

**Egyetemi doktori (PhD) tézisei**

**A P-GLYCOPROTEIN EXPRESSZIÓJÁNAK ÉS  
MŰKÖDÉSÉNEK VIZSGÁLATA LYMPHOMÁS ÉS  
MASTOCYTOMÁS KUTYÁK ESETÉN**

Dr. Dékay Valéria

Témavezető: Dr. Vajdovich Péter



**ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM**  
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2023

Témavezető:

.....

Dr. Vajdovich Péter  
Állatorvostudományi Egyetem  
Kórélettani és Onkológiai Tanszék

Készült 8 példányban. Ez a ....sz. példány

.....

Dr. Dékay Valéria

## **Tartalomjegyzék**

<b>1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései ....</b>	<b>4</b>
1.1. A lymphoma és mastocytoma klinikuma, valamint a terápiaerezisztencia jelentősége.....	4
1.2. Célkitűzések .....	8
<b>2. Vizsgálati anyagok és módszerek.....</b>	<b>9</b>
2.1. Vizsgálati anyagok.....	9
2.2. Alkalmazott módszerek.....	10
<b>3. Az értekezés új tudományos eredményei.....</b>	<b>11</b>
<b>4. Az értekezés témájában született publikációk listája.....</b>	<b>17</b>

## **1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései**

### **1.1. A lymphoma és mastocytoma klinikuma, valamint a terápia rezisztencia jelentősége**

Kutyák klinikailag legjelentősebb tumorai közé tartoznak a lymphomás és mastocytomás megbetegedések.

A lymphoma hemopoetikus eredetű daganat, mely alkotói malignizálódott lymphoid sejtek. A betegség különböző anatómiai régiókban manifesztálódhat; ezek között leggyakrabban nyirokcsomókban, gyomor-bél rendszerben, mellkas nyirokszerveiben, bőrben detektálható. Ezek között is kiemelkedő jelentőségű az elsősorban perifériás nyirokcsomók megduzzadásával kezdődő multicentrikus forma, mely a pácinesek mintegy 80%-ra jellemző. A progresszió következtében a magasabb stádiumokban (IV. és V. stádium) érintetté válnak egyéb szervek, úgymint a lép, máj, későbbiekben a csontvelő és perifériás vér is. A prognózis ismeretéhez, a terápiás tervezéshez elengedhetetlen az immunfenotípus ismerete. A B-sejtes és T-sejtes fenotípus elkülönítése elsősorban nyirokcsomó szövetből zajlik. A betegség kezelése multimodális kemoterápiás protokollokkal történik. Leggyakrabban az ún. CHOP protokollt alkalmazzuk, mely ciklofoszfamid (C), doxorubicin (H; hidroxidaunorubicin), vinkrisztin (O;

Oncovin) és prednizolon (P) gyógyszerek kombinációjából áll. A protokoll 19 hetében a betegség stádiumát (nyirokcsomók, lép és máj állapota) és a pácinens immunrendszerének állapotát (vérkép, máj- és vesefunkció) minden héten, a citosztatikum beadását megelőzően ellenőrizzük. A kemoterápiás szerek okozta mellékhatásokat detektáljuk az Állatorvosi Onkológiai Együtműködési Csoport (Veterinary Cooperative Oncology Group; VCOG) ajánlásai alapján. A CHOP protokollon túl, főként recidívált esetekre más terápiák is rendelkezésre állnak, például az L-aszparaginázzal kiegészített CHOP protokoll (L-CHOP), LOPP protokoll (L, lomusztin; O, Oncovin/vinkrisztin; P, prokarbazin; P, prednizolon), vagy lomusztin és L-asparagináz kombinációja. A kemoterápiás kezelések mellett a várható túlélés jellemzően 10-12 hónap. A kezelés sikertelenségét szinte minden esetben a terápiaerezisztencia okozza, így a lymphoma progressziója a beteg elhullásához vezet.

A mastocytoma malignizálódott hízósejtek által alkotott szövetszaporulat, mely lymphomával ellentétben leggyakrabban a bőrben szolid tumorokat képez. A bőrön kívül nyálkahártya, viscerális és csontvelői manifesztációja ismert. A progresszió folyamán a cutan

forma magasabb stádiumaiban regionalis (nyirokcsomó) metasztázis (III, IV, V. stádium) vagy távoli metasztázis (V. stádium) detektálható. A diagnózist és stádiumba sorolást követően amennyiben lehetséges, elsősorban műtéti eltávolítás javasolt. Indokolt esetben, a szövettani malignitástól (grade) és későbbi metasztázisoktól függően alkalmazunk kemoterápiás készítményeket. A mastocytoma szisztémás gyógyszeres kezelése a tirozin kináz inhibitor masitinib és toceranib, valamint vinblastin, illetőleg lomusztin készítményekkel történik. A lymphomákhoz hasonlóan mastocytomák esetében is a kemoterápiás kezelés sikertelenségét a terápia rezisztenciának tulajdoníthatjuk.

