

**Állatorvostudományi Egyetem  
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Immunfenotípus és kemoterápia rezisztencia  
vizsgálat egér és kutya limfóma/leukémia sejteken**

PhD értekezés

Karai Edina

2020

Témavezető:

.....

Dr. Vajdovich Péter

Állatorvostudományi Egyetem

Kórélettani és Onkológiai Tanszék

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

.....

Karai Edina

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	6
1. Összefoglalás.....	8
2. Bevezetés .....	9
3. Irodalmi áttekintés .....	11
3.1 Limfóma.....	11
3.1.1 A limfóma kialakulása .....	11
3.1.2 A limfóma kialakulásában szerepet játszó gének és jelátviteli utak bemutatása..	12
3.1.3 A limfóma előfordulási formái, stádiumai.....	14
3.1.4 A limfóma klasszifikációja, szövettani típusai.....	15
3.2 A limfóma prognosztikai faktorai .....	16
3.2.1 A limfóma immunfenotípusa .....	16
3.2.2 A terápia rezisztencia státusza .....	17
3.3 Terápiás lehetőségek.....	18
3.3.1 Sebészi terápia.....	18
3.3.2 Sugárterápia.....	19
3.3.3 Kemoterápia .....	19
3.3.4 Kombinált terápia.....	20
3.3.5 Szisztémás terápia limfóma kezelésére .....	21
3.3.6 Célzott terápiák.....	21
3.3.7 NSAID, COX-2 gátlószerek.....	24
3.3.8 Epigenetikai gátlószerek.....	26
3.4 Multidrog rezisztencia .....	27
3.4.1 MDR kialakulásának mechanizmusai .....	27
3.4.2 A P-glikoprotein felfedezése .....	27
3.4.3 A P-glikoprotein szerepe a tumorok drogrezisztenciájában.....	29
3.4.4 P-glikoprotein gátlása .....	29
3.4.5 P-glikoprotein és a COX-2 közötti kapcsolat.....	32
4. Célkítűzések.....	33

5. Anyag és módszer.....	35
5.1 A limfóma célzott kezeléséhez szükséges prognosztikai faktorok tanulmányozása ...	35
5.1.1 Az immunfenotipizálási vizsgálatban szereplő állatok .....	35
5.1.2 Mintavételi eljárás a kutya betegekből .....	36
5.1.3 Immunhisztokémia.....	36
5.1.4 Immunfenotípus meghatározás áramlási citométerrel.....	37
5.1.5 Limfóma minták citológiai vizsgálata .....	38
5.1.6 A Pgp funkcionális vizsgálatban szereplő állatok .....	38
5.1.7 A Pgp funkcionális mérése áramlási citométerrel.....	39
5.1.8 A kutya limfóma kemoterápiás kezelési protokollja, többszöri mintavétel időpontjai .....	39
5.1.9 Statisztikai vizsgálat.....	39
5.2 <i>In vitro</i> vizsgálatok a rezisztencia tanulmányozására .....	40
5.2.1 Vegyületek.....	40
5.2.2 Limfóma sejtvonal panel .....	40
5.2.3 Egér allograft modell.....	40
5.2.4 Citotoxicitási vizsgálatok .....	41
5.2.5 <i>In vitro</i> modellrendszer limfóma sejtvonalakon.....	41
5.2.6 RNS izolálás, rtPCR .....	41
5.2.7. Áramlási citométer.....	42
5.2.8 Szinergia vizsgálat.....	42
5.2.9 Adatelemzés.....	42
6. Eredmények .....	43
6.1 A limfóma célzott kezeléséhez szükséges prognosztikai faktorok tanulmányozása ...	43
6.1.1 B- és T-sejtes limfóma immunfenotípus meghatározása.....	43
6.1.2 T-sejt gazdag B-sejtes limfóma esettanulmány.....	46
6.1.3 Multidrog rezisztencia Aktivitási Faktor (MAF) növekedésének detektálása kutya limfóma kemoterápiás kezelés hatására.....	48
6.1.4 Multidrog rezisztencia Aktivitási Faktor (MAF) változásának utókövetése a terápia végéig 2 kutya eset bemutatásán keresztül .....	49

6.2 Egér és kutya limfóma sejtek <i>in vitro</i> gyógyszeresztelésre való alkalmasságának vizsgálata.....	51
6.2.1 Pgp szerepének <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> vizsgálata P388 egér limfoblasztos leukémia sejtekkel .....	51
6.2.2 Pgp szerepének <i>in vitro</i> vizsgálata CLBL-1 kutya limfóma sejtekkel .....	53
6.3 <i>In vitro</i> modellrendszer kidolgozása a rezisztencia tanulmányozására limfóma sejtekkel .....	54
6.3.1 Hosszútávú doxorubicin kezelés által előidézett rezisztencia kialakítása limfóma sejtvonalakon .....	54
6.3.2 Gyógyszerszünet alkalmazásával reverzibilis rezisztencia kialakítása limfóma sejtvonalakon .....	57
6.4 Állatgyógyászatban már alkalmazott COX-2 és epigenetikai gátlók kombinálása doxorubicinnal egér és kutya limfóma sejtvonalon a rezisztencia kialakulásának megakadályozására.....	60
6.4.1 Epigenetikai gátlók és doxorubicin Pgp expresszióra gyakorolt hatása limfóma sejtvonalon.....	60
6.4.2 COX-2 gátlók és doxorubicin Pgp expresszióra gyakorolt hatása limfóma sejtvonalon .....	61
6.4.3 COX-2, HDAC gátlók és doxorubicin egymásra gyakorolt hatásának vizsgálata limfóma sejtvonalakon .....	63
6.4.4 Celecoxib hatása DOX kezelést követően vagy önmagában alkalmazva.....	65
7. Megbeszélés (következtetések).....	68
8. Új tudományos eredmények.....	76
9. Irodalom .....	77
10. A doktori kutatás eredményeinek közzélése.....	98
11. Melléklet.....	101
12. Köszönetnyilvánítás.....	102

## Rövidítések jegyzéke

5-FLU – 5-fluorouracil

ABC – ATP-kötő kazetta (ATP-Biding Cassette)

ÁHOK – Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ

ALL – Akut limfoblasztikus leukémia (Acute lymphoblastic leukemia)

BCR – B-sejt-receptor

BH3 – Bcl-2 homológ 3

BRCA1 –Emlőrák 1-es típusú fehérje (Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein)

CD – Cluster of differentiation

CDC – Amerikai Járványtani Intézet (Centers for Disease Control and Prevention)

CEL – Celecoxib

CHO – Kínai hörcsög petefészek (Chinese Hamster Ovary)

CHOP – ciklofoszfamid (C), doxorubicin (H, hydroxydaunorubicin), vinkrisztin (O, Oncovin) és prednisone (P)

CI – Kombinációs Index (Combination Index)

CLL – Krónikus limfocitás leukémia (Chronic Lymphocytic Leukemia)

CML – Krónikus mieloid leukémia (Chronic Myeloid Leukemia)

COX-2 – Ciklooxygenáz-2

CTLA4 – Citotoxikus T-limfocita-asszociált fehérje 4

CYP450 – Citokróm P450

DLBCL – Diffúz nagy B-sejtes limfóma (Diffuse Large B-Cell Lymphoma)

DNS – Dezoxiribonukleinsav

DOX – Doxorubicin

EGFR – Epidermális növekedési faktor receptor (Epidermal Growth Factor Receptor)

FC – Áramlási citométer (Flow cytometry)

FDA – Amerikai Élelmezési és Gyógyszerügynökség (Food and Drug Administration)

FIR – Firocoxib

FL – Follikuláris Limfóma

GI – Növekedésgátlás (Growth Inhibition)

HER2 – Humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), másnéven ErbB2

HGF – Hepatocita növekedési faktor (Hepatocyte Growth Factor)

IC – Gátló koncentráció (Inhibitory Concentration)

mAb – Monoklonális antitest (Monoclonal Antibody)

MAF – Multidrog rezisztencia Aktivitási Faktor

MAPK – Mitogén-aktivált protein kináz (Mitogen-Activated Protein Kinase)  
MAV – Mavacoxib  
MCL – Köpeny-sejtes limfóma (Mantle Cell Lymphoma)  
MDR – Multidrog rezisztencia  
MEL – Meloxicam  
mTOR – Emlős rapamycin célpont (Mammalian Target of Rapamycin)  
MZL – Marginális Zóna Limfóma  
NCI DTP – Nemzeti Rákkutató Intézet Fejlesztési Terápiás Programja (National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program)  
NF-  $\kappa$ B – nukleáris faktor  $\kappa$ B  
NHL – Non-Hodgkin Limfóma  
NK sejtek– Természetes ölősejtek (Natural Killer)  
NSAID-ok – Nemszteroid gyulladáscsökkentők (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs)  
PARR – PCR for Antigen Receptor Rearrangements  
PGE2 – Prostaglandin E2  
Pgp – P-glikoprotein (P-glycoprotein)  
PI3K – Foszfinozítid 3-kináz  
PLC – foszfolipáz C  
PTCL-NOS – Perifériás T-sejtes limfóma egyéb csoportba nem sorolható típusa (Peripheral T-cell Lymphoma Not Otherwise Specified)  
PTEN – foszfatáz és tenzin homológ (Phosphatase and tensin homolog)  
RAS – Patkány szarkóma (Rat Sarcoma)  
RNS – Ribonukleinsav  
TK – Tirozin-kináz  
TKI – Tirozin-kináz gátló  
TNM – Tumorméret, Nyirokcsomó érintettség, Metasztázis (Tumor size; Nodal involvement; and distant Metastasis)  
TQ – Tariquidar  
TZL – T-Zóna Limfóma  
USA – Amerikai Egyesült Államok (United States of America)  
VEGF – Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)  
WHO – Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

## 1. Összefoglalás

A non-Hodgkin limfóma (NHL) az egyik leggyakrabban előforduló daganat emberek és kutyák esetében is. A túlélési időt jelentősen befolyásolja a kezelés, mely az immunfenotípus függvényében jól meghatározható. A kezelésre adott megfelelő terápiás válasznak azonban gyakran akadálya lehet a gyógyszerekkel szembeni multidrog rezisztencia (MDR) kialakulása. Az MDR kialakulása történhet a terápia hatására, de epigenetikai mechanizmusok is befolyásolhatják. Azonban az egyik leggyakoribb okozója a P-glikoprotein (Pgp) fokozott kifejeződése a tumorsejteken. A Pgp aktivitását befolyásolja többek között a ciklooxygenáz-2 (COX-2) expresszió is, melynek mértékét COX-2 gátlószerekkel csökkenthetjük.

Céljaink között szerepelt, hogy az immunfenotípus meghatározására irányuló módszereket (immunhisztokémia [IHK], áramlási citométer [FC]) összehasonlítsuk és meghatározzuk azok előnyeit és hátrányait. Továbbá a Pgp rutindiagnosztikai mérését elsőként valósítsuk meg kutya tumormintákból áramlási citométerrel. A klinikumban tapasztalt MDR kialakulását *in vitro* limfóma sejtekkel kívántuk modellezni és legfőbb célunk volt, hogy az általunk létrehozott modellrendszerben találjunk egy új terápiás lehetőséget az MDR kialakulásának megakadályozására.

Az immunfenotipizálás során 35 limfómás kutya tumormintájából határoztuk meg a diagnózist IHK és FC segítségével. A Pgp aktivitás vizsgálat esetében szintén FC segítségével mértük a multidrog rezisztencia aktivitási faktort (MAF értéket) a diagnóziskor és a terápia során. A rezisztencia *in vitro* tanulmányozására P388 egér és CLBL-1 kutya limfóma sejteket használtunk, melyben doxorubicin (DOX) és többféle epigenetikai vagy COX-2 gátlószer kombinációját vizsgáltuk.

Az IHK és FC eredménye között erős szignifikáns ( $p < 0,0001$ ) korrelációt mértünk 35 kutya tumormintájából. Továbbá 14 kutyánál kimutattuk a MAF növekedését a kezelés során, ezzel igazoltuk a rezisztencia kialakulását a terápia hatására. A kutyáknál megfigyelt rezisztenciát *in vitro* is modelleztük, egér sejteken 42 nap alatt (MAF=0,6), kutya limfóma sejteken 74 nap alatt (MAF=0,42) alakítottuk ki a Pgp mediált rezisztenciát doxorubicin kezeléssel. A kombinált kezelések közül az epigenetikai gátlószerek esetében hasonlóan magas MAF értékeket mértünk, mint a DOX monoterápiában. Azonban a COX-2 gátlószerek közül a celecoxib (CEL) esetében körülbelül 100 nap kezelést követően is sikerült megakadályozni a Pgp indukcióját (MAF<0,2).

Az áramlási citométerről sikerült igazolni, hogy nemcsak a limfóma immunfenotipizálására alkalmas gyors és kevésbé invazív módszer, de a Pgp aktivitás változásának követésére is egyszerűen használható. A rezisztencia problémájának leküzdésére találtunk egy új lehetőséget a DOX és CEL kombinációjával, mely *in vitro* sikeresen megakadályozta az MDR kialakulását.



## 2. Bevezetés

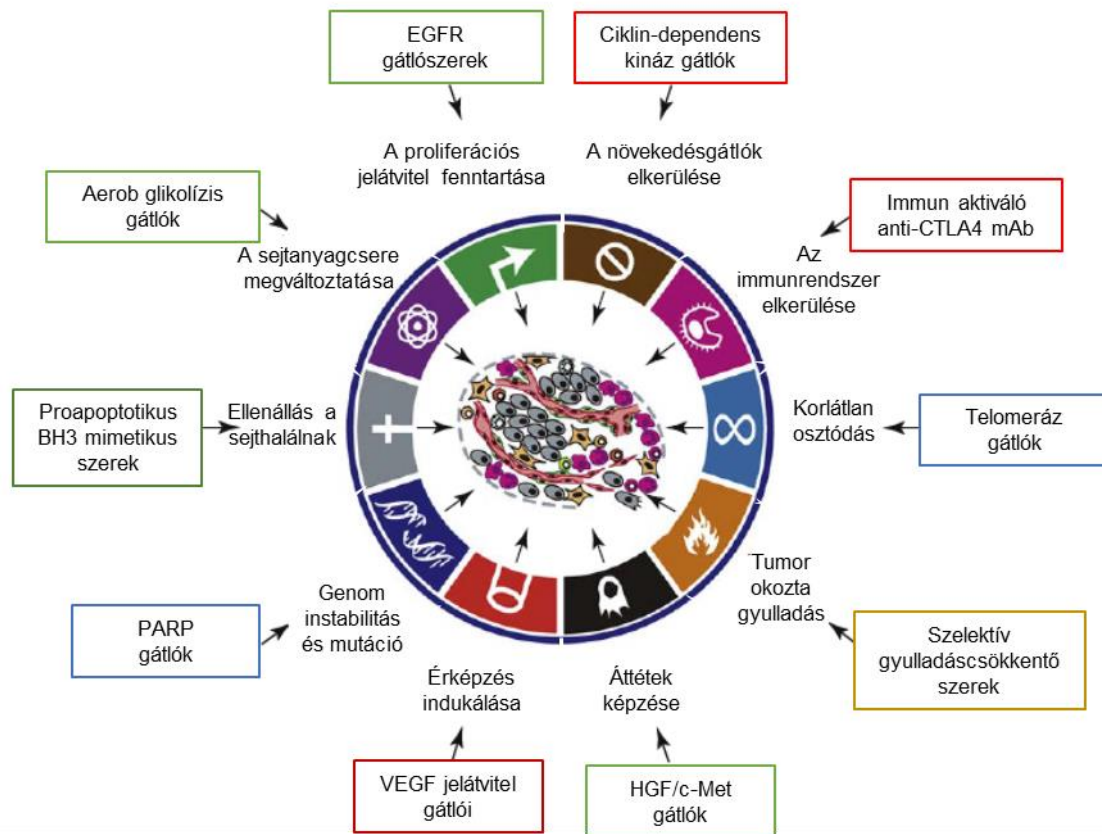
### A daganatos betegség kialakulása és következményei

A daganatos betegségek a vezető halálozási okok közé tartoznak mind az emberek, mind társállataink esetében. 2018-ban a világon 18,1 millió új daganatos megbetegedést és 9,6 millió halálesetet regisztráltak emberek esetében (Bray és mtsai. 2018). Régiókat tekintve az Egyesült Államokban az amerikai Járványtani Intézet a CDC (Centers for Disease Control and Prevention) által közölt 2017-es adatok alapján a daganatos betegség okozta halálozások a második helyen szerepeltek a szívbetegségek után. Az amerikai adatok alapján elmondható, hogy 100 000 lakosra 438 rákos megbetegedés esik évente (CDC 2017). Európában is hasonlóak a statisztikai mutatók, a WHO közlése szerint 2016-ban a tüdődaganatok, a vastagbél és az emlődaganatok okozta halálozások szerepeltek az első 10 vezető halálok között (WHO 2020). Hazánkban is ezek a leggyakrabban előforduló tumortípusok, de a prosztata tumor, a száj- és garatüregi daganatok esetében is magas az előfordulási arány (Bray és mtsai. 2018; Ferlay és mtsai. 2013).

Társállataink körében, egy 2015-ben megjelent tanulmány szerint, évente 4,2 millió esetet diagnosztizálnak daganattal az USA-ban. 100 000 kutyára vonatkoztatva ez körülbelül 5300 beteget jelent évente, amely tízszer több, mint emberek esetében, ahol 100 000 lakosra körülbelül 500 daganatos eset jut (Schiffman és Breen 2015). Egy másik retrospektív vizsgálat kimutatta, hogy Észak-Amerikában a felnőtt kutyáknál a legfőbb halálozási ok a daganatos megbetegedés volt. A vizsgálatból egyértelműen kiderült, hogy a 6 évesnél idősebb egyedeket jobban érinti a betegség, valamint bizonyos fajtáknál magasabb a daganatos betegség előfordulási aránya, például a berni pásztorkutyák, a golden retrieverek, a skót terrier, a flandriai pásztorkutyák és a boxerek esetében (Fleming és mtsai. 2011).

A daganatos betegség kialakulása évekig is tarthat, többlépcsős folyamat, amelynek háttérében mutációk sorozata áll. Csupán egyetlen mutáció nem vagy csak nagyon ritkán vezet malignus átalakuláshoz, körülbelül 4-6 különböző gén mutációja szükséges a tumor kialakulásához (Hahn és Weinberg 2002). A molekuláris vizsgálatok számos gént felderítettek, melyek részt vesznek a rosszindulatú változás indukálásában. Bizonyos tumortípusokban megfigyelhető az onkogének (normális sejtosztódást és sejt differenciálódást szabályozó gének) vagy a tumorszupresszor (sejtproliferációt gátló) gének megváltozott funkciója (Tulassay és Matolcsy 2011). 2000-ben Douglas Hanahan és Robert Weinberg a tumorsejteket 6 tulajdonsággal azonosította: a sejtek képesek a korlátlan osztódásra, elkerülik a sejtnövekedést gátló jeleket, ellenállnak a programozott sejthalálnak, immortalizálódnak, képesek érésképzésre és áttétképzésre (Hanahan és Weinberg 2000). Ezeket a tulajdonságokat a daganat „fémjeleinek” (hallmarks of cancer) nevezik. Új tudományos eredményekre alapozva, 2011-ben 4 újabb tulajdonsággal egészítették ki, amik szerint a daganatsejtek

genomja instabil és könnyen szenved mutációt, a tumor sejtek gyulladást képeznek, megváltoztatják az anyagcseréjüket és kivédik az immunrendszer támadásait (Hanahan és Weinberg 2011) (1. ábra).



1. **ábra:** A rák fémjelei. A daganat kialakulásáért felelős 10 tulajdonság és a folyamat szabályozását gátló tényezők összefoglalása. Bizonyos növekedési faktorok vagy enzimek gátlásával megakadályozható a tumorsejtek proliferációja, migrációja, az érképző vagy mutációs képessége, így például az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR), a hepatocita növekedési faktor (HGF), a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) vagy a poli (ADP-ribóz) polimeráz (PARP) gátlásával. A citotoxikus T-limfocita-asszociált fehérje 4-hez (CTLA4) kapcsolódó monoklonális antitest képes az immunrendszer aktivitását fokozni, míg a Bcl-2 Homológ 3 (BH3) mimetikus szerek proapoptotikus hatást idéznek elő. (Forrás: Hanahan és Weinberg 2011)

Az emberekben és a kutyákban spontán fejlődő daganatok morfológiai és klinikai megjelenésükben egyenértékűek, amely lehetővé teszi az összehasonlító vizsgálatokat és a patogenezis részletesebb feltérképezését (Modiano, Jamie F. és Breen 2008).

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1 Limfóma

##### 3.1.1 A limfóma kialakulása

A non-Hodgkin limfóma, amely főként a nyirokcsomókat érintő limfocita eredetű megbetegedés, (NHL) az egyik leggyakoribb daganat emberek és kutyák esetében is. Egy 2018-as felmérés szerint az NHL emberi populációt tekintve világszerte az első 10 daganattípus között szerepel 510 000 új esettel (Miranda-Filho és mtsai. 2019). Ehhez hasonlóan kutyáknál az emlődaganat mellett az NHL előfordulási aránya a legmagasabb, 100 000 kutyára 13-24 eset jut (Merlo és mtsai. 2008; Withrow és mtsai. 2012). Kutyák esetében megfigyelhető az életkorral változó incidencia, amely 1 éves kor alatt alacsony, csupán 1,5/100 000 kutyát tekintve, azonban az arány jelentősen emelkedik az idősebb egyedeket vizsgálva, ahol 84 beteget regisztrálnak 100 000 kutyából. Habár a betegség minden életkorban és minden kutyafajtánál jelentkezhethet, az életkor mellett bizonyos fajtáknál magasabb a rizikófaktor a kialakulásra, mint például a boxer, bullmasztiff, bernáthegyi, skót terrier vagy akár a rottweiler esetében (Vail és mtsai. 2019).

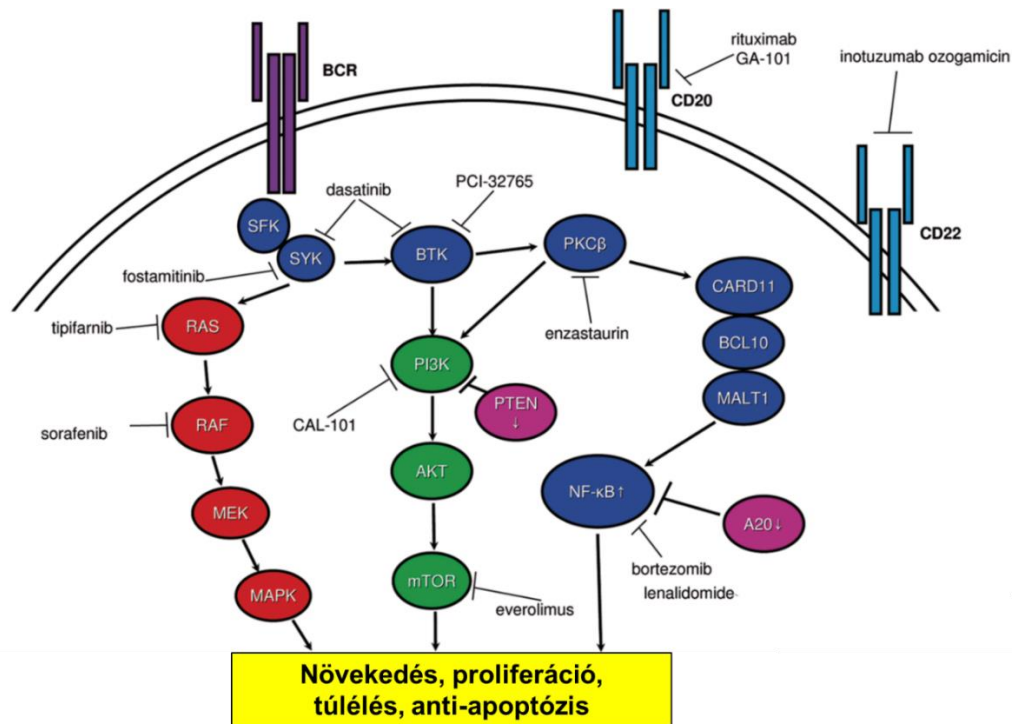
Azonban nemcsak az előfordulási arányban van hasonlóság az emberi és kutya NHL-t tekintve, de a biológiai és genetikai tulajdonságokban is. Kialakulásának hátterében genetikai és molekuláris faktorok egyaránt szerepet játszanak. Kromoszóma aberrációk közül a 13-as, 31-es és 14-es kromoszóma rendellenességek a leggyakoribbak (Thomas és mtsai. 2003). Szubtípusok tekintetében hasonlóságok és különbségek egyaránt megfigyelhetők. Míg mindkét fajnál a leggyakoribb szubtípus a diffúz nagy B-sejtes limfóma (Diffuse Large B-Cell Lymphoma, DLBCL), addig kutyák esetében ezt követi a perifériás T-sejtes limfóma egyéb csoportba nem sorolható típusa (Peripheral T-cell Lymphoma Not Otherwise Specified, PTCL-NOS), amely az emberi betegségnél kevésbé ismert (Seelig és mtsai. 2016).

Nemcsak genetikai tényezők játszanak szerepet a limfóma kialakulásában, hanem fertőző ágensek is, például emberek esetében bizonyos típusú limfómák kialakulásával kapcsolatba hozható az Epstein-Barr vírusfertőződés, azonban ezen kapcsolat felderítéséhez kutyáknál további vizsgálatok szükségesek (Milman és mtsai. 2011; Withrow és mtsai. 2012). A *Helicobacter sp.* fertőződés szintén bizonyított, hogy limfóma kialakulását okozza emberek esetében a gyomorban, de kutyáknál nem egyértelmű a kapcsolat a daganat kialakulás és a megfertőződés között (Farinha és Gascoyne 2005). Egyéb környezeti tényezők is szerepet játszhatnak a daganat kialakulásában, például szignifikánsan magasabb volt a limfóma kialakulásának gyakorisága azoknál a kutyáknál, akiknek a gazdája 2,4-diklórfenoxi-ecetsav növényvédő szereket használt a ház körül, mint azoknál az egyedeknél, melyek tulajdonosa mellőzte a növényvédő szer használatot (Hayes és mtsai. 1991). További hasonlóságokat

fedeztek fel a két fajnál az onkogén/tumorszuppresszor gének expressziójának változásában, bizonyos epigenetikai eltérésekben és az apoptózis szabályozásának megváltozásában is (például Bcl-2 család, p53 gének) (Withrow és mtsai. 2012).

### **3.1.2 A limfóma kialakulásában szerepet játszó gének és jelátviteli utak bemutatása**

A sejt normál működéséhez szükséges folyamatok (sejtosztódás, proliferáció, migráció, apoptózis stb.) jelátviteli útvonalakon keresztül valósulnak meg. A sejt receptorai fogadják a jeleket, majd fehérjék egymást követő foszforilációja vagy defoszforilációja révén közvetítik azokat a transzkripciós faktorokhoz. A komplex rendszerben a jelátviteli molekulák lehetnek serkentő hatásúak (proto-onkogének) vagy gátló jellegűek (szuppresszor gének), melyek a génexpresszió szabályozására nemcsak közvetlenül képesek hatni, de a szomszédos útvonalakat is befolyásolják. Ezeknek a géneknek a megváltozott működésével az onkogének és a tumor szuppresszor gének segítik a tumorsejteket a korlátlan osztódásban, a folyamatos proliferációban vagy akár az apoptózis ellenállásában (Jeney és Kralovánszky 2009; Kopper és Tímár 2007). Embereknél előforduló limfóma kialakulásában 322 mutált gént azonosítottak, melyek a különböző jeltovábbító útvonalakat befolyásolva képesek hasznosítani előnyüket. Daganattípusonként eltérő jelátviteli utak dominálnak, de a diffúz nagy B-sejtes limfóma kialakulásához az onkogének leggyakrabban a B-sejt receptort (BCR), RAS/RAF/MEK/MAPK, PI3K/AKT/mTOR jelátviteli utakat és az NF- $\kappa$ B fehérjecsaldót aktiválják, míg a tumorszuppresszor gének közül a PTEN (Foszfataz és tenzin homológ) és az A20 fehérjét kódoló gén mutálódik (2. ábra) (Barton és mtsai. 2012; Zhang és mtsai. 2013).



2. ábra: A limfóma kialakulásában szerepet játszó legfontosabb jelátviteli útvonalak összefoglalása. A B-sejt receptoron (BCR) keresztül a RAS/RAF/MEK/MAPK, PI3K/AKT/mTOR jelátviteli útvonalak aktiválódnak, de gyakori az NF- $\kappa$ B fehérjecsalád fokozott aktivitása is, míg a tumorszuppresszor gének közül a PTEN és az A20 fehérjét kódoló gén mutálódik. RAS: Patkány szarkóma; MAPK: Mitogén-aktivált protein kináz; PI3K: Foszfinozítid-3-kináz; mTOR: Emlős rapamycin célpont; PTEN: Foszfataz és tenzin homológ. (Forrás: Barton és mtsai. 2012)

Az NF- $\kappa$ B legalább 150 gén expressziójának szabályozásában játszik szerepet, a sejt proliferáció és apoptózis működésében egyaránt. A tumorsejtek ezt kihasználva képesek a túlélésre, a proliferációra, az onkogének, mint a Bcl-2 vagy MYC, serkentésére. A konstitutívan aktív fehérje komplex megfigyelhető embereknél a diffúz nagy B-sejtes limfóma esetében (Kopper és Tímár 2007). A Bcl-2 neve, a B-sejtes limfóma 2, utal arra, hogy a fehérjecsalád második tagjaként fedezték fel a folliculáris limfómákban előforduló 14. és 18. kromoszómát érintő transzlokáció kapcsán (Kosmidis és mtsai. 2018). A fehérjecsalád körülbelül 25 fehérjéből áll, amelyeknek az apoptózis irányításában van szerepük. A kutyák esetében az anti-apoptotikus irányítók, a Bcl-2, az Mcl-1 (mieloid sejt leukémia-1) és a Bcl-XL (extra nagy B-sejtes limfóma) nagyfokú hasonlóságot mutatnak az emberi génekkel. A Bcl-6 gén olyan transzkripciós faktort kódol, amely hozzájárul az emberi DLBCL kialakulásához. Azonban a Bcl-6 mRNS és fehérje expresszió alacsony volt vagy hiányzott a kutya high-grade B-sejtes limfómában és nem volt prognosztikai értékű, ellentétben az embereknél megfigyelttel (Zandvliet 2014). A tumor szuppresszor gén funkcióvesztéssel járó mutációja vagy deléciója a PTEN-ben fokozott sejtnövekedést és csökkent apoptózist eredményez, mely általában kimutatható az emberi daganatos megbetegedésekben, beleértve a limfómát is, de ezeket

még nem vizsgálták a kutyáknál előforduló limfómáknál. A PTEN funkciója szorosan összefügg a lipid-foszfataz aktivitásával, mellyel a foszfoinozítid-3-kináz (PI3K) család által előállított PIP3-at gátolja. A PI3K szignalizáció fokozott aktiválása is gyakori a hematopoetikus daganatokban, mely képes az EGFR, VEGFR serkentésére. Továbbá kimutatták, hogy a jelátviteli útvonalban az emlős rapamycin célpont (mTOR) is szerepet játszik a Pgp által mediált gyógyszerrezisztencia kialakulásában B-sejtes limfómáknál (Zandvliet 2014). A Wnt /  $\beta$ -catenin útvonalon történő módosulás is számos tumortípusban megfigyelhető, melyek közül a leukémiában és a diffúz nagy B-sejtes limfómában is kimutatták az aktivációját. Ez a jelút fontos szabályozó tényező az embrionális és felnőtt szövetek fejlődésében, a homeosztázis fenntartásában befolyásolva a sejtek szaporodását, mozgását, túlélését és pusztulását. Azonban még nem vizsgálták kutyák hematopoietikus daganatában (Zandvliet 2014). Különböző gátlószerek léteznek, melyek a jelátviteli utak számos pontjára hatnak, mint például a különböző monoklonális antitestek (anti-CD20) (lásd 3.3.6.2) vagy tirozin-kináz gátlók (TKI-k) (lásd 3.3.6.1), melyek segítségével tumorelles hatás érhető el.

### **3.1.3 A limfóma előfordulási formái, stádiumai**

Előfordulás szempontjából a leggyakoribb a multicentrikus, vagyis a testszerte egyszerre több nyirokcsomót is érintő forma, amely az esetek kb. 80%-ban alakul ki. Kezdetben általában a fejkörnyéki nyirokcsomók megnagyobbodását okozza, de bármely más nyirokcsomót és nyirokszervet is érinthet. Ritkábban előforduló forma az alimentáris limfóma, amely az összes limfóma 5-7%-át képezi. Ebben az esetben a belekben, a mesenterialis nyirokcsomókban és/vagy a májban találunk elváltozásokat. Kevésbé ismert formák a mediasztinális, amely kb. 5%-ban fordul elő és az esetek nagy részében T-sejtes immunfenotípussal rendelkezik, továbbá bőrre kiterjedő forma, melynek két változata ismert (epitheliotrop és nem- epitheliotrop). Míg a multicentrikus forma a perifériás nyirokcsomókat érinti, addig az extranodális limfóma a mediasztinális, abdominális nyirokcsomók megnagyobbodását okozza (gasztrointesztinális, máj, lép, vese), továbbá megjelenhet a szemben, központi idegrendszerben, orrüregben és a tüdőben is (Vail és mtsai. 2019; Zandvliet 2016). A kutya multicentrikus limfómák stádiumbesorolása a WHO (TNM Classification of Tumors in Domestic Animals, Geneva, 1980.) ajánlása szerint történik:

- I.: egy nyirokcsomót érintő elváltozás,
- II.: egy azonos régióban több nyirokcsomót érintő elváltozás,
- III.: generalizált nyirokcsomó-duzzanat,
- IV.: a lép és/vagy a máj érintettsége (a III. stádium fennállása vagy hiánya mellett),
- V.: daganatsejtek megjelenése a vérben, valamint a csontvelő és/vagy egyéb nem limfoid szervek érintettsége.

