gp szubsztrát tetraciklin, ivermektin vagy kortikoszteroidok (prednizolon, metilprednizolon, dexametazon) befolyásolják a későbbi rezisztenciát (Gramer és mtsai, 2015). Ezekon túlmenően számos vegyület működhet P-gp inhibítorként, ezek közé tartozik az azitromicin, klaritromicin, eritromicin, omeprazol, pantoprazol, melyek kutya lymphoma kezelése során gyakran használatosak (Bansal és mtsai, 2009). Habár a T-sejtes betegpopulációban a P-gp expresszió növekedésével csökken az OST és RFP, a P-gp funkció vizsgálatakor a MAF növekedésével az RFP csökken, az alacsony elemszám miatt nem tekinthetjük ezt a felfedezést relevánsnak a P-gp, mint negatív prognosztikai faktor elbírálásakor. Összességében arra a következtetésre jutottunk, hogy a diagnóziskor mért P-gp expresszió és aktivitás nem jelzi előre a túlélési időket kutya lymphomában.

Az alacsony kezdeti P-gp expresszióval, aktivitással jellemezhető lymphoma tumorsejtek a kemoterápia következtében később fokozott efflux funkciót mutathatnak. Ennek vizsgálata tünetmentes és recidivált betegek nyirokcsomó-szöveteiből elvégzett ismételt mérésekkel van lehetőség. Fontos lehet korábbi, *in vitro* vizsgálatokhoz hasonlóan (Kurai és mtsai, 2020) a P-gp funkció változásainak jellemzése a kemoterápia során, annak meghatározása, hogy a P-gp által közvetített gyógyszerkiáramlás hozzájárul-e a szerzett rezisztenciához, behatárolva a betegek túlélésének lehetőségeit.

7.2. Konklúzió a mastocytomás betegek eredményei kapcsán

A vizsgálatban részt vevő, 31 mastocytomás beteg esetén megállapítottuk, hogy a malignitási fokozat összefüggésben áll a túlélési idővel, negatívan befolyásolja azt. Azon betegek, amelyek daganata Kiupel szerint „high grade” volt (OST medián 132 nap), szignifikánsan rövidebb ideig éltek a „low grade” (OST medián 599 nap, $p < 0,05$) daganattal rendelkező egyedeknél. Korábbi összefoglaló tanulmányban szintén leírták a malignitási fokozat és a túlélési idő közötti negatív korrelációt. Kizárólag műtétilag kezelt betegeknek a Patnaik-féle osztályozásban „grade I, II és III” osztályokban a túlélési idő 801, 492 és 144 nap volt. A Kiupel-féle felosztásban a túlélési idők a „low grade” tumorok esetében 728, „high grade” tumoroknál 189 nap volt. Abban a tanulmányban, amelyben vegyes kezelési csoportok voltak, a túlélési idők csak a rosszabb indulatú formáknál voltak statisztikailag meghatározhatók. Ők a Patnaik-féle „grade II”-es csoportot is kisebb és nagyobb malignitású csoportokra osztották. A „high grade/grade II”-es csoport túlélése 226 nap volt, a „high grade/grade III”-as csoporté 203 nap (Kiupel és mtsai, 2011; Patnaik és mtsai, 1984). A túlélési idő és szövettani malignitás kapcsolatot árnyalja az a tény is, hogy hazánk betegpopulációjában a „high grade” esetek gyakran előre haladottabb stádiumba (stage III, IV) sorolhatók onkológiai szakrendelésre kerülésük idejében. Ezen esetek jellemzően egyéb, kiegészítő citosztatikus terápiát igényelnek a sebészeti beavatkozás mellett, és rövidebbek a várható túlélési adataik. Az érintett páciensek állapota akár ki is zárja a műtéti eltávolítás lehetőségét, amennyiben a műtéttől nem várható az életminőség javulása, a túlélési idő növekedése.

A lymphomás betegek mintáihoz hasonlóan a mastocytomás szöveteken történő expresszió értékelése is manuálisan történt, ezért nem hagyhatjuk figyelmen kívül a vizsgáló szubjektivitását, mint befolyásoló tényezőt. A mastocytoma mintákban a nyirokcsomó részletekhez képest még nagyobb számban vannak jelen a P-gp antigént expresszáló sejtek (endothel sejtek epithel sejtek) (Ginn és mtsai, 1996). A pozitívítás 5 beteg esetében nem csak a membránon, hanem a cytoplasmában is tapasztalható volt (25. táblázat). A mastocytoma szövetekben a P-gp fokozott cytoplasma-beli kifejeződését korábbi tanulmány is leírta (Miyoshi és mtsai, 2002). A magasabb expresszió szignifikánsan korrelált a festődés intenzitásával, tehát feltehetően a százalékosan több P-gp pozitív sejt előfordulása individualisan nagyobb számú receptort is jelenthet a tumorsejtek felszínén.

A terápiareszisztencia szempontjából végzett vizsgálataink igazolták, hogy a P-gp immunhisztokémia és a receptor aktivitását mutató MAF értékek összehasonlíthatóak, és korrelálnak egymással a mastocytomák esetében is. Minél nagyobb mértékben fejeződött ki a P-gp a kórszövettani metszeteken a sejtek felszínén, annál fokozottabb volt az aktivitásuk (26. táblázat).

Egy korábbi tanulmányban 54 kutya betegen végeztek P-gp és MRP1 immunhisztokémiai jelölést. Vizsgálatukban a reakciót 10%-nál magasabb expressziónál tekintették pozitívnak. Ezzel a feltétellel 8 esetben igazoltak P-gp, és 10 esetben az MRP1 expressziót. A P-gp pozitív sejtek 5 db „grade I”-es és 3 db „grade II”-es besorolású páciensből származtak, míg az MRP1-pozitív sejtek tekintetében 4 eset tartozott „grade I”, 6 eset pedig „grade II” besorolás alá. Egyetlen „grade III” tumorból származó kimetszés sem tartalmazott P-gp-vagy MRP1-protonpumpát. Nem tapasztaltak szignifikáns korrelációt a fehérjék jelenléte és a szövettani malignitás között, de a „grade II” besorolású mintákban kisebb mértékű P-gp-expresszió volt tapasztalható, mint a „grade I” esetekben (Miyoshi és mtsai, 2002). Ezzel ellentétben a saját vizsgálatunk szerint, a P-gp immunhisztokémiai expressziója nem szignifikánsan ugyan, de növekedik a malignitási fokkal ($p = 0,187$), és a „grade II” esetek MAF-értékei pedig szignifikánsan nagyobbak a „grade I” esetekhez képest ($p = 0,0407$).