A kemoterápiás kezelések alatt tapasztalt multidrog rezisztencia során a gyógyszer váltással sem tudunk megfelelő terápiás választ elérni. A rezisztencia oka számtalan farmakodinamikai és farmakokinetikai tényező együttes hatása, melyek közül igen nagy jelentőséggel bírnak az ABC szupercsaládba tartozó transzporter funkciókért felelős fehérjék. Ezek között is kiemelkedő jelentősége van a P-glikoproteinnek (P-gp). A P-gp transzmembrán fehérje számtalan xenobiotikum exportjáért felelős, köztük szerepel több, a tárgyalt tumorok kezelésében is alkalmazott gyógyszer;

vin krisztin, vinblasztin, doxorubicin, prednizolon. A P-gp sejt felszíni kifejeződése és aktivációja részben intrinsic, részben azonban környezeti hatásokra (pl. hipoxia, gyulladás, karcinogének, cytotoxikus vegyületek) fokozódik, nagyban hozzájárulva a tumor betegek gyógyszeres terápiájának kudarcához, és a túlélési idők rövidüléséhez.

## 1.2. Célkitűzések

- 1) Definitív tumorterápia előtt álló betegek mintáiban a P-gp expressziójának és aktivitásának meghatározása. Konkrétan azt szeretnénk volna vizsgálni, hogy a két módszerrel igazolható-e a fokozott P-gp kifejeződés, valamint a protein aktívabb működése.
- 2) Két vizsgálati módszer (immunhisztokémiák és áramlási citometria) összehasonlítása
- 3) Túlélési idők vizsgálata
  - Teljes túlélési idő (overall survival time=OST)
  - Recidíva mentes túlélési idő (relapse free period=RFP)
- 4) P-gp expresszió és aktivitás eredményei alapján megjósolható-e előre a beteg túlélési ideje. Azt szeretnénk volna megtudni, hogy a fokozott P-gp expresszió és aktivitás rövidíti-e a recidíváig, vagy az elhullásig eltelt várható időt.



## **2. Vizsgálati anyagok és módszerek**

### **2.1. Vizsgálati anyagok**

A vizsgálatban szereplő 95 lymphomás kutyaából 79 B-sejtes, 16 T-sejtes volt immunfenotípus szerint. A legtöbb kutya (76) CHOP protokollban részesült. Ezen kívül -jellemzően recidívát követően- 13 beteg L-CHOP protokollt, és 6 beteg lomusztin kezelést kapott. A B-sejtes csoportban 26 beteg recidívát követően is kapott kemoterápiát. A mellékhatások megjelenése több esetben dózisredukciót, vagy a kezelés kényszerű elhalasztását vonta maga után. A halál oka nem minden esetben volt a lymphoma, az OST adatokat ezért befolyásolták egyéb megbetegedések, és a tulajdonosok idő előtti döntése az eutanáziát illetően. A T-sejtes lymphomás betegekből 5 beteg kapott recidíva után is kezelést. A halál oka ebben a csoportban minden esetben a lymphoma volt.

A 31 mastocytomás beteg daganata minden esetben műtétilag eltávolításra került. Műtétet követően 16 beteg részesült kemoterápiás utókezelésben, melyek között 10 beteg masitinibet, 11 beteg vinblasztint, 2 beteg lomusztint kapott. Súlyos mellékhatás esetén dózisredukciót alkalmaztunk, vagy elhagytuk a

gyógyszeres kezelést. A halál oka nem minden esetben volt a mastocytomához köthető.

## 2.2. Alkalmazott módszerek

A P-gp expressziót immunhisztokémai vizsgálattal jelöltük, C494 klón monoklonális ellenanyag felhasználásával a daganatos nyirokcsomó, valamint mastocytoma mintákon. A primer antitest kötődését barna kromogénnel kapcsolt szekunder ellenanyaggal tettük láthatóvá. A festődés értékelése manuálisan, fénymikroszkóp segítségével történt. A kifejeződés mértékén (%) túl feljegyeztük a festődés helyét (membrán vagy citoplazma domináns) és intenzitását is.