A multicentrikus limfóma öt stádiuma mellett két alstádiumot is megkülönböztetünk. A betegség kialakulásával a legtöbb esetben nem társul egyéb nem specifikus tünet („a” alstádium), azonban előfordulhat étvágytalanság, súlycsökkenés, hányás, hasmenés, kimerültség, poliuria, láz stb., melyeket a „b” alstádiumba soroljuk (Vail és mtsai. 2019).

### 3.1.4 A limfóma klasszifikációja, szövettani típusai

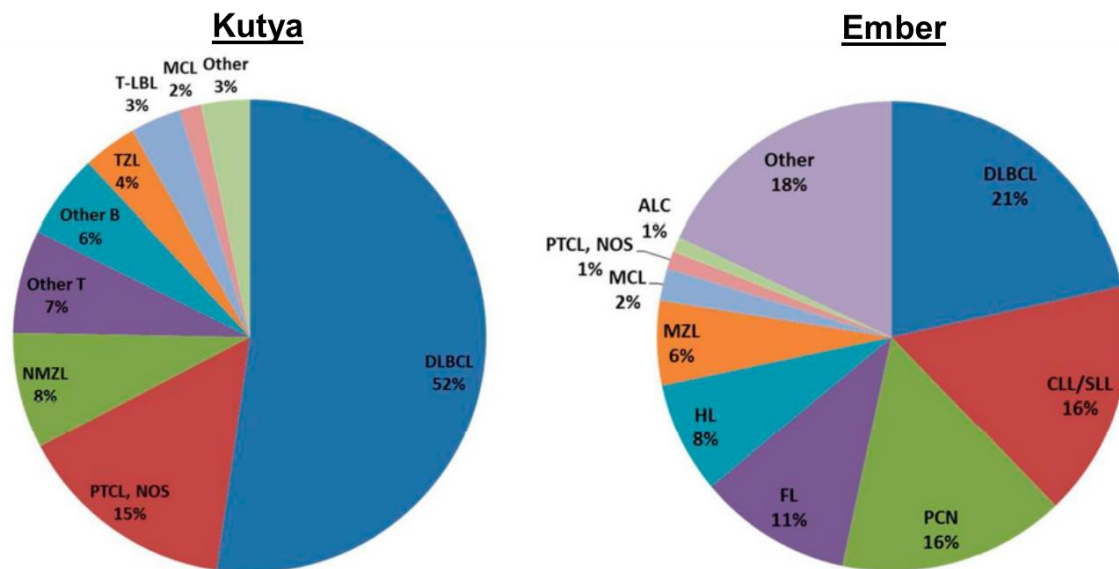
Az egyes limfóma típusok csoportosítása a WHO klasszifikációja szerint történik, mely szerint emberek körében a betegségnek több mint 60 formája ismert, azonban a kutyák esetében más besorolásra volt szükség, amit 2011-ben Valli és munkatársai dolgoztak ki (Seelig és mtsai. 2016; Valli és mtsai. 2011). Kutyáknál a limfómák klasszifikációja az anatómiai elhelyezkedésre, a hisztológiai követelményekre és az immunfenotípus karakterizálásra épül. A limfóma aktuális szövettani klasszifikációját kutyák esetében az 1. táblázat foglalja össze (Vail és mtsai. 2019; Valli és mtsai. 2011).

1. **táblázat:** A limfóma aktuális szövettani klasszifikációja kutyák esetében.

<b>B-sejtes limfómák</b>	<b>T- és NK (natural killer, természetes ölősejt) - sejtes limfómák</b>
Prekurzor B-sejtes daganatok:	Prekurzor T-sejtes daganatok:
Prekurzor B-limfoblasztos leukémia/limfóma	Prekurzor T-limfoblasztos limfóma /leukémia
<b>Érett (perifériás) B-sejtes daganatok:</b>	<b>Érett (perifériás) T-sejtes/NK-sejtes daganatok:</b>
B-sejtes krónikus limfocitás leukémia/kis limfocitás limfóma	T-sejtes krónikus limfocitás leukémia (CLL)/kis sejtes limfóma
Limfoplazmacitás limfóma	Intesztinális T-sejtes limfóma
Köpeny-sejtes limfóma (MCL)	Mycosis fungoides és Sézary szindróma
Folikuláris limfóma (FL)	Bőr nem epitheliotrop limfóma
Marginális zóna limfóma (MZL) (nodális, lép, MALT)	Anaplasztikus nagy sejtes limfóma
Plazmablasztos limfóma	Perifériás T-sejtes limfómák egyéb csoportba nem sorolható típusa (PTCL-NOS)
Diffúz nagy B-sejtes limfóma	T-zóna limfóma (TZL)
T-sejt gazdag diffúz nagy B-sejtes limfóma	Egyéb T-sejtes
Nagy sejtes immunoblasztos limfóma	
Mediasztinális nagy B-sejtes limfóma	
Burkitt limfóma /leukémia	
Egyéb B-sejtes	

A szövettani vizsgálatban a tumormintát három módon jellemzik. Fontos szempont a daganat felépítése, a tumorsejtek morfológiája (méret, alak, magi és citoplazmatikus tulajdonságok) és a mitotikus aktivitás. Az osztódási ráta szerint további három kategóriát különítünk el (alacsony-, közepes-, és nagy malignitású). Az előbbi (ún. low-grade) forma alacsony

mitotikus rátával rendelkező kis sejtekből áll, melyek általában lassan progrediálnak, hosszabb a túlélési idő, de végül nem gyógyíthatók. A nagy malignitású forma, mely magas mitotikus rátájú sejtekből épül fel, gyorsabban progrediál, de kezdetben reagál a kemoterápiás kezelésre és emberek esetében lehetőség van a teljes gyógyulásra. Ebbe a csoportba tartozik a kutyáknál és embereknél egyaránt leggyakrabban előforduló típus, a diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL). A ritkábban előforduló low-grade forma, például a T-zóna limfóma (TZL), amely kutyák esetében jellemző típus (3. ábra) (Vail és mtsai. 2019; Valli és mtsai. 2011).



**3. ábra:** Az emberek és a kutyák limfómájának szubtypus szerinti százalékos megoszlása. DLBCL: diffúz nagy B-sejtes limfóma; PTCL, NOS: perifériás T-sejtes limfóma egyéb csoportba nem sorolható típusa; NMZL: nodális marginális zóna limfóma; TZL: T-zóna limfóma; CLL: krónikus limfocitás leukémia; PCN: plazma sejtes daganat; FL: folliculáris limfóma; HL: Hodgkin limfóma; MZL: marginális zóna limfóma (Forrás: Seelig és mtsai. 2016)

### 3.2 A limfóma prognosztikai faktorai

#### 3.2.1 A limfóma immunfenotípusa

Az immunfenotípus meghatározást általában nyirokrendszeri vagy hematológiai kórképek diagnosztizálására használják. Az eljárás fő célja a limfóma szubtypusba sorolása, mely prognosztikai jelentőségű és a kezelés meghatározásához is fontos tényező. A kutyáknál a gyakoribb, 60-80%-ban előforduló, B-sejtes limfómák jobban reagálnak a kemoterápiára, hosszabb a betegek recidívamentes és teljes túlélése is, szemben a 10-38%-ban előforduló T-sejtes formával (Kiupel és mtsai. 1999; Vail és mtsai. 2019). Kutatócsoportunk korábbi vizsgálata is igazolta a különbséget, melyben 33 limfómás kutya vett részt, akiknél a B-sejtes forma esetében a medián túlélési idő 253 nap volt, míg a T-sejtes limfóma esetében ez az idő



150 nap volt (Vajdovich és mtsai. 2018). Az immunfenotípus meghatározására többféle módszert alkalmazhatunk, így az immunhisztokémiai vizsgálatot (IHK), citológiai vizsgálatot, áramlási citométert (FC) vagy akár klonalitás vizsgálatot PCR segítségével (PARR) (Vail és mtsai. 2019). Az állatorvosi gyakorlatban általános diagnosztikai módszerként az indirekt jelölést alkalmazó immunhisztokémiai vizsgálat terjedt el, melyben különböző CD (cluster of differentiation) markereket alkalmaznak, például a T-sejtek jelölésére CD3 markert, az éretlen és érett B-sejtek jelölésére a CD20 és a CD79a markert. Utóbbi marker 20%-ban expresszálódhat plazma sejteken is (Thalheim és mtsai. 2013). Azonban a daganatos betegségek kezelésénél fontos tényező a korai diagnózis felállítása és a helyes terápia mielőbbi megkezdése, melyben az FC segítségünkre lehet (Godlewski és mtsai. 2017; Pasechnikov és mtsai. 2014). Az FC-vel végzett mérés gyorsabb a direkt jelölt monoklonális ellenanyagok használata révén és kevésbé invazív beavatkozást igényel a mintavételi eljárás, mivel a vizsgálat elvégezhető a tűaspirációs (FNA) technikával nyert tumormintából (Comazzi és Gelain 2011). Az áramlási citometria a nevéből adódóan olyan diagnosztikai mérésre alkalmas eszköz, mely folyadék közegben áramoltatott akár  $10^6$  nagyságrendű sejt gyors és multiparaméteres vizsgálatát teszi lehetővé. Az FC segítségével pár órán belül sok információt nyerhetünk egy vizsgált sejtről, így a sejtméretről, belső struktúráról, fehérjék jelenlétéről a felszínen, valamint jelöléstől függően egyéb fluoreszcens molekula expressziójának mértékéről (Dunphy 2004). Direkt jelölt ellenanyagok közül a leggyakrabban alkalmazott FC esetén a T-sejtes limfóma karakterizálásához a CD3, CD5 – pán T-sejt marker, CD4 – helper T-sejt marker vagy CD8 – citotoxikus T-sejt marker, a B-sejtes limfóma meghatározásra alkalmazott a CD21 – B-sejt marker, CD79a – pre B-sejt marker, de találunk monocita markert (CD14), mieloid markert (CD11/18), illetve hematopoetikus őssejt markert is (CD34) (Vail és mtsai. 2019). A B-sejt markerek között megkülönböztetünk sejt felszíni markert, mint a CD21, de előfordul intracelluláris marker is, így a CD79a, melynek vizsgálatához szükséges a sejtek fixálása, a membrán permeabilizálása, azonban így az élő sejtek vizsgálata már nem lehetséges.

### **3.2.2 A terápia rezisztencia státusza**

Az áramlási citometria a malignus hematológiai kórképek differenciál diagnosztikáján (immunfenotipizálás, stádiumbesorolás, minimális reziduális betegség követés) felül számos más célra is használható, például sejtciklus vagy apoptózis vizsgálatra, különböző funkcionális vizsgálatokra, így az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció, a proliferációs index meghatározásra vagy akár a sejt felszíni P-glikoprotein efflux transzporter (Pgp) funkcionális mérésére is (Aresu és mtsai. 2014; Pozarowski és Darzynkiewicz 2004; van der Pol és mtsai. 2003; Ward 1999). Az immunhisztokémiai módszerrel detektált Pgp prognosztikai szerepét kutya limfóma esetében több tanulmány is vizsgálta, de nem volt egyértelmű a kapcsolat a túlélési idővel

(Bergman és mtsai. 1996; Dhaliwal és mtsai. 2013; Moore és mtsai. 1995). Azonban kutatócsoportunk megállapított egy 35%-os határértéket, mely felett a túlélési idő alacsonyabb volt, szemben azokkal a betegekkel, akiknél a tumorminta 35%-nál kevesebb Pgp pozitív sejtet tartalmazott (Vajdovich és mtsai. 2018). A Pgp detektálása FC-vel is elvégezhető. A calcein mérés segítségével egyszerűen megvalósítható a Pgp funkcionális vizsgálata (Szakács és mtsai. 1998). A mérésből származtatott érték, a multidrog rezisztencia aktivitási faktor (MAF), melynek relevanciáját limfómával vagy leukémiával diagnosztizált betegek körében is vizsgálták (Karászi és mtsai. 2001; Szerémy és mtsai. 2019). A limfóma esetében a terápiára adott válasszal összefüggésben megállapították, hogy a MAF prognosztikai jelentőséggel bír a klinikumban. Azonban limfómás kutyák tumormintáján még nem alkalmazták ezt a mérési módszert. Az áramlási citométer segítségével közelebb kerülhetünk az állatorvosi onkológiai esetek személyre szabott kezelésének megvalósításához is az immunfenotípus és Pgp funkcionális mérés együttes vizsgálatával.

### **3.3 Terápiás lehetőségek**

#### **3.3.1 Sebészi terápia**

A sebészeti onkológia egy olyan összetett rendszer, mely magában foglalja a diagnózishoz szükséges biopsziát, a gyógyításra szolgáló daganat és áttétek eltávolítását, valamint számos más eljárást, mely a kezelés hatékonyságának fokozására vagy kiegészítésére szolgál. A legtöbb daganattípus esetében az elsődleges kezelési módszer a sebészi beavatkozás. A technológia fejlődésével a sebészeti onkológusok nagy részben hozzájárulnak a kezelések eredményeinek és a betegek életminőségének javulásához (Wyld és mtsai. 2015). A sebészeti beavatkozás azonban nem oldja meg a kiváltó problémát (például genetikai hiba), de a tumor eltávolításával lehetőséget nyújt a szervezet védekezőképességének helyreállításához. A gyógyító (kuratív) műtétnek három fokozata van, melyek abban különböznek, hogy a daganat egészét és az érintett nyirokcsomókat milyen mértékben sikerül a sebésznek eltávolítani. Megkülönböztetünk R0 fokozatot, melyben a daganat teljes mértékű kimetszése és a társuló nyirokcsomók eltávolítása is sikeresen megtörténik a műtéti területen, ekkor beszélünk daganatmentes állapotról. R1 eltávolítás esetén azért nem tekinthető daganatmentesnek a beteg a műtétet követően, mert a másodlagos nyirokcsomó régiókban mikroszkópos szintű érintettség marad. R2 eltávolítás esetében a daganatnak csak egy részét lehetséges eltávolítani (Tulassay és Matolcsy 2011). Abban az esetben, amikor a daganat nem távolítható el olyan mértékben, hogy megvalósuljon a kuratív kezelés, de a beteg panaszainak enyhítésére alkalmazható a műtéti kezelés, akkor beszélünk palliatív műtétről. A daganat eltávolítása mellett fontos szempont az őrszem nyirokcsomók vizsgálata és indokolt esetben azok eltávolítása. Az elsődleges áttét helyén lévő nyirokcsomó daganatos érintettsége

indokolja, hogy az adott régióban található többi nyirokcsomót is eltávolítsák, melynek szempontjai, hogy megelőzi a daganat nyirokcsomóból való kiújulását, javítja a daganatmentes túlélési időt, kórjósló és meghatározza a kiegészítő onkológiai kezelést (Tulassay és Matolcsy 2011).

### **3.3.2 Sugárterápia**

A sugárkezelés egy irányított energiaátadást jelent, ionizáló sugárzás, mely lehet  $\beta$ - vagy másnéven elektronsugár. A sugárkezelés során fontos a társszakorvosokkal való együttműködés, a műtét, a sugárkezelés és a kemoterápia együttesét, sorrendjét jól meghatározni. A sugárkezelés által a helyi tumorokban nagy dózisú besugárzással makroszkóposan pusztítják a daganatsejteket, melynek eszköze lehet az ionizáló sugárforrás (radioaktív izotóp) vagy részecskegyorsítóval előállított ionizáló sugárnyaláb. Az ionizáló sugárzás károsítja a sejteket, főként a DNS-t, mely a sejt halálához vezet. A sugárhatás által okozott kémiai reakciók különböző védekező folyamatokat indíthatnak be, így a javító mechanizmusok működésbe lépnek, tapasztalható gyulladáshoz vezető reakció vagy heges elváltozások is észlelhetők nagyobb számú sejtpusztulás esetén. A sugárkezelés gyakran párosul kemoterápiás szerek együttes alkalmazásával, ez a kemo-radioterápia, melynek célja, hogy amíg a sugárkezelés a makroszkópos tumor pusztításában játszik szerepet, addig a gyógyszeres kezeléssel a mikroáttétek képzését akadályozzák meg. A sugárzás DNS-károsító hatását fokozhatjuk a DNS-be épülő vegyületekkel, továbbá megnyújtható a sejtciklus sugárérzékeny G2 és M fázisa topoizomeráz gátlókkal. A molekuláris biológiai kutatások eredményeként a kemo-, illetve a radiorezisztencia mechanizmusokat megismerték és célzott vegyületekkel együtt alkalmazva a sugárkezelés hatása nagyságrendekkel fokozható (Tulassay és Matolcsy 2011; Withrow és mtsai. 2012).

### **3.3.3 Kemoterápia**

A sebészeti és a radioterápia mellett a gyógyszeres kezelés is fontos részét képezi a daganatos betegség gyógyításának. A rosszindulatú megbetegedések egész szervezetre való kiterjedése és a kiújulás veszélye miatt indokolt az ún. szisztémás kezelés, mely elpusztítja a primer tumortól távolabb jelenlévő tumorsejteket is. A kemoterápiás szereket többféle szempont szerint csoportosíthatjuk, így például a sejtciklus szabályozásának működése szempontjából. Az adott szer kifejtheti hatását a sejtciklus bizonyos fázisában vagy a sejtciklustól függetlenül, az alkalmazott dózis szerint.

A sejtciklus egészében fázistól függetlenül ható kezelőszerek az alkilálószerek. Az alkil csoportok illesztése kovalensen történik DNS-hez, RNS-hez és fehérjéhez, majd az N7-es pozícióban egy keresztkötést indukál a guaninok között, ezáltal a DNS szintézis vagy RNS

replikáció során lánctörés megy végbe, ami apoptózishoz vezet. Ezek a gyógyszerek lineáris dózis-hatás görbe szerint hatnak. Ebbe a csoportba tartoznak a mustárnitrogének (Ciklofoszfamid, klorambucil), nitrózureák (lomusztin, sztreptozotocin), de a dakarbazin és a prokarbazin is. A sejtciklus függő antimetabolitok esetében a sejtciklus S fázisában történik a sejtosztódás gátlása, amely apoptózist indukál (azatioprin, 5-FLU, citarabin, gemcitabin, metotrexát). Míg az antimikrotubulus ágensek esetében a gátlás a tubulin fehérjéknél (vinca alkaloidok) vagy a mikrotubulusok depolimerizációjánál történik (taxánok). Ide tartozik a vincristin, vinblastin, vinorelbin. Topoizomeráz gátlók esetében a hatás úgy következik be, hogy a DNS polinukleotid lánc közé beékelődve a hélix érintett szakaszát letekerik, így a szintézis gátlódik (például etopozid). A platina származékok kovalensen képesek a DNS-hez kötni és keresztkötésekkel gátolni a szintézist (carboplatin, ciszplatin) (Vail és mtsai. 2019). A tumorelles antibiotikumoknak különböző hatásmechanizmusa is megfigyelhető. Ebbe a csoportba tartozik a doxorubicin, epirubicin, mitoxantron és az actinomycin-D is. A doxorubicin széles körben (leukémia, Hodgkin limfóma, húgyhólyag-, emlő-, petefészek-, tüdő-, gyomor-, pajzsmirigy daganat, lágyszöveti szarkóma) alkalmazott kemoterápiás szer (Brayfield 2014). A doxorubicin és epirubicin hatásmechanizmusa, hogy a DNS-be épül a bázispárok közé a DNS vagy RNS szintézis S fázisában.

Habár számos mechanizmus révén lehet a tumorsejtekre hatni, ezek a vegyületek önmagukban kevésbé hatékonyak és általában gyorsan kialakul velük szemben a rezisztencia.

### **3.3.4 Kombinált terápia**

A tumor sejtek heterogenitása, azaz a különböző morfológiával, osztódási rátával, funkcióval rendelkező sejtek miatt, hatékonyabbak azok a kezelések, melyek egyidejűleg többféle hatást fejtenek ki, így különböző tumorsejteket lehet célba venni. Ezekben a kezelésekben a gyógyszerek alkalmazása egy meghatározott rendszer szerint történik, így a sejtciklus több pontján érvényesülő terápia alakítható ki, ezáltal a kezelés hatékonysága nő, de ugyanakkor érdemes olyan kezelőszereket választani, melyek nem erősítik fel egymás toxikus mellékhatásait. Továbbá fontos az egyes gyógyszerek közötti keresztrezisztencia és toxikológiai tulajdonságok ismerete is. Ritkább esetben előfordulnak olyan daganatok, melyek egyetlen kemoterápiás szerrel hatékonyan kezelhetők (például nők choriocarcinómája) (Ehrke 2003; Tulassay és Matolcsy 2011). Limfóma esetében is lehet hatékony a doxorubicin monoterápia (Higginbotham és mtsai. 2013), azonban a rezisztencia kialakulása miatt a leghatékonyabb a doxorubicin alapú politerápia (Mochel és mtsai. 2019; Zandvliet 2014).

### **3.3.5 Szisztémás terápia limfóma kezelésére**

A limfóma egy szisztémás, az egész testet érintő megbetegedés, mely a nyirokrendszer sejtjeit érinti, éppen ezért elsődlegesen a szisztémás terápia javasolt. Kezelés nélkül kutyáknál a túlélés csupán 4-6 hét, míg intenzív kemoterápiás kezeléssel elérhető tünetmentes állapot, vagyis remisszió (medián betegségmentes időszak 238 nap) és hosszabb túlélési idő is (medián túlélési idő 344 nap) (Zandvliet 2014). A multidrogtérápia ebben az esetben is hatékonyabb, mint az egyféle kezelőszert alkalmazó terápia. Habár nagyon sokféle protokoll létezik limfóma kezelésére, a legtöbb alapja az ún. CHOP (ciklofoszfamid [C], doxorubicin [H, hydroxydaunorubicin], vinkrisztin [O, Oncovin] és prednisone [P]) protokoll, amelyet emberek betegségére is alkalmaznak. Ezzel a terápiával remisszió a kutya esetek 80-90%-ban érhető el, az életminőség javítható és a medián túlélési idő 10-12 hónapra növelhető (Withrow és mtsai. 2012). A doxorubicin monoterápiánál igazolták, hogy a T-sejtes limfómás betegek terápiás válasza alacsonyabb volt, mint a B-sejteseké, ami felveti a kérdést, hogy a T-sejtes limfóma esetében van-e létjogosultsága a CHOP-terápiának vagy már az iniciáció során más kezelési protokollt kellene bevezetni (Beaver és mtsai. 2010). A második vonalbeli citosztatikus szerek azok, amelyeket a recidíva esetén alkalmazunk, például a lomusztin, vinblasztin, chlorambucil, methotrexate, dacarbazine hatóanyagok. Egy retrospektív vizsgálatban azt találták, hogy az L-aszparagináz és MOPP (M, mechlorethamine; O, Oncovin; P, procarbazine; P, prednisone) protokoll alkalmazásával hosszabb progresszió mentes túlélési idő érhető el (Brodsky és mtsai. 2009), azonban 2019-ben egy újabb tanulmány rávilágított arra, hogy az L-aszparaginázzal kiegészített CHOP-terápia (L-CHOP) és a MOPP kezelése között mégse volt jelentősebb különbség (Angelo és mtsai. 2019). Azokban az esetekben, amikor a CHOP nem hatékony, a lomusztin (CCNU) beilleszthető a multicentrikus T-sejtes limfóma protokollba (Withrow és mtsai. 2012). Továbbá, 63 kutya beteg bevonásával végzett, retrospektív tanulmány szerint felfedeztek egy újabb lehetőséget egy kettős prodrug alkalmazásával, a Tanovea-CA1®-t (Rabacfosadine), melynél elegendő három hetente adni az intravénás kezelést, ezzel az állat nyugodtabb életminősége biztosítható és csökkenthető a mellékhatások kialakulásának esélye is (Saba és mtsai. 2020).

### **3.3.6 Célzott terápia**

#### **3.3.6.1 Tirozin-kináz-gátlók**

Amennyiben a kemoterápia sikertelennek bizonyul, abban jelentős szerepe lehet a rezisztencia kialakulásának és/vagy a toxikus mellékhatások megjelenésének. Azonban megkezdődött a daganatterápia felfedezésére irányuló kutatások újabb szakasza, melyben a molekuláris genetikai vizsgálatok számos új diagnosztikai és terápiás lehetőséget biztosítottak.

A célzott molekuláris terápiákkal nagy áttörést értek el például embereknél a krónikus mieloid leukémiában (CML) szenvedő betegek körében. 1960-ban felfedezték a 9-es (ABL-t kódoló) és 22-es (BCR-t kódoló) kromoszóma reciprok transzlokációját, majd 30 évvel később a molekuláris kutatási program keretében a hibás BCR/ABL fúziós fehérje gátlására terveztek molekulát, amely a tirozin-kináz (TK) enzim gátlója. Így találták meg az imatinib-et. Már 1996-ban *in vitro* bizonyították az imatinib mesylate (Glivec®) hatékonyságát a CML sejtekkel szemben, majd 4 évvel később 6000 beteg bevonásával igazolták, hogy a CML betegek 90%-ban reagáltak az újonnan fejlesztett kezelésre (Kopper és Tímár 2007). 2001-ben megkapta az FDA jóváhagyását, melyet követően a betegek pár hónapos túlélési ideje közel egy évtizedre nőtt és a 8 éves túlélési idő elérése 15%-ról 87%-ra emelkedett (Kantarjian és mtsai. 2012).

A tirozin-kináz gátlók másik csoportja, melyek sokkal nagyobb betegcsoportot céloznak meg, az EGFR inhibitorok. Az EGFR négy típusa különíthető el: EGFR, ErbB2 (Her-2), ErbB3 és 4. A mutáns EGFR fokozott expressziója megfigyelhető számos humán daganat esetében (méhnyak-, fej-nyak-, petefészek-, húgyhólyag-, emlő-, nyelőcső-, gyomor-, vastagbél-, tüdődaganat). A mutáns EGFR gátlására többféle lehetőség is létezik. Például az intracelluláris TK domént gátló kis molekulású gátlószerekkel (gefitinib, erlotinib) (Jeney és Kralovánszky 2009; Kopper és Tímár 2007). Az eddigi ismereteink alapján az EGFR TKI-k hatékonyságát befolyásolja az EGFR-, valamint a K-RAS gén mutációja is. Abban az esetben, ha az EGFR gén 19. exonján mutáció történik, akkor a fehérje nagy mértékben kötődik a TKI-hoz, ezáltal az hatékonyabb terápiás választ eredményez. Így például a nem kissejtes tüdődaganat kezelésében hosszabb betegség mentes és teljes túlélési időt sikerült elérni EGFR TKI alkalmazásával (Jiang és mtsai. 2019). A molekuláris biológiai kutatások eredményeként a különböző jelátviteli útvonalak feltérképezésére is sor került, az EGFR család a jelátviteli utak nagy részét képes aktiválni, így például a RAF-MAPK, PI3K-AKT, STAT útvonalakat, de a c-Src proto-onkogén és a foszfolipáz C (PLC) enzim működését is.

### 3.3.6.2 Monoklonális antitestek

Az említett EGFR gátlása megvalósítható az extracelluláris domént támadó monoklonális antitestek alkalmazásával is. A cetuximab az egyik legismertebb tagja a monoklonális antitesteknek, amelyet 2004-ben engedélyezett az FDA az EGFR-pozitív metasztatikus vastagbél-daganatok ellen. Ez egy humán-egér kiméra monoklonális antitest, amely nagy affinitással kötődik az EGFR-hez, ezzel megakadályozva a foszforilációját így az EGFR blokkolásához és a jelátviteli útvonal működésképtelenségéhez vezet. A B-sejtes limfóma esetében is jelentősen növekedett a betegség relapszus mentes és a teljes túlélési ideje is, amikor kifejlesztették a rituximabot (Rituxan®), mely az emberi CD20 sejtfelszíni receptorhoz képes kötődni. 1997-ben engedélyezte az FDA ezt a kiméra antitestet, melyet 2006-ban ex

*vivo* CD20 markert expresszáló kutya sejteken is vizsgáltak, de az nem kötődött megfelelő mértékben a sejtfelszínhez. Később létrehoztak egy újabb kutya anti-CD20 monoklonális antitestet, mely felismerte a CD20 extracelluláris domént és megfelelően nagy affinitással kötődött a sejtfelszíni receptorhoz, így sikerült immunhisztokémiai festéssel detektálni az anti-CD20-t kutya szövetekben diffúz nagy B-sejtes limfóma, marginális zóna limfóma és egyéb B-sejtes limfómák esetében (Ito és mtsai. 2015; Jain és mtsai. 2016).

### 3.3.6.3 Antitumor immunterápia

A célzott és személyre szabott terápiákhoz szükség volt a különböző jelátviteli útvonalak feltérképezésére, az onkogének és tumorszupresszor gének célzott gátlására vagy serkentésére. A jelátviteli útvonalakon célzottan ható monoklonális antitestek megjelenésével egyidőben elkezdődött az onkológiai kutatások újabb szakasza, melyben a legjelentősebb feladat a tumor és a gazdaszervezet immunsejtjei közötti kapcsolatok feltérképezése (Jeney és Kralovánszky 2009). Régóta ismert tény, hogy az immunválasznak nagy szerepe van a daganat eliminálásában, melyet a citotoxikus T-limfociták és a természetes ölősejtek (natural killer, NK-sejtek) végeznek. A tumor kifejlődése összefügg a citotoxikus T-sejtek működésének zavarásával, gátlásával a tumor mikrokörnyezetben. A daganatellenes immunterápiák passzív és aktív terápiákra oszthatóak. Előző csoportba tartoznak a T-sejt terápiák, mint a tumorantigén-specifikus T-sejtek (Vonderheide és June 2003) és a CAR T-sejtek (kiméra antigén receptor). 2017-ben az FDA két CAR T-sejt terápiát hagyott jóvá gyermekkori akut limfoblasztos leukémia (ALL) kezelésére és felnőtt betegek limfóma kezelésére (Mochel és mtsai. 2019), 2019-ben pedig a kutyák diffúz nagy B-sejtes limfómájának kezelésére fejlesztettek ki CAR T-sejteket, melyek a CD20 pozitív limfociták ellen irányultak (Panjwani és mtsai. 2020).

Az aktív immunterápiát két további csoportra különíthetjük el, mely a specifikus és a nem specifikus immunterápiát foglalja magában. A nem specifikus immunterápia jelentheti a különböző citokinek alkalmazását (IFN- $\alpha$ , IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ ), míg a specifikus immunválasz tartalmazza a tumorsejtvakcinákat, tumorantigén-alapú vakcinákat, onkolitikus vírusokat, valamint a gátló mechanizmusok kiküszöbölésére irányuló terápiákat (checkpoint inhibitor). Az ellenőrzőpont gátlók közül kutya betegek számára is megindultak a kutatások. A PD-1 és PD-L1-re sikerült kifejleszteni specifikus monoklonális antitestet, melyet T-sejtekkel inkubálva *in vivo* két kutya betegben (szájüregi melanoma és sarcoma esetében) hatékonynak bizonyult (Maekawa és mtsai. 2017; Nemoto és mtsai. 2018). Kutyák számára már elérhető vakcina is, az Oncept, amely szintén a melanoma kezelésére szolgál (Turek és mtsai. 2020).

### 3.3.7 NSAID, COX-2 gátlók

A ciklooxygenáz enzimnek 2 formája létezik, a COX-1 és COX-2 izoenzimek, melyek 60%-os szerkezeti homológiát mutatnak (Jeney és Kralovánszky 2009; Rizzo 2011). A COX-1 jelentősége minden szövetben konstitutív formában, ún. háztartási prosztaglandinok termelésében van, elsősorban a gyomor védő mucintermeléséért, a trombociták aggregációjáért, és a vese vérellátásának biztosításáért felelős. Csaknem minden sejtben megtalálható enzim. A COX-2 mennyisége különböző, elsősorban gyulladásos stimulusok (citokinek, növekedési faktorok, tumor promoterek vagy endotoxinok) hatására képes változni, indukálható enzim. A COX enzimek szerepe a prosztaglandin szintézis katalizálásában van. A prosztaglandin az arachidonsav származéka, valamilyen sérülés vagy foszfolipáz A2 felszabadulás hatására keletkezik, majd a COX enzimek hatására alakul tovább endoperoxiddá, majd stabil prosztaglandinokká (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>). A keletkezett prosztaglandinok eltérő klinikai hatásokat mutatnak, így létezik simaizom-összehúzó hatás vagy dilatáció, gátolhatják a trombocita aggregációt, de képesek befolyásolni az ér permeabilitást, a sejt migrációt és a mirigyszekréciót is. Igazolták, hogy a COX-2 enzimek által képződött prosztaglandinoknak szerepe van a fájdalom és a gyulladás patomechanizmusában, így a szelektív COX-2 gátló nem szteroid gyulladásgátló készítmények (NSAID-ok) képesek csillapítani a fájdalmat és csökkenteni a gyulladást (Jeney és Kralovánszky 2009).