A túlélési adatok vizsgálatakor megállapítottuk, hogy az OST annál rövidebb volt, minél alacsonyabb volt a P-gp-expresszió, vagyis a membrántranszporter funkció. Figyelembe kell vennünk, hogy a teljes túlélési időt több tényező (elhullás oka, malignitás foka, stádium, kezelés módja) jelentősen befolyásolhatta. A statisztikailag értékelhető elemszámot az limitálja, hogy mennyi az a beteg, amely a daganat előrehaladottsága miatt hullik el, és nem valamilyen egyéb, a tumorról összefüggést nem mutató ok következtében (pl. trauma, fertőzés, nem megfelelő tulajdonosi hozzáállás a gyógyszerek adásával kapcsolatban stb.). A mi esetünkben ez az elemszám viszonylag kicsi volt (11/31; 35%). Nem véletlen, hogy a rosszabb indulatú (high grade) és előrehaladottabb daganatban szenvedő betegeket kezeltük inkább kemoterápiával, és ezek pusztultak el a tumor miatt többnyire (10/11), míg azok közül, amelyek nem a daganat miatt hullottak el ($n = 20$), csak 7 kapott kemoterápiát. A túlélést kifejezetten nagy mértékben befolyásolja a stádium, a műtét melletti egyéb kemoterápiás kezelés, tehát nem lehet kizárólag a membrántranszporter működésre visszavezetni.

Ugyanakkor viszonylag hasznos paraméternek látszik a MAF érték az RFP vonatkozásában, mert azon betegek tumorai, amelyek MAF-értéke alacsonyabb volt, mint 0,17, később recidiváltak, és a recidíva kb. 170 nap múlva következett be.

Mindezek mellett úgy látjuk, hogy kutatási eredményeinket jelentősen befolyásolta az a tény, hogy a kemoterápiával kezelt betegek száma viszonylag kicsi volt, és ezek között a malignus, „high grade”-nek mondható esetek száma is alacsony volt. Feltehetően ezeket a paramétereket nagyszámú, lehetőleg kizárólag kemoterápiával kezelt beteganyagban kellene vizsgálni, különösen kiemelve a recidívamentes túlélési idők elemzését. Úgy véljük, hogy a terápia rezisztenciát jelző P-gp immunhisztokémiai expressziója, valamint áramlási citometriával mért funkciója nem tekinthető független túlélési markernek, főként az

alacsonyabb „grade” besorolású tumorok esetében. A malignitási fokozat mellett olyan - lymphoma fejezetben is leírt- paraméterek is jelentősen befolyásolhatnak, mint az elhullás oka, a stádium, a kezelés módja. Mindezek mellett pedig gyanítható, hogy a multidrogrezisztencia a hízósejtes tumorok esetében is más rezisztenciamechanizmusok útján is aktívan érvényesül, és ezek a jelátviteli utak dominánsabbak lehetnek a P-gp funkcionál.

A nagyszámú publikáció ellenére korlátozott mennyiségű információnk van a daganatos kutyák ABC-transzportereiről, mivel ismereteink nagy része *in vitro* vizsgálatokon alapul. Nagyon kevés olyan klinikai vizsgálat létezik, amely értékelné ezen transzporterek expressziójának és funkciójának relevanciáját. A lymphoma és mastocytoma tumorok esetén a leírtakon felül lehet számos más befolyásoló molekuláris folyamat, más rezisztencia protein, amely befolyásolhatja a klinikai végeredményt. Vizsgálatunk nem elemezte más ABC-transzporterek, például a multidrog rezisztenciával asszociált protein 1-es (MRP1) és 2-es (MRP2) és a mellrák rezisztencia fehérje (BCRP) hozzájárulását a gyógyszerrezisztenciához (Sharom és mtsai, 2008; Ohta és mtsai, 2015). Más, ismert terápia rezisztenciát okozó mechanizmusok, mint például a citokróm P450 rendszer (Nieth és Lage, 2005) vagy az antioxidánsok (Grandjean és mtsai, 2002) szintén tompíthatták az intrinsic P-gp aktivitás hatását a terápia kimenetelére.

8. Új tudományos eredmények

1. A két vizsgálati módszer, a P-glikoprotein immunhisztokémiai jelölése, valamint áramlásos citométerrel megállapított aktivitása egymással jól összehasonlítható, és a vizsgálatok eredményei szorosan korrelálnak egymással a lymphomás és a mastocytomás kutyák esetében egyaránt.
2. A P-gp sejtmembránon (és esetenként a cytoplasmában is) történő jelentős kifejeződése, a P-gp kifejeződés-beli különbség, valamint a festődés intenzitása összefüggésben lehet a daganatsejt malignitásával, és rosszabb klinikai kórjólathoz vezethet.
3. Lymphomás betegekben a P-gp expresszió negatívan korrelál a teljes túlélési idővel a B-sejtes és T-sejtes csoportban is. A P-gp aktivitás a B-sejtes lymphomákban pozitívan korrelál a túlélési idővel, míg a T-sejtes betegek esetén negatív korreláció igazolható.
4. A B-sejtes lymphomás pácienseknél a csökkent P-gp aktivitás inkább okoz kemoterápia túlérzékenységet, mint előnyt a daganatellenes kezelés szempontjából. A T-sejtes lymphomában szenvedő betegek esetében ez a hatás nem volt tapasztalható.
5. A mastocytomás betegek esetében a P-gp expressziója és aktivitása is növekedett a szövettanilag meghatározott malignitási fokkal összefüggésben.
6. A P-gp funkció (MAF) nem bizonyult negatív prediktív faktornak a lymphomás vagy mastocytomás kutyák esetén.