A P-gp aktivitást calcein teszt segítségével határoztuk meg. A calcein-acetoxilmetilészter az élő sejtbe diffúzan belépve észterázok által aktív calcein molekulává alakul, amely fluoreszcenciája áramlási citométerrel mérhető. A sejtfelszíni aktív P-gp molekulák ezt a calceint exportálják, így a fluoreszcencia csökken. Azonban P-gp gátló verapamil hozzáadásával ezen transzporterek gátlódnak, a calcein erős jele ismét detektálhatóvá válik. A két fluoreszcencia intenzitás mediánértékének különbségéből kapható érték a multidrogrezisztencia aktivitási faktor (MAF):

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

### **3. Az értekezés új tudományos eredményei**

A nemzetközi szakirodalom alapján a P-gp expressziót, valamint aktivitást egyidejűleg sosem vizsgálták ekkora betegpopuláción kutyák kereksejtes tumoraiban.

A P-gp festődés intenzitása szignifikánsan fokozottabb volt a proteint magasabb százalékban expresszáló lymphoma és mastocytoma minták esetén is. A fokozottabb kifejeződés nagyobb számú receptort jelenthet, amelyek által okozott jelintenzitás is arányosan növekedik. A lymphomás populációban a T-sejtes betegek szövetein volt magasabb az expresszió mértéke, valamint ebben a csoportban sokkal gyakrabban volt észlelhető dominánsan citoplazma P-gp festődés. Az intracelluláris P-gp kifejeződés arra utal, hogy a magasabb malignitású sejtek képesek lehetnek a citoplazma organelumaiban elkülöníteni a citotoxikus vegyületeket azok membránjában kifejeződő proteinek segítségével.

A P-gp expresszió és MAF mindkét vizsgált tumortípus esetén szignifikánsan, pozitívan korrelált egymással. Tehát a calcein teszttel detektált aktivitás emelkedése megbízhatóan mutatja a kifejeződött

receptorok működését. Az alkalmazott két vizsgálati módszer jól összehasonlítható egymással.

A mastocytomás páciensek esetén megállapított rosszindulatúsági fok (grade) szintén szoros kapcsolatot, pozitív korrelációt mutatott mind a P-gp expresszió, mind a MAF értékekkel. Tehát minél inkább malingus a mastocytoma, annál fokozottabb terápia rezisztenciát várhatunk a későbbi kemoterápiás kezelésekre vonatkozóan.

A hipotézisünk alapján a magasabb P-gp expresszió és fokozottabb működés kifejezettebb terápia rezisztencia képességgel is jár, mivel a nagyobb számú transzmembrán fehérje több citosztatikum transzportjára képes az extracelluláris térbe. Ezt a felvetést kívántuk igazolni, és a túlélési időkkel végeztünk összehasonlításokat. A vizsgálatokat az ún. cut off értékek meghatározásával kezdtük. Azt vártuk, hogy a magasabb expresszióval és magasabb MAF értékkel rendelkező tumoros betegek rövidebb OST és RFP medián időket mutatnak. A hipotézisnek a T-sejtes lymphomás betegek feleltek meg leginkább.

*A hipotézis igazolásához köthető statisztikai vizsgálatok főbb eredményei a következők: A cut off 8 % P-gp*

expresszió felett az OST 158 nap volt, míg ezalatt 177 napig éltek a betegek. A P-gp aktivitás esetében a cut off 0,19 MAF feletti páciensek 158 napig éltek, míg az alatta lévő csoport OST 181 nap volt. Az előbbiekhöz hasonlóan az RFP a 8% feletti csoportban rövidebb volt (56 nap), a cut off alatti betegekhez képest (93 nap). A 0,19 feletti MAF populáció RFP 47 nap volt, míg 0,19 alatti betegek 140 napig nem recidiváltak. Azonban a teljes lymphomás beteganyagot és B-sejtes populációt megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a P-gp expresszió és MAF eltérő eredményeket adtak az OST és RFP adatok összehasonlításakor. Az összes lymphomás adatait figyelembe véve negatív korreláció tapasztalható, vagyis 6,4%-os cut off felett a OST 351 nap volt, míg alatta 398 napot éltek a betegek. Ezzel ellentétben az RFP összehasonlításban pozitív az összefüggés, tehát a cut off feletti betegek 301 napig nem recidiváltak, 6,4 % alatt pedig 263 nap volt a recidíva mentes túlélés. A funkcionális vizsgálat során mindkét túlélési idő pozitív korrelációt mutatott. A 0,19 feletti MAF 417 napos OST értéket produkált a 0,19 MAF alatt 349 nappal összevetve. Az RFP tekintetében 0,19 felett 323 nap, alatta 198 napig nem recidiváltak a kutyák. Ezzel hasonló összefüggéseket kaptunk a B-sejtes lymphomás