NSAID-ok 3 fő hatásuk révén eredményesek: a trombocita aggregáció gátlása, a láz- és fájdalomcsillapító hatás és a gyulladáscsökkentő hatás. A COX-2 fokozott expressziója számos daganattípusban megfigyelhető és negatív prognosztikai értékűnek bizonyult. A vastagbél-tumörök 71-85%-ban fokozott mértékben termelődik, illetve emlőtumörök esetén is igazolták a növekedett expresszióját (Costa és mtsai. 2002; Tulassay és Matolcsy 2011). A COX-2 fokozott expressziója a daganatokat tekintve kapcsolatba hozható a sejt proliferációval a PGE<sub>2</sub>-n keresztül, az áttétképzéssel a mátrix-metalloproteinázok fokozásával, a tumorgenezissel, a vérér képződéssel a VEGF működésének serkentésével és az apoptózis rezisztenciával is (Pang és mtsai. 2014; Rizzo 2011). Ezért a COX-2 gátlásának jelentős szerepe van a daganatellenes terápiában is, melynek célja az, hogy minél kevesebb mellékhatást előidézve a COX-2 enzim szelektív gátlása megvalósuljon anélkül, hogy a COX-1 enzim működését befolyásolná. A COX-2 szelektivitását az enzimek működésének gátlásához szükséges IC<sub>50</sub> koncentrációk hányadosával jellemezhetjük (IC<sub>50</sub> COX-2/ IC<sub>50</sub> COX-1). Abban az esetben, ha ez a hányados 1 vagy annál nagyobb, akkor nem szelektív COX-2 gátlószerekről beszélünk (ibuprofen, naproxen, diclofenac). Részben COX-2 szelektív gátlók a meloxicam, etodolac, melyek enyhén gátolják a COX-1 enzimet, de hatásukat főként a COX-2 enzimre fejtik ki. A harmadik csoportba tartoznak a specifikus COX-2



gátlószerek, melyeknek nincs hatásuk a COX-1 enzimre, de a COX-2-t képesek gátolni (celecoxib, firocoxib, mavacoxib).

#### 3.3.7.1 Celecoxib

Szeletív COX-2 gátlószert, mely képes apoptózist indukálni és gátolni a sejtproliferációt emberi daganatsejteken, mint a hepatocelluláris karcinómánál (Fantappiè és mtsai. 2007), a kis-sejtes tüdőkarcinómánál (P. Zhang és mtsai. 2019), a laphámsejtes karcinómánál (Yoshida és mtsai. 2019) vagy a pajzsmirigy karcinómánál (Meng és mtsai. 2014). Ezekben a tanulmányokban többféle mechanizmust vizsgálva megállapították, hogy a celecoxib nemcsak a COX-2 enzimre, de a p53 apoptózist szabályozó génre, az Akt/mTOR jelátviteli útvonalra, a Bcl-2 pro-apoptotikus génre is kifejtette hatását. Továbbá a hepatocelluláris- és a pajzsmirigy karcinóma esetében a celecoxib a terápia rezisztencia kialakulásáért gyakran felelős P-glikoprotein (Pgp) expresszió szintjét is jelentősen csökkentette. Roy és munkatársai szintén hepatocelluláris karcinóma sejtekben bizonyították, hogy a celecoxib csökkenti a Pgp-expressziót COX-2 függő mechanizmuson keresztül, ezáltal tízszer érzékenyebbek lettek a sejtek a doxorubicin kezelésre (Roy és mtsai. 2010). Humán bőrdaganat sejtekben a doxorubicin liposzomális változatával kombinálták a celecoxibot, így hatékonyabb volt a kezelés a daganatsejtek elpusztításában, mint a kemoterápia magában. A kombináció jelentős hatását az AKT és COX-2 jelátviteli utak szinergisztikus gátlásán keresztül fejtette ki, mely a sejtek apoptózist indukálta (Singh 2018). Továbbá kutya emlőtumorban is kimutatták, hogy a COX-2 fokozott működése csökkenthető és a celecoxib alkalmazásával a sejtproliferáció is gátolható egy COX-2 független mechanizmuson keresztül (Tamura és mtsai. 2015).

#### 3.3.7.2 Firocoxib

A firocoxib önmagában is alkalmazható kutya antitumor terápiaként, de számos tanulmányban vizsgálták az előnyeit kombinációban alkalmazva. Húgyhólyag tumoroknál önmagában palliatív kezelésként használható, mivel részleges remissziót indukált a betegek 20%-nál, de ciszplatinnal kombinálva szignifikánsan hosszabb remissziós időt értek el és nem okozott több mellékhatást, mint a ciszplatin önmagában (Knapp és mtsai. 2013). Tacsókóknál gyulladásoos vastagbél polipot kezeltek chlorambucillal és firocoxibbal, így sikerült jobb terápiás választ elérni, valamint a kutyák életminőségét javítani (Murakami és mtsai. 2018). Emlőtumor esetében is a kombinált terápia bizonyult a legsikeresebbnek, melyben a műtéti kezelést kiegészítették carboplatinnal és firocoxibbal (Lavalle és mtsai. 2012).

#### 3.3.7.3 Mavacoxib

Szintén szeletív COX-2 gátlószert, melyről *in vitro* bizonyították, hogy antitumor hatása van, apoptózist indukál a tumorsejteken és gátolja a migrációt (Pang és mtsai. 2014). Különböző

humán és kutyatumorokban (osteosarcoma, emlőtumor, húgyhólyag karcinóma) igazolást nyert, hogy a mavacoxib képes apoptózist indukálni és a tumorsejt migrációt gátolni az emelkedett COX-2 expressziótól függetlenül (Hurst és mtsai. 2019).

#### 3.3.7.4 Meloxicam

Részben szelektív COX-2 gátlószer, melyről szintén *in vitro* bizonyított, hogy képes apoptózist indukálni és sejtproliferációt gátolni kutya tumorsejtek esetén (limfóma és emlőtumor sejtvonalakon), melynek hatása dóziszfüggő volt (Knottenbelt és mtsai. 2006). Humán vastagbél daganatsejteken *in vitro*, továbbá egér xenograft modellben is igazolták, hogy a meloxicam a tumornövekedést csökkentette azokban az esetekben, ahol COX-2 fokozott expressziója kimutatható volt (Goldman és mtsai. 1998). Továbbá egér adenokarcinóma esetében lassította a tumor növekedését (Hussey és Tisdale 2000).

### 3.3.8 Epigenetikai gátlószer

Jelen ismereteink szerint a daganat kialakulásához mutációk sorozata vezet, azonban nemcsak a DNS-ben bekövetkező változások felelősek a folyamatért. Az epigenetikai szabályozás a DNS bázisrendjét nem változtatja meg, de a gének hozzáférhetőségét és az expresszióját igen. A „felett” jelentésű ógörög *epi* prefixum arra utal, hogy az információ átkerülése a DNS-szekvencia megváltozása nélkül (*felett*) történik. Ez a folyamat visszafordítható, az epigenetikai mechanizmusok fő feladatai a sejt differenciáció és a szövetfajlagos expresszió mintázatok fenntartása. Abban az esetben, ha ez a szabályozás rendellenes, akkor a génműködés megváltozik, ami kóros folyamatokat idézhet elő. A daganatképződés epigenetikai szabályozásának három egymással összefüggő formája van: a DNS metilációja, a nukleoszómák belső hisztonjainak N-terminális lizin oldalláncon történő deacetilációja, kromoszóma struktúra szabályozás változása és a genomialis imprinting. Az epigenetikai mintázatot több enzimcsalád határozza meg: a DNS-metiltransferázok (DNMT), a hiszton-deacetilázok (HDAC), a hiszton-lizin-metiltransferázok (HMT) és a hiszton-demetilázok. A daganatokban a metilációs állapot eltér a normál működéstől, vagyis a promóter régiók hipermetiláltsága és a genom hipometiláltsága jellemző. A hiper- és hipometiláltság egyaránt előidézhetheti a daganat kialakulását a génátírás szabályozásán keresztül. A promóter régiók metilációjának változása a tumorszuppresszor gének inaktiválódásához vezet, így a sejt ciklus szabályozásában, a DNS-javításban, a sejt-sejt kölcsönhatásban, a vérképződésben és az apoptózisban is szerepet játszik. A genom hipermetilált állapota a heterokromatin kompakt szerkezetét okozza, ezáltal az átíródást elősegítő faktorok kevésbé tudnak kötődni. Ezen felül a hisztonfehérjéknek is jelentős szerepük van a daganat kialakulásában, ezeknek a fehérjéknek az N-terminális oldallánc változásai határozzák meg a kromatin szerkezetét és a gének kifejeződését. A hiszton

oldalláncok acetilációja a kromatint nyitottá, vagyis aktívvá teszi, míg a hiszton metiláció a génexpresszió gátlásáért és serkentéséért egyaránt felelős lehet (Kopper és Tímár 2007; Tulassay és Matolcsy 2011). Számos kutatás foglalkozik az epigenetikai gátlószerek tumorellenes terápiás alkalmazásával. Ezek között találunk példát a kutya diffúz nagy B-sejtes limfóma vizsgálatára, mely jó modellje a humán Non-Hodgkin limfómának. Egy 2018-as tanulmányban megvizsgálták különböző HDAC gátlószerek tumorellenes hatását (panobinostat, SBHA, SAHA, trichostatin-A, scriptaid, subacin). Ezek közül a panobinostat bizonyult a leghatékonyabbnak a tumor növekedés gátlásában és az apoptózis indukálásában *in vitro* CLBL-1 sejteken és *in vivo* xenograft egér modellben is (Dias és mtsai. 2018).

### **3.4 Multidrog rezisztencia**

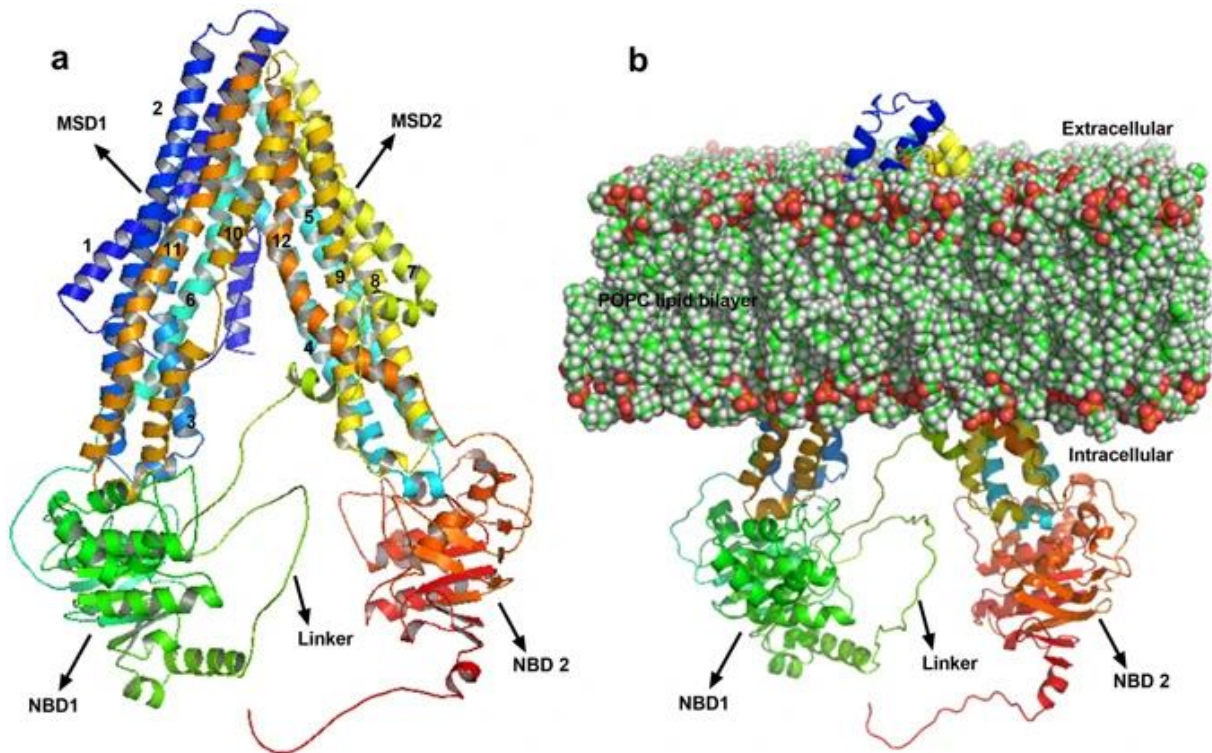
#### **3.4.1 MDR kialakulásának mechanizmusai**

Annak ellenére, hogy számos újfajta terápia került kidolgozásra és tesztelésre, a limfómák esetében mégsem tudták jelentősen megnövelni a kezelés hatékonyságát és kutyák esetében nem értek el 12 hónapnál, a hagyományos kemoterápiás szerek alkalmazásával elérhető időtávnál, hosszabb medián túlélési időt. 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 rezisztencia kialakulásának lehetnek farmakokinetikai okai (gyenge gyógyszerfelszívódás, elégtelen gyógyszer szállítás, tumor mikro környezetében alacsony pH, rossz oxigénellátás, specifikus szerv akadályok, mint a vér-agy gát), de gyakoribbak a farmakodinamikai okok. Utóbbi létrejöhet a csökkent gyógyszerfelvétel, megnövekedett gyógyszerkiválasztás, gyógyszer anyagcsere változás miatt, melyben szerepet játszhat a glutation-S-transzferáz vagy a CYP450 rendszer. Azonban az egyik legfőbb oka az MDR kialakulásának a gyógyszerek fokozott kijuttatása a sejtekből, melyért az ATP-t felhasználó sejt felszíni fehérjék, az ABC (ATP-Binding Cassette) fehérjecsald felelős (Jeney és Kralovánszky 2009). Az MDR leküzdésére nagy hangsúlyt fektetnek mind a humán, mind a kutya kezelés kutatási területein (Withrow és mtsai. 2012).

#### **3.4.2 A P-glikoprotein felfedezése**

A hatóanyagoknak a citoplazmából az extracelluláris térbe történő kipumpálásáért nagy részben felelős az elsőként felfedezett efflux pumpa, a P-glikoprotein (Permeability glycoprotein, Pgp). A Pgp-t kódoló gén az ABCB1, ami arra utal, hogy az ember esetében létező ABC fehérjecsald 48 transzportere közül elsőként fedezték fel. Annak ellenére, hogy ez a fehérjecsald szinte minden életformában megtalálható, a felfedezésére 1976-ig várni kellett. Már korábban is, 1973-ban bizonyították, hogy a rezisztens sejtek képesek csökkenteni a daunomycin hatóanyag intracelluláris koncentrációját, sőt keresztrezisztenciát mutatnak

bizonyos vinka alkaloidokkal szemben (Dano 1973). Ezt követően, 1974-ben kínai hörcsög petefészkek sejtvonalon (CHO) is igazolták, hogy a rezisztens sejteknél megnövekedett a gyógyszer kiválasztás cianid jelenlétében (See és mtsai. 1974). Azonban 1976-ban sikerült először kimutatni és leírni, hogy a rezisztens fenotípusért egy 170 kDa molekulatömegű membrán alkotóelem felelős, amely a CHO vad típusú sejtekben nem, de a rezisztens sejtekben jelentős mennyiségben volt jelen (Juliano és Ling 1976). A következő években a kutatók egyre több információt szolgáltattak a Pgp működéséről, 2009-ben a szerkezetét is megismerhették (Aller és mtsai. 2009) (4. ábra).



**4. ábra:** A P-glikoprotein 3D szerkezete (a) és az elhelyezkedése a foszfolipid kettősrétegben (b). A Pgp képes kipumpálni a szubsztrátokat az intracelluláris térből az extracelluláris térbe (Syed és mtsai., Nature, 2017).

A Pgp felfedezését követően majdnem 20 évvel később véletlenül derült fény a fiziológiai szerepére, amikor MDR1a géniütött („knock-out”) egereket parazitafertőzés ellen kezeltek ivermectinnel és azok, röviddel a kezelés után, elpusztultak. Ekkor állapították meg, hogy a Pgp hiánya a vér-agy gátban volt felelős a neurotoxicitásért (Schinkel és mtsai. 1994). Később megisméltődött az eset, amikor skót juhászkutyáknál szintén ivermectin indukálta neurotoxicosis lépett fel, ami rámutatott, hogy ennél a fajtánál gyakori az MDR1 gén deléciós mutációja (Mealey és mtsai. 2001). A későbbi kutatások kimutatták, hogy a kutyákban megtalálható Pgp 93%-os homológiát mutat a humán Pgp-vel (Steingold és mtsai. 1998). Az ABC-transzporterek a sejtmembránban helyezkednek el és képesek sokféle molekula transzportálására, mind exogén szubsztrátok (gyógyszerek, toxinok), mind endogén

szubsztrátok szállítására (ionok, peptidek, szteroidok, aminosavak, szerves ionok stb.) alkalmasak. Ezek a transzporterek nélkülözhetetlen védelmi szerepet töltenek be a fiziológias folyamatokban. Részt vesznek a különböző vér-szöveti határok védelmében, úgy mint a vér-agy gát, vér-here gát, vér-placenta gát működésében, de nagy számban vannak jelen a vese- és bélhámsejtekben, májsejtekben, mellékvesében, csontvelőben, valamint a perifériás vérsejtjeiben is, ahol meghatározzák a gyógyszerfelvételt és eliminációt (Gameiro és mtsai. 2017; Lin és Yamazaki 2003). Időközben megindultak a Pgp gátlószerek keresésére irányuló kutatások is, amelyek képesek lehetnek a rezisztencia visszafordítására (Zandvliet 2014). A Pgp mellett számos más ABC-transzporter szerepe is jelentős, melyek mutációi különféle betegségekhez vezetnek. Ezek közül ismert például a cisztás fibrózis (ABCC7), progresszív familiáris intrahepatikus kolesztázis (ABCB4, ABCB11), immunhiányos betegségek (ABCB2, ABCB3), pszeudoxantoma elasztikum (ABCC6) vagy megfigyelhető eltérő fenotípus a Dubin-Johnson-szindróma esetében (ABCC2) (Borst és Elferink 2002; Gottesman és Ambudkar 2001).

### **3.4.3 A P-glikoprotein szerepe a tumorok drogrezisztenciájában**

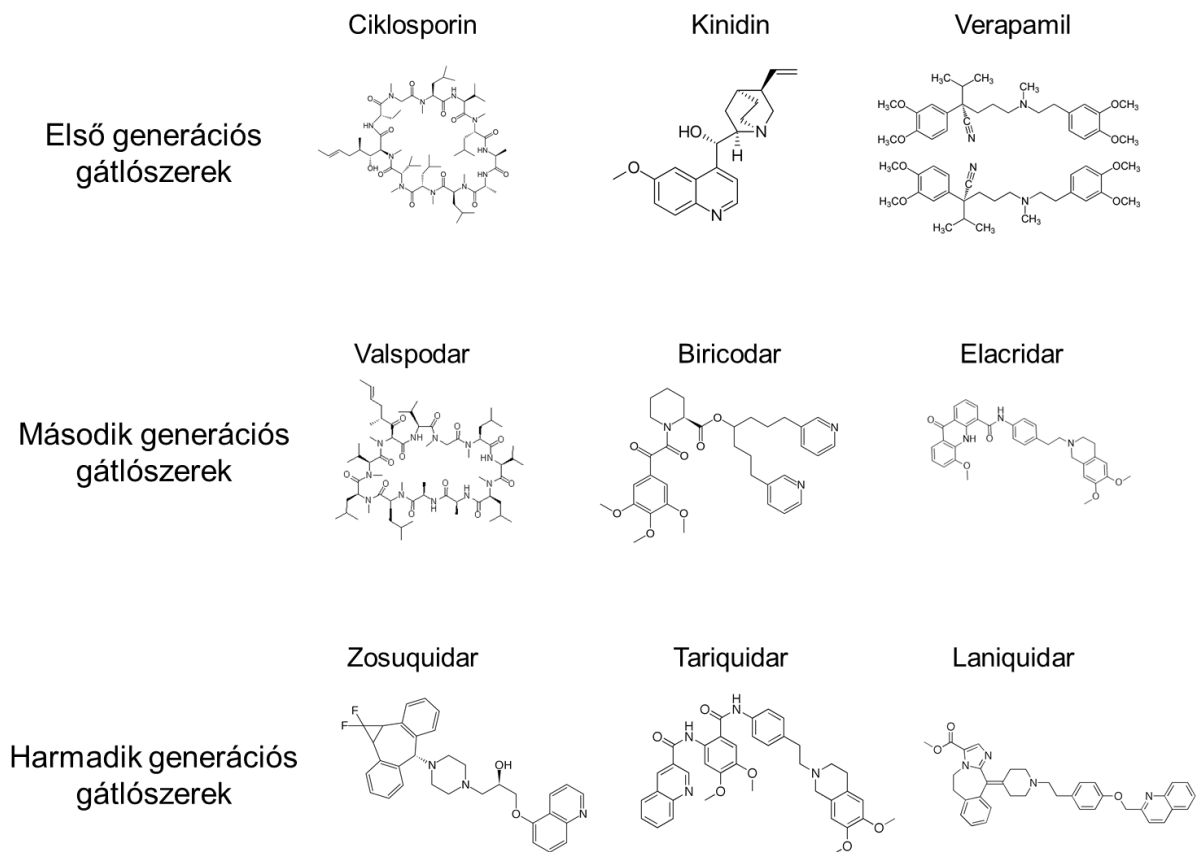
Habár 48 leírt ABC-transzporter létezik, közülük négy felelős leginkább a gyógyszer rezisztencia kialakulásáért. A Pgp (MDR1/ABCB1) mellett, a multidrog rezisztencia asszociált fehérje 1 (MRP1/ABCC1) és 2 (MRP2/ABCC2), valamint az emlődaganat rezisztencia fehérje (BCRP/ABCG2) (Zandvliet 2014). Az ABC családba tartozó fehérjék ATP hidrolízisét felhasználva képesek az anyagok aktív transzportjára a biológiai membránokon keresztül, egy szubsztrát transzportjához 2 ATP hidrolízise szükséges (Gottesman és mtsai. 2002). A Pgp sokféle gyógyszer felismerésére és eliminálására képes, ideértve a citosztatikus ágenseket is (vinka alkaloidokat, antraciklineket, taxánokat) (Zandvliet 2014).

A Pgp túlzott expressziója megfigyelhető számos kutya tumor sejtvonalban (limfoid leukémia, hízósejt tumor, osteosarcoma) (Nakaichi és mtsai. 2007; Page és mtsai. 2000; Uozurmi és mtsai. 2005) és a kutya páciensekben spontán kialakuló tumorokban is, mint máj, mellékvese (Ginn 1996), gasztrointesztinális, tüdő (Hifumi és mtsai. 2010), átmeneti sejtes karcinóma (Lee és mtsai. 2007), emlődaganat (Petterino és mtsai. 2006), bőr mastocytoma (Miyoshi és mtsai. 2002) és limfóma (Bergman és mtsai. 1996; Schleis és mtsai. 2008). A magas Pgp expresszió együtt járt a nagy malignitással is kutya emlődaganatokban (Badowska-Kozakiewicz és Malicka 2010), valamint alacsonyabb remisszió mentes és teljes túlélési idővel párosult limfóma esetén (Vajdovich és mtsai. 2018).

### **3.4.4 P-glikoprotein gátlása**

Miután azonosították az ABC transzporterekről, hogy nagy szerepet játszanak a rezisztencia kialakulásában, 10 éven belül megkezdődtek a kutatások, amelyek a Pgp és egyéb ABC

transzporter gátlók fejlesztésére összpontosultak. A Pgp esetében a gátlószerek 3 generációját különíthetjük el. Az első generációs Pgp gátlók olyan gyógyszerek voltak, amelyek már a klinikai gyakorlatban is használatban voltak, de más céllal alkalmazták őket, például a kalciumcsatorna blokkoló verapamil vagy bizonyos immunszuppresszív vegyületek, mint a ciklosporin A. Ezek a gyógyszerek *in vitro* nagyon ígéretesnek bizonyultak, de a klinikai vizsgálatokban általában elbuktak, mivel alacsony hatékonysággal gátolták a transzportert vagy a Pgp gátlásához szükséges koncentrációban alkalmazva toxikus mellékhatások alakultak ki (Fisher és mtsai. 1996). Ez vezetett a második generációs Pgp gátlók kifejlesztéséhez, amelyek hatásosabbak, de kevésbé szelektívek, akár több ABC-transzporter gátlására is képesek voltak, sőt még a CYP450 rendszerre is hatottak. Ide tartozik például a Valspodar, melyet kemoterápiás szerrel együtt adva végeztek klinikai vizsgálatokat. Azonban a transzporter specifitása hiánya olyan nem várt farmakokinetikai kölcsönhatásokat indukált, amelyek megváltoztatták a citosztatikus gyógyszer metabolizmusát és egyes betegeket így alul vagy éppen túldozíroztak, de a terápiás előny nem volt egyértelmű (Szakács és mtsai. 2006; Zandvliet 2014). A harmadik generációs Pgp, BCRP vagy akár CYP450 gátlók hatékonyabbak, specifikusabbak és ígéretesebbek voltak *in vitro*, azonban a klinikai eredmények nem voltak meggyőzőek. A Pgp gátlószereket hosszú időn keresztül tanulmányozták, a kutatások során a Pgp-re kifejtett hatásmechanizmus változásával a szerkezetük is folyamatosan alakult (5. ábra).



**5. ábra:** A P-glikoprotein gátlószeret három generációba lehet besorolni. Ezek nagy részének szerkezeti képletét ábrázoltuk.

2002-ben egy klinikai fázis III. vizsgálatban a Tariquidart kombinálták elsővonalbeli kemoterápiás szerrel nem kissejtes tüdődaganatos betegek esetében, de a vizsgálatot korábban abbahagyták a citotoxikus gyógyszerekkel kapcsolatos toxicitás miatt. A harmadik generációs inhibitorokkal végzett klinikai fázis III. vizsgálatok eredményei kulcsszerepet játszanak annak meghatározásában, hogy a Pgp vagy más ABC transzporter gátlók javíthatják-e a betegek túlélési idejét (Szakács és mtsai. 2006; Zandvliet 2014). 2010-ben egy újabb Pgp inhibitor, a Zosuquidar és placebo kontrol csoport összehasonlítását végezték egy jól megtervezett, randomizált, megfelelő végponttal rendelkező klinikai vizsgálatban akut mieloid leukémiás betegeken, de a túlélési időben nem tapasztaltak különbséget (Libby és Hromas 2010). A sikertelen eredmények miatt levonhatjuk a következtetést, hogy bár az ABC-transzporterek nagy részben felelősek a rezisztencia kialakulásáért, mégsem sikerült olyan gátlószerrel találni, amelynek *in vivo* is van terápiás előnye. A gátlószer alkalmazásának eredménytelensége abból fakad, hogy a Pgp fiziológiai védelmi szerepe (a különböző barriereken, bélhám sejteken, vesében, májban) nélkülözhetetlen. Különböző alternatív megközelítésekre is léteznek kutatások, monoklonális antitestek vagy az aktív immunizáció Pgp ellen vagy akár géncsendesítés (Abbasi és mtsai. 2013; Heike és mtsai. 1990; Morizono

és mtsai. 2005), de ide tartozik a TKI-k alkalmazása is. A TK-k döntő szerepet játszanak a daganat fejlődésének számos útjában, a sejt proliferációban, apoptózisban, angiogenezis és áttét képzésben is, melyek szabályozhatók a különböző TKI-kal (Zandvliet 2014). A TKI nemcsak szubsztrátja a Pgp-nek és BCRP-nek, de különböző ABC-transzporterek gátlói is és *in vitro* többféle sejtvonalon nyert bizonyítást, hogy kemoterápiás szerekkel kombinálva sikeresen alkalmazták anélkül, hogy gyógyszer rezisztencia kialakult volna (Hegedus és mtsai. 2009; Shukla és mtsai. 2009). További potenciális célpont lehet a különböző COX-2 gátlószeres terápiás alkalmazása a rezisztencia leküzdésére, azáltal, hogy képesek a Pgp expresszió csökkentésére (S. Zhang és mtsai. 2019).

### **3.4.5 P-glikoprotein és a COX-2 közötti kapcsolat**

A COX-2 / PGE<sub>2</sub> / PGE receptor jelátviteli útvonal aktiválódásával fokozódik nem csak az MDR1, de az MDR kialakulásában fontos szerepet betöltő egyéb ABC transzporterek, mint az MRP1 vagy a BCRP expressziója is (Liu és mtsai. 2009). Azonban a különböző NSAID-ok képesek gátolni a COX-2 enzim működését (patel és mtsai. 2002), melynek alkalmazásával lehetőségünk nyílna a transzporter fehérjék expressziójának megakadályozására, ezzel a daganatellenes hatóanyag citotoxikus hatásának fokozására, a toxikus mellékhatások kialakulása nélkül.

Elsőként 2002-ben egy amerikai kutatócsoportnak sikerült direkt kapcsolatot igazolni a COX-2- és a Pgp aktivitás között (patel és mtsai. 2002). Az MDR1 mRNS expresszió növekedése a COX-2 expresszió mértékétől függött. Majd bizonyították áramlási citométer és Western blot segítségével, hogy az NS398 COX-2 gátlószer a COX-2 mediált Pgp expressziót és aktivitást is csökkentette. Habár azóta számos sejtvonalon és tumortípusban igazolták az összefüggést, a COX-2 hatásmechanizmusa az MDR folyamatában még ma sem teljesen ismert. A COX-2 overexpresszió növeli a Pgp expressziót kutya átmeneti sejtes karcinómánál (Lee és mtsai. 2007), továbbá kimutatták embereknél emlőtumor esetén *in vitro* és egér modellben is (Chen és mtsai. 2011; S. Zhang és mtsai. 2019), emberi vastagbél daganat sejteken *in vitro* és egér modellben *in vivo* (Zrieki és mtsai. 2008; Zrieki és mtsai. 2010), emberi gyomor- és májdaganat sejtvonalon is (Fantappiè és mtsai. 2002; Xu és mtsai. 2016).

Más tanulmányok néhány esetben kimutatták, hogy a daganatos kutya limfoid szövetekben is megfigyelhető a fokozott COX-2 expresszió (Asproni és mtsai. 2014; Mohammed és mtsai. 2004), azonban nem vizsgálták a szelektív COX-2 gátlószer alkalmazását a gyógyszer rezisztencia leküzdésének összefüggésében.



## 4. Célkitűzések

### 4.1. A limfóma célzott kezeléséhez szükséges prognosztikai faktorok tanulmányozása

A limfóma esetében a kezelés megválasztását és a prognózist jelentősen befolyásolja az immunfenotípus, valamint a WHO szerinti szubtípus meghatározása is. A kutyáknál a gyakrabban előforduló B-sejtes limfómák jobban reagálnak a kemoterápiára, hosszabb a betegek recidívamentes és teljes túlélési ideje is, szemben a T-sejtes formával (Kiupel és mtsai. 1999; Vail és mtsai. 2019; Vajdovich és mtsai. 2018). Mindezek ismeretében célunk volt, hogy összehasonlítsuk az immunfenotípus meghatározására szolgáló módszereket, így az immunhisztokémiai vagy az áramlási citometriai analízis előnyeit és hátrányait.

A terápiát befolyásoló további tényező a gyógyszerekkel szembeni multidrog rezisztencia (MDR) kialakulása, melynek leggyakoribb okozója a P-glikoprotein (Pgp) megjelenése és aktivitásának fokozódása a tumorsejtekben (Lee és mtsai. 1996; Sokołowska és mtsai. 2015; Zandvliet 2014). Kutatócsoportunk korábban igazolta, hogy az immunhisztokémiai módszerrel végzett Pgp százalékos meghatározás szintén prognosztikai értékkel bírhat a kutya limfóma kezelése során (Vajdovich és mtsai. 2018). Azonban jelen tanulmányban arra keressük a választ, hogy a Pgp aktivitás mérése elvégezhető-e a rutindiagnosztikai módszer részeként a diagnózis megállapításakor áramlási citométer segítségével. Hosszútávú célunk ezzel a vizsgálattal az volt, hogy a kezdeti rezisztencia státuszt össze tudjuk hasonlítani a kutyák kemoterápiás kezelése során mért Pgp aktivitással, melynek változása információt adhat a Pgp szerepéről a terápia rezisztencia kialakulásában és ennek függvényében a kezelőszerek helyes megválasztásával közelebb kerülünk az egyedre szabott gyógyászat kialakításához.

### 4.2. Egér és kutya limfóma sejtek *in vitro* gyógyszeresztelésre való alkalmasságának vizsgálata

Nemcsak a spontán fejlődő tumorok, mint például a limfóma (Bergman és mtsai. 1996; Schleis és mtsai. 2008), az emlődaganat (Petterino és mtsai. 2006) vagy akár a bőr mastocytoma (Miyoshi és mtsai. 2002) esetében találunk bizonyítékot a Pgp fokozott expressziójára, hanem az az egyes sejtvonalakon is megfigyelhető. A következő kísérletsorozattal az volt a célunk, hogy választ kapjunk az állatgyógyászatban használatos terápiás szerek hatékonysága hogyan változik a tumorsejtek felszínén kifejeződő Pgp hatására. Ehhez a vizsgálathoz egy doxorubicin által kialakított rezisztens egér leukémia sejtvonalon (Schabel és mtsai. 1983), a gyógyszerérzékeny párján és egy diffúz nagy B-sejtes kutya limfóma sejtvonalon is teszteljük a vegyületeket, valamint az említett egér sejteket allograft modellben is vizsgáljuk (Rütgen és mtsai. 2010).

#### **4.3. *In vitro* modellrendszer kidolgozása a rezisztencia tanulmányozására limfóma sejtekkel**

A korábbi vizsgálatban szereplő rezisztens egér leukémia sejtvonal, melyet folyamatos gyógyszeres szelekció eredményeként hoztak létre, *in vitro* hasznos, azonban a klinikumban tapasztalt MDR kialakulásának modellezésére ez a módszer nem vagy csak nagyon kis mértékben alkalmas. Ezért célunk volt, hogy a rezisztencia kialakulására kidolgozzunk egy olyan *in vitro* modellrendszert, amelyben a kutya betegeknél alkalmazott terápiás protokollhoz hasonló módon alakítjuk ki a gyógyszerérzékeny tumorsejtekből a rezisztens populációt.