9. Irodalomjegyzék

- Ambudkar S.V.; Dey S.; Hrycyna C.A.; Ramachandra M.; Pastan I.; Gottesman M.M.: **Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter.** Annu. Rev. Pharmacol., Toxicol., 39, 361–398, 1999.
- Amiri-Kordestani L.; Basseville A.; Kurdziel K.; Fojo A.T.; Bates S.E.: **Targeting MDR in breast and lung cancer: Discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies.** Drug Resist. Update, 15, 50–61., 2012.
- Arancia G.; Calcabrini A.; Meschini S.; Molinari A.: **Intracellular distribution of anthracyclines in drug resistant cells.** Cytotechnology, 27, 95–111 1998.
- Azijli K., Gotink K.J., Verheul H.M.: **The Potential Role of Lysosomal Sequestration in Sunitinib Resistance of Renal Cell Cancer.** J Kidney Cancer, 2(4):195-203., 2015.
- Baioni E., Scanziani E., Vincenti M.C., et al.: **Estimating canine cancer incidence: findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy.** BMC Vet Res, 13:203, 2017.
- Bansal T.; Jaggi M.; Khar R.K.; Talegaonkar S.: **Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy.** J. Pharm. Pharm. Sci., 12, 46-78, 2009.
- Barber L.G., Weishaar K.M.: **Criteria for designation of clinical substage in canine lymphoma: a survey of veterinary oncologists,** Vet Comp Oncol, 14:32–39, 2016.
- Benjamin S.E., Sorenmo K.U., Krick E.L., Salah P, Walsh K.A., Weinstein N.M., Keuler N.S., Avery A.C., Atherton M.J., Lenz J.A.: **Response-based modification of CHOP chemotherapy for canine B-cell lymphoma.** Vet. Comp. Oncol., 19, 541-550, 2021.
- Bergman P.J., **Multidrug resistance.** In: Kirk's Current Veterinary Therapy XIII: Small Animal Practice, 13th ed., 479-482., 2000.
- Blackwood L, Murphy S, Buracco P, De Vos JP, De Fornel-Thibaud P, Hirschberger J, Kessler M, Pastor J, Ponce F, Savary-Bataille K, Argyle DJ.: **European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats.** Vet Comp Oncol., 10(3):1-29., 2012.
- Bostock D.E.: **Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs ad cats,** Br Vet J 142:19, 1986.
- Braun M., Kirsten R., Rupp N.J., Moch H., Fend F., Wernert N., Kristiansen G., Perner S.: **Quantification of protein expression in cells and cellular subcompartments on immunohistochemical sections using a computer supported image analysis system.** Histol Histopathol., 28(5):605-10, 2013.
- Bronden L.B., Nielsen S.S., Toft N., et al.: **Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark,** Vet Rec, 166:586–590, 2010.
- Campos M., Ducatelle R., Kooistra H.S., Rutteman G., Duchateau L., Polis I., Daminet S.: **Immunohistochemical expression of potential therapeutic targets in canine thyroid carcinoma.** J Vet Intern Med., 28: 564-570, 2014.

- Camus M.S., Priest H.L., Koehler J.W., Driskell E.A., Rakich P.M., Ilha M.R., Krimer P.M.: **Cytologic Criteria for Mast Cell Tumor Grading in Dogs With Evaluation of Clinical Outcome.** *Vet Pathol.*, 53(6):1117-1123, 2016.
- Canioni D., Deau-Fischer B., Taupin P., Ribrag V., Delarue R., Bosq, J., Rubio M.-T., Roux D., Vasiliu V., Varet B., Brousse N., Hermine, O.: **Prognostic Significance of New Immunohistochemical Markers in Refractory Classical Hodgkin Lymphoma: A Study of 59 Cases,** *Plos one*, 4., 6341, 2009.
- Cheuk W., Chan J.K.: **Subcellular localization of immunohistochemical signals: knowledge of the ultrastructural or biologic features of the antigens helps predict the signal localization and proper interpretation of immunostains.** *Int J Surg Pathol.*, 12(3):185-206., 2004.
- Comazzi S., Gelain M. E.: **Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma,** *Vet J*, 188. 149–155, 2011.
- Comazzi S., Marelli S., Cozzi M. et al: **Breed-associated risks for developing canine lymphoma differ among countries: an European canine lymphoma network study.** *BMC Vet Res*, 14, 232, 2018.
- Cooper M., Tsai X., Bennett P.: **Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases.** *Veterinary and Comparative Oncology*, 7: 196-206, 2009.
- Culmsee K.; Gruber A.D.; von Samson-Himmelstjerna G.; Nolte I.: **Quantification of MDR-1 gene expression in canine tissues by real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction.** *Res. Vet. Sci.*, 77, 223-229, 2004.
- D'Archangelo M., Hewitt S., Robinowitz M.: **CLSI Releases Updated Guideline for the Development of Immunohistochemical Assays,** *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 19, 4, 291-292, 2011.
- Davis B.W., Ostrander E.A.: **Domestic Dogs and Cancer Research: A Breed-Based Genomics Approach.** *ILAR Journal*, Vol 55 (1), 59–68, 2014.
- de Nardi A.B., dos Santos Horta R., Fonseca-Alves C.E., de Paiva F.N., Linhares L.C.M., Firmo B.F., Ruiz Sueiro F.A., de Oliveira K.D., Lourenço S.V., De Francisco Strefezzi R., Brunner C.H.M., Rangel M.M.M., Jark P.C., Castro J.L.C., Ubukata R., Batschinski K., Sobral R.A., da Cruz N.O., Nishiya A.T., Fernandes S.C., dos Santos Cunha S.C., Gerardi D.G., Challoub G.S.G., Biondi L.R., Laufer-Amorim R., de Oliveira Paes P.R., Lavallo G.E., Huppel R.R., Grandi F., de Carvalho Vasconcellos C.H., dos Anjos D.S., Luzo Â.C.M., Matera J.M., Vozdova M., Dagli M.L.Z.: **Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors.** *Cells*, 11, 618., 2022.
- Dhaliwal R.S, Kitchell B.E., Ehrhart E, Valli V.E., Dervisis N.G.: **Clinicopathologic significance of histologic grade, pggp, and p53 expression in canine lymphoma.** *J Am Anim Hosp Assoc.*, 49(3):175-84, 2013.
- Dhaliwal R.S., Kitchell B.E., Ehrhart E., Valli V.E., Dervisis N.G.: **Clinicopathologic significance of histologic grade, pggp, and p53 expression in canine lymphoma.** *J Am Anim Hosp Assoc.*, 49(3):175-84, 2013.