csoport analízisekor. A 6% alatti csoport OST 398 nap volt, míg a cut off alatti betegek 445 napig éltek. Tehát itt negatív korreláció igazolódott. Ezzel szemben az RFP és P-gp expresszió pozitívan korreláltak egymással, a cut off felett 315 napig nem recidiváltak a betegek, cut off alatt 283 nap volt az RFP. A funkcionalitás vizsgálatnál alkalmazott 0,19 MAF és túlélési idők pozitívan korreláltak egymással. A cut off feletti MAF csoport OST 485 nap volt, míg a cut off alatti betegek 381 napig éltek. Az RFP összehasonlításakor a cut off feletti csoport 326 napig nem recidivált, míg 0,19 alatti MAF populáció recidíva mentes túlélése 263 nap volt.

A mastocytomás betegek esetében mind a P-gp kifejeződés, mind a MAF pozitívan korreláltak az OST adatokkal. A 37,5% cut off P-gp feletti betegek 1274 napot éltek, szemben a cut off alatti csoport 330 napos túlélési idejével. A MAF 0,17 cut off érték feletti csoport teljes túlélése 398 nap volt, a cut off alatti betegek 245 napig éltek. Érdekes tapasztalás volt, hogy az RFP negatív korrelációt mutat a MAF értékekkel. A 0,17 feletti betegek recidíva mentes túlélése 131 nap, míg 0,17 alatti csoport RFP 212 nap volt. Ennek a mastocytomás betegeknél nagy jelentőséget tulajdonítottunk, mivel a kemoterápiával is kezelt betegeknél a recidíva

megjelenése elsődlegesen a gyógyszerrezisztenciához köthető. Így tehát elméletünket megerősítő eredményként kezelhető, hogy a magasabb aktivitással csökken az RFP.

Az összehasonlítások alapján azonban nem jelenthető ki, hogy a P-gp expresszió vagy az aktivitás ismerete prognosztikus lenne a lymphomás vagy mastocytomás betegek esetében. Eredményeink konklúziójában kiemelkedő hangsúlyt fektettünk a befolyásoló tényezők megtárgyalására, amelyek hatással vannak a kezeléseik során a páciensek túlélésére. Ezek között tárgyaltuk az elhullás okát, mely a T-sejtes lymphomás populációban, -ahol a várt összefüggések igazolódtak-, nem volt befolyásoló körülmény. A B-sejtes lymphomás betegeknél megállapítottuk, hogy az alacsonyabb MAF értékkel bíró betegek jóval érzékenyebbek voltak a citosztatikumokra, és sokkal gyakoribbak voltak náluk a mellékhatások, ezeknek az egyedek a kemoterápiás kezelését sokkal gyakrabban kellett elhalasztani vagy a dózist redukálni. Ezzel összefüggésben a csoport egyedei sokkal hamarabb recidiváltak, 48,3% már az első CHOP protokoll alatt, és az OST is itt volt a legalacsonyabb. Azt

feltételezhetjük tehát, hogy a mellékhatások miatti dózisredukciókkal és kezeléshalasztásokkal párhuzamosan növekedett a terápia rezisztencia, valamint a tumorszövetben mért alacsonyabb P-gp aktivitás az ép, nem tumoros szövetekben gyengébb ellenálló képességet jelent a kemoterápiás készítmények károsító hatásával szemben.

További befolyásoló tényezők lehetnek mind a lymphoma, mind a mastocytoma esetében a mintavétel, a szövet feldolgozásának, és az értékelésnek a módja. Habár technikai szempontból a calcein teszt jól standardizálható vizsgálat, a nyirokcsomóból való transzkután mintavétel során nyirokcsomó szöveten kívül hámszövetek, kötőszöveti- és zsírszövetek is kerülhetnek a mintába. Ezeken felül, az alacsony kezdeti P-gp kifejeződéssel, aktivitással jellemezhető tumorsejtek a kemoterápiás kezeléseket követően (szubsztrát vinkrisztin, doxorubicin, vinblasztin) későbbiekben fokozhatják efflux aktivitásukat. A jövőben érdekes lehet korábbi, *in vitro* vizsgálatainkhoz hasonlóan a P-gp funkció változásának jellemzése a kemoterápiás protokoll alatt, valamint más, terápia rezisztenciát szintén fokozó proteinek és faktorok vizsgálata az állatorvosi klinikai onkológiában.



#### **4. Az értekezés témájában született publikációk listája**

Dékay V., Karai E., Füredi A., Szebényi 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

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

Karai E., Szebényi 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

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

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