#### **4.4. Állatgyógyászatban már alkalmazott COX-2 és epigenetikai gátlók kombinálása doxorubicinnal egér és kutya limfóma sejtvonalon a rezisztencia kialakulásának megakadályozására**

A szerzett gyógyszer rezisztencia kialakulásáért a daganatokban nemcsak a már vizsgált efflux transzporter expressziójának megváltozása lehet felelős, hanem a sejthalál gátlásának, a gyógyszer metabolizmusának megváltozott működése vagy akár epigenetikai változások is (Shah és Rawal 2019). A következő kísérletekben olyan epigenetikai gátlószereket alkalmaztunk, amelyek az állatgyógyászatban használatosak és potenciális kezelőszerei lehetnek a kutya limfómának. A doxorubicin mellett kutya multicentrikus limfóma kezelésére alkalmazták a temozolomidot (Dervisis és mtsai. 2007; Treggiari és mtsai. 2018), amely egy DNS metil-alkiláló szer, a tumorsejtek apoptózisát idézi elő. A SAHA egy hiszton-deacetiláz inhibitor, amely a génátíródás folyamatát képes befolyásolni, speciálisan a cutan T-sejtes limfóma kezelésére alkalmazzák humán és kutya betegeknél egyaránt (Mann és mtsai. 2007). A harmadik gátló szer szintén egy hiszton-deacetiláz inhibitor, a trihostatin-A (TSA), melyet *in vitro* kísérletekben tesztelték kutya limfóma sejteken (Dias és mtsai. 2018). Célunk között szerepelt, hogy megvizsgáljuk az említett gátlószerek és a doxorubicin kombinációjának a Pgp aktivitásra kifejtett hatását.

Azonban a Pgp és a másik két MDR kialakulásáért felelős efflux transzporter (BCRP, MRP1) aktivitására bizonyítottan hatással van a COX-2 fokozott expressziója is (Liu és mtsai. 2009; patel és mtsai. 2002), amely számos daganattípusban megfigyelhető (Doré és mtsai. 2003; Goldman és mtsai. 1998; Tamura és mtsai. 2015). Mindezek ismeretében választottuk további kísérleteinkhez a különböző COX-2 gátlószereket (celecoxib, firocoxib, meloxicam, mavacoxib), melyekkel az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk képesek-e a doxorubicinnal együttesen alkalmazva a terápia rezisztencia kialakulásáért felelős Pgp aktivitásának fokozódását megakadályozni.

## **5. Anyag és módszer**

### **5.1 A limfóma célzott kezeléséhez szükséges prognosztikai faktorok tanulmányozása**

#### **5.1.1 Az immunfenotipizálási vizsgálatban szereplő állatok**

Az immunfenotípus módszereinek összehasonlításához a mintagyűjtés az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ (ÁHOK) állatorvosai segítségével történt 2014-2020 között. A vizsgálatban 35 multicentrikus limfómával diagnosztizált kutya vett részt, 17 nőtény és 18 hím, átlagéletkoruk  $8 (\pm 2,7)$  év volt. A kutya fajtákat tekintve keverék ( $n = 8$ ), golden retriever ( $n = 3$ ), magyar vizsla ( $n = 3$ ), jack russel terrier ( $n = 2$ ), német juhászkutya ( $n = 2$ ), amerikai staffordshire terrier ( $n = 2$ ), west highland white terrier ( $n = 2$ ), labrador retriever ( $n = 2$ ) volt, de előfordult welsh corgi, yorkshire terrier, angol cocker spániel, shar-pei, francia bulldog, dobermann, bullmasztiff, argentin dog, fox terrier, husky és shi-tzu is a betegek között. A kutyák stádium és alstádium meghatározása a WHO által létrehozott rendszer szerint történt (Valli és mtsai. 2013). A diagnózist tekintve gyakoribb volt a B-sejtes limfóma, így a diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL) 22 esetben volt megfigyelhető, de előfordult kis B-sejtes, nagy sejtes immunoblasztos, T-sejt gazdag B-sejtes limfóma is, melyet külön esettanulmányban elemeztünk, míg T-sejtes limfómák közül 5 esetben volt perifériás T-sejtes limfóma egyéb csoportba nem sorolható típusa (PTCL-NOS), továbbá szerepelt T-sejtes cutan és T-limfoblasztos limfóma is (1. sz. melléklet).

##### **5.1.1.1 T-sejt gazdag B-sejtes limfómás beteg klinikai anamnézise**

Az esettanulmányban, melyet az eredmények részben részletezünk, egy 11 éves nőtény, yorkshire terrier kutya páciens szerepelt. A fizikális vizsgálattal a bal submandibularis nyirokcsomó duzzanata, valamint súlyos fogkövesség volt tapasztalható. Hasi ultrahangvizsgálat során a cranialis mesenteriumban voltak detektálhatóak duzzadt nyirokcsomók. A diagnosztizálás során elvégeztük az immunhisztokémiai, áramlási citometriai és kórszövettani vizsgálatokat is. A beteg CHOP kemoterápiás protokoll szerinti kezelést kapott, melyet a kemoterápiás kezeléseknél alkalmazott elővigyázatosságok ellenére nem viselt jól. Az első három kezelés után tartósabb hányás, hasmenés és letargia volt jellemző a gyógyszermentes időszakokban, de leukopénia, neutropénia nem volt megfigyelhető. A páciens 3 hónap alatt mindössze 7 kezelésen esett át. A terápia megkezdésétől számított negyedik hónapban már idegrendszeri tünetei voltak, az epigastriumban és mesogastriumban duzzadt nyirokcsomók, valamint a jejunumban egyenetlenül megvastagodott bélfal volt detektálható hasi ultrahang

vizsgálattal. Az állat nem fogadott el eleséget, letargikus és apatikus volt. A tulajdonosok az eutanázia mellett döntöttek.

### **5.1.2 Mintavételi eljárás a kutya betegekből**

Az immunfenotípus vagy a Pgp aktivitás meghatározáshoz a szükséges tumor mintavétel történhet a szövettani mintavétellel egyidőben műtét során vagy a citológiai mintavételhez hasonlóan tűaspirációs mintavétellel. A műtét kezdetén a betegeket intravénásan kanüláltuk, majd fentanyl (0,003-0,005mg/kg) és propofol (5mg/kg) bolussal szedáltuk. A légcsőtubus behelyezését követően, az altatás a továbbiakban izoflurán (1,5-2,5 V/V%), valamint oxigén gáz keverékeként folyt, a beteget folyamatosan monitoroztuk. Ezt követően a duzzadt nyirokcsomó felett előkészítettük a bőrt, melyen metszést követően kipreparáltuk a nyirokcsomót a környező szövetekből. A sebet két rétegben zártuk és a beteget ébredésig megfigyelés alatt tartottuk. A műtétet követő második héten eltávolítottuk a varratokat. A teljes nyirokcsomót 10%-os pufferolt formalinba helyeztük és külső laboratóriumba küldtük további feldolgozás céljából.

A vékonytű-aspirációs mintavétel kevésbé invazív eljárás, a mintavételhez előkészítettük a mintavételi csövet, 5 ml-es fecskendőt, valamint egy 18G tűt az áramlási citométer vizsgálathoz és 22G tűt a citológiai vizsgálathoz. A kiválasztott, duzzadt nyirokcsomót egyik kezünkben rögzítettük, másik kezünkkel a tűs fecskendőt beszúrtuk a szövetbe. Ugyanezen kezünkkel a fecskendővel vákuumot képeztünk, ezt követően reszelő mozdulatokkal aspiráltuk a sejteket. A mozdulatsort elvégeztük két-három alkalommal és a mintát kiegészített RPMI (Life Technologies, Carlsbad, USA) folyadékba helyeztük, mely tartalmazott 10% főtális borjú szérumot (FBS), 5 mmol/l glutamint és 50 egység/ml penicillin/sztreptomycin (Lonza) kombinált antibiotikumot vagy a citológiai vizsgálathoz tárgylemezre applikáltuk további feldolgozásig. A műtéti vagy biopsziás mintavételt követően a tumort kiegészített RPMI (Life Technologies) médiumban tároltuk 4°C-on további feldolgozásig, melyet legkésőbb 24 órán belül megkezdtünk.

### **5.1.3 Immunhisztokémia**

Műtéti eltávolítás után a nyirokcsomót átlagosan 24 óráig 10%-os (v/v) formaldehid oldatban fixáltuk. A szövettani vizsgálatok a Mátix Kórszövettani és Citológiai Laboratóriumában, valamint az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékének Laboratóriumában történtek. Fixálást követően a szövetek felszálló alkoholsorban víztelenítésre, majd xilolt helyettesítő intermedierbe (Ottix plus, Diapath S.p.A, Martinengo, I) kerültek. Ezt követően a nyirokcsomó részletek blokkban paraffinvaszban kerültek beágyazásra, végül a 3 µm vastagságú lemetszett szövetmintákat tárgylemezre (Superfrost Ultra Plus, TSLabor,

Budapest, HU) helyzetük. A minták deparaffinálása, majd rehidrálása következett. A pontos diagnózis megállapításához elvégeztük a minták hematoxilin-eozin, valamint a T és B-limfociták festését, melyhez különböző poliklonális ellenanyag KIT-eket használtunk. Az antigének feltárásához hőindukált epitop kinyerési technikát kellett alkalmazni speciális feltáró oldatban. A vizsgálatunkhoz 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. 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, szintén a protokollban leírtak szerint DAB (3,3'-Diaminobenzidine) kromogén segítségével. A háttérfestéshez Hematoxylin Gill II (Merck KgaA, Darmstadt, Németország) jelölést alkalmaztunk. Pozitív kontrollként kutya tonsilla-szövet került vizsgálatra, a negatív kontrollhoz a primer ellenanyag felhasználása nélkül alkalmaztuk a jelölési protokollt. A diagnózis megállapítása, amelyhez a hematoxilin-eozin festett, valamint a CD3 és CD79a/CD20 jelölt metszeteket együttesen értékeltük, a WHO kutyákra adaptált klasszifikációja szerint történt (Valli és mtsai. 2013). Az egyes CD markerek százalékos meghatározásához mindkét festés esetében a legnagyobb mértékben expresszáló területeket választottuk ki és 5 nagy nagyítású látótérben, látóterenként 200 sejtet számoltunk meg (Canioni és mtsai. 2009; NANETS és ENETS 2011).

#### **5.1.4 Immunfenotípus meghatározás áramlási citométerrel**

A betegtől nyert tumormintából sejtszuszpenziót hoztunk létre. A kutya tumorok esetében tűaspirációval (FNA) vagy műtétilag nyert mintákat disszociációs médiumot tartalmazó RPMI oldatba tettük. A disszociációs médiumban 200 U/ml II-es típusú kollagenáz és 0,6 U/ml diszpáz (Life Technologies) enzimeket oldottunk fel. 30 perces 37°C hőmérsékleten történő inkubációt követően 40 µm-es szűrővel elválasztottuk a pórusméretnél kisebb sejteket a nagyobb méretű sejtektől, melyből így kialakult a sejtszuszpenzió. Ezt követően Sysmex XT-2000iV™ (Sysmex) segítségével meghatároztuk a sejtszámot. Az immunfenotipizálás elvégzéséhez 10<sup>6</sup> sejtet használtunk, melyekhez direkt jelölt monoklonális ellenanyagokat adtunk a gyártó által leírt protokoll alapján 1:10 hígításban. 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 sejtpopulációkat. 30 percig 37°C-os vízfürdőben jelöltük a mintákat, melyekhez 1ml hideg PBS-t adva leállítottuk a jelölést és 300 G centrifugálást követően 270 µl PBS-ben mértük le a sejteket FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA) áramlási citométer segítségével. A domináns sejtpopulációt kapuzási technikával méret (FSC>400) és granuláltság (200<SSC<500) szerint választottuk

ki (R1 kapu) (Comazzi és mtsai. 2018; Marconato és mtsai. 2013). A mérés megkezdése előtt 0,8 µl 7-Amino-aktinomicin D-t (7-AAD, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) festéket adtunk minden mintához, melynek segítségével csak az élő sejteket elemeztük (R2 kapu). A mérés befejeztével az R1 és R2 kapu 10 000 darab sejtet tartalmazott. A mérés abban az esetben tekinthető megbízhatónak, ha a sejtpopuláció legalább 10-30%-a pozitív valamelyik markerre az izotípus kontrollhoz képest (Canioni és mtsai. 2009; Selliah és mtsai. 2019), esetünkben 15%-os minimum értéket határoztunk meg. A CD3 és CD21 markerek százalékos kiértékeléséhez a BD CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, USA) statisztikai programját használtuk.

### **5.1.5 Limfóma minták citológiai vizsgálata**

A tűaspirációs mintavételt követően a sejteket a tárgylemezre applikáltuk, majd a két tárgylemezt összeillesztettük és a lemezek összenyomása nélkül gyors és finom mozdulattal széthúztuk azokat. A citológiai vizsgálathoz alkoholos fixálást alkalmaztunk, majd mindkét tárgylemezt gyors festést lehetővé tévő Panoptic készlettel megfestettük (Reagens Kft., Budapest).

### **5.1.6 A Pgp funkcionális vizsgálatban szereplő állatok**

Vizsgálatunkban 12 olyan kutya vett részt, akiknél a diagnóziskor mért Pgp aktivitást összehasonlítottuk a kezelés során kiújuló tumorból mért értékkel. A kutyák között 4 nőstény és 8 hím szerepelt, az átlagéletkoruk 6,8 ( $\pm 2,3$ ) év volt, a fajtákat tekintve keverék ( $n = 3$ ), magyar vizsla ( $n = 2$ ), labrador retriever ( $n = 2$ ), bichon havannese, berni pászorkutya, yorkshire terrier, amerikai staffordshire terrier, golden retriever szerepeltek. A vizsgálatban 10 diffúz nagy B-sejtes limfómával diagnosztizált beteget kezeltek az ÁHOK állatorvosai a CHOP protokoll szerint, 2 beteget, akiknek nagy B-sejtes ún. Burkitt-like vagy prekursor T-sejtes limfómát diagnosztizáltak, őket pedig a Madison-Wisconsin protokoll alapján kezelték.

2 további esetről négy alkalommal is megvalósult a Pgp aktivitás mérése a diagnózistól a terápia végéig.

1. eset: német juhászkutya, hím, 3,5 éves, nagy sejtes immunoblasztos limfómával diagnosztizálva, V. stádium („b” alstádium).

2. eset: cocker spániel, nőstény, 6,5 éves, diagnózis DLBCL, IV. stádium („a” alstádium).

A kutyák stádium és alstádium meghatározása a WHO által létrehozott rendszer szerint történt (Valli és mtsai. 2013).

### 5.1.7 A Pgp funkcionális mérése áramlási citométerrel

Az 5.1.4 pontban leírtak szerint a tumormintából sejtszuspenziót készítettünk, majd a P-glikoprotein funkciójának megállapításához calcein mérést használtunk (Homolya és mtsai. 1996). A módszer lényege, hogy a nem fluoreszcens Calcein AM festék a sejtekbe jutva intracelluláris észteráz enzimek hasítására erősen fluoreszkáló festékké alakul, melynek jelintenzitása mérhető áramlási citométer segítségével. Azonban a P-glikoprotein jelenléte megakadályozza a Calcein AM akkumulációját a sejtekben, ezáltal a Pgp pozitív sejtekben a festék jelintenzitása alacsony lesz. A Pgp gátlószer verapamil hozzáadásával az intenzitás jelentősen emelkedik, így a módszerrel a Pgp funkciója jól követhető a különböző sejtekben. Ehhez a vizsgálathoz 250 000 darab sejtet 10 mmol/l P-glikoprotein inhibitor, verapamil hozzáadásával vagy anélkül jelöltük meg 0,25 mmol/l Calcein AM (Dojindo Molecular Technologies) festékkel 37°C hőmérsékleten. A 10 perces inkubálást követően a sejteket jéghideg PBS oldattal mostuk és a calcein akkumulációt FACScan (Becton Dickinson Biosciences) áramlási citométer készüléken mértük. A halott sejteket a 7-AA-D (Life Technologies) DNS festék pozitivitás alapján zártuk ki. A Multidrog rezisztencia Aktivitási Faktort (MAF) a verapamil jelenlétével (mean fluorescence inhibited [MFI]) és anélkül (noninhibited [MFNI]) mért hisztogram átlagértékéből számítottuk ki a következő képlettel:  $MAF = (MFI - MFNI) / MFI$  (Holló és mtsai. 1994; Karászi és mtsai. 2001).

### 5.1.8 A kutya limfóma kemoterápiás kezelési protokollja, többszöri mintavétel időpontjai

A limfómával diagnosztizált kutyák leggyakoribb kezelési protokollja a CHOP (ciklofoszfamid [C], doxorubicin [H], vinkrisztin [V] és prednizolon [P]). A kezelőszereket a következő sorrendben alkalmazzák: doxorubicin (Adriamycin injekció, Pharmacia & Upjohn S.p.A. Co.) 30 mg/m<sup>2</sup>: 2., 11. és 20. héten; vinkrisztin (Vinkrisztin oldatos injekció, Gedeon Richter Co.) 0,75 mg/m<sup>2</sup>: 1., 3–10. és 12–19. héten; ciklofoszfamid (Endoxan injection, Baxter Co.) 250 mg/m<sup>2</sup>: 5., 8., 14. és 17. héten; prednizolon (Prednizolon tableta, Gedeon Richter Co.): 2 mg/testtömeg kg 1.héten szájon át napi egyszer, 1,5 mg/testtömeg kg 2. héten napi egyszer, 1 mg/testtömeg kg napi egyszer és 0,5 mg/testtömeg kg a 4. héten szintén napi egyszer. A kezelést megelőzően tüáspirációval vagy műtétileg nyert mintából meghatároztuk a MAF értéket (MAF 1), majd a kezelés során újra mértük általában a tumor megnagyobbodása, recidíva idején (MAF 2).

### 5.1.9 Statisztikai vizsgálat

Az immunfenotípus meghatározására használt két módszer (IHK, FC) közötti kapcsolatot Pearson-féle korrelációs analízissel hasonlítottuk össze (Microsoft Excel 2019, Microsoft, Washington, USA). A szignifikancia szintet p<0,05 értékben határoztuk meg.

## **5.2 *In vitro* vizsgálatok a rezisztencia tanulmányozására**

### **5.2.1 Vegyületek**

A doxorubicint (DOX), celecoxibot (CEL) és firocoxibot (FIR) a Sigma-Aldrich-től, a meloxicamot (MEL) a Ceva-tól, a mavacoxibot (MAV) pedig a Zoetis-től szereztük be. A SAHA-t és a trichostatin-A-t (TSA) a Tocris Bioscience-től vásároltuk.

### **5.2.2 Limfóma sejtvonal panel**

A P388 egér B-limfoblasztos leukémia sejtvonalat és az abból létrehozott doxorubicin rezisztens P388/ADR sejteket a National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program (NCI DTP) sejtvonal gyűjteményéből kaptuk. A P388/ADR egér leukémia vonalat 800 nmol/l doxorubicin mellett tenyésztettük, hogy fenntartsuk a magas P-glikoprotein expressziót. A CLBL-1 kutya diffúz nagy B-sejtes limfóma úszó sejtvonalat, melyet egy 8 éves IV. stádiumú multicentrikus limfómával diagnosztizált hím berni pásztorkutyából alapították, Dr. Barbara Rütgen-től kaptuk (Rütgen és mtsai. 2010). A sejtvonalakat RPMI tápoldatban (Life Technologies) tenyésztettünk, amit 10% főtális borjú szérummal (FBS), 5 mmol/l glutaminnal és 50 egység/ml penicillin/sztreptomycin (Lonza) kombinált antibiotikummal egészítettünk ki. A sejtvonalakat 37°C-os hőmérsékleten tartottuk 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó inkubátorban.

### **5.2.3 Egér allograft modell**

Az állatkísérleteket az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztályának állatházában végeztük a szükséges engedélyek (22.1/2291/3/2010) és az Európai Unió állatkísérletes előírásainak betartásával.

A P388 és P388/ADR egér leukémia sejteket használtuk fel aszcitesz tumorok képzésére BDF1 (Országos Onkológiai Intézet) egerekben, melynek során 10<sup>6</sup> darab sejtet injektáltunk intraperitoneálisan 6-8 hetes állatok hasüregébe. 48 óra elteltével fiziológiás sóoldatot, doxorubicint (3 mg/kg) vagy PLDt (pegilált liposzomális doxorubicint) (3 vagy 5 mg/kg) adtunk intraperitoneálisan. A kezelést követően az egerek testtömegét hetente 3 alkalommal mértük, valamint naponta ellenőriztük az állatok állapotát (stressz, diszkomfort, fájdalom) a Test Kondíció Pontozás (Body Condition Scoring, BCS) módszerrel, amely segít meghatározni az eutanázia időpontját és csökkenti az egereknek okozott tartós fájdalmak időtartamát (Ullman-Culleré és Foltz 1999).



#### 5.2.4 Citotoxicitási vizsgálatok

A kezelőszerek  $IC_{50}$  értékét meghatároztuk minden kísérlet előtt, továbbá a doxorubicin érzékenységet a kísérletek végén is. A sejtek viabilitását PrestoBlue® reagenssel (Life Technologies) mértük a gyártó által megadott protokoll szerint. Röviden, a sejteket 96-lyukú mikrolemezre ültettük ki úszó sejteket alkalmazva P388 esetén 5000 sejt/lyuk, CLBL-1 kísérletnél 150 000 sejt/lyuk denzitással. A sejt számokat TC-10-es automata sejt számoló készülékkel (Bio-Rad) határoztuk meg. Ezt követően a sejteket a megadott vegyületekkel kezeltük 120 órán át. Az inkubációs idő leteltével a sejtekhez 5%-os PrestoBlue® oldatot adtunk, majd a viabilitást spektrofotometriás módszerrel mértük EnSpire mikrolemez olvasóval (Perkin Elmer). A viabilitási görbék számításait GraphPad Prism 8. szoftverrel végeztük minimum három párhuzamos mérés eredményéből a szigmoidális dózis-válasz modellt alkalmazva. Az  $IC_{50}$  értékeket görbe illesztés statisztikai elemzéssel nyertük.

#### 5.2.5 *In vitro* modellrendszer limfóma sejt vonalakon

Minden hosszútávú kezelés indítását megelőzte egy citotoxicitási vizsgálat, melynek során meghatároztuk az adott kezelőszerek kísérlethez szükséges koncentrációját. A legtöbb esetben a sejtek 20%-át elpusztító koncentrációt alkalmaztunk ( $IC_{80}$ ). Doxorubicin esetében azonban  $IC_{10}$  koncentrációt alkalmaztunk, vagyis a sejtek 90%-át elpusztította az adott kezelés, míg a firocoxibot a celecoxib  $IC_{80}$  koncentrációjában használtuk. Ezek alapján a P388 sejteket ( $10^6$  darab) 13 nmol/l doxorubicinnel kezeltük 120 órán át T75 szuszpenziós flaskában. Kombinált kezelés esetén a doxorubicint kiegészítettük celecoxibbal (16  $\mu$ mol/l), firocoxibbal (16  $\mu$ mol/l), trichostatin-A-val (30 nmol/l) vagy SAHA-val (0,4  $\mu$ mol/l). Kezelést követően a sejteket kezelőszerszert mentes tápoldatban tenyésztettük, melyet 5 naponta cseréltünk addig, amíg a túlélő sejtek elérték a kezdeti denzitást  $10^6/18$  ml (repopulációs idő). A kezeléseket többször ismételtük, minden harmadik alkalommal mértük a MAF értéket calcein módszer segítségével, valamint a kemoterápiás szerre való érzékenységet citotoxicitási vizsgálattal meghatároztuk.

A CLBL-1 kutya sejteken is ezt a kísérleti elrendezést alkalmaztunk, de a kezdeti sejt szám ebben az esetben  $10^7$  darab sejt volt. A kezelés a következő szerekekkel történt: DOX (0,3 nmol/l), trichostatin-A (50 nmol/l), SAHA (0,7  $\mu$ mol/l), celecoxib (26  $\mu$ mol/l), firocoxib (26  $\mu$ mol/l), meloxicam (20  $\mu$ mol/l) és mavacoxib (40  $\mu$ mol/l).

#### 5.2.6 RNS izolálás, rtPCR

P388 sejteket homogenizáltuk TRIzol™ reagensben (Life Technologies) majd a Direct-zol® MiniPrep kittel (Zymo Research) izoláltunk RNS-t a gyártó által megadott módon. Annak érdekében, hogy elkerüljük a szennyeződést az izolálás során a szeparáló oszlopon Dnáz I

kezelést alkalmaztunk. 300 ng RNS-t írtunk át cDNS-sé a Promega Reverz Transcription System segítségével. A Real-Time PCR vizsgálatokhoz endogén kontrollként az előre gyártott egér Béta-Aktin (Akt $\beta$ ) próbát (Life Technologies) használtuk, míg az egér Abcb1a és Abcb1b gének expresszióját a megfelelő TaqMan® primerekkel kvantifikáltuk StepOne™ Real-Time PCR készüléken (Life Technologies). Az mRNS expresszió változását pedig a  $2^{\Delta\Delta Ct}$  módszerrel határoztuk meg. A relatív mRNS szint változásokat 3 független kísérlet átlagaként ábrázoltuk  $\pm$  S.E.M. (standard error of mean).

### 5.2.7. Áramlási citométer

Az 5.1.7 pontban leírt calcein módszer elvégzéséhez 750 000 darab P388 vagy CLBL-1 sejtet használtunk fel. A MAF kiszámítását követően a rezisztencia határértéket 0,2-ben állapítottuk meg.

### 5.2.8 Szinergia vizsgálat

Az úszó sejteket (2500 darab P388/lyuk és 100 000 darab CLBL-1/lyuk) 384 lyukú lemezre ültettük ki. A kezelőszerek kombinációját egy Hamilton StarLet automata folyadékkezelő pipettázó robot segítségével adtuk a sejtekhez. Az inkubálási idő 120 óra volt 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> környezetben. GI<sub>50</sub> (Growth Inhibition/növekedés gátlás) értékeket PrestoBlue® reagens segítségével (Life Technologies) határoztuk meg és EnSpire mikrolemez olvasóval (Perkin Elmer) mértük le az Anyag és módszer 5.2.4 pontban leírt módszerrel. Az 1. kezelőszers GI<sub>50</sub> értékeit párosítottuk úgy, hogy a 2. kezelőszers GI<sub>50</sub> értékét fixen tartottuk és fordítva, majd GI<sub>50</sub> izobolokként ábrázoltuk. Abban az esetben, ha az egyik kezelőszers nem volt toxikus a sejtekre, oszlopdiagram ábrázolási módot választottunk. A vizsgálat minden adatpontjának szignifikanciáját kiszámítottuk kombinációs indexként (CI) (Chou 2006). A gyógyszer-kombinációkat a következőkben határoztuk meg: szinergizmus (CI  $\leq$  0,7), mérsékelt szinergizmus (0,7 < CI  $\leq$  0,85), additív (0,85 < CI  $\leq$  1,2), mérsékelt antagonizmus (1,2 < CI  $\leq$  1,45) és az antagonizmus (CI > 1,45).

### 5.2.9 Adatelemzés

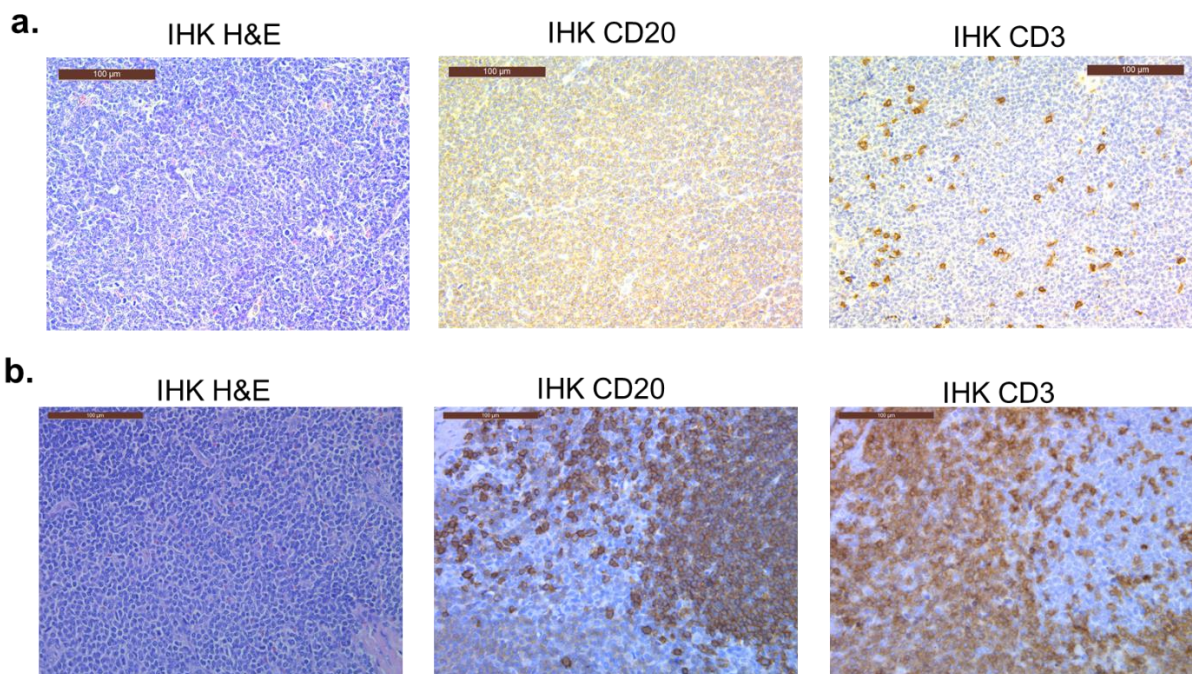
A statisztikai kiértékeléshez a GraphPad Prism 8. szoftvert használtuk, melyekkel a citotoxicitási vizsgálatok növekedési görbét és a Kaplan-Meier túlélési görbét is ábrázoltuk. Az egyes kezelési csoportok és MAF értékek közötti vizsgálatokhoz egy vagy kétutas ANOVA modellt használtunk Tukey teszttel. A szignifikancia szintet p < 0,05 határoztuk meg.

## 6. Eredmények

### 6.1 A limfóma célzott kezeléséhez szükséges prognosztikai faktorok tanulmányozása

#### 6.1.1 B- és T-sejtes limfóma immunfenotípus meghatározása

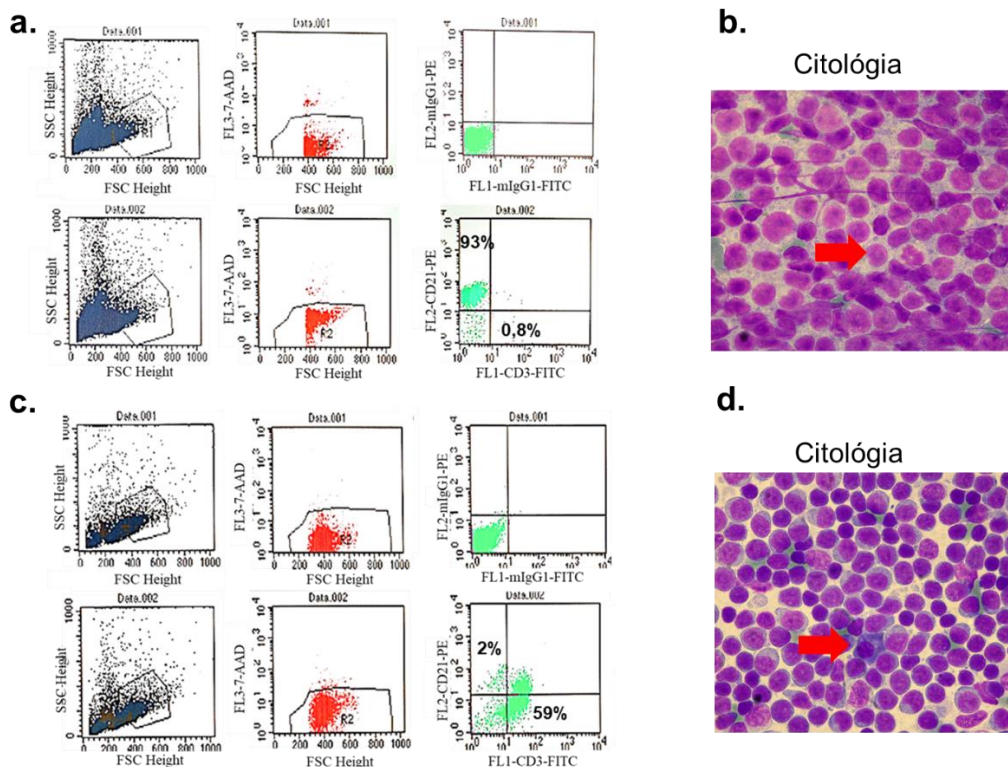
Első vizsgálatunkban az állatorvosi gyakorlatban elterjedt immunhisztokémiai (IHK) módszer elvégzésével vizsgáltuk egy tipikus B- és egy tipikus T-sejtes limfóma hematoxilin-eozin festődését, valamint a CD20 és CD3 markert expresszáló mintázatát (6. ábra). Az első esetben diffúz nagy B-sejtes limfóma látható, 90% CD20 pozitív és 1% CD3 pozitív sejtekkel (6. ábra a). A második esetben perifériás T-sejtes limfóma egyéb csoportba nem sorolható típusa látható, melyben a CD3 pozitív sejtek aránya 57% volt, míg a CD20 festődésű sejtek aránya 16% volt (6. ábra b).



**6. ábra:** A kutyáknál előforduló limfóma két leggyakoribb szubtypusának diagnosztizálása immunhisztokémiai (IHK) módszerrel. A tipikus B-sejtes (a), valamint T-sejtes (b) limfóma hematoxilin eozin festődése és a CD20, CD3 markerek expressziós mintázata látható. A B-sejtes limfóma esetében 90% CD20 és 1% CD3 pozitívitas volt tapasztalható, míg a T-sejtes esetrél 16%-ban láttunk CD20 pozitív és 57%-ban CD3 pozitív sejteket 40-szeres nagyításnál.