- Dias J. N. R., André A. S., Aguiar S. I., Gil S., Tavares L., Aires-da-Silva F. **Immunotherapeutic Strategies for Canine Lymphoma: Changing the Odds Against Non-Hodgkin Lymphoma**, *Frontiers in Vet Sci*, 8, 2021.
- Ernst T., Kessler M., Lautscham E., et al.: **Multicentric lymphoma in 411 dogs - an epidemiological study**, *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*, 44:245–251, 2016.
- Farinha P., Gascoyne R.D.: **Helicobacter pylori and MALT lymphoma**, *Gastroenterology*, 128:1579–1605, 2005.
- Foster A.P., Sturgess C.P., Gould D.J., et al.: **Pemphigus foliaceus in association with systemic lupus erythematosus, and subsequent lymphoma in a cocker spaniel**, *J Small Anim Pract*, 41:266–270, 2000.
- Fry M.M., Vernau W., Pesavento P.A., et al.: **Hepatosplenic lymphoma in a dog**, *Vet Pathol*, 40:556–562, 2003.
- Fulcher R.P., Ludwig L.L., et al.: **Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs**. *J Am Vet Med Assoc*, 228:210–215, 2006.
- Geyer N.E., Reichle J.K., Valdes-Martinez A., et al.: **Radiographic appearance of confirmed pulmonary lymphoma in cats and dogs**, *Vet Radiol Ultrasound*, 51:386–390, 2010.
- Ginn P.: **Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues**. *Vet Pathol*, 33:533–541, 1996.
- Godlewski D., Adamczak M., Wojtyś P.: **Experiences of cancer patients in Poland throughout diagnosis and treatment**, *Eur J Cancer Care*, 26. 2017.
- Gramer I.; Kessler M.; Geyer J.: **Determination of MDR1 gene expression for prediction of chemotherapy tolerance and treatment outcome in dogs with lymphoma**. *Vet. Comp. Oncol.*, 13 ,363-372, 2015.
- Grandjean F., Brémaud L., Robert J., Ratinaud M.H.: **Alterations in the expression of cytochrome c oxidase subunits in doxorubicin-resistant leukemia K562 cells**. *Biochem. Pharmacol.*, 63, 823-831, 2002.
- Grüntzig K., Graf R., Hässig M., et al.: **The Swiss canine cancer registry: a retrospective study on the occurrence of tumours in dogs in Switzerland from 1955 to 2008**. *J Comp Path*, 152:161–171, 2015.
- Hahn K.A., Richardson R.C., Hahn E.A., et al.: **Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma**, *Vet Pathol*, 31:528–540, 1994.
- Hayes A., Adams V., et al.: **Vinblastine and prednisolone chemotherapy for surgically excised grade III canine cutaneous mast cell tumours**. *Vet Comp Oncol*, 5:168–176., 2007.
- Hifumi T., Miyoshi N., Kawaguchi H., Nomura K., Yasuda N.: **Immunohistochemical detection of proteins associated with multidrug resistance to anti-cancer drugs in canine and feline primary pulmonary carcinoma**. *J Vet Med Sci.*, 72(5):665-8, 2010.

- Holló Z., Homolya L., Davis C.W., Sarkadi B.: **Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter**. *Biochim. Biophys. Acta*, 1191, 384-388, 1994.
- Horta R.S., Lavalle G.E., Monteiro L.N., Souza M.C.C, Cassali G.D., Araújo R.B.: **Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features**. *Vet Pathol.*, 55(2):212-223., 2018.
- Hyokai S, Tanak H, Aihara N, Kamiie J.: **Expression of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein in three cases of canine lymphoma showing drug resistance**. *J Vet Med Sci*, 83:473–477, 2021.
- Ilyinskaya GV, Mukhina EV, Soboleva AV, Matveeva OV, Chumakov PM.: **Oncolytic Sendai Virus Therapy of Canine Mast Cell Tumors (A Pilot Study)**. *Front Vet Sci*. 4;5: 116., 2018.
- Ito D, Brewer S, Modiano JF, et al.: **Development of a novel antic canine CD20 monoclonal antibody with diagnostic and therapeutic potential**, *Leuk Lymphoma* 56:219–225, 2015.
- Ito D., Frantz A.M., Modiano J.F.: **Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications**. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 159, 192–201, 2014.
- Jark P.C.; Mundin D.B.; de Carvalho M.; Ferioli R.B.; Anai L.A.; Marchi F.A.; Rogatto S.R.; Laufer-Amorim R.; Tinucci-Costa M.: **Genomic copy number variation associated with clinical outcome in canine cutaneous mast cell tumors**. *Res. Vet. Sci.*, 111, 26–30., 2017.
- Juliano R.L.; Ling V.: **A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants**. *Biochim Biophys Acta*, 455, 152–162., 1976.
- Karai E.; Szabényi K.; Windt T.; Fehér S.; Szendi E.; Dékay V.; Vajdovich P, Szakács G.; Füredi A.: **Celecoxib Prevents Doxorubicin-Induced Multidrug Resistance in Canine and Mouse Lymphoma Cell Lines**. *Cancers*, 12, 11-17, 2020.
- Karászi E., Jakab K., Homolya L., Szakács G., Holló Z., Telek B., Kiss A., Rejtő L., Nahajevszky S., Sarkadi B., Kappelmayer J.: **Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia**. *Br. J. Haematol*, 112, 308-314, 2001.
- Keller E.T.: **Immune-mediated disease as a risk factor for caninelymphoma**, *Cancer*, 70:2334–2337, 1992.
- Kinns J., Mai W.: **Association between malignancy and sonographic heterogeneity in canine and feline abdominal lymph nodes**, *Vet Radiol Ultrasound* 48:565–569, 2007.
- Kiupel M., Teske E., Bostock D.: **Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma**. *Vet. Pathol.*, 36, 292-300, 1999.