A tumormintákból FC és citológiai vizsgálat segítségével is meghatároztuk az immunfenotípust. A B-sejtes limfóma esetében az FC-vel 93% CD20 pozitív sejtet detektáltunk és 1% CD3 pozitív sejtet (7. ábra a). A citológiai mintában számos közepesen nagy limfoid sejt jelent meg, melyek mérete a vörösvérsejtek 1,5-1,7-szerese volt. A citoplazmák alig festődőek voltak, kifejezetten halvány bazofilokkal. A magok nagyok, kerek, magbehúzóásokat

többnyire nem tartalmaztak. A mitotikus alakok aránya 0,5/10 volt 1000-szeres látótérben (piros nyíl) (7. ábra b). Az első mintánál sikerült igazolni áramlási citométer és citológiai vizsgálat segítségével a diffúz nagy B-sejtes limfóma diagnózisát. A második esetben az FC 59% CD3 pozitív sejtet és 2% CD21 pozitív sejtet detektált, ami a T-sejtes limfómára engedett következtetni (7. ábra c). A vizsgálatot kiegészítve a citológiai mintában számos nagy, kerek sejt jelent meg kb. 50%-ban kis limfociták, immunociták, plazmasejtek (piros nyíl) a néhány kis, a vörösvérsejtek átmérőjének az 1-1,5-szeresének megfelelő magvú, rövid nyúlványt mutató citoplazmával rendelkező T-limfoid sejt mellett. A nagy sejtek a vörösvérsejtek 2-2,5-szerese, melyek alakja kissé egyenetlen volt, limfoid sejtek voltak. A magok egyenetlenek, durván szemcsézettek voltak, míg magvacskák nem voltak láthatók. A mitotikus alakok aránya pedig 2/10 volt 1000-szeres látótérben (7. ábra d). Az FC eredményét és citológiai képet összevetve sikerült igazolni a T-sejtes limfómát.



**7. ábra:** A kutyáknál előforduló limfóma két leggyakoribb szubtypusának diagnosztizálása áramlási citométerrel (FC) és citológiai analízissel. A tipikus B-sejtes limfóma esetében FC méréssel 93% CD21 pozitív és csupán 0,8% CD3 pozitív sejtet detektáltunk az izotípus kontrollhoz viszonyítva (a), míg a citológiai elemzéssel számos közepesen nagy limfoid sejt volt látható, melyek mérete a vörösvérsejtek 1,5-1,7-szerese volt. A mitotikus alakok aránya 0,5/10 volt 1000-szeres látótérben (piros nyíl) (b). A T-sejtes limfóma esetében a CD21-CD3 aránya 2% és 59% volt FC vizsgálatl (c), míg a citológiai képen számos nagy, kerek sejt jelent meg kb. 50%-ban kis limfociták, immunociták, plazmasejtek (piros nyíl) a vörösvérsejtek átmérőjének az 1-1,5-szeresének megfelelő magvú, rövid nyúlványt mutató citoplazmával rendelkező T-limfoid sejt mellett. A mitotikus alakok aránya itt 2/10 volt 1000-szeres látótérben (d).

A két módszer eredményeit összehasonlítottuk 35 limfómás kutya mintájánál, a vizsgálatban 26 B- és 9 T-sejtes limfóma szerepelt (2. táblázat).

**2. táblázat:** Az immunhisztokémiai módszerrel (IHK) és áramlási citométerrel (FC) meghatározott immunfenotípus eredményei. 35 limfómás kutya mintájánál a vizsgálatban 26 B- és 9 T-sejtes limfóma szerepelt. DLBCL: diffúz nagy B-sejtes limfóma; PTCL-NOS: perifériás T-sejtes limfóma egyéb csoportba nem sorolható típusa.

Sorszám	szövettan	CD3 IHK	CD79a /CD20 IHK	CD3 FC	CD21 FC
1	DLBCL	22	52	1	17
2	DLBCL	10	96	1	4
3	DLBCL	2	92	13	2
4	DLBCL	3	86	1	87
5	DLBCL	11	96	0	61
6	DLBCL	2	94	0	98
7	DLBCL	17	56	2	21
8	DLBCL	6	90	4	41
9	DLBCL	1	80	1	60
10	DLBCL	3	85	2	80
11	DLBCL	7	82	3	61
12	DLBCL	9	79	1	17
13	DLBCL	4	73	0	80
14	DLBCL	5	65	1	69
15	DLBCL	15	58	6	24
16	DLBCL	7	52	6	40
17	DLBCL	12	82	3	82
18	DLBCL	1	55	3	12
19	DLBCL	8	85	1	35
20	DLBCL	3	90	1	93
21	DLBCL	3	41	1	24
22	DLBCL	2	87	4	52
23	Folikuláris limfóma	16	81	0	46
24	kis B-sejtes	21	93	0	30
25	nagy sejtes immunoblasztos	5	89	2	60
26	PTCL-NOS	97	2	65	1
27	PTCL-NOS	96	5	97	1
28	PTCL-NOS	89	11	28	0
29	PTCL-NOS	57	16	59	2
30	PTCL-NOS/T-zóna limfóma	85	47	11	6
31	PTCL-NOS/T-zóna limfóma	98	16	40	4
32	T sejt gazdag B sejtes limfóma	27	43	14	62
33	T zóna limfóma	42	2	61	8
34	T-limfoblasztos limfóma	89	2	91	0
35	T-sejtes cutan limfóma	96	8	69	0

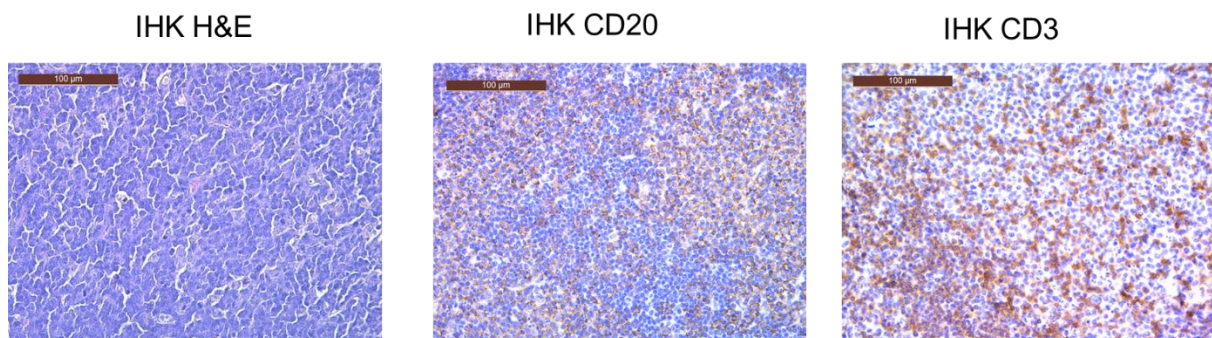
Az áramlási citométerrel és az immunhisztokémiai analízissel meghatározott B- és T-sejt markerek százalékos aránya között erős szignifikáns korrelációt tapasztaltunk mindkét marker

esetén ( $R_{CD21}=0,6560$  ( $p=0,00002$ ),  $R_{CD3}=0,8334$  ( $p<0,00001$ )). Az FC mérés során 15%-ban határoztuk meg a markerek pozitívitasának minimális értékét, ez 4 esetet kivéve megvalósult.

### 6.1.2 T-sejt gazdag B-sejtes limfóma esettanulmány

#### Patológiai jellemzők

Makroszkóposan a nyirokcsomók tömött tapintatúak voltak, az egyéb limfómás nyirokcsomók kifejezetten puha tapintatához képest. A kórszövettani diagnózis alapja volt a változatos megjelenés. A többi limfómával szemben kifejezetten inhomogén sejtpopuláció volt megfigyelhető. A B-sejtek bizonyos régiókban prominensek voltak. Markáns anizocitózis jellemezte, magjuk heterokromatikus, nagyméretű volt, a vörösvértestek átmérőjének akár három-ötszöröse is lehetett. A nagyobb sejtek akár kettő vagy több sejtmagot is tartalmaztak. A B-sejtek között közepes számban makrofágok és bizonyos területenként kifejezetten nagyszámú T-sejt foglalt helyet. Ezen felül mérsékelt szklerózis, vagyis sejtzegény kötőszöveti burjánzás és nekrotikus régiók is láthatóak voltak. A nagyméretű B sejtek CD20 festéssel jól elkülöníthetőek voltak, erős membrán pozitívítást mutattak. A kisméretű T sejtek a CD3 markert szintén egyértelműen expresszálták a citoplazmában, a B sejtek között diffúzan, nagy számban voltak jelen (8. ábra). Az IHK vizsgálat eredménye T-sejt gazdag B-sejtes limfóma volt.

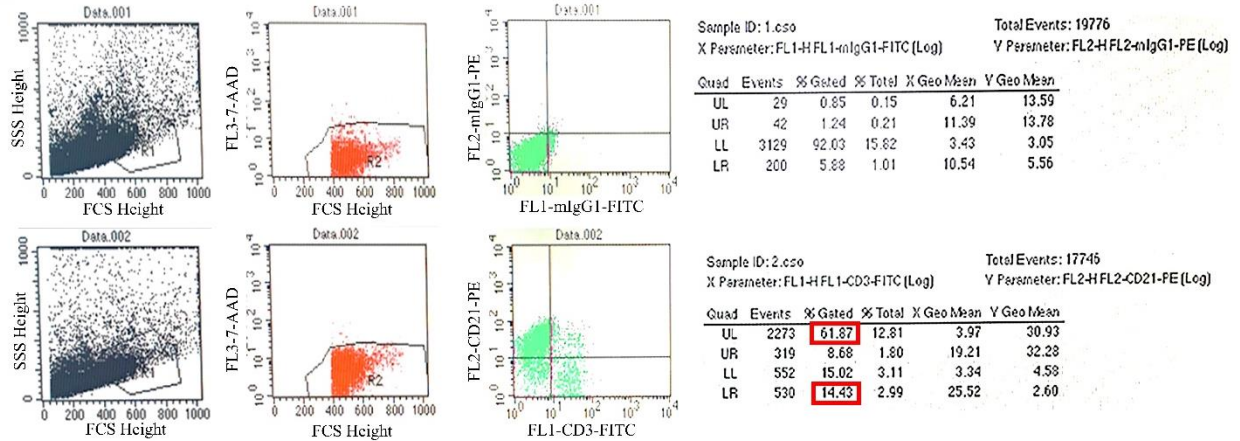


**8. ábra:** T-sejt gazdag B-sejtes limfóma esettanulmányának immunhisztokémiai vizsgálati eredménye látható hematoxin-eozin festéssel (H&E), valamint a 43% CD20 pozitív és 27% CD3 pozitív sejtek expressziójának mintázata.

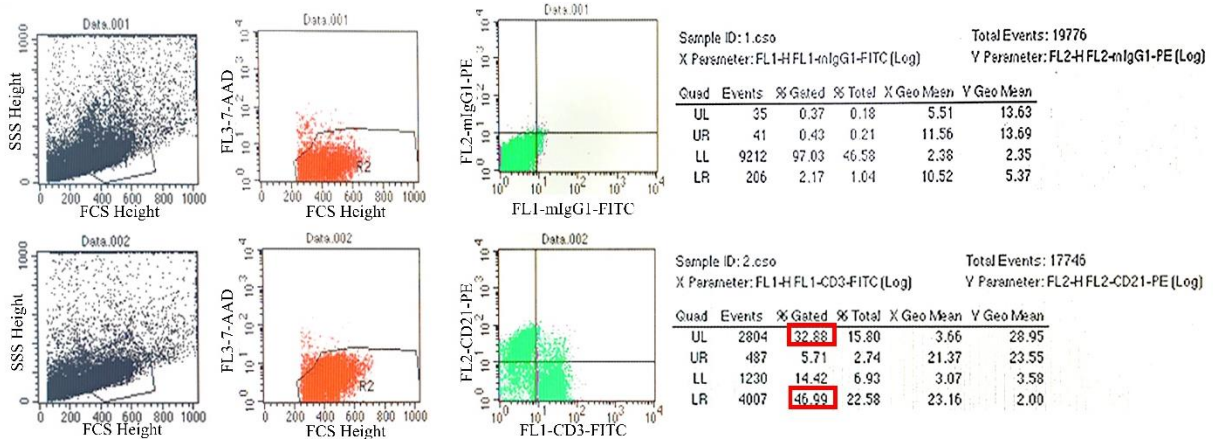
#### Áramlási citometria analízis

Az előző vizsgálatban bemutatott eset immunfenotípusát áramlási citométer segítségével is meghatároztuk, melyben az 5.1.4 pontban leírt módszert alkalmaztuk. Az R1 kapu FSC>400 szerint, melyet más tanulmány alapján határoztunk meg (Marconato és mtsai. 2013), az adott betegnél B-sejtes limfóma gyanúja állt fenn, mivel a CD21 pozitív sejtek aránya 62% volt, szemben a CD3 markerrel, amire a sejtek csupán 14%-a volt pozitív (9. ábra). Azonban a dot

ploton látszott, hogy a limfociták már FSC>300 esetében elkülönültek a többi sejttől, így ezeknek a sejteknek is megvizsgáltuk az expresszióját. Abban az esetben, ha ezeket a kisebb méretű sejteket is beleszámítottuk az R1 kapuba, akkor a CD3 és 21 markerek százalékos megoszlása 47:33-ra változott (10. ábra). Tehát a kis limfociták jelentős része a T-sejt markerre mutatott pozitivitást, így feltételezhető volt egy jelentős kis limfocitás T-sejtes infiltráció.



**9. ábra:** R1 kapuzás, FSC>400 esetén a CD21 pozitív sejtek aránya 61,87%, míg a CD3 pozitív sejtek aránya 14,43%.

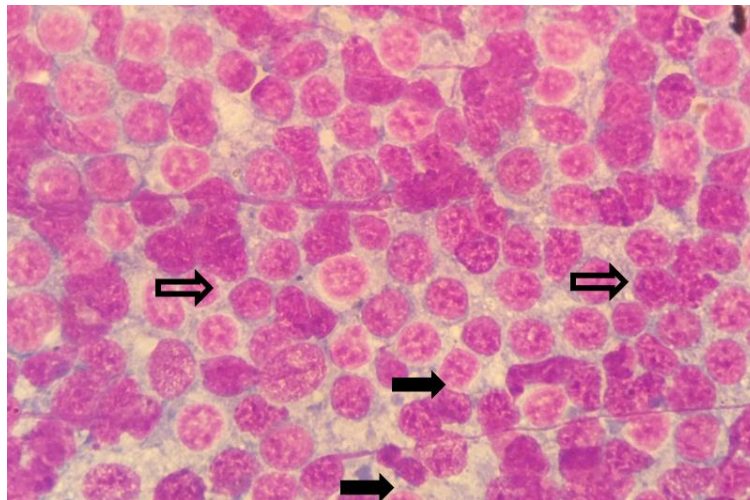


**10. ábra:** Előző mérés R1 kapuzását módosítva, FSC>300 esetén a CD21 pozitív sejtek aránya csupán 32,88%, míg a CD3 pozitív sejtek aránya 46,99%.

## Citológiai vizsgálat

Az áll alatti tájékon inkább T-sejtes (prekurzor T-sejtes) limfóma, de a hasi nyirokcsomóban inkább diffúz nagy B-sejtes limfóma volt gyanítható. Összességében B-sejtes limfóma alapos gyanúja állt fenn, amely centroblasztos típusú és nagy mitotikus arányú. A kenetben látható volt számos nagy, kerek sejt, kb. 70%-ban középnagy (a vörösvérsejtek átmérőjének az 2-2,5-szeresének megfelelő magvú) és kb. 30%-ban nagy T-limfociták/limfoblasztok (a vörösvérsejtek átmérőjének a 2-3-szorosának megfelelő magvú). A nagy sejtek alakja kissé

egyenetlen volt, míg a citoplazmák halványan granuláltak, alig festődtek, közepesen szélesek voltak. A magok többnyire egyenetlenek és durván szemecskézettek voltak. Magvacskák nem voltak láthatók. A mitotikus alakok aránya pedig 1,5/10 volt. Ugyanakkor egy-két kis limfocita is megjelent, valamint a középnagy sejtek között magbehúzódot mutató, kerek sejtet is láttunk, melyek citoplazmája közepesen széles, bazofil és halvány Golgi-zóna is látható volt a megbehúzódot mellett, melyek a B-limfocitákra/limfoblasztokra utaltak. Elnyúlt maganyag is látható volt fonal formájában néhány helyen (alul és felül), amely a kenetkészítés során alakult ki (11. ábra).



**11. ábra:** A T-sejt gazdag B-sejtes limfóma citológiai vizsgálatának eredménye. A kenetben számos nagy, kerek, sejt látható kb. 70%-ban középnagy és kb. 30%-ban nagy limfociták. A nagy sejtek alakja kissé egyenetlen. A citoplazmák halványan granuláltak, alig festődnek, közepesen szélesek. A magok egyenetlenek, durván szemecskézettek, míg magvacskák nem láthatók. A mitotikus alakok aránya 1,5/10 (fekete nyíl T-limfocita/limfoblaszt). Egy-két kis limfocita is megjelenik, valamint a középnagy sejtek között magbehúzódot mutató, kerek sejt is látható. Ezek citoplazmája közepesen széles, bazofil és halvány Golgi-zóna is látható a megbehúzódot mellett (fekete keretes nyíl B-limfocita/limfoblaszt) 1000-szeres látótérben.

Az FC analízis és a citológiai vizsgálat is igazolta, hogy a B-sejtes limfómában jelentős mennyiségű T-sejt volt megfigyelhető, amely megegyezett az IHK módszer eredményével.

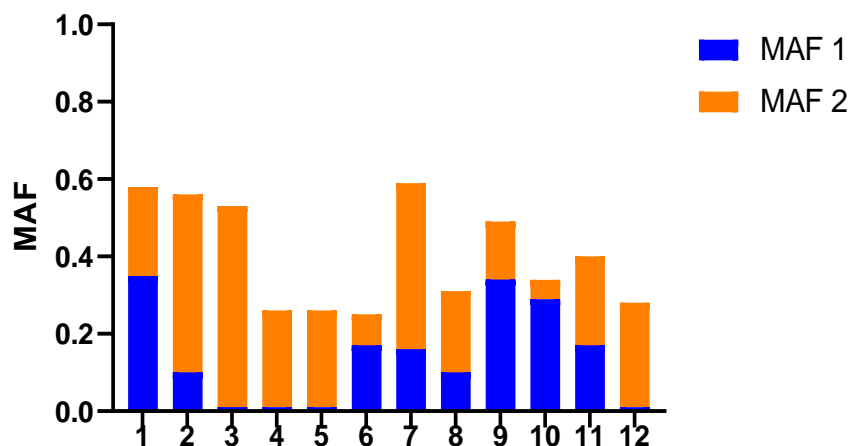
### **6.1.3 Multidrog rezisztencia Aktivitási Faktor (MAF) növekedésének detektálása kutya limfóma kemoterápiás kezelés hatására**

A következő vizsgálatban a limfóma újabb prognosztikai faktorát vizsgálva, 12 kutyánál tapasztaltuk, hogy a Pgp aktivitás jelentősen fokozódott a kemoterápiás kezelés hatására (12. ábra). 3 esetben a MAF már a diagnóziskor is emelkedett értéket mutatott (átlag  $0,33 \pm 0,03$ ), de a kemoterápiás kezelés hatására ezek az értékek még tovább növekedtek (átlag  $0,47 \pm$



0,1). A másik 9 kutyánál a diagnóziskor megállapított átlag 0,08 ( $\pm$  0,07) MAF érték a terápia hatására elérte az átlag 0,38 ( $\pm$  0,13) értéket. Összességében a kezdeti MAF értékek szignifikánsan ( $p=0,00006$ ) alacsonyabbak voltak, mint a terápia során mért értékek. A betegek átlagos túlélési ideje 396 ( $\pm$ 179) nap volt, amely összhangban volt más tanulmányokban leírt adatokkal (Withrow és mtsai. 2012; Zandvliet 2014). Azonban a recidíva megjelenésétől, vagyis a MAF 2 időpontjától számított periódus csupán átlag 120 ( $\pm$ 104) nap volt.

### MAF utókövetés

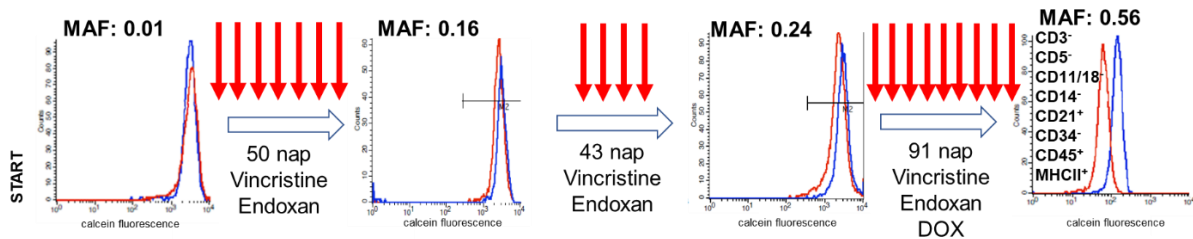


**12. ábra:** A multidrog rezisztencia aktivitási faktor (MAF) változásának bemutatása. 12 limfómával diagnosztizált kutya kemoterápiás kezelés előtti (MAF 1 - kék) és a tumor kiújulásakor (MAF 2 - narancssárga) mért Pgp mediált rezisztencia értékei láthatóak. A kezelés hatására minden esetben jelentősen fokozódott a Pgp aktivitás.

#### 6.1.4 Multidrog rezisztencia Aktivitási Faktor (MAF) változásának utókövetése a terápia végéig 2 kutya eset bemutatásán keresztül

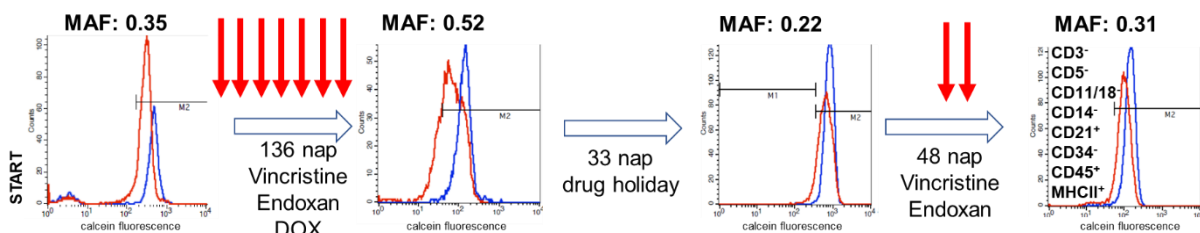
Azt követően, hogy 12 betegnél két mintavételi időpontban összehasonlítottuk a Pgp aktivitás mértékét és megállapítottuk annak növekedését a kemoterápia hatására, két további betegnél négy mintavételi időpont alapján még több információt szereztünk a terápia rezisztencia kialakulásáról. A vizsgálatból kiderült, hogy a diagnóziskor megállapított immunfenotípus változatlan maradt a CHOP kezelés ideje alatt (CD3-, CD5-, CD11/18-, CD14-, CD21+, CD34-, CD45+, MHCII+) (13, 14. ábra). Ezzel ellentétben a MAF változása folyamatos volt a kezelés hatására. Az első betegnél diagnóziskor a Pgp aktivitás hiányát tapasztaltuk (MAF=0,01) a tumorsejtekben. A CHOP protokoll megkezdésével azonban emelkedett a MAF érték, amely 93 nap után már fokozott Pgp aktivitásra utalt (MAF=0,24) és további 91 napos kezelést követően az ismételt Pgp karakterizálásnál elérte a 0,56 értéket (13. ábra). Az utolsó

mintavétel időpontjában a jobb poplitalis nyirokcsomó mérete 400 cm<sup>3</sup> volt, a bal poplitalis és az állkapocs alatti 50 cm<sup>3</sup> volt.



**13. ábra:** MDR kialakulásának kinetikája. A P-glikoprotein funkció változásának követése látható egy B-sejtes limfómával diagnosztizált kutya kemoterápiás kezelése (piros nyíl) során. Az áramlási citométer hisztogramok jelzik a calcein fluoreszcenciájának mértékét a Pgp gátlószer verapamil jelenlétében (kék) és hiányában (piros). A két hisztogram különbségéből származtatott MAF érték, amely a Pgp aktivitásra utal, folyamatosan fokozódott a kezelések hatására. Az immunfenotípus nem változott a kezelőszerek alkalmazásával (az utolsó mérés adatait jelöltük).

A második esetben a Pgp aktivitás már a diagnóziskor kimutatható volt (MAF=0,35), melynek oka a prednizolon előkezelés lehetett (Zandvliet 2014), majd 7 kezeléssel később már 0,52-re emelkedett. A 136. naptól a tulajdonos anyagi problémái miatt a terápiát 33 napra ideiglenesen fel kellett függeszteni, ezt az időszakot „drug holiday-nek” vagy gyógyszereszünetnek neveztük. A nem tervezett gyógyszereszünet szignifikáns csökkenést eredményezett a Pgp aktivitásban, a MAF lecsökkent 0,22-re. Azonban két további kezelés hatására, a terápia végére a tumorsejtek visszanyerték fokozott Pgp aktivitásukat (MAF=0,31) (14. ábra) és a nyirokcsomók mérete is növekedett a kezelés ellenére, a jobb áll alattiak nagyok, a jobb poplitalis nyirokcsomó 250 cm<sup>3</sup> tömött volt, míg a bal poplitalis enyhén megnagyobbodott 50 cm<sup>3</sup> volt. Az immunfenotípus ebben az esetben sem változott a terápia ideje alatt.

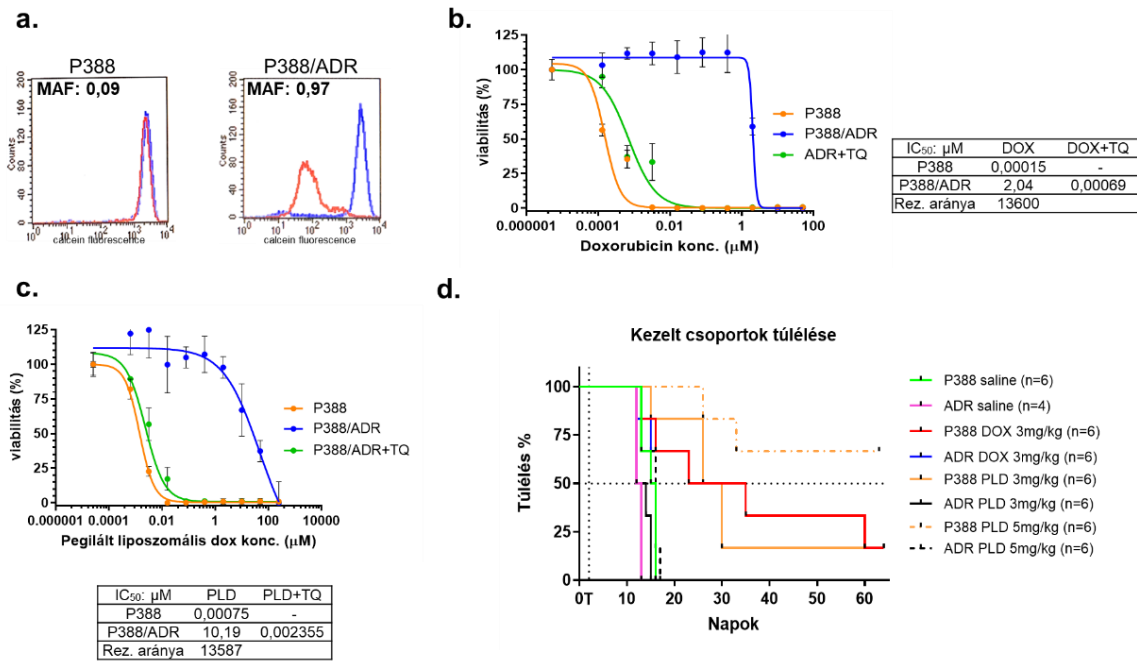


**14. ábra:** Gyógyszereszünet reverzibilis hatása a P-glikoprotein aktivitásra. A Pgp funkció változásának végig követése látható egy diffúz nagy B-sejtes limfómával diagnosztizált kutya kemoterápiás kezelése (piros nyíl) során a calcein módszer segítségével. A sejtek calcein felvételét verapamil nélkül (piros) és jelenlétében (kék) vizsgáltuk, melyből látható, hogy a kezelés hatására fokozódó Pgp aktivitás egy 33 napos nem tervezett gyógyszereszünet következtében lecsökkent. A vizsgálatok során az immunfenotípus nem változott (az utolsó mérés adatait jelöltük).

## 6.2 Egér és kutya limfóma sejtek *in vitro* gyógyszeresztelésre való alkalmasságának vizsgálata

### 6.2.1 Pgp szerepének *in vitro* és *in vivo* vizsgálata P388 egér limfoblasztos leukémia sejtekkel

A Pgp szerepének *in vitro* vizsgálatsorozata következett, ahol elsőként a P388 gyógyszerérzékeny és doxorubicin által kialakított rezisztens egér sejtvonalakon mértük a Pgp aktivitását. A kezeletlen sejtvonala esetén 0,09 volt a MAF, vagyis a tumorsejtekben nem volt megfigyelhető Pgp aktivitás, szemben a rezisztens P388/ADR sejtekkel, ahol a MAF érték 0,97 volt (15. ábra a). Az áramlási citométer segítségével bizonyítottuk, hogy ez a sejtvonala pár alkalmas a Pgp hatásának vizsgálatára a kezelése során. Citotoxicitási módszerben is kimutatható volt a különbség, mely a P388 és a P388/ADR doxorubicin érzékenysége között 13 600-szoros volt (15. ábra b). A P388/ADR sejteken a doxorubicin kezelés mellé Pgp gátlószert, tariquidart adtunk, így a DOX érzékenység közelített a P388 érzékeny sejteken mért értékhez és a különbség 4,6-szeresre csökkent. Ezzel a módszerrel igazoltuk, hogy a P388/ADR sejtek Pgp mediált rezisztens tumorsejtek, melyekben a Pgp, gátlószert hiányában, felismeri és kipumpálja a DOX-t. Emellett megvizsgáltuk a doxorubicin egy speciális változatát, a pegilált liposzomális doxorubicint (PLD) is, melyet azért fejlesztettek ki, hogy leküzdjék a DOX okozta olyan mellékhatásokat, mint a kardiotoxicitás és a mieloszuppresszió (Barenholz 2012). A PLD hatékonyságát számos xeno-, és allograft modellen igazolták leukémia és limfóma esetében is (Cabanés és mtsai. 1998; Working és Dayan 1996). A PLD-t szintén teszteltük gyógyszerérzékeny és rezisztens egér sejtvonalakon *in vitro*, majd *in vivo* is, hogy meghatározzuk a Pgp pozitív és negatív tumorsejtek hogyan befolyásolják a hatását. Hasonlóan a doxorubicinhez, a PLD esetében is megfigyeltük a rezisztencia okozta különbséget a P388 és P388/ADR sejtek között, amely 13 587-szeres volt. Azonban a PLD mellett a tariquidar alkalmazásával ez a különbség lecsökkent 3,14-szeresre (15. ábra c).

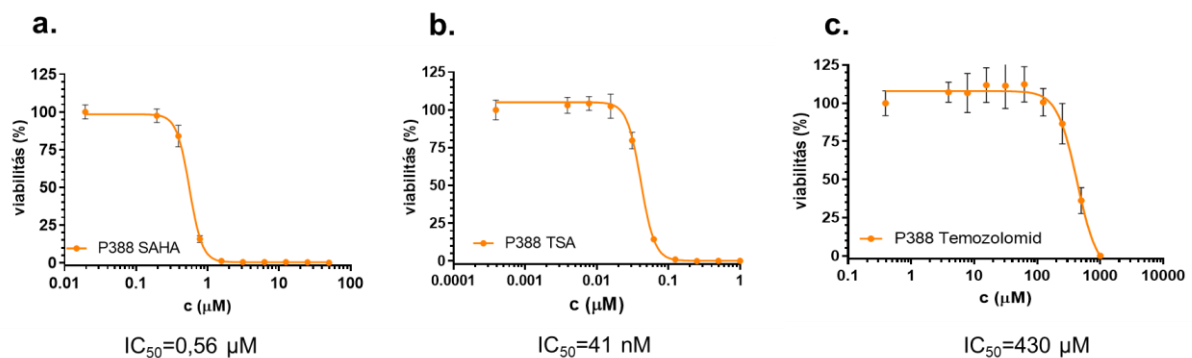


**15. ábra:** A P-glikoprotein szerepének bemutatása egér sejtekkel *in vitro* és *in vivo* rendszerben. A gyógyszerérzékeny P388 és rezisztens P388/ADR egér sejtek közötti különbség meghatározása áramlási citométerrel (a). A rezisztens sejteknél fokozott Pgp aktivitás következtében a calcein fluoreszcens festék jelentős intenzitás csökkenése látható verapamil hiányában (piros), szemben a gátlószert mérve (kék). A citotoxicitási vizsgálatokban meghatározott doxorubicin (b) és pegilált liposzomális doxorubicin (PLD) (c) koncentráció tekintetében is lényeges különbség fedezhető fel, az arra érzékeny (narancssárga vonal) és rezisztens (kék vonal) sejtek túlélésében. A Pgp specifikus gátlószert (tariquidar [TQ]) (2 μmol/ml) alkalmazva a rezisztens sejtek érzékennyé válnak a kezelőszerekre (zöld). A táblázatban feltüntettük a citotoxicitási görbékből számolt IC<sub>50</sub> értékeket (a sejtek 50%-át elpusztító koncentráció), továbbá a rezisztens és szenzitív sejteken mért IC<sub>50</sub> értékek hányadosát (Rez. aránya). A terápia érzékeny vagy rezisztens sejtek okozta különbség megfigyelhető az allograft modellben mért egerek túlélési idejében is (d). A P388 és drog rezisztens P388/ADR sejteket hordozó állatok kezelési csoportjai: fiziológiás sóoldat (saline, zöld és rózsaszín), 3mg/kg doxorubicin (piros és kék) vagy PLD (narancs és fekete), illetve 5 mg/kg PLD (szagattott narancs és fekete). A kezelés időpontját a fekete pontozott vonal jelzi. (Füredi és mtsai., Journal of Controlled Release, 2017)

A PLD vizsgálatát egér allograft modellben is elvégeztük. A limfóma és a rezisztencia *in vivo* tanulmányozására BDF1 egértörzset választottunk, melyeknél intraperitoneális ascitesz tumorokat alakítottunk ki P388 vagy P388/ADR sejtekkel (Füredi és mtsai. 2015; Talmadge és mtsai. 2007). Az egér allograft modellben a PLD magasabb dózisban is adható volt, mert ez a kezelőszert kevesebb mellékhatást okoz, szemben a doxorubicinnal, így 3 és 5 mg/kg dózist is alkalmaztunk. A gyógyszer-érzékeny P388 sejtek jól reagáltak a DOX és PLD kezelésekre

egyaránt, a túlélési idő (DOX: 29 nap; PLD 3 mg/kg: 28 nap; PLD 5 mg/kg: > 63 nap) jelentősen növekedett a fiziológias sóoldattal kezelt csoporthoz képest (15,5 nap). Ugyanezeket a kezeléseket alkalmazva a rezisztens sejtekkel kialakított tumormodellben nem sikerült a túlélési időt meghosszabbítani (DOX: 12,5 nap; PLD 3 mg/kg: 13 nap; PLD 5 mg/kg: 16 nap). Tehát az *in vitro* adatokkal összhangban a Pgp mediált rezisztens daganatsejtek esetében a DOX és a PLD magasabb dózis ellenére sem bizonyult hatásosnak (15. ábra d).