- Kiupel M., Webster J.D., Bailey K.L., Best S., DeLay J., Detrisac C.J., Fitzgerald S.D., Gamble D., Ginn P.E., Goldschmidt M.H., Hendrick M.J., Howerth E.W., Janovitz E.B., Langohr I., Lenz S.D., Lipscomb T.P., Miller M.A., Misdorp W., Moroff S., Mullaney T.P., Neyens I., O'Toole D., Ramos-Vara J., Scase T.J., Schulman F.Y., Sledge D., Smedley R.C., Smith K., Snyder P.W., Southorn E., et al.: **Proposal of a two-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biologic behavior.** *Vet Pathol* 48:147–155, 2011.
- Kiupel M., Webster J.D., Kaneene J.B., Miller R., Yuzbasiyan-Gurkan V.: **The Use of KIT and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors.** *Vet. Pathol.*, 41, 371–377, 2004.
- Kiupel M.: **Mast cell tumors.** In: Meuten D.J.: *Tumors in domestic animals*, 6th edition, 176–202. 2016.
- Kourti M., Vavatsi N.; Gombakis N.; Sidi V.; Tzimagiorgis G.; Papageorgiou T.; Kolioukas D.; Athanassiadou F.: **Expression of multidrug resistance 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein 1 (MRP1), lung resistance protein (LRP), and breast cancer resistance protein (BCRP) genes and clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Int. J. Hematol.*, 86, 166–173., 2007.
- Lai J.I., Tseng Y.J., Chen M.H., Huang C.F., Chang P.M.: **Clinical perspective of FDA approved drugs with P-glycoprotein inhibition activities for potential cancer therapeutics.** *Front. Oncol.*, 10, 561936., 2020.
- LeBlanc A. K., Atherton M., Bentley R. T., Boudreau C.E., Burton J.H., Curran K.M., Dow S., Giuffrida M.A., Kellihan H.B., Mason N.J., Oblak M., Selmic L.E., Selting K.A., Singh A., Tjostheim S., Vail D.M., Weishaar K.M., Berger E.P., Rossmeisl J.H., Mazcko C.: **Veterinary cooperative oncology group - common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE v2) following investigational therapy in dogs and cats.** *Vet. Comp. Oncol.*, 19, 311-352, 2021.
- LeBlanc A.K., Jakoby B.W., Townsend D.W., Daniel G.B.: **18FDG-PET imaging in canine lymphoma and cutaneous mast cell tumor.** *Vet Radiol Ultrasound.*, 50(2):215-23, 2009.
- Lee J.J.; Hughes C.S.; Fine R.L.; Page R.L.: **P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance.** *Cancer*, 77, 1892-1898, 1996.
- Lee J.Y., Rosenbaum D.M.: **Transporters Revealed.** *Cell*, 9;168(6):951-953, 2017.
- Lindblad-Toh K., Wade C.M., Mikkelsen T.S., et al.: **Genomesequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog,** *Nature*, 438:803–819, 2005.
- Lowe R, Gavazza A, Impellizeri JA, et al.: **The treatment of canine mast cell tumors with electrochemotherapy with or without surgical excision,** *Vet Comp Oncol* 15:775–784, 2017.
- Luethcke K.R., Trepanier L.A., Tindle A.N., Labadie J.D.: **Environmental exposures and lymphoma risk: a nested case–control study using the Golden Retriever Lifetime Study cohort.** *Canine Med Genet* 9, 10, 2022.
- Madewell B.: **Hematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions.** In Theilen G.H., Madewell B.: *Veterinary Cancer Medicine*, ed 2, Philadelphia, 1987.

- Marconato L., Frayssinet P., Rouquet N., et al.: **Randomized, placebo-controlled, double-blinded chemoimmunotherapy clinical trial in a pet dog model of diffuse large B-cell lymphoma**, *Clin Cancer Res* 20:668–677, 2014.
- Marconato L.; Gelain M.E.; Comazzi S.: **The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review**. *Hematol Oncol*, 31, 1–9, 2013.
- Meyer A., Gruber A.D., Klopffleisch R.: **CD25 is expressed by canine cutaneous mast cell tumors but not by cutaneous connective tissue mast cells**. *Vet Pathol* 49:988–997., 2012.
- Miller A.G., Morley P.S., Rao S., et al.: **Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma**, *J Vet Intern Med*, 23:116–122, 2009.
- Miyoshi N, Tojo E, Oishi A, Fujiki M, Misumi K, Sakamoto H, Kameyama K, Shimizu T, Yasuda N.: **Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors**. *J Vet Med Sci*, 64:531–533, 2002.
- Modiano J.F., Breen M.: **Shared pathogenesis of human and canine tumors - an inextricable link between cancer and evolution**. *Cancer Therapy*, 6:239–246, 2008.
- Moore A, Leville C, Reimann K, Shu H, Arias I: **The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and it's association with multidrug resistance**. *Cancer Invest*, 13:475–479, 1995.
- Moore A.S., Frimberger A.E., Taylor D., Sullivan N.: **Retrospective outcome evaluation for dogs with surgically excised, solitary Kiupel high-grade, cutaneous mast cell tumours**. *Vet. Comp. Oncol.*, 18, 402–408., 2020.
- Moore A.S.: **Treatment of T cell lymphoma in dogs**. *Vet Rec.*, 179(11):277, 2016.
- Moore P.F., Affolter V.K., Keller S.M.: **Canine inflamed nonepitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: a diagnostic conundrum**, *VetDermatol*, 24:204–211, 2013.
- Mora Lagares L.; Pérez-Castillo Y.; Minovski N.; Novič M.: **Structure–Function Relationships in the Human P-Glycoprotein (ABCB1): Insights from Molecular Dynamics Simulations**. *Int. J. Mol., Sci.* 23, 362, 2022.
- Mullins M.N., Dernell W.S., et al.: **Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004)**. *J Am Vet Med Assoc*, 228:91–95, 2006.
- Musser M.L., Clifford C.A., Bergman P.J., Trembl L.S., McAnulty LCC, McNiel E.A., Johannes CM.: **Randomised trial evaluating chemotherapy alone or chemotherapy and a novel monoclonal antibody for canine T-cell lymphoma: A multicentre US study**. *Vet Rec Open*, 9(1), 49, 2022.
- Nakaichi M, Takeshita Y, Okuda M, Nakamoto Y, Itamoto K, Une S, Sasaki N, Kadosawa T, Takahashi T, Taura Y.: **Expression of the MDR1 gene and P-glycoprotein in canine mast cell tumor cell lines**. *J Vet Med Sci.*, 69(2):111-5., 2007.
- Nieth C., Lage H.: **Induction of the ABC-transporters Mdr1/P-gp (Abcb1), mrpl (Abcc1), and bcrp (Abcg2) during establishment of multidrug resistance following exposure to mitoxantrone**. *J. Chemother.*, 17, 215–223., 2005.

- Ohmori K, Kawarai S, Yasuda N, Tanaka A, Matsuda H, Nishimura R, Sasaki N, Tsujimoto H, Masuda K.: **Identification of c-kit mutations-independent neoplastic cell proliferation of canine mast cells.** *Vet Immunol Immunopathol.* 126:43–53. 2008.
- Ohta K.; Hoshino H.; Wang J.; Ono S.; Iida Y.; Hata K.; Huang S.K.; Colquhoun S.; Hoon D.S.: **MicroRNA-93 activates c-Met/PI3K/ Akt pathway activity in hepatocellular carcinoma by directly inhibiting PTEN and CDKN1A.** *Oncotarget*, 6, 3211–3224, 2015.
- Ozaki K., Yamagami T., Nomura K., et al.: **T-cell lymphoma with eosinophilic infiltration involving the intestinal tract in 11 dogs.** *Vet Pathol*, 43:339–344, 2006.
- Palacios-Ortega J., Rivera-de-Torre E.; Gavilanes J.G.; Slotte J.P.; Martínez-Del-Pozo Á.; García-Linares S.: **Biophysical approaches to study actinoporin-lipid interactions.** *Methods Enzymol.*, 649, 307-339, 2021.
- Pasechnikov V., Chukov S., Fedorov E., Kikuste I., Leja, M.: **Gastric cancer: Prevention, screening and early diagnosis,** *World J Gastroenterol.*, 20. 13842–13862, 2014.
- Pastor M., Chalvet-Monfray K., Marchal T., et al.: **Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year,** *J Vet Intern Med*, 23:301–310, 2009.
- Patnaik A.K., Ehler W.J., MacEwen E.G.: **Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs.** *Vet Pathol* 21:469–474., 1984.
- Peto R.: **Quantitative implications of the approximate irrelevance of mammalian body size and lifespan to lifelong cancer risk.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370, 2015.
- Poirier V.J., Adams WM., Forrest L.J., Green E.M., Dubielzig R.R., Vail D.V.: **Radiation therapy for incompletely excised grade II canine mast cell tumors.** *J Am Anim Hosp, Assoc* 42:430–434, 2006.
- Ponce F., Marchal T., Magnol J.P., et al.: **A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology,** *Vet Pathol*, 47:414–433., 2010.
- Poźniak B., Pawlak A., Obmińska-Mrukowicz B.: **Flow cytometric assessment of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein activity and expression in canine lymphoma.** *In Vivo.*, 29, 149-153., 2015.
- Priester W.A., McKay F.W.: **The occurrence of tumors in domestic animals,** *Natl Cancer Inst Monogr*, 54:1–210, 1980.
- Rassnick K.M., McEntee M.C., Erb H.N., Burke B.P., Balkman C.E., Flory A.B., Kiselow M.A.; Autio K., Gieger T.L.: **Comparison of 3 Protocols for treatment after induction of remission in dogs with lymphoma.** *J. Vet. Intern. Med.*, 21, 1364-1373, 2017.
- Reddell P., De Ridder T.R., Morton J.M., Jones P.D., Campbell J.E., Brown G., Johannes C.M., Schmidt P.F., Gordon V.: **Wound formation, wound size, and progression of wound healing after intratumoral treatment of mast cell tumors in dogs with tigilanol tiglate.** *J Vet Intern Med*, 35(1):430-441., 2021.

- Richards K.L., Suter S.E.: **Man's best friend: what can pet dogs teach us about non-Hodgkin's lymphoma?** *Immunol. Rev.*, 263, 173–191, 2015.
- Ridge L., Swinney G.: **Angiotropic intravascular lymphosarcoma presenting as bi-cavity effusion in a dog**, *Aust Vet J*, 82:616–618, 2004.
- Rivera P, Akerlund-Denneberg N, Bergvall K, Kessler M, Rowe A, Willmann M, et al.: **Clinical efficacy and safety of a water-soluble micellar paclitaxel (Paccal Vet) in canine mastocytomas.** *J Small Anim Pract*, 54:20–7 2013.
- Rosenberg M.P., Matus R.E., Patnaik A.K.: **Prognostic factors in dogs with lymphoma and associated hypercalcemia**, *J Vet Intern Med*, 5:268–271, 1991.
- Rout E.D., Labadie J.D, Yoshimoto J.A., Avery P.R., Curran K.M., Avery A.C.: **Clinical outcome and prognostic factors in dogs with B-cell chronic lymphocytic leukemia: A retrospective study.** *J. Vet. Intern. Med.*, 35, 1918-1928, 2021.
- Sabattini S., Scarpa F., Berlato D., Bettini G.: **Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3?** *Vet Pathol.*, 52(1):70-3, 2015.
- Santoro D., Marsella R., Hernandez J.: **Investigation on the association between atopic dermatitis and the development of mycosis fungoides in dogs: a retrospective case-control study**, *Vet Dermatol*, 18:101–106, 2007.
- Scarpa F., Sabattini S., Marconato L., Capitani O., Morini M., Bettini G.: **Use of histologic margin evaluation to predict recurrence of cutaneous malignant tumors in dogs and cats after surgical excision.** *J Am Vet Med Assoc*, 240: 1181–1187, 2012.
- Schenck P.A., Chew D.J., Nagoda L.A., et al.: **Disorders of calcium: hypercalcemia and hypocalcemia.** In DiBartola SP, editor: *Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice*, ed 4, St. Louis, Elsevier, 20–194, 2012.
- Schleis S.E.; LeBlanc A.K.; Neilsen N.R.; LeBlanc C.J.: **Flow cytometric evaluation of multidrug resistance proteins on grossly normal canine nodal lymphocyte membranes.** *Am. J. Vet. Res.*, 69, 1310-1315, 2008.
- Seelig D.M., Avery A.C., Ehrhart E.J., Linden M.A.: **The Comparative Diagnostic Features of Canine and Human Lymphoma.** *Vet. Sci.*, 3, 11, 2016.
- Selliah N., Eck S., Green C., Oldaker T., Stewart J., Vitaliti A., Litwin, V.: **Flow Cytometry Method Validation Protocols**, *Current Protocols in Cytometry*, 87., e53, 2019.
- Sharom F.J.: **ABC multidrug transporters: Structure, function and role in chemoresistance.** *Pharmacogenomics*, 9, 105–127, 2008.
- Sheet S., Oh YI., Arora D., Choi BH., Ko M., Nam Y., Lim Y., Lim JA., Park M., Park W., Seo KW., Lee KT.: **Insight into the potential candidate genes and signaling pathways involved in lymphoma disease in dogs using a comprehensive whole blood transcriptome analysis.** *Gene*, 5;838:146735, 2022.
- Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A.: **Cancer Statistics, 2021.** *CA. Cancer. J. Clin.*, 71, 7-33, 2021.