Ezt követően a P388 sejteken további állatgyógyászatban is alkalmazott gyógyszerek vizsgálatát végeztük el, amelyek a limfóma potenciális kezelőszerei lehetnek. Ezeknek a kezelőszereknek először *in vitro* meghatároztuk az IC<sub>50</sub> koncentrációját P388 egér sejteken, melyek közül a temozolomid nem bizonyult toxikusnak, illetve csak nagyon magas koncentrációknál mutatott toxicitást (IC<sub>50</sub> = 430 μM), a SAHA és a TSA esetében az a koncentráció, amelyet alkalmazva a sejtek 50%-a elpusztul 0,56 μM és 41 nM volt (16. ábra a, b, c).

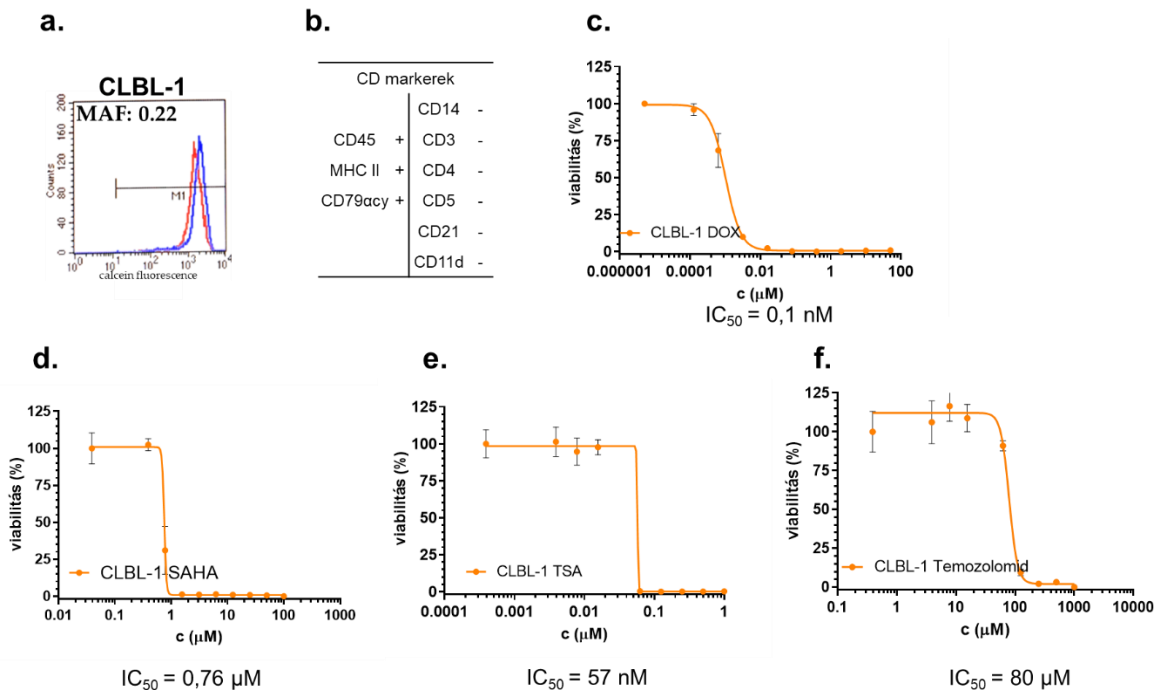


**16. ábra:** Az epigenetikai gátlószerek citotoxicitási vizsgálatának eredményei P388 egér sejtvonalon. A SAHA (a), Trichostatin-A (TSA) (b) és Temozolomid (c) citotoxicitási görbéből számolt IC<sub>50</sub> értékei (a sejtek 50%-át elpusztító koncentráció) láthatók.

### 6.2.2 Pgp szerepének *in vitro* vizsgálata CLBL-1 kutya limfóma sejtekkel

Az egér leukémia sejteken *in vitro* és *in vivo* is meghatároztuk az állatgyógyászatban használt kemoterápiás szerek alkalmazható dózist, de a kutya limfóma tanulmányozására egy relevánsabb sejtvonallal bővítettük a panelt és a CLBL-1 diffúz nagy B-sejtes kutya limfóma sejtvonalon is elvégeztük a vegyületek tesztelését. A CLBL-1 naiv sejtek rendelkeztek enyhe Pgp aktivitással, ezt három mérés átlagából állapítottuk meg (MAF = 0,18 [± 0,04]), azonban egy reprezentatív mérést ábrázoltunk (MAF = 0,22) (17. ábra a). Az általunk meghatározott immunfenotípus a következő volt: CD45+, CD79a+, MHCII+, CD14-, CD3-, CD4-, CD5-, CD21-, CD11- (17. ábra b). Az áramlási citometriai vizsgálatokat követően elvégeztük a CLBL-1 sejtek érzékenységének vizsgálatát a különböző kemoterápiás szerekre és epigenetikai

gátlószerekre. A DOX  $IC_{50}$  értéke 0,1 nM volt (17. ábra c), a DNS metil-alkiláló és hiszton-deacetiláz inhibitorok esetében az a koncentráció, ahol a sejtek 50%-a elpusztult 0,76  $\mu$ M SAHA esetében és 57 nM TSA esetében, míg a temozolomid  $IC_{50}$  értékét 80  $\mu$ M-ban állapítottuk meg (17. ábra d, e, f).



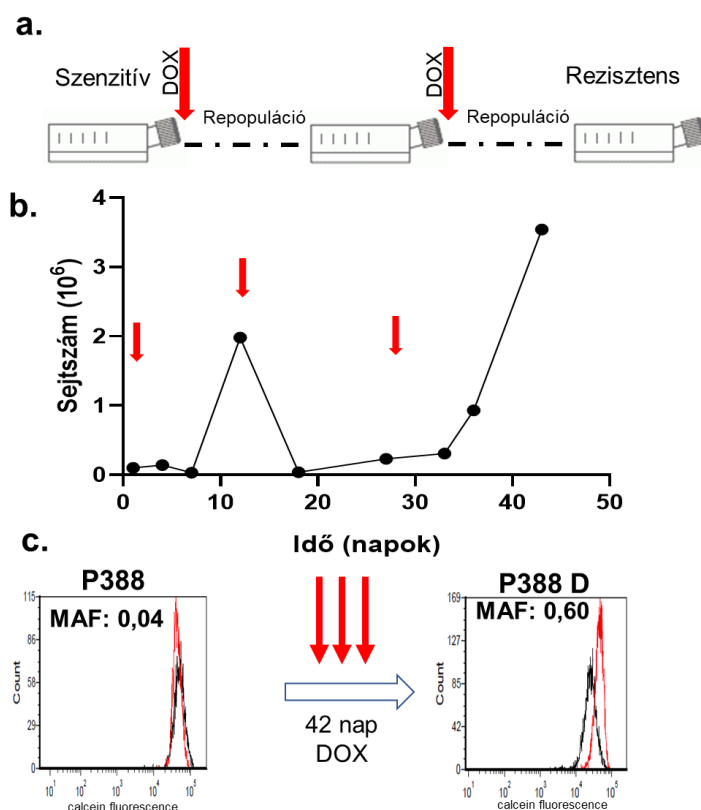
**17. ábra:** A Pgp aktivitás és a különböző kezelőszerek érzékenységének vizsgálata kutya limfóma sejtvonalon. A calcein módszerrel meghatározott enyhe Pgp aktivitás tapasztalható (a) verapamil hiányában (piros) és jelenlétében (kék). Áramlási citométerrel végzett immunfenotípus meghatározásból igazolható a B-sejtes limfóma különböző CD markerek használatával (b). Citotoxicitási görbéből számolt  $IC_{50}$  értékek (a sejtek 50%-át elpusztító koncentráció) eredményei doxorubicin (c), SAHA (d), Trichostatin-A (TSA) (e) és Temozolomid (f) esetében.

## 6.3 *In vitro* modellrendszer kidolgozása a rezisztencia tanulmányozására limfóma sejtekkel

### 6.3.1 Hosszútávú doxorubicin kezelés által előidézett rezisztencia kialakítása limfóma sejtvonalakon

A következő *in vitro* kísérletben reprezentáltuk a kutya betegek kezelési protokollját. Az új módszerben a gyógyszer érzékeny P388 sejteket 5 napig kezeltük a CHOP protokoll egyik vegyületével, doxorubicinnal, majd a túlélő sejteken tápoldatot cseréltünk, amivel kimostuk a maradék hatóanyagot a kultúrából (repopuláció) (18. ábra a). A doxorubicin koncentrációját úgy határoztuk meg, hogy a sejtek 90%-t megölje ( $IC_{10}$ ), a túlélő sejtek viszont vissza tudják nyerni a proliferációs képességüket, majd a kezdeti denzitást ( $10^6$  db/18 ml) elérve újabb DOX

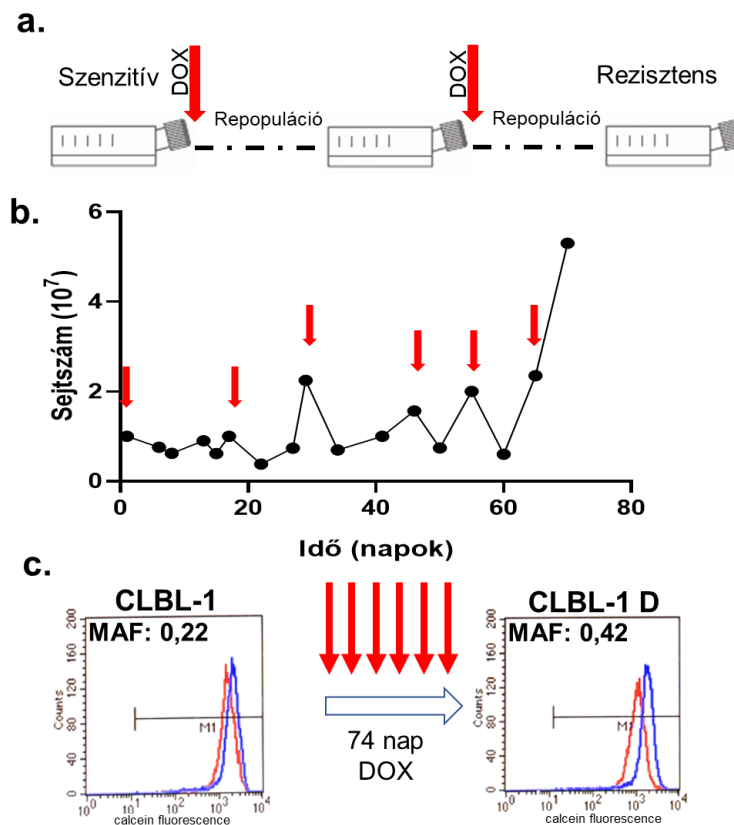
kezelést alkalmaztunk (18. ábra b). A második kezelést követően is hatásosnak bizonyult a DOX IC<sub>10</sub> koncentráció, a sejtszám ismét lecsökkent (<10<sup>6</sup> db/18ml), tehát a sejtek továbbra is érzékenyek voltak a DOX kezelésre. Azonban a harmadik kezelésnél már nem volt tapasztalható a sejtpusztulás, a kezelés ellenére is növekedtek a sejtek, amelyből arra következtettünk, hogy kialakult a gyógyszer rezisztencia (P388 D). Elvégeztük a Pgp funkcionális vizsgálatát, melyből újabb bizonyítékot nyertünk annak igazolására, hogy a kezdetben érzékeny sejtek (MAF = 0,02 [± 0,02]) 42 napos, háromszori DOX kezelést követően jelentősen megnövekedett Pgp expressziót mutattak (MAF = 0,68 [± 0,16]), melyet három párhuzamos mérés eredményéből állapítottunk meg (18. ábra c).



**18. ábra:** A klinikai drog rezisztencia folyamatának modellezése P388 egér sejtekkel. A modellrendszer sematikus ábráján (a) látható a gyógyszerérzékeny sejt doxorubicin kezelése (piros nyíl), mely 5 napig tartott, majd gyógyszer mentes tápoldatban következett a repopulációs időszak. A folyamatot ismételve, amikor a sejtszám csökkenés már nem volt tapasztalható a kezelés ellenére, kialakult a rezisztens populáció (P388 D) (b). Áramlási citométerrel is igazoltuk a fokozott Pgp aktivitást, mely 42 nap kezelés elteltével 0,6 MAF értékre növekedett (c). A sejtek calcein felvételét verapamil nélkül (fekete) és jelenlétében (piros) vizsgáltuk.

Hasonló eredményt mértünk a kutya B-sejtes limfóma sejtvonalon is. A parentális CLBL-1 sejteken (10<sup>7</sup> db/18 ml) 0,3 nmol/l DOX kezelést alkalmaztunk a korábban leírt kísérleti elrendezésben többszöri ismétléssel, vagyis 5 napos kezelést követően gyógyszer mentes tápoldatban következett a repopulációs időszak (19. ábra a). A DOX kezelésre 5 alkalommal

tapasztaltunk terápiás választ, amikor a kezelést követően csökkent a kiindulási sejtszám. Azonban a hatodik kezelés ellenére a tumorsejtek korlátlanul kezdtek növekedni és érzéketlenné váltak a DOX használatára (19. ábra b). Az áramlási citométerrel elvégzett funkcionális mérés kimutatott MAF változás szintén jelezte, hogy a 74 napos kezelés hatására a Pgp aktivitás fokozódott (MAF=0,39  $\pm$  0,06)], melyet legalább három párhuzamos mérés eredményéből igazoltunk (19. ábra c).

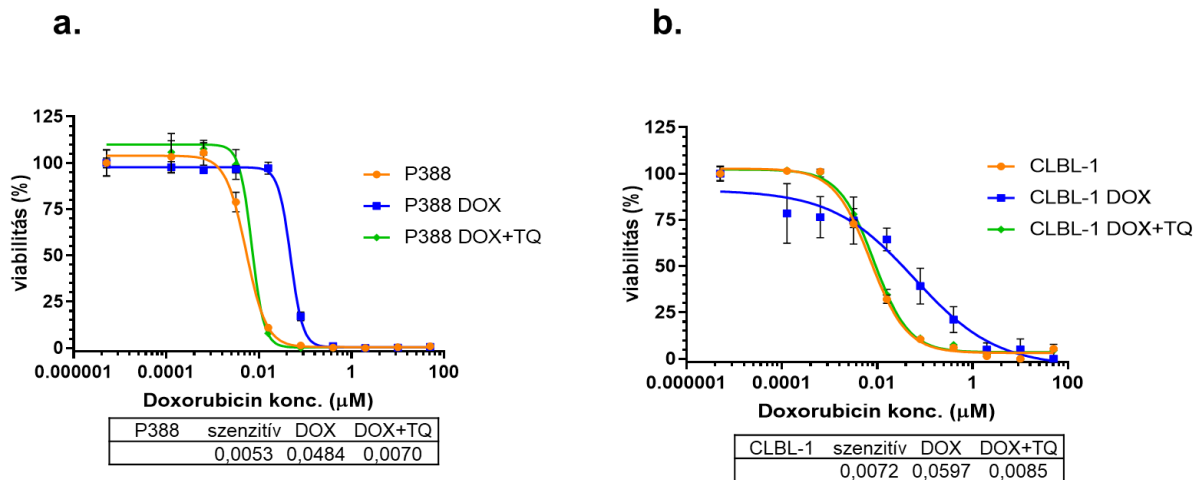


**19. ábra:** A klinikai drog rezisztencia folyamatának modellezése CLBL-1 kutya sejtekkel. A modellrendszer sematikus ábráján (a) látható a gyógyszerérzékeny sejt doxorubicin kezelése (piros nyíl), mely 5 napig tartott, majd gyógyszer mentes tápoldatban következett a repopulációs időszak. A folyamatot többször ismételve, 74 nap elteltével már nem volt tapasztalható a sejtszám csökkenés a kezelés ellenére (b). A létrejött rezisztens populációban (CLBL-1 D) a kezdeti 0,22 MAF értékhez képest jelentősen növekedett a Pgp aktivitás (MAF=0,42), melyet áramlási citométerrel határoztunk meg (c). A sejtek calcein akkumulációját verapamil nélkül (piros) és jelenlétében (kék) is mértük.

A kezelésre adott válasz és a MAF érték növekedésével összhangban a citotoxicitási módszer eredményéből is egyértelműen kiderült, hogy a kezdeti P388 sejtek kilencszer érzékenyebbek voltak, szemben az általunk háromszor DOX kezelt sejtekkel (P388 D) (20. ábra a). A P388 D sejteken Pgp gátlószert, tariquidart alkalmazva a különbség csupán 1,3-szeres volt. A módszerrel igazoltuk, hogy a Pgp fokozott expressziója okozta a doxorubicinnal szembeni ellenállást. A rezisztencia kialakulását mutatta a CLBL-1 parentális és a kezelt (CLBL-1 D)



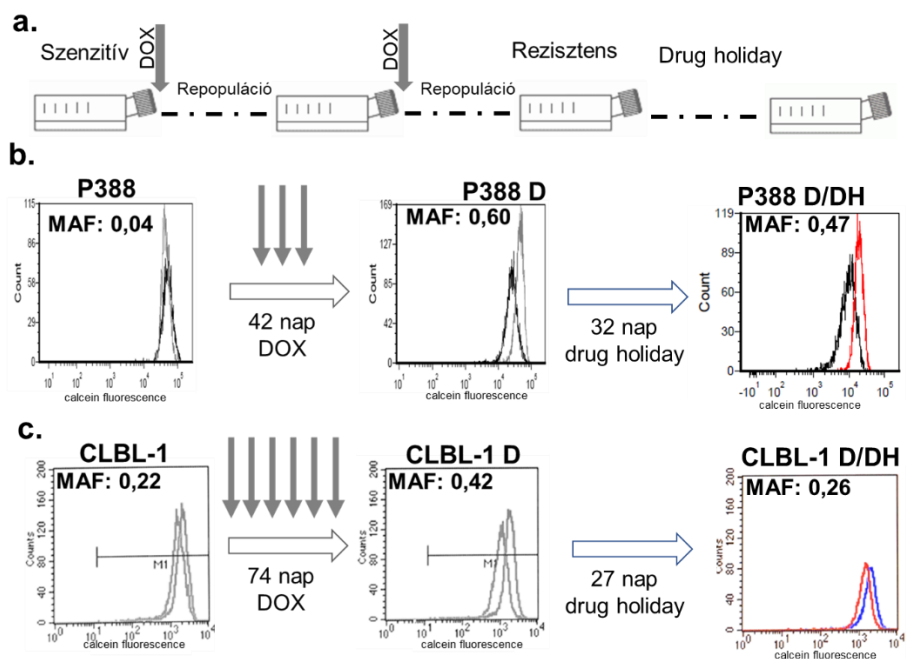
tumorsejtek közötti 9-szeres különbség is a DOX érzékenységben, amely Pgp gátlószer hatására 1,2-szeresre csökkent (20. ábra b). Tehát a kutya limfóma sejteknél is igazoltuk a DOX kezelés által előidézett rezisztenciát.



**20. ábra:** A Pgp aktivitásának különbsége citotoxicitási vizsgálattal igazolva az általunk kialakított modellrendszerben. A doxorubicin IC<sub>50</sub> értékét (μM) a táblázatban feltüntettük az érzékeny (narancssárga vonal), a klinikai kezeléshez hasonlóan kialakított rezisztens (kék vonal) és a Pgp gátlószerrel (tariquidar [TQ]) (2 μmol/ml) kezelt (zöld) rezisztens sejtek esetében.

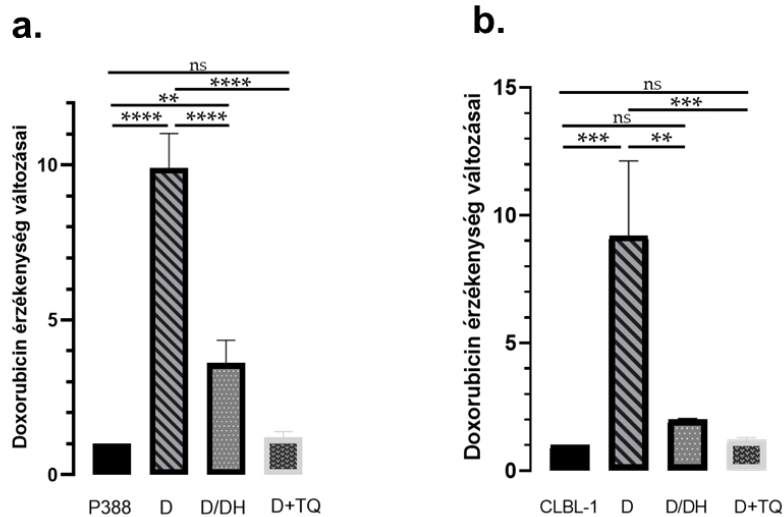
### 6.3.2 Gyógyszerszünet alkalmazásával reverzibilis rezisztencia kialakítása limfóma sejtvonalakon

A kutya esettanulmányok, az *in vitro* P388 és CLBL-1 sejteken végzett kísérletek és az *in vivo* allograft modell során is megfigyelhettük, hogy a rezisztencia gyakori okozója a kezelés hatástalanná válásának. Azonban a klinikumban megfigyelt esettanulmányban a véletlenszerű gyógyszerszünet beiktatása egy lehetőségnek bizonyult a rezisztencia átmeneti leküzdésére, amely a Pgp pozitív tumorsejtek arányának csökkenését eredményezte. A limfómás kutya betegnél általunk alkalmazott gyógyszerszünetet szintén megpróbáltuk *in vitro* modellezni (21. ábra a). Ehhez az előzőleg DOX kezelt rezisztens P388 D és CLBL-1 D tumorsejteket gyógyszer mentes tápoldatba helyeztük, az egér sejteknél 32 nap elteltével tapasztaltuk a MAF csökkenését P388 D/DH sejteknél (MAF=0,47) (21. ábra b). Hasonló volt a CLBL-1 sejteken alkalmazott 27 napos gyógyszerszünet hatása is, melynek eredménye 2 párhuzamos mérésből, hogy a MAF 0,26-ra csökkent (MAF = 0,3 [± 0,04]) 0,42-ről (21. ábra c).



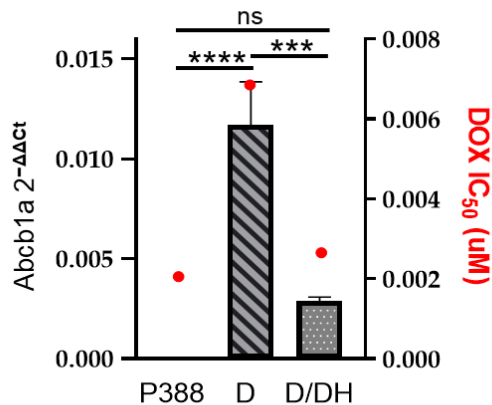
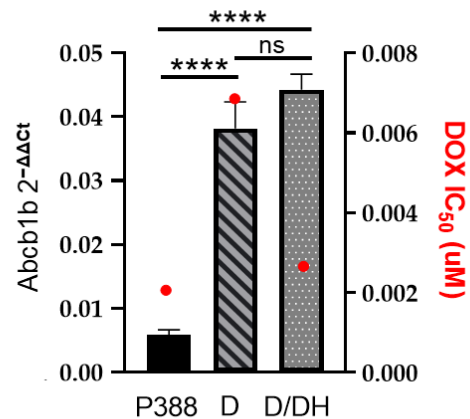
**21. ábra:** A gyógyszerezület Pgp aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata P388 egér és CLBL-1 kutya sejtvonalakon. A gyógyszerezület modellezésének sematikus ábrája látható a klinikai drog rezisztencia kialakítása után (a). A Pgp aktivitás változását gátlószerrel (piros) és anélkül (fekete) mért calcein jelerősség különbségéből számítottuk. P388 sejteken 0,6-ról 0,47-re csökkent a MAF érték (b). CLBL-1 sejteknél is vizsgáltuk a calcein akkumulációját gátlószer jelenlétében (kék) és hiányában (piros). A MAF érték 0,42-ről 0,26-ra csökkent a kutya sejteken (c).

A Pgp aktivitás mellett megvizsgáltuk a tumorsejtek DOX érzékenységének változását is. A DOX kezelés hatására korábban megfigyelt több mint 9-szeres különbség a P388 és P388 D sejtek között a kezelés szüneteltetésének hatására lecsökkent 3,6-szeresre ( $p < 0,0001$ ) (22. ábra a). Pgp gátlószer alkalmazva az érzékenységben nem volt különbség a kezeletlen sejtekhez képest. A CLBL-1 D sejteknél is tapasztaltuk, hogy 9,2-szeres DOX koncentrációt is túléltek ( $p = 0,001$ ), szemben a CLBL-1 D/DH sejtekkel, melynél csupán 2-szeres (ns) volt a különbség a parentális sejtekhez képest (22. ábra b).



**22. ábra:** A DOX érzékenység változása a különböző kezelési csoportokban gyógyszerzűnet hatására. A citotoxicitási vizsgálatból számított doxorubicin érzékenységet ( $IC_{50}$ ) összehasonlítottuk a naiv (P388 és CLBL-1), a rezisztens (D) és a gátlószerrerrel kezelt (D+TQ) sejteknél, valamint a gyógyszerzűnetet (D/DH) követően (c, d). Szignifikáns különbséget mértünk a doxorubicin kezelés hatására, mindkét sejtvonalon több mint 9-szeres koncentrációt toleráltak a rezisztens sejtek, ami a gyógyszerzűnet hatására szignifikánsan lecsökkent. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , ns: nem szignifikáns.

A funkcionális és citotoxicitási vizsgálatokkal párhuzamosan a következő vizsgálatban mértük a rezisztencia kialakulásáért felelős gének mRNS expressziójának szintjét. A Pgp-t kódoló gének közül az egér *Abcb1a* és *Abcb1b* géneket vizsgáltuk, előbbi estében az mRNS expresszió szint növekedett a P388 D sejtekben, ahogyan a MAF és az  $IC_{50}$  értékek is emelkedtek a doxorubicin kezelés hatására, de a gyógyszerzűnetet követően szignifikánsan lecsökkent az mRNS szint a P388 D/DH sejtekben ( $p=0,0003$ ). Az *Abcb1b* expressziója mindkét kezelési csoportban hasonlóan magas volt, szignifikáns különbséget a kezeletlen sejtekhez hasonlítva mértünk ( $p<0,0001$ ) (23. ábra a, b).

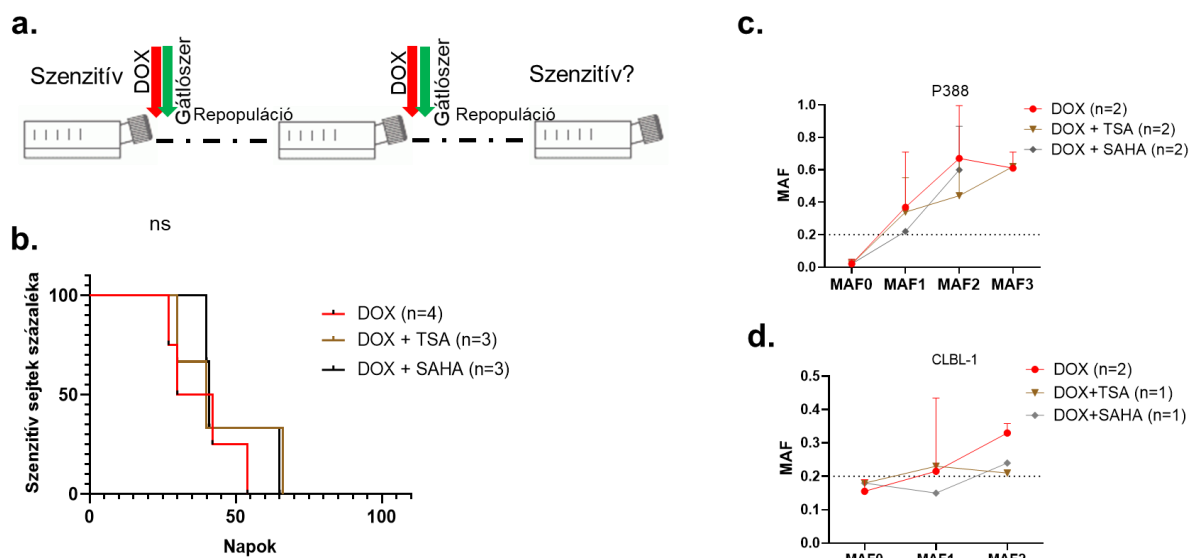
**a.****b.**

**23. ábra:** Az mRNS expresszióra és a gyógyszerérzékenységre gyakorolt hatás a Pgp aktivitás fokozódása és csökkenése esetén. A doxorubicin IC<sub>50</sub> értéke (piros pontok) és az Abcb1a gén mRNS expressziója szignifikánsan emelkedett a rezisztens (D) sejtekben, de lecsökkent a gyógyszerészület hatására (D/DH) (a). Azonban az Abcb1b gén expressziója a D és D/DH sejtekben is emelkedett értéket mutatott (b). \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001, ns: nem szignifikáns.

#### 6.4 Állatgyógyászatban már alkalmazott COX-2 és epigenetikai gátlók kombinálása doxorubicinnal egér és kutya limfóma sejtvonalon a rezisztencia kialakulásának megakadályozására

##### 6.4.1 Epigenetikai gátlók és doxorubicin Pgp expresszióra gyakorolt hatása limfóma sejtvonalon

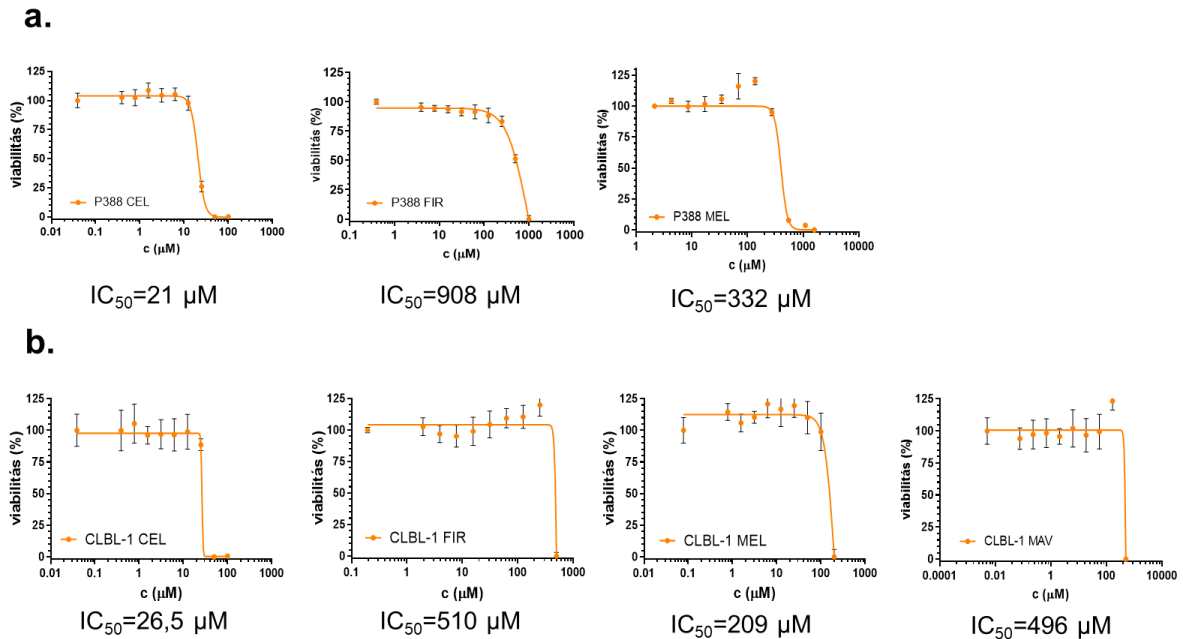
Korábbi vizsgálatainkban meghatároztuk a különböző epigenetikai gátlók IC<sub>50</sub> értékét, a következő vizsgálatokban pedig a TSA-t és a SAHA-t kombináltuk doxorubicinnal az új kezelési mód szerint P388 és CLBL-1 sejteken (24. ábra a). Minden harmadik kezelést követően mértük a MAF-t (MAF 1, 2, 3), majd összehasonlítottuk azt az időt, amikor a sejtek MAF értéke elérte vagy meghaladta a 0,2 értéket. A határérték felett rezisztensnek tekintettük a sejteket. Ezt az időszakot vizsgálva a DOX+TSA (40 nap) és DOX+SAHA (41 nap) esetében nem volt jelentős különbség a DOX monoterápiához képest (30 nap) (24. ábra b). 9 kezelést követően pedig a MAF érték jelentősen növekedett a P388 kezelési csoportokban (MAF ≥ 0,6) (24. ábra c), de a CLBL-1 esetén is meghaladta a 0,2 MAF értéket a 6. kezelés után, így ezeknél a tumorsejteknel már nem folytattuk a további kezeléseket (24. ábra d).