- Sierra Matiz OR, Santilli J, Anai LA, Da Silva MCL, Sueiro FA, Sequeira JL, Magalhães LF, Magalhães GM, Tinucci Costa M, Calazans SG.: **Prognostic significance of Ki67 and its correlation with mitotic index in dogs with diffuse large B-cell lymphoma treated with 19-week CHOP-based protocol.** J Vet Diagn Invest, 30(2):263-267, 2018.
- Simoes J.P.C., Schoning P.: **Canine Mast Cell Tumors: A Comparison of Staining Techniques.** J. Vet. Diagn. Investig., 6, 458–465., 1994.
- Simpson A.M., Ludwig L.L., Newman S.J., Bergman P.J., Hottinger H.A., Patnaik A.K.: **Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs.** J Am Vet Med Assoc, 224:236–240, 2004.
- Sirivisoot S., Kasantikul T., Techangamsuwan S., Radtanakantikanon A., Chen K., Lin T.Y., Rungsipipat A.: **Evaluation of 41 single nucleotide polymorphisms in canine diffuse large B-cell lymphomas using MassARRAY.** Sci Rep 12, 5120, 2022.
- Sledge D.G., Webster J., Kiupel M.: **Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection.** Vet J 215:43–54, 2016.
- Śmiech A., Ślaska B., Łopuszyński W., Jasik A., Bochyńska D., Dąbrowski R.: **Epidemiological assessment of the risk of canine mast cell tumours based on the Kiupel two-grade malignancy classification.** Acta Vet Scand 60:70, 2018.
- Smith J., Kiupel M., Farrelly J., Cohen R., Olmsted G., Kirpensteijn J., Brocks B., Post G.: **Recurrence rates and clinical outcome for dogs with grade II mast cell tumours with a low AgNOR count and Ki67 index treated with surgery alone.** Vet. Comp. Oncol., 15, 36–45, 2015.
- Sogame N., Risbon R., Burgess K.E.: **Intestinal lymphoma in dogs: 84 cases (1997-2012),** J Am Vet Med Assoc, 252:440–447, 2018.
- Sokołowska J, Urbańska K, Giziński S, Zabielska K, Lechowski R.: **Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in various subtypes of canine lymphomas.** Pol J Vet Sci., 18(1):123-30, 2015.
- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F.: **Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.** CA Cancer J Clin., 71(3):209-249, 2021.
- Takashima-Uebelhoer B.B., Barber L.G., Zagarins S.E., et al.: **Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non-Hodgkin's lymphoma,** EnvironRes, 112:171–176, 2012.
- Tams T.R., Macy D.W.: **Canine mast cell tumors.** Comp Cont Ed Pract Vet, 27:259–263,1981.
- Tanabe S, Yamaguchi M, Iijima M, et al.: **Fluorescence detection of a new photosensitizer, PAD-S31, in tumour tissues and its use as a photodynamic treatment for skin tumours in dogs and a cat: a preliminary report,** Vet J, 167:286–293, 2004.
- Teng S.P.; Hsu W.L.; Chiu C.Y.; Wong M.L.; Chang S.C.: **Overexpression of P-glycoprotein, STAT3, phospho-STAT3 and KIT in spontaneous canine cutaneous mast cell tumours before and after prednisolone treatment.** Vet. J., 193, 551-556, 2012.

- Thamm D.H., Turek M.M., Vail D.M.: **Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases.** *J Vet Med Sci*, 68:581–587., 2006.
- Thamm D.H., Weishaar K.M., Charles J.B., Ehrhart E.J.: **Phosphorylated KIT as a predictor of outcome in canine mast cell tumours treated with toceranib phosphate or vinblastine.** *Vet. Comp. Oncol.*, 18, 169–175, 2019.
- Thompson J.J., Morrison J.A., Pearl D.L., Boston S.E., Wood G.A., Foster R.A., Coomber B.L.: **Receptor tyrosine kinase expression profiles in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors.** *Vet Pathol*, 53:545–558, 2016.
- Thompson J.J., Pearl D.L., et al: **Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices.** *Vet Pathol*, 48:156–168., 2011.
- Tomasetti C., Li L., Vogelstein B.: **Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention.** *Science*, 355:1330– 1334, 2017.
- Tomasetti C., Vogelstein B.: **Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions,** *Science*, 347:78–81, 2015.
- Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A.: **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin.*, 65(2):87-108, 2015.
- Turek M.M., Thamm D.H., Mitzey A., et al.: **Human granulocytemacrophage colony-stimulating factor DNA cationic-lipid complexed autologous tumour cell vaccination in the treatment of canine B-cell multicentric lymphoma,** *Vet Comp Oncol* 5:219–231, 2007.
- Vail D.M., Thamm D.H., Liptak J.M. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology 6th ed.;** WB Saunders: Philadelphia, Pennsylvania, pp. 688-712, 2019.
- Vajdovich P.; Koltai Z.; Dékay V.; Kungl K.; Harnos A.: **Evaluation of P-gp (MDR1) immunohistochemistry in canine lymphoma - prognostic and clinical aspects.** *Acta Vet. Hung.*, 66, 309–328, 2018.
- Valli V.E., Kass P., San Myint M., and Scott, F.: **Canine lymphoma: The effect of age, stage of disease, subtype of tumor, mitotic rate and treatment protocol on overall survival.** *Vet Pathol* 50:738–748, 2013.
- Valli V.E., San Myin, M., Barthel A., Bienzle D., Caswell J., Colbatzky F., Durham A., Ehrhart E.J., Johnson Y., Jones C., Kiupel M., Labelle P., Lester M., Miller M., Morre P., Moroff S., Roccabianca P., Ramos-Vara J., Ross A., Scase T., Tvedten H., Vernau W.: **Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria.** *Vet. Pathol*, 48, 198–211, 2011.
- Villamil J.A., Henry C.J., Hahn A.W., et al.: **Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma,** *J Cancer Epidemiol*, 2009:591753, 2009.
- Wang S.L.; Lee J.J.; Liao A.T.: **Chemotherapy-induced neutropenia is associated with prolonged remission duration and survival time in canine lymphoma.** *Vet. J.*, 205, 69-73, 2015.
- Watton T.C., Purzycka K., Fitzgerald E.: **Computed tomographic findings and clinical features in dogs with canine cutaneous lymphoma: 10 cases (2007-2018).** *J Am Vet Med Assoc.*, 259(12):1433-1440, 2021.

- Waugh E.M., Gallagher A., Haining H., et al.: **Optimisation and validation of a PCR for antigen receptor rearrangement (PARR) assay to detect clonality in canine lymphoid malignancies**, *Vet Immunol Immunopathol*, 182:115–124, 2016.
- Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Miller R.A., Kaneene J.B., Kiupel M.: **Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication**. *Vet. Pathol.*, 44, 298–308., 2007.
- Weishaar K.; Ehrhart E.; Avery A.; Charles J.; Elmslie R.; Vail D.; London C.; Clifford C.; Eickhoff J.; Thamm D.: **c-Kit mutation and localization status as response predictors in mast cell tumors in dogs treated with prednisone and toceranib or vinblastine**. *J. Vet. Intern. Med.*, 32, 394–405., 2017.
- White C.R., Hohenhaus A.E., Kelsey J., Procter-Gray E.: **Cutaneous MCTs: associations with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster**. *J Am Anim Hosp Assoc*, 47:210–216, 2011.
- Willmann M., Hadzijusufovic E., Hermine O., et al.: **The paradigmatic example of canine and human mast cell neoplasms**. *Vet Comp Oncol.*, 17(1):1-10., 2019.
- Willmann M., Yuzbasiyan-Gurkan V., Marconato L., Dacasto M., Hadzijusufovic E., Hermine O., Sadovnik I., Gamperl S., Schneeweiss-Gleixner M., Gleixner K.V., Böhm T., Peter B., Eisenwort G., Moriggl R., Li Z., Jawhar M., Sotlar K., Jensen-Jarolim E., Sexl V., Horny H.P., Galli S.J., Arock M., Vail D.M., Kiupel M., Valent P.: **Proposed Diagnostic Criteria and Classification of Canine Mast Cell Neoplasms: A Consensus Proposal**. *Front Vet Sci.*, 10;8:755258., 2021.
- Yasuda D., Fujita M., Yasuda S., Taniguchi A., Miura H., Hasegawa D., Orima H.: **Usefulness of MRI compared with CT for diagnosis of mesenteric lymphoma in a dog**. *J Vet Med Sci.*, 66(11):1447-51, 2004.
- Yoda A.; Adelmant G.; Tamburini J.; Chapuy B.; Shindoh N.; Yoda Y.; Weigert O.; Kopp N.; Wu S.C.; Kim S.S.; Liu H.; Tivey T.; Christie A.L.; Elpek K.G.; Card J.; Gritsman K.; Gotlib J.; Deininger M.W.; Makishima H., Turley S.J., Javidi-Sharifi N., Maciejewski J.P., Jaiswal S., Ebert B.L., Rodig S.J., Tyner J.W., Marto J.A., Weinstock D.M., Lane A.A.: **Mutations in G protein beta subunits promote transformation and kinase inhibitor resistance**. *Nat. Med.*, 21, 71–75., 2014.
- Zandvliet M., Teske E.: **Mechanisms of Drug Resistance in Veterinary Oncology- A Review with an Emphasis on Canine Lymphoma**. *Vet Sci.*, 12;2(3):150-184, 2015.
- Zandvliet M.; Teske E.; Schrickx J.A.: **Multi-drug resistance in a canine lymphoid cell line due to increased P-glycoprotein expression, a potential model for drug-resistant canine lymphoma**. *Toxicol. In Vitro*, 28, 1498–1506, 2014.

10. A doktori kutatás eredményeinek közzései

10.1. Lektorált, impakt faktoral bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk

Vajdovich P., Koltai Z., 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

Karai E., Dékay V., és Vajdovich P.: **Az áramlási citométer, mint a lymphoma diagnosztikájában alkalmazható eszköz az állatorvosi onkológiában,** MÁL, 142 (9), 531–544, 2020. IF (2020): 0.107

Karai E., Szabényi K., Windt T., Fehér S., Szendi E., Dékay V., Vajdovich P., Szakács G. és Füredi A.: **Celecoxib Prevents Doxorubicin-Induced Multidrug Resistance in Canine and Mouse Lymphoma Cell Lines,** Cancers, 12(5). 1117, 2020.; IF (2020): 6.162

Dékay V., Vajdovich P., Karai E.: **P-glikoprotein immunhisztokémiai és áramlásos citometriai összehasonlító vizsgálata kutyák mastocytomái esetében.** MÁL, 144 (2), 77-90., 2022. IF (2022): 0.236

Dékay V., Karai E., Füredi A., Szabényi K., Szakács G., Vajdovich P.: **P-Glycoprotein activity at diagnosis does not predict therapy outcome and survival in canine B-cell lymphoma.** Cancers, 13, 14 (16):3919., 2022. IF (2022): 6.575

10.2. Konferencia prezentációk

Vasas O., László Z., Dékay V., Vajdovich P.: **Hogyan csökkentjük a doxorubicin mellékhatásait, dóziscsökkentéssel vagy előkezeléssel II.,** Akadémiai Beszámolók, Klinikumok, Gyógyszertan, Toxikológia, 2014.

Dékay V., Karai E., Verebényi T., Koltai Z., Vajdovich P.: **A multidrogrezisztencia fehérje-1 (MDR1) immunhisztokémiai és funkcionális vizsgálatának összehasonlítása lymphomás, emlődaganatos és mastocytomás kutyák vizsgálata során,** Akadémiai beszámolók, Klinikumok, 2016.

Dékay V.: **A Multidrog rezisztencia protein-1 (MDR1) immunhisztokémiai és funkcionális összehasonlító vizsgálata kutyák lymphomás, emlődaganatos és mastocytomás megbetegedései esetén,** Akadémiai beszámolók, Klinikumok, 2016.

Dékay V., Karai E., Füredi A., Szabényi K., Szakács G., Vajdovich P.: **Multidrug resistance activity factor (MAF) calculations based on Calcein test in canine lymphoma patients treated by various protocols,** ESVONC-ESVCP Congress, Nantes, Franciaország, 2016.

11. Köszönetnyilvánítás

Mély tisztelettel köszönöm témavezetőmnek, dr. Vajdovich Péternek a támogatását, türelmes útmutatását a kutatási munka minden fázisában. A Kolléga által létrehozott intézményben kaptam lehetőséget a beteganyag gyűjtésére, a kutatás mellett a klinikai gyakorlat elsajátítására. Támogatásával vehettem részt az oktatási munkában, segítségével készülhettek a publikációkhoz és értekezéshez szükséges statisztikai vizsgálatok. Hálás vagyok neki mind szakmai, mind emberi tekintetben az elmúlt években történt fejlődésemért.

Köszönettel tartozom továbbá Karai Edinának, akivel közösen kutattuk a lymphomás kutyák multidrogrezisztencia témakörét kéz a kézben, ő biológiai, én klinikai oldalon. Neki köszönhetem a FACScan vizsgálatok eredményeit és számos adat gyűjtését.

Hálával gondolok továbbá azon kutatókra, Szakács Gergőre, Füredi Andrásra, és Szebényi Kornéliára, akik átsegítették közös munkánk gyümölcseit, a közös cikkeket egészen a publikálásig.

Megemlíteném továbbá az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ, a Mátrix Állatorvosi Kórszövettani és Citológiai Laboratórium munkatársait, akik segítségemre voltak a beteganyag gyűjtésében, vizsálatok elvégzésében és a mérések értelmezésében az elmúlt években. Itt mondanék köszönetet az Állatorvostudományi Egyetem Onkológiai és Kórélettani Tanszék, valamint a Patológiai Tanszék munkatársainak, hogy segítették kutatásomat beszerzések intézésével és vizsgálatok elvégzésével.

Nem utolsó sorban pedig köszönöm a családomnak és barátaimnak fizikailag és morálisan nyújtott támogatását, amely nagyban hozzájárult ahhoz, hogy ezidáig eljussak.