**24. ábra:** A doxorubicin és hiszton-deacetiláz gátlószeres együttes alkalmazásának vizsgálata P388 és CLBL-1 sejteken. A kombinált kezelés modellezésének sematikus ábráján látható, hogy a különböző vegyületek alkalmazása egyidőben történt, mely a monoterápiához hasonlóan 5 napig tartott, majd a repopulációt követően ismételtük a kezelést (a). A Kaplan-Meier túlélési görbén együttesen ábrázoltuk a két sejtvonal méréseit, hogy az egyes kezelt csoportok MAF értéke mikor haladta meg a 0,2 értéket, amit már rezisztensnek tekinttünk (b). A kezelések között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, a DOX (piros) esetében átlagosan 30 nap alatt érték el a sejtek a határértéket, míg a DOX+TSA (barna) és DOX+SAHA (szürke) kezelt sejteknél ez az idő 40 és 41 nap volt. A MAF értékeket minden harmadik kezelést követően mértük (MAF 1-2-3) P388 (c) és CLBL-1 (d) sejtvonalon.

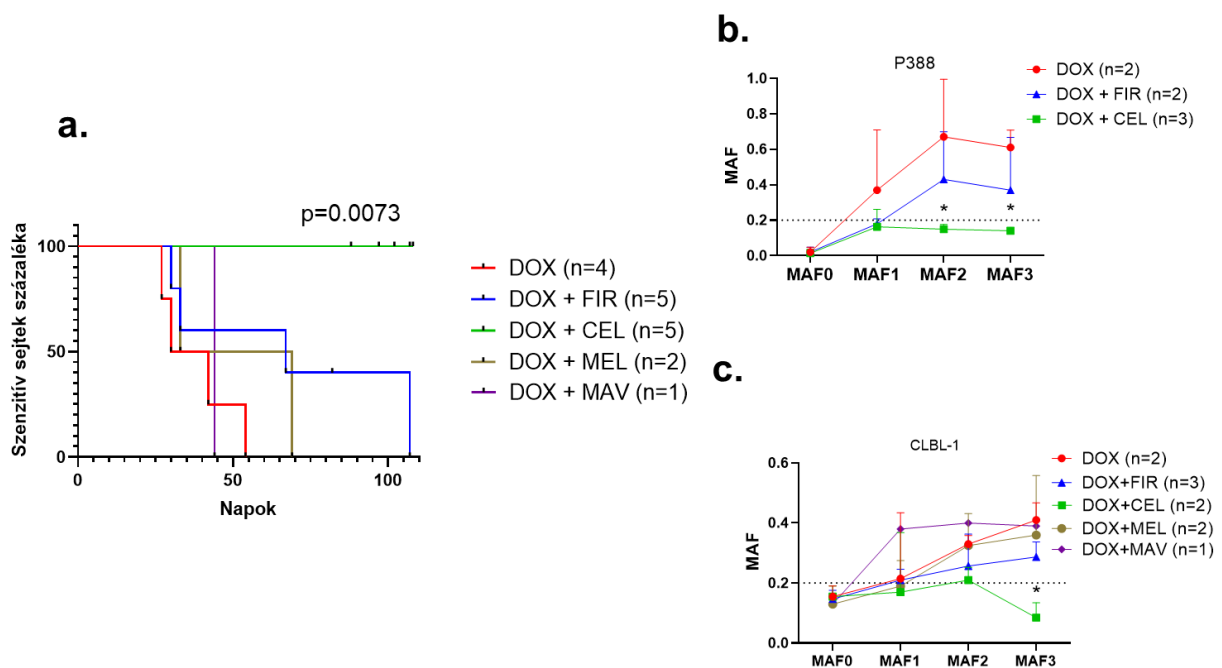
#### 6.4.2 COX-2 gátlószeres és doxorubicin Pgp expresszióra gyakorolt hatása limfóma sejtvonalon

A következő kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a különböző COX-2 gátlószereseket (celecoxib, firocoxib, meloxicam, mavacoxib) doxorubicinnel kombinálva hogyan hatnak a Pgp aktivitására. Szintén a korábban kialakított, új, hosszútávú kezelésen alapuló *in vitro* modellrendszerünkben mértük a P388 és CLBL-1 sejteken a MAF érték változását. Kísérletünk elvégzéséhez első lépésben meghatároztuk a kezelőszeres IC<sub>50</sub> koncentrációját mindkét sejtvonalon (25. ábra a, b). Azonban hamar kiderült, hogy a firocoxib magas koncentrációban sem volt toxikus a sejtvonalakon, míg a mavacoxib esetében csak kutya tumorsejtekre állapítottuk meg ugyanezt.



**25. ábra:** Citotoxicitási vizsgálatok eredményei a különböző COX-2 gátlószerekkel. A citotoxicitási görbéből számolt IC<sub>50</sub> értékeket (a sejtek 50%-át elpusztító koncentráció) tüntettük fel P388 (a) és CLBL-1 (b) sejteken celecoxib (CEL), firocoxib (FIR), meloxicam (MEL) és mavacoxib (MAV) esetében.

A citotoxicitási vizsgálat elvégzését követően a hosszú távú kombinált kezelésben a két sejtvonalon együttesen összehasonlítottuk azt az időt, amíg a kezelt sejtek nem érték el a rezisztensnek tekintett 0,2 határértéket, mely a következőképpen alakult: 36 nap DOX kezelésnél, 44 nap DOX+mavacoxib, 51 nap DOX+meloxicam, 67 nap DOX+firocoxib esetén. Azonban meglepő módon a DOX+celecoxib kombináció használata esetén a tumorsejtek Pgp aktivitása 9 kezelést követően sem érte el a 0,2 MAF értéket ( $p=0,0073$ ) (26. ábra a). A P388 tumorsejteknél szignifikáns különbség mutatkozott a MAF értékben 6 és 9 kezelést követően is a DOX+CEL alkalmazásával szemben a DOX monoterápiával ( $p<0,05$ ), ahol 3 kezelés alatt jelentősen nőtt a Pgp aktivitás (26. ábra b). A COX-2 gátlószerek kombinációjának eredménye hasonló volt a CLBL-1 sejteken is, ahol a DOX rezisztens tumorsejtek MAF értékéhez közelített a DOX+mavacoxib (MAF=0,39), DOX+meloxicam (MAF=0,36) és a DOX+firocoxib (MAF=0,29) kezelési csoportban mért MAF érték is. A MAV és MEL esetében a kutya limfóma tanulmányozásához közelebbi modellen, a kutya tumorsejteken végeztük el a kombinációs vizsgálatot és miután meggyőződünk, hogy ezek a kezelések nem voltak hatékonyabbak a monoterápiánál, így a P388 sejteken már nem alkalmaztuk. Azonban a leghatékonyabb kombináció a CLBL-1 sejteken is a DOX+CEL együttese volt, ahol szignifikáns ( $p<0,05$ ) különbséget mértünk 9 ciklust követően is a DOX monoterápiához képest (26. ábra c).



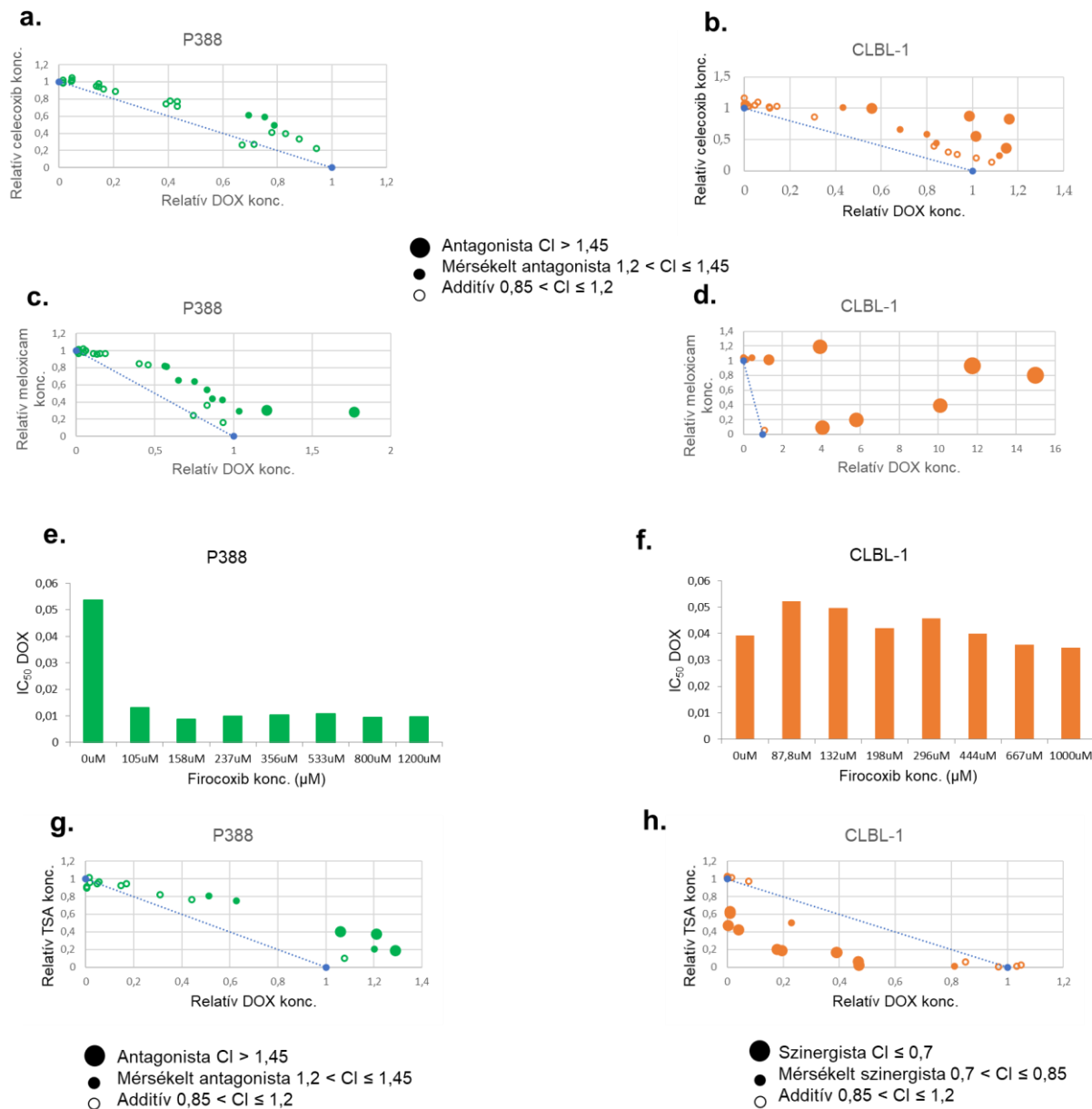
**26. ábra:** A doxorubicin és a COX-2 gátlószerek együttes alkalmazásának vizsgálata P388 és CLBL-1 sejteken. A Kaplan-Meier görbén szignifikáns különbség látható a DOX+CEL (zöld) és a többi kezelt csoport (DOX – piros, DOX+FIR – kék, DOX+MEL – világos barna, DOX+MAV – lila) MAF értéke között a két sejtvonal méréseit együttesen ábrázolva. A rezisztencia határértéke  $MAF \geq 0,2$  volt (a). 9 kezelés során minden harmadik után meghatározva a MAF értékeket (MAF 1-2-3) a P388 sejteken szignifikáns különbség volt kimutatható a DOX+CEL csoportnál 6 (MAF 2) és 9 (MAF 3) kezelést követően is (b). A CLBL-1 sejteknél 9 kezelés (MAF 3) elteltével volt szignifikánsan alacsonyabb a MAF érték a DOX+CEL csoportban (c).

Eddigi vizsgálatainkból kiderült, hogy bár az általunk tesztelt HDAC gátlószerekkel kombinált terápia nem volt szignifikánsan hatékonyabb, mint a doxorubicin önmagában, de a COX-2 gátlószerek közül a celecoxibbal kiegészített kemoterápiával sikeresen megakadályoztuk a Pgp indukció kialakulását.

### 6.4.3 COX-2, HDAC gátlószerek és doxorubicin egymásra gyakorolt hatásának vizsgálata limfóma sejtvonalakon

Az *in vitro* hosszútávú kombinációs kísérletet követően egy rövid távú, 5 napos módszerrel, megvizsgáltuk az eddig használt kezelőszerek (epigenetikai és COX-2 gátlószerek) hogyan hatnak a doxorubicin toxicitására. A DOX és celecoxib, valamint a DOX és meloxicam között antagonista hatást mértünk, vagyis a kezelőszerek nem erősítették a toxikus hatásukat a P388 és CLBL-1 sejteken együttesen alkalmazva (27. ábra a, b, c, d). A firocoxib esetében, mely önmagában nem volt toxikus, nem valósulhatott meg az izoblogram ábrázolási mód. A DOX és firocoxib esetén szintén antagonista volt a hatás, de ez csak a CLBL-1 sejteken érvényesült

(27. ábra f), valamint a P388 sejteken DOX+TSA-t alkalmazva (27. ábra g). Ezzel szemben szinergista hatás mutatkozott a DOX és firocoxib között P388 sejtvonalon és DOX+TSA között CLBL-1 sejteken, tehát ezeket együttesen alkalmazva a kezelőszerek erősítették egymás hatását (27. ábra e, h).

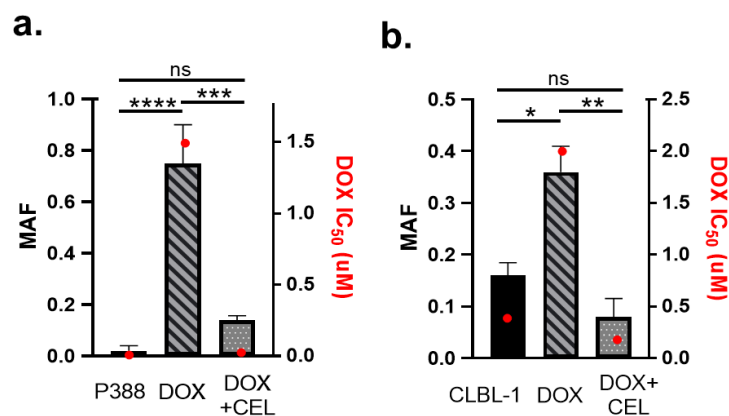


**27. ábra:** A gátlószerek és a doxorubicin egymásra kifejtett hatásának vizsgálata. Míg a celecoxibot (a, b), valamint a meloxicamot (c, d) doxorubicinnal együtt vizsgálva antagonista hatás volt kimutatható P388 és CLBL-1 sejtvonalon is, addig a firocoxib esetében ugyanez a hatás csak a CLBL-1 sejteken érvényesült (f). Továbbá a doxorubicin és trichostatin-A kombinációja sem erősítette egymás hatását P388 sejteken (g), szemben a kutya sejteken mért hatással (h). Szintén szinergista volt a firocoxib és doxorubicin együttese egér sejtvonalon alkalmazva (e).



#### 6.4.4 Celecoxib hatása DOX kezelést követően vagy önmagában alkalmazva

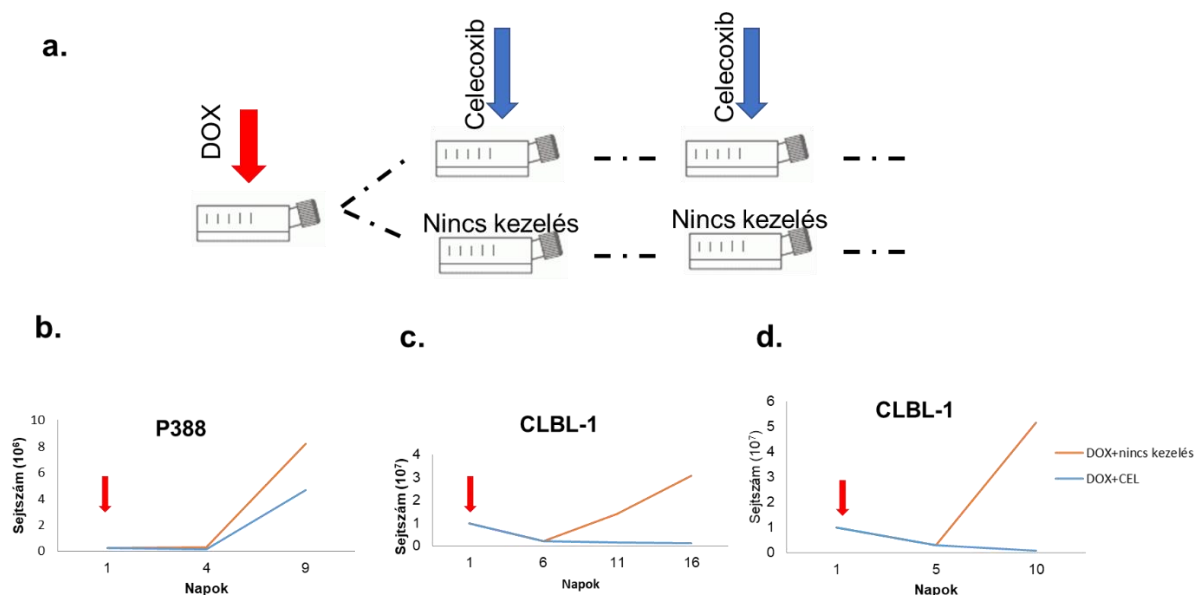
A DOX+CEL Pgp-re gyakorolt hatásának vizsgálata mellett a sejtek gyógyszerérzékenységét is mértük citotoxicitási vizsgálattal. P388 tumorsejteken összehasonlítottuk az  $IC_{50}$  értékeket 9 kezelést követően, mely a következőképpen alakult:  $IC_{50} = 0,01 \mu M$  kezeletlen sejteken,  $IC_{50} = 1,6 \mu M$  9 DOX kezelést követően és  $IC_{50} = 0,03 \mu M$  9 DOX+CEL kezelés után (a 28. ábrán piros pontokkal jelöltük). A DOX és DOX+CEL kezelési csoport között szignifikáns különbséget mértünk ( $p < 0,0001$ ) (28. ábra a). A következő mérésnél a kombináció sikerességét a CLBL-1 sejteken is bizonyítottuk. A kezeletlen sejtekhez hasonlóan ( $IC_{50} = 0,44 \mu M$ ) a DOX+CEL terápiás csoport tumorsejtjei is megőrizték a DOX-ra való érzékenységüket, sőt valamelyest csökkent is, ( $IC_{50} = 0,24 \mu M$  DOX+CEL) szemben a DOX monoterápiával ( $IC_{50} = 1,99 \mu M$ ) (28. ábra b).



**28. ábra:** A doxorubicin monoterápia és a celecoxibbal kiegészített kombinált terápia összehasonlítása. A MAF értékeket (mintázott oszlopok) és a doxorubicin érzékenységét jelölő  $IC_{50}$  értékeket (piros pontok) elemezve nem találtunk szignifikáns különbséget a kiindulási sejtek és a kombinált kezelést kapott sejtek között P388 (a) és CLBL-1 (b) sejtvonalon sem, szemben a monoterápiával kezelt rezisztenssé vált sejtek értékeivel. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , ns: nem szignifikáns.

Korábbi vizsgálatunkból kiderült, hogy a Pgp megjelenésének megakadályozása nem a DOX és a CEL szinergisztikus toxicitásának eredménye, ezért a következő *in vitro* kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a celecoxib egy DOX kezelés hatására bekövetkező változást használ-e támadáspontul. A kísérletben nem egyidejűleg alkalmaztuk a DOX-t és CEL-t, hanem egy 5 napos DOX előkezelést követően adtuk folyamatosan a sejteknek a COX-2 gátlószert, míg a kontrol csoportot gyógyszer mentes tápoldatba helyeztük (29. ábra a). A sejtszámot vizsgálva láttuk, hogy a P388 sejteknél körülbelül 50%-os visszaesés mutatkozott a celecoxib kezelés hatására (29. ábra b), míg a CLBL-1 tumorsejtek nem is élték túl az egyébként 20%-t elpusztító

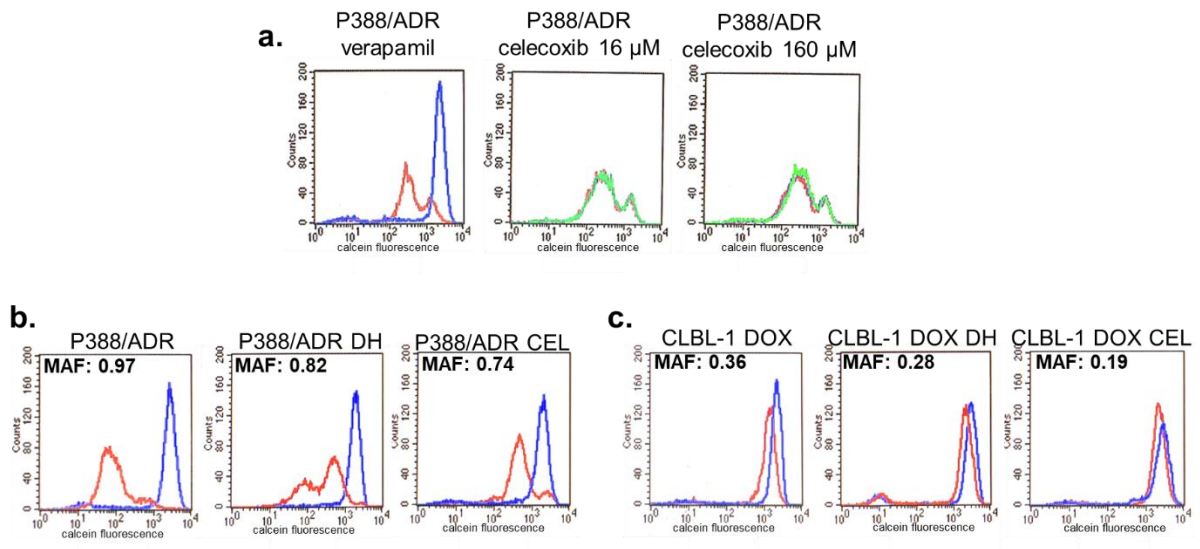
kezelést (29. ábra c, d). A DOX előkezelést követően sikerült kimutatni, hogy a sejtek még érzékenyebbé váltak a celecoxibbal szemben.



**29. ábra:** A doxorubicin (piros) előkezelést követő celecoxib (kék) kezelés hatásának vizsgálata. A kísérlet sematikus ábráján látható, hogy a két kezelőszert nem egyidejűleg alkalmaztuk, hanem az 5 napos DOX kezelés elteltével a sejteket két csoportra osztottuk (további kezelés nélküli vagy celecoxib jelenlétében tenyésztettük) (a). A P388 tumorsejteknel kétszer több élő sejtet detektáltunk a celecoxib kezelt csoport sejttségéhez viszonyítva (b). Azonban a CLBL-1 sejteknel jelentős különbség volt mérhető, celecoxib kezelt csoportban a tumorsejtek elpusztultak (c, d).

A következő kísérletben megvizsgáltuk, hogy a CEL gátolja-e a Pgp funkcióját egy doxorubicin-rezisztens sejtvonalon. A fokozott Pgp aktivitás miatt ezeknél a sejteknel alacsony calcein intenzitást mértünk (30. ábra piros vonal), azonban Pgp gátlószert, verapamilt adva a sejtekhez már magas fluoreszcencia intenzitás volt megfigyelhető (kék vonal). Azonban a verapamil helyett, a modellrendszerben alkalmazott  $IC_{80}$  koncentrációban és annak 10-szeres dózisában használva a celecoxibot, nem tapasztaltunk különbséget a hisztogramok között (30. ábra a zöld), vagyis bizonyítottuk, hogy a celecoxib nem képes a Pgp direkt gátlására. A következő lépésben a MAF mérést egy hónapos gyógyszeres kezelést vagy celecoxib kezelést követően végeztük el. 28 nap elteltével a P388/ADR sejteknel 0,97-ről (MAF = 0,90 [± 0,08]) 0,82-re (MAF = 0,73 [± 0,1]) csökkent a MAF a gyógyszeres kezelés hatására, de a celecoxib kezelés még jobban csökkentette a Pgp aktivitás mértékét (MAF=0,74), 2 párhuzamos mérés eredménye alapján (MAF = 0,65 [± 0,1]) (30. ábra b). A CLBL-1 kutya tumorsejteknel is hasonló eredményt mértünk, míg a rezisztens sejtek MAF értéke 0,36-ről (MAF = 0,39 [± 0,05]) 0,28-ra (MAF = 0,3 [± 0,04]) változott a 28 napos gyógyszermentes időszaknak köszönhetően, addig a celecoxib hatására a MAF változása ennél is jelentősebb volt (MAF=0,19), 2

párhuzamos mérésből számítva (MAF = 0,23 [± 0,04]), amely arra utalt, hogy a sejtek egy része elveszítette a Pgp transzporter aktivitását (30. ábra c).



**30. ábra:** Celecoxib további vizsgálata, P-glikoprotein gátlószerként és a rezisztens sejteken alkalmazva. A specifikus Pgp gátlószerrel, verapamillal (kék) szemben, a 16 μM és 160 μM celecoxib (zöld) nem volt képes a Pgp funkcionális gátlására (a). Azonban kifejezett mértékű Pgp aktivitás csökkenést eredményezett a Pgp-t expresszáló rezisztens P388/ADR (b) és CLBL-1 DOX (c) sejteken összehasonlítva a gyógyszerszűnet alkalmazásával.

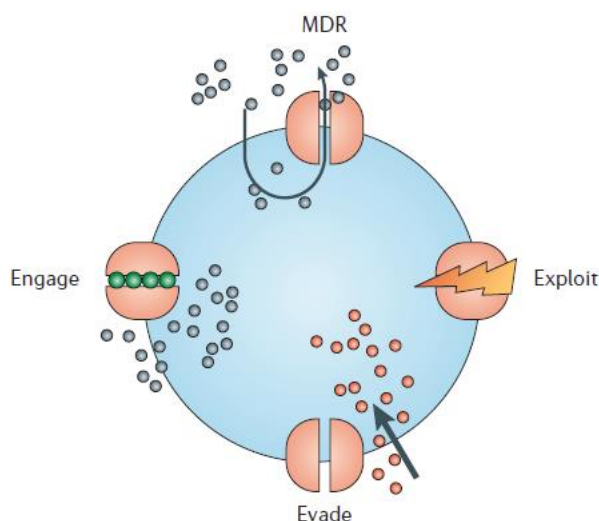
## 7. Megbeszélés (következtetések)

### 7.1. A limfóma célzott kezeléséhez szükséges prognosztikai faktorok tanulmányozása

A limfóma esetén számos prognosztikai faktort megállapítottak, mint a kor, az ivar, a stádium, az immunfenotípus vagy a proliferációs index (Teske és mtsai. 1994), melyek közül az utóbbi három meghatározható áramlási citométerrel, akár egyetlen túaspirációs mintából (Comazzi és Gelain 2011; Katz és mtsai. 1993; Valli és mtsai. 2013). Az állatorvosi gyakorlatban megbízható diagnosztikai módszerként az immunhisztokémiai vizsgálat terjedt el (Thalheim és mtsai. 2013), melynek előnyét tapasztaltuk a vizsgálatainkban, miszerint a sejtek morfológiailag jól elkülöníthetők, azonban az immunfenotipizáláshoz szükséges különböző CD markerek százalékos arányát limitált számú sejt elemzésével végezhetjük. Vizsgálatainkból kiderült, hogy az áramlási citométer és az immunhisztokémiai módszer eredményei között erős szignifikáns korrelációt mértünk (2. táblázat). Más vizsgálatokhoz hasonlóan bizonyítottuk, hogy az FC citológiai vizsgálattal kiegészítve alkalmas a limfóma immunfenotípus meghatározására (Comazzi és Gelain 2011; Culmsee és mtsai. 2001; Tasca és mtsai. 2009). Az áramlási citométer előnye, hogy gyorsabb módszer és a túaspirációs mintavételi technika alkalmazásával kevésbé invazív. Továbbá a CD markerek százalék meghatározását legalább 10 000 darab sejtől végezhetjük, valamint citológiai vizsgálattal kiegészítve a sejtek morfológiájáról is kapunk információt. A kapuzási technika segítségével, melynek révén a sejt méret és granulátság szerint választhatjuk ki a sejteket, egy ritkábban előforduló limfóma típust, a T-sejt gazdag B-sejtes limfómát is sikerült igazolni a citológiai vizsgálattal együttesen értékelve (9, 10, 11. ábra).

Az áramlási citométer az említett vizsgálatok mellett alkalmas a P-glikoprotein (Pgp) funkcionális mérésére is. A tumorsejteken megjelenő transzporter gyakran felelős a multidrog rezisztencia (MDR) kialakulásáért, amely az adott kemoterápiás szerek hosszú távú hatékonyságát akadályozza. Az MDR kialakulhat a kezelés hatására (szerzett rezisztencia) vagy megjelenhet már a kezelés kezdetén is (nem szerzett/intrinsic rezisztencia) (Zandvliet 2014). Mindkét esetre láttunk példát a kutatásunkban, amikor a multidrog rezisztencia aktivitási faktort (MAF) mértük 12 kutya esetében, melyből 3 kutyánál már a diagnóziskor mért MAF érték is magas volt, ez utalhat az intrinsic rezisztenciára, majd a terápia hatására tovább emelkedett az érték és ezzel párhuzamosan feltételezhetően csökkent a terápiás válasz. Ezzel szemben a másik 9 kutyánál átlag 0,08 MAF értékről a kezelés hatására alakult ki a gyógyszerekkel szembeni ellenállás (12. ábra). Habár más kutatócsoportok által végzett klinikai vizsgálatokban is azonosították a Pgp jelentőségét a kedvezőtlen terápiás választ mutató betegeknél (Karászi és mtsai. 2001; Stasiłojć és mtsai. 2020), azonban kutya tumormintákon elsőként alkalmaztuk az áramlási citometriai módszert (Dékay Valéria és mtsai. 2020).

A terápia rezisztencia probléma megoldását számos kísérletben a Pgp gátlásán keresztül kívánták megvalósítani (Baer és mtsai. 2002: 3; Daenen és mtsai. 2004; Goldman 2003; Höllt és mtsai. 1992; List és mtsai. 2001; Wattel és mtsai. 1999), azonban ez az elgondolás a klinikai vizsgálatok során elbukott a nem várt toxicitás és az eredmények elégtelensége miatt (Libby és Hromas 2010). A potenciális Pgp gátlószerek keresését követően új stratégiára volt szükség, mely magában foglalja a transzporter-gátlók és a citotoxikus szerek együttes alkalmazását („engage”), olyan citotoxikus szerek használatát, melyek kikerülnek a Pgp mediált effluxot („evade”) vagy kihasználják az MDR sejtek érzékenységét („exploit”) (Szakács és mtsai. 2006) (31. ábra).



**31. ábra:** A P-glikoprotein okozta multidrug rezisztencia leküzdésére irányuló stratégiák összefoglaló ábrája. (Forrás: Szakács és mtsai. 2006)

A doxorubicin pegilált liposzomális változata, melyet kutatócsoportunk sikeresen alkalmazott egér emlőtumor modellen, jó példa volt arra, hogyan lehet a Pgp okozta rezisztenciát kikerülni és ezzel a terápia hatékonyságát növelni. Egy klinikailag is releváns egér emlődaganat modellen bemutattuk, hogy a rezisztencia kialakulásának jelentős eltolásával a relapszus mentes túlélés 6-szorosára, míg a teljes túlélés 3-szorosára volt növelhető (Füredi és mtsai. 2017). Azonban jelen munkából kiderült, hogy a már kialakult Pgp-mediált rezisztenciát a PLD kezelés sem tudta áttörni (15. ábra d).

Az ún. MDR szelektív vegyületek felfedezésével és tanulmányozásával újabb lehetőség nyílt a multidrog rezisztens tumorok kezelésére. Ezek a molekulák képesek egy eddig ismeretlen mechanizmuson keresztül a Pgp-t kifejező MDR sejtek célzott elpusztítására, ezzel egy új és még kiaknázatlan stratégia kidolgozására adva lehetőséget (Cserepes és mtsai. 2019; Füredi és mtsai. 2017; Szakács és mtsai. 2004; Szakács és mtsai. 2014; Türk és mtsai. 2009).

Az új lehetőségek ellenére is komoly kihívást jelent a terápia során kialakuló Pgp által előidézett rezisztencia, melyet folyamatában sikerült végig követni 2 kutya esettanulmányban. Míg az első esetben a diagnóziskor a Pgp aktivitás hiányát tapasztaltuk, ami a kemoterápiás kezelés hatására folyamatosan növekedett (13. ábra), addig a másik kutyánál a MAF kezdeti magas értékét mértük a calcein módszer segítségével, amely a kezelőszerek alkalmazásával tovább emelkedett (14. ábra). Ezzel egyidőben mindkét esetben megnagyobbodott nyirokcsomókat mértünk, amely a terápiás válasz csökkenésére utalt. Azonban a második betegnél megfigyeltük, hogy egy nem tervezett gyógyszerezés alkalmazásával a rezisztencia visszafordítható volt, ez a Pgp aktivitás csökkenését és a daganatok kezelésére adott ideiglenes válaszát eredményezte (14. ábra). Számos más tanulmányban beszámoltak hasonló jelenségről humán daganatos betegek esetében, amikor a terápia hatékonysága megszűnt vagy jelentősen csökkent, de a gyógyszerezés hatására újra tapasztaltak terápiás választ, így például az EGFR kezelés során tüdődaganat esetén (Kurata és mtsai. 2004; Yano és mtsai. 2005). Hasonlóképpen, azok a melanómával diagnosztizált páciensek, akik a progresszió vagy egyéb okok miatt abbahagyták a BRAF kezelést, a későbbi szakaszban részesülhettek a kezelés újbóli hatékonyságával járó előnyökből. A kemoterápiával járó újbóli lehetséges előnyt a kutya betegeknél is leírták (Cara és Tannock 2001). Az állatorvosi gyakorlatban a körülbelül 2-4 hetes gyógyszerezést rutinszerűen alkalmazzák, azokban az esetekben, amikor felmerül, hogy a kemoterápiás kezelés során csökkenteni kell a kezelőszerek okozta mellékhatásokat. Azonban a második páciensnél a nem tervezett gyógyszerezés jótékony előnyeit látva, felmerült egy újabb stratégia megvalósítása is. Amennyiben a gyógyszerezés hatása farmakológiailag előidézhető vagy reprodukálható, akkor lehetséges, hogy megelőzhető a kezelés által indukált Pgp kifejeződése a tumorsejteken. Azonban ennek igazolására további betegek bevonása és klinikai megfigyelése szükséges.

## **7.2. Egér és kutya limfóma sejtek *in vitro* gyógyszeresztelésre való alkalmasságának vizsgálata**

A rezisztencia tanulmányozására olyan sejtvonalpárt választottunk, melyen, más tanulmányokhoz hasonlóan, jól összevethető az állatgyógyászatban széles körben alkalmazott gyógyszerek hatékonysága (Batrakova és mtsai. 2010; Krishna és mtsai. 1997). A P388 egér leukémia sejtek és a drog rezisztens P388/ADR sejtek alkalmasak voltak, hogy kimutassuk a Pgp szubsztrát vegyületek, mint a doxorubicin hatásának jelentős különbségét. A gyógyszerérzékeny sejteken kifejezett mértékben bizonyult hatékonynak a kezelőszerek és egy adott koncentrációban a sejtek elpusztultak, de ugyanazt a koncentrációt alkalmazva a P388/ADR sejteken, a fokozott Pgp aktivitás miatt ezek a sejtek túléltek a kezelést (15. ábra).

A pegilált liposzomális doxorubicint is teszteltük az egér leukémia sejteken, amely korábbi tanulmányokban kevesebb mellékhatást okozva is sikeresnek bizonyult emlőtumor (Ansari és mtsai. 2017; Füredi és mtsai. 2017; O'Shaughnessy 2003), valamint limfóma (Tulpule és mtsai. 2006; Visani és Isidori 2009) esetében, úgy, hogy közben vagy elkerülte az MDR-t vagy lassította annak kialakulását. Saját kísérleteink is megerősítették, hogy a Pgp aktivitással nem rendelkező tumorsejtekkel szemben a PLD meghosszabbította a túlélési időt, azonban a rezisztens tumorsejteknél, melyek fokozottan expresszálták a Pgp-t, nem bizonyult hatásosnak, a magasabb dózis alkalmazása ellenére sem találtunk különbséget a túlélési időben (15. ábra).

A széleskörben alkalmazott, Pgp-mediált rezisztenciát mutató sejteket, mint a MES-SA/Dx5 (Harker és Sikic 1985), a KB-V1 (Shen és mtsai. 1986) vagy a P388/ADR (Schabel és mtsai. 1983), folyamatos gyógyszeres szelekció eredményeként hozták létre, amely *in vitro* hasznosnak bizonyult a rezisztencia tanulmányozására, azonban a klinikumban tapasztalt MDR kialakulásának modellezésére kevésbé alkalmas.

### **7.3. *In vitro* modellrendszer kidolgozása a rezisztencia tanulmányozására limfóma sejtekkel**

A folyamatos szelekciós módszerrel kialakított rezisztens tumorsejtek helyett létrehoztunk egy modellrendszert, amelyben a doxorubicint olyan dózisban használtuk, hogy a sejtek nagy része elpusztult, de a túlélők képesek voltak újra létrehozni a populációt. A kezelőszert tartalmazó médiumban 5 napig tartottuk a sejteket, melyet egy gyógyszermentes időszak követett, ezt többször megismételve kialakítottuk a Pgp által előidézett rezisztens P388 egér és a CLBL-1 kutya limfóma sejteket (18, 19. ábra). Ez a módszer hasonló volt Sharma és munkatársai által végzett *in vitro* kísérletekhez, melyben 3 napos módszerrel 3 ciklusban alakították ki a drog toleráns túlélő sejteket (Sharma és mtsai. 2010), azonban mégis fontos különbség, hogy míg az irodalomban található hasonló rendszerek valamilyen célzott vagy biológiai terápiát használnak, mi egy konvencionális kemoterápiás hatóanyagot választottunk. Tekintve, hogy négy lábú betegek ritkán részesülnek célzott terápiákban, ellenben gyakran kapnak kemoterápiás kezelést daganatos megbetegedések következtében, a mi kísérleti elrendezésünk sokkal inkább releváns az állatonkológiai környezetre nézve. Ebben az új modellrendszerben a rezisztens P388 sejteket 1, míg a CLBL-1 DOX rezisztens sejteket 2 hónapos kezelést követően sikerült kialakítani, szemben a folyamatos szelekciós nyomás alatt tarott sejtekkel, mint például a P388/ADR, amelynek kialakítása 1 évet is igénybe vett. A rezisztencia kialakulásának folyamatát és a gyógyszeres kezelés hatását is az új rendszerben tanulmányoztuk. A rezisztens P388 és CLBL-1 sejteken felfedeztük, hogy az MDR fenotípus változás, csakúgy, mint a második kutya esettanulmányban, *in vitro* is befolyásolható és

visszafordítható 1 hónapos gyógyszereszünetet követően (21. ábra). A rezisztencia kialakulásáért felelős *Abcb1a* és *Abcb1b* géneket vizsgálva megállapítottuk, hogy az új módszerrel kialakított rezisztens sejtekben mindkét gén expressziója szignifikáns mértékben emelkedett a kiindulási sejtekhez képest. A két gén közül az *Abcb1a* expressziós szintje volt az, amelyik jelentősebb mértékben növekedett a P388/ADR és az általunk kialakított rezisztens sejtek esetében is (2. sz. melléklet). A két gén expressziója eltérő a különböző szöveti barriereket vizsgálva, valamint funkcionális különbségeket is megfigyeltek más tanulmányban (Su és mtsai. 2017). A gyógyszereszünet hatását követően az *Abcb1a* génnek az expressziója csökkent le szignifikánsan, mely újabb bizonyíték volt arra, hogy a rezisztencia folyamata visszafordítható és lehetőség van a rezisztenssé vált sejteket újra érzékennyé tenni az adott kezelőszerre (23. ábra).

#### **7.4. Állatgyógyászatban már alkalmazott COX-2 és epigenetikai gátlók kombinálása doxorubicinnal egér és kutya limfóma sejtvonalon a rezisztencia kialakulásának megakadályozására**

Az MDR fenotípus gyors és reverzibilis változását más tanulmányokban is megfigyelték, például a HL60 humán leukémia sejtek a vinkrisztin kezelés hatására váltak rezisztenssé, de a Pgp expresszió emelkedés visszafordítható volt (Pisco és mtsai. 2013). A nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) sejtvonalak nagy dózisú EGFR-gátló kezelésével kimutatták, hogy a többszöri terápiát túlélő sejtpopuláció képes a gyógyszerrel szembeni ellenállásra (ezeket „perziszterek-nek” nevezték) (Sharma és mtsai. 2010). Azonban a perziszterek, vagyis azok a rezisztens túlélő sejtek, melyekből újra kialakult a tumor, a KDM5a hiszton-demetiláz szelektív gátlásával megújult érzékenységet mutattak az EGFR gátlókkal szemben. Ezzel összhangban megfigyelték, hogy a T-sejtes akut limfoblasztos leukémia (T-ALL) kezelése során létrejött perziszterekkel szemben előnyös a BRD4 fehérje kromatin gátlószer, vagyis a JQ1 alkalmazása (Knoechel és mtsai. 2014). Ezek az eredmények megalapozták a feltételezésünket, hogy az epigenetikai modulátor vegyületek kombinált terápiákba való beépítése esetleg előnyös lehet a rezisztenciával szemben. Az epigenetikai szabályozó mechanizmusok relevanciájának tesztelésére megismételtük az *in vitro* doxorubicin kezelést kiegészítve olyan epigenetikai gátlószerekkel, melyeket az állatgyógyászatban is alkalmaznak. A cutan T-sejtes limfóma kezelésére használtak hiszton-deacetiláz gátlószert (SAHA) humán és kutya betegeknél egyaránt (Mann és mtsai. 2007). Továbbá kipróbáltuk a TSA-t is, mely szintén HDAC inhibitor, *in vitro* kísérletekben tesztelték az általunk is használt kutya limfóma sejteken (Dias és mtsai. 2018). Azonban a várakozásainkkal ellentétben az epigenetikai gátlók nem befolyásolták a szerzett gyógyszerrezisztencia kialakulását (24. ábra). Nemrég megjelent tanulmányokban a CLBL-1 sejteken hétféle HDAC gátlószer közül



a panobinostat bizonyult a legeredményesebbnek (Dias és mtsai. 2018), míg más tanulmányban szintén a panobinostat és a SAHA ígéretes hatását mutatták ki az immunterápiával szembeni rezisztencia kialakulásakor (Torres-Collado és Jazirehi 2018; Wang és mtsai. 2020). A hematológiai daganatok különösen érzékenyek a HDAC gátlószerekre, azonban az epigenetikai gátlószereket a DOX mellett nem alkalmazhattuk toxikus koncentrációban, mert ugyan a két vegyület kombinációja még hatékonyabb lehetett volna a tumor sejtek ellen, azonban jelentősen növelte volna a toxikus mellékhatások számát és/vagy mértékét is, ami a klinikumban nem megengedhető következmény. Az alacsony, szuboptimális kezelési koncentráció magyarázhatja a nem kellően eredményes hatást, de az is elképzelhető, hogy limfóma sejtekben fellépő Pgp-mediált MDR kialakulásában nem játszanak szerepet a gátolt HDAC enzimek.

A Pgp fokozott expressziójának megelőzésére egy másik, klinikailag alkalmazható, új stratégia megvalósítása is felmerült a COX-2 gátlásán keresztül. A COX-2 gátlószerek fájdalom- és gyulladáscsökkentő hatásuk mellett rendelkeznek proapoptotikus és antiproliferatív hatásokkal is. Kimutatták, hogy a Pgp szerepet játszik a celecoxib indukált apoptózis folyamatában, mivel aktiválja a kaszpáz-3-t és növeli a citokróm-c felszabadulását a mitokondriumból (Fantappiè és mtsai. 2007). Továbbá számos humán és kutya daganattípusban kimutatták a COX-2 fokozott expressziója (Bernard és mtsai. 2008; Doré és mtsai. 2003; Goldman és mtsai. 1998; Liu és mtsai. 2015; Tamura és mtsai. 2015) és a Pgp túlműködése közötti erős korrelációt (Liu és mtsai. 2009; patel és mtsai. 2002). A COX-2 és a Pgp mediált gyógyszerrezisztencia közötti kapcsolatot alátámasztó bizonyítékok alapján a klinikailag alkalmazott COX-2 gátlók paneljét (celecoxibot, firocoxibot, meloxicamot, mavacoxibot) teszteltük (Knottenbelt és mtsai. 2006; Meng és mtsai. 2014; Murakami és mtsai. 2018; Pang és mtsai. 2014; Tamura és mtsai. 2015). Meglepetésünkre, a celecoxib és a doxorubicin kombinációjával sikerült teljesen megelőzni az MDR kialakulását a P388 és a CLBL-1 sejtvonalon is (26. ábra). Habár a COX-2-ről ismert, hogy a Pgp expresszióját a c-Jun foszforiláción vagy a PGE2-n keresztül szabályozza (Roy és mtsai. 2010; Sui és mtsai. 2011), a firocoxib, meloxicam és a mavacoxib kombinált terápia esetén mégis elmaradt a Pgp túlműködésének megakadályozása, amely azt jelezte, hogy a celecoxib Pgp expresszió gátlására gyakorolt hatása független a COX-2 gátlásától. A hatásmechanizmus nem teljesen ismert, de összefüggésben lehet azzal, hogy a celecoxib számos sejtműködést befolyásol, mint például a karbon anhidráz II. gátlását humán daganatok esetén (Knudsen és mtsai. 2004), a PDK1 jelátviteli út szabályozását (Arico és mtsai. 2002; Kulp és mtsai. 2004) vagy az endoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$  ATP-áz gátlását (Johnson és mtsai. 2002).

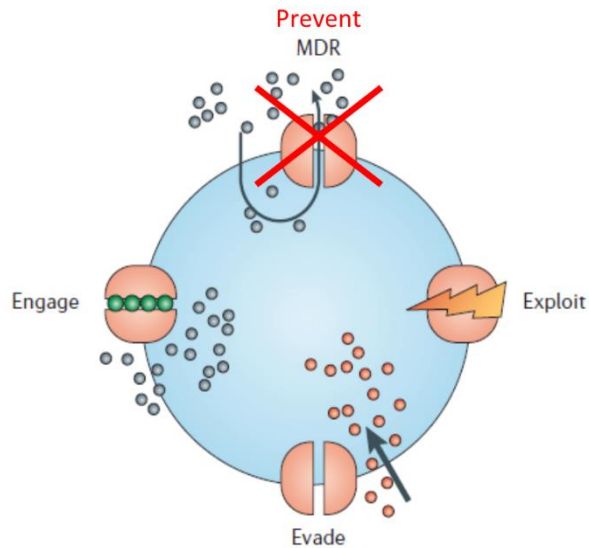
A COX-2 gátlószereket is szubtoxikus koncentrációban alkalmaztuk, mivel hosszútávú célunk között szerepel, hogy a betegeknél ne a toxikus koncentrációt és a mellékhatások kialakulását növeljük, hanem ezeket elkerülve a rezisztencia kialakulását megelőzzük. A kezelőszerek

együttes hatásvizsgálatából kiderült, hogy a celecoxib nem befolyásolja a DOX toxicitását, tehát nem szinergista hatású. Hasonló eredményt mértünk a DOX és meloxicam, vagy a DOX és firocoxib között CLBL-1 sejteken, a DOX és TSA között P388 sejteken. Azonban szinergista hatást is felfedeztünk a DOX firocoxib esetén az egér sejtekkel és a TSA kombinációjával kutya tumorsejteken (27. ábra).

Habár láttuk, hogy a DOX toxicitását nem növelte a celecoxib az együttes hatásvizsgálat során, mégis képes volt ez a COX-2 gátlószer a tumorsejteket érzékenyíteni a DOX előkezelést követően és CLBL-1 sejteket kipusztítani szubtoxikus koncentrációban alkalmazva (29. ábra). A vizsgálatból arra következtettünk, hogy a celecoxib a DOX kezelés hatására bekövetkező változást használja támadáspontul. Más tanulmányokban is találunk példát arra, hogy a COX-2 gátlószer képesek a HeLa tumorsejteket érzékenyíteni a doxorubicin vagy etopozid kezelésre az apoptózis indukálásával szintén függetlenül a COX-2 gátlástól (Totzke és mtsai. 2003). Továbbá a celecoxib növelte a TRAIL apoptotikus aktivitását B-sejtes limfóma sejtek kezelése során is COX-2 független útvonalon (Gallouet és mtsai. 2014).

Akár DOX kombinációval, akár DOX előkezelést követően használtuk a celecoxibot, minden esetben eredményesen alkalmaztuk a tumorsejtekkel és a rezisztencia kialakulásával szemben. Ezt követően megvizsgáltuk a DOX kezeléssel kialakított rezisztens sejtekre kifejtett hatását, melynek során tapasztaltuk, hogy jelentősebb Pgp aktivitás csökkenést értünk el, mint a gyógyszer szünet alkalmazásával, azonban ez a hatás nem a Pgp direkt gátlásán keresztül valósult meg (30. ábra). A celecoxib COX-2 független hatásvizsgálatára számos példát láttunk, de az összefüggések még nem teljesen ismertek.

A különböző terápiák hatékonyságának növelése érdekében a kezelőszerezrel szembeni rezisztencia kialakulásának leküzdésére számos stratégia létezik. A Pgp kikerülése, a gátlása vagy az MDR pozitív tumorsejtek érzékenységének kihasználása mellett egy új lehetőséget fedeztünk fel a celecoxib Pgp expresszióját megelőző hatásában (32. ábra).



**32. ábra:** A P-glikoprotein okozta multidrug rezisztencia leküzdésére irányuló stratégiák összefoglaló ábrájának kiegészítése az általunk felfedezett új, kialakulást megelőző lehetőséggel. (Forrás: Szakács és mtsai. 2006)

Eredményeinkre alapozva elindítottunk egy randomizált kettős-vak *in vivo* kutatást az Állatorvosi Hematológiai és Onkológia Központban, ahol összehasonlítjuk a hagyományos CHOP protokollal kezelt limfómás kutyák recidívamentes és teljes túlélési idejét az új módosított CHOP+CEL terápiával kezelt betegekkel.

## 8. Új tudományos eredmények

1. Igazoltuk, hogy az áramlási citométerrel végzett és citológiai vizsgálattal kiegészített limfóma immunfenotípus meghatározás erősen korrelált az immunhisztokémiai vizsgálat eredményével, azonban az előbbi módszer egyszerűbben, gyorsabban és kevésbé invazív módon használható az állatorvosi onkológia területén. (Kurai E., Dékay V. és Vajdovich P.: Az áramlási citométer, mint limfómához alkalmas diagnosztikai eszköz az állatorvosi onkológiában, MÁL, 142. 531–544, 2020.)
2. A Multidrog rezisztencia Aktivitási Faktor (MAF) rutindiagnosztikai alkalmazásával lehetővé tettük, hogy a limfómával diagnosztizált kutyák kezelése során egyszerűen mérjük és igazoljuk a Pgp által előidézett rezisztencia kialakulását, amely gyakran a kezelés sikertelenségét eredményezi.
3. Két kutya limfóma eset tanulmányozása közben sikerült a kemoterápiás kezelés során több mintavételi időpontban is vizsgálni a Pgp aktivitás változását és megfigyelni egy esettanulmányban, hogy ez a folyamat reverzibilis volt a gyógyszerszünetnek köszönhetően.
4. Létrehoztunk egy *in vitro* modellrendszert, melyben nem a klasszikus folyamatos szelekciós nyomás alatt tartott és ezáltal rezisztenssé vált tumorsejtekkel dolgoztunk. A klinikumban a kemoterápiás szerek alkalmazásához hasonló módon alakítottuk ki az egér és kutya rezisztens tumorsejteket, így lehetőségünk nyílt a rezisztencia *in vitro* tanulmányozására és a probléma megoldására új stratégiákat keresni.
5. Bizonyítottuk *in vitro* is, hogy a rezisztencia kialakulása visszafordítható és a gyógyszerszünet képes ideiglenesen a Pgp aktivitást csökkenteni.
6. A COX-2 gátlószer panelje (celecoxib, firocoxib, meloxicam, mavacoxib) közül a celecoxibról először sikerült bizonyítani, hogy doxorubicinnal kombinálva képes az MDR kialakulásának megelőzésére egér és kutya limfóma sejteken egyaránt. Továbbá az általunk kialakított rezisztenssé tett tumorsejteken is sikerült a Pgp aktivitást csökkenteni celecoxib kezeléssel. Megállapítottuk, hogy a hatást nem a Pgp közvetlen gátlásán keresztül fejt ki és nem a doxorubicin toxicitásának növelésével éri el.

2-6-os pontban szereplő eredmények nagy része a Kurai 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. cikkben került bemutatásra.

## 9. Irodalom

- Abbasi, M., Lavasanifar, A. és Uludag, H.: **Recent attempts at RNAi-mediated P-glycoprotein downregulation for reversal of multidrug resistance in cancer**, *Med Res Rev.*, 33. 33–53, 2013.
- Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L. és Chang, G.: **Structure of P-glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding**, *Science.*, 323. 1718–1722, 2009.
- Angelo, G., Cronin, K. és Keys, D.: **Comparison of combination l-asparaginase plus CHOP or modified MOPP treatment protocols in dogs with multi-centric T-cell or hypercalcaemic lymphoma**, *J Small Anim Pract.*, 60. 430–437, 2019.
- Ansari, L., Shiehzadeh, F., Taherzadeh, Z., Nikoofal-Sahlabadi, S., Momtazi-Borojeni, A. A., Sahebkar, A. és Eslami, S.: **The most prevalent side effects of pegylated liposomal doxorubicin monotherapy in women with metastatic breast cancer: a systematic review of clinical trials**, *Cancer Gene Ther.*, 24. 189–193, 2017.
- Aresu, L., Aricò, A., Ferraresso, S., Martini, V., Comazzi, S., Riondato, F., Giantin, M., Dacasto, M., Guadagnin, E., Frayssinet, P., Rouquet, N., Drigo, M. és Marconato, L.: **Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma**, *Vet J.*, 200. 318–324, 2014.
- Arico, S., Patingre, S., Bauvy, C., Gane, P., Barbat, A., Codogno, P. és Ogier-Denis, E.: **Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line**, *J Biol Chem.*, 277. 27613–27621, 2002.
- Asproni, P., Vignoli, M., Cancedda, S., Millanta, F., Terragni, R. és Poli, A.: **Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in normal, hyperplastic and neoplastic canine lymphoid tissues**, *J Comp Pathol.*, 151. 35–41, 2014.
- Badowska-Kozakiewicz, A. M. és Malicka, E.: **Evaluation of immunohistochemical expression of P-glycoprotein in neoplasms of the mammary gland in bitches**, *Pol J Vet Sci.*, 13. 343–347, 2010.

- Baer, M. R., George, S. L., Dodge, R. K., O'Loughlin, K. L., Minderman, H., Caligiuri, M. A., Anastasi, J., Powell, B. L., Kolitz, J. E., Schiffer, C. A., Bloomfield, C. D. és Larson, R. A.: **Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720**, *Blood.*, 100. 1224–1232, 2002.
- Barenholz, Y.: **Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned**, *J Control Release.*, 160. 117–134, 2012.
- Barton, S., Hawkes, E. A., Wotherspoon, A. és Cunningham, D.: **Are We Ready To Stratify Treatment for Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using Molecular Hallmarks?**, *Oncologist.*, 17. 1562–1573, 2012.
- Batrakova, E. V., Li, S., Brynskikh, A. M., Sharma, A. K., Li, Y., Boska, M., Gong, N., Mosley, R. L., Alakhov, V. Y., Gendelman, H. E. és Kabanov, A. V.: **Effects of pluronic and doxorubicin on drug uptake, cellular metabolism, apoptosis and tumor inhibition in animal models of MDR cancers**, *J Control Release.*, 143. 290–301, 2010.
- Beaver, L. M., Strottner, G. és Klein, M. K.: **Response rate after administration of a single dose of doxorubicin in dogs with B-cell or T-cell lymphoma: 41 cases (2006-2008)**, *J Am Vet Med Assoc.*, 237. 1052–1055, 2010.
- Bergman, P. J., Ogilvie, G. K. és Powers, B. E.: **Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma**, *J Vet Intern Med.*, 10. 354–359, 1996.
- Bernard, M. P., Bancos, S., Sime, P. J. és Phipps, R. P.: **Targeting cyclooxygenase-2 in hematological malignancies: rationale and promise**, *Curr Pharm Des.*, 14. 2051–2060, 2008.
- Borst, P. és Elferink, R. O.: **Mammalian ABC transporters in health and disease**, *Annu Rev Biochem.*, 71. 537–592, 2002.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. és Jemal, A.: **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**, *CA Cancer J Clin.*, 68. 394–424, 2018.
- Brayfield, A.: *Martindale: The Complete Drug Reference*, Pharmaceutical Press, 2014.

- Brodsky, E. M., Maudlin, G. N., Lachowicz, J. L. és Post, G. S.: **Asparaginase and MOPP treatment of dogs with lymphoma**, J Vet Intern Med., 23. 578–584, 2009.
- Cabanes, A., Tzemach, D., Goren, D., Horowitz, A. T. és Gabizon, A.: **Comparative study of the antitumor activity of free doxorubicin and polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin in a mouse lymphoma model**, Clin Cancer Res., 4. 499–505, 1998.
- Canioni, D., Deau-Fischer, B., Taupin, P., Ribrag, V., Delarue, R., Bosq, J., Rubio, M.-T., Roux, D., Vasiliu, V., Varet, B., Brousse, N. és Hermine, O.: **Prognostic Significance of New Immunohistochemical Markers in Refractory Classical Hodgkin Lymphoma: A Study of 59 Cases**, PLOS ONE., 4. e6341, 2009.
- Cara, S. és Tannock, I. F.: **Retreatment of patients with the same chemotherapy: implications for clinical mechanisms of drug resistance**, Ann Oncol., 12. 23–27, 2001.
- CDC: **Leading Cancer Cases and Deaths, All Races/Ethnicities, Male and Female, 2017**, United States Cancer Statistics Data Visualizations. URL: <https://www.cdc.gov/nchs/products/databriefs/db355.htm>  
<https://gis.cdc.gov/cancer/USCS/DataViz.html> [Elérés március 2020].
- Chen, C., Shen, H. L., Yang, J., Chen, Q. Y. és Xu, W. L.: **Preventing chemoresistance of human breast cancer cell line, MCF-7 with celecoxib**, J Cancer Res Clin Oncol., 137. 9–17, 2011.
- Chou, T.-C.: **Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies**, Pharmacol Rev., 58. 621–681, 2006.
- Comazzi, S., Cozzi, M., Bernardi, S., Zanella, D. R., Aresu, L., Stefanello, D., Marconato, L. és Martini, V.: **Effects of pre-analytical variables on flow cytometric diagnosis of canine lymphoma: A retrospective study (2009-2015)**, Vet J., 232. 65–69, 2018.
- Comazzi, S. és Gelain, M. E.: **Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma**, Vet J., 188. 149–155, 2011.
- Costa, C., Soares, R., Reis-Filho, J. S., Leitão, D., Amendoeira, I. és Schmitt, F. C.: **Cyclooxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer**, J Clin Pathol., 55. 429–434, 2002.

- Culmsee, K., Simon, D., Mischke, R. és Nolte, I.: **Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma**, J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med., 48. 199–206, 2001.
- Cserepes, M., Türk, D., Tóth, S., Pape, V. F. S., Gaál, A., Gera, M., Szabó, J. E., Kucsma, N., Várady, G., Vértessy, B. G., Strel, C., Szabó, P. T., Tovari, J., Szoboszlai, N. és Szakács, G.: **Unshielding multidrug resistant cancer through selective iron depletion of P-glycoprotein expressing cells**, Cancer Res., 2019.
- Daenen, S., van der Holt, B., Verhoef, G. E. G., Löwenberg, B., Wijermans, P. W., Huijgens, P. C., van Marwijk Kooy, R., Schouten, H. C., Kramer, M. H. H., Ferrant, A., van den Berg, E., Steijaert, M. M. C., Verdonck, L. F. és Sonneveld, P.: **Addition of cyclosporin A to the combination of mitoxantrone and etoposide to overcome resistance to chemotherapy in refractory or relapsing acute myeloid leukaemia: a randomised phase II trial from HOVON, the Dutch-Belgian Haemato-Oncology Working Group for adults**, Leuk Res., 28. 1057–1067, 2004.
- Dano, K.: **Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells**, Biochim Biophys Acta., 323. 466–483, 1973.
- Dékay V., Karai E., Szakács G., Füredi A., Szebényi K. és Vajdovich P.: **Calcein assay for multidrug resistance predicts therapy response and survival rate in canine lymphoma patients**. *in preparation*, 2020.
- Dervisis, N. G., Dominguez, P. A., Sarbu, L., Newman, R. G., Cadile, C. D., Swanson, C. N. és Kitchell, B. E.: **Efficacy of temozolomide or dacarbazine in combination with an anthracycline for rescue chemotherapy in dogs with lymphoma**, J Am Vet Med Assoc., 231. 563–569, 2007.
- Dhaliwal, R. S., Kitchell, B. E., Ehrhart, E., Valli, V. E. és Dervisis, N. G.: **Clinicopathologic significance of histologic grade, pgg, and p53 expression in canine lymphoma**, J Am Anim Hosp Assoc., 49. 175–184, 2013.
- Dias, J. N. R., Aguiar, S. I., Pereira, D. M., André, A. S., Gano, L., Correia, J. D. G., Carrapiço, B., Rütgen, B., Malhó, R., Peleteiro, C., Goncalves, J., Rodrigues, C. M. P., Gil, S., Tavares, L. és Aires-da-Silva, F.: **The histone deacetylase inhibitor panobinostat is a potent antitumor agent in canine diffuse large B-cell lymphoma**, Oncotarget., 9. 28586–28598, 2018.



- Doré, M., Lanthier, I. és Sirois, J.: **Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors**, *Vet Pathol.*, 40. 207–212, 2003.
- Dunphy, C. H.: **Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology**, *Arch Pathol Lab Med.*, 128. 1004–1022, 2004.
- Ehrke, M. J.: **Immunomodulation in cancer therapeutics**, *Int Immunopharmacol.*, 3. 1105–1119, 2003.
- Fantappiè, O., Masini, E., Sardi, I., Raimondi, L., Bani, D., Solazzo, M., Vannacci, A. és Mazzanti, R.: **The MDR phenotype is associated with the expression of COX-2 and iNOS in a human hepatocellular carcinoma cell line**, *Hepatology.*, 35. 843–852, 2002.
- Fantappiè, O., Solazzo, M., Lasagna, N., Platini, F., Tessitore, L. és Mazzanti, R.: **P-glycoprotein mediates celecoxib-induced apoptosis in multiple drug-resistant cell lines**, *Cancer Res.*, 67. 4915–4923, 2007.
- Farinha, P. és Gascoyne, R. D.: **Helicobacter pylori and MALT lymphoma**, *Gastroenterology.*, 128. 1579–1605, 2005.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., Forman, D. és Bray, F.: **Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012**, *Eur J Cancer.*, 49. 1374–1403, 2013.
- Fisher, G. A., Lum, B. L., Hausdorff, J. és Sikic, B. I.: **Pharmacological considerations in the modulation of multidrug resistance**, *Eur J Cancer.*, 32A. 1082–1088, 1996.
- Fleming, J. M., Creevy, K. E. és Promislow, D. E. L.: **Mortality in north american dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death**, *J Vet Intern Med.*, 25. 187–198, 2011.
- Füredi, A., Szabó, P., Tóth, S., Cserepes, M., Hátori, L., Nagy, V., Karai, E., Vajdovich, P., Imre, T., Szabó, P., Szüts, D., Tóvári, J. és Szakács, G.: **Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer**, *Journal of Controlled Release.*, 261. 287–296, 2017.

- Füredi A., Tóth S., Hámori L., Nagy V., Tóvári J. és Szakács G.: **Állatmodellek szerepe a multidrogrezisztens tumorokat célzó kemoterápia fejlesztésében**, Magyar Onkológia., 8, 2015.
- Füredi, A., Tóth, S., Szebényi, K., Pape, V. F. S., Türk, D., Kucsma, N., Cervenak, L., Tóvári, J. és Szakács, G.: **Identification and Validation of Compounds Selectively Killing Resistant Cancer: Delineating Cell Line-Specific Effects from P-Glycoprotein-Induced Toxicity**, Mol Cancer Ther., 16. 45–56, 2017.
- Gallouet, A.-S., Travert, M., Bresson-Bepoldin, L., Guilloton, F., Pangault, C., Caulet-Maugendre, S., Lamy, T., Tarte, K. és Guillaudeux, T.: **COX-2-independent effects of celecoxib sensitize lymphoma B cells to TRAIL-mediated apoptosis**, Clin Cancer Res., 20. 2663–2673, 2014.
- Gameiro, M., Silva, R., Rocha-Pereira, C., Carmo, H., Carvalho, F., Bastos, M. de L. és Remião, F.: **Cellular Models and In Vitro Assays for the Screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP**, Molecules., 22. 2017.
- Ginn, P. E.: **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. és Wojtyś, P.: **Experiences of cancer patients in Poland throughout diagnosis and treatment**, Eur J Cancer Care (Engl)., 26. 2017.
- Goldman, A. P., Williams, C. S., Sheng, H., Lamps, L. W., Williams, V. P., Pairet, M., Morrow, J. D. és DuBois, R. N.: **Meloxicam inhibits the growth of colorectal cancer cells**, Carcinogenesis., 19. 2195–2199, 1998.
- Goldman, B.: **Multidrug resistance: can new drugs help chemotherapy score against cancer?**, J Natl Cancer Inst., 95. 255–257, 2003.
- Gottesman, M. M. és Ambudkar, S. V.: **Overview: ABC transporters and human disease**, J Bioenerg Biomembr., 33. 453–458, 2001.
- Gottesman, M. M., Fojo, T. és Bates, S. E.: **Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters**, Nat Rev Cancer., 2. 48–58, 2002.
- Hahn, W. C. és Weinberg, R. A.: **Modelling the molecular circuitry of cancer**, Nat Rev Cancer., 2. 331–341, 2002.

- Hanahan, D. és Weinberg, R. A.: **The Hallmarks of Cancer**, Cell., 100. 57–70, 2000.
- Hanahan, D. és Weinberg, R. A.: **Hallmarks of Cancer: The Next Generation**, Cell., 144. 646–674, 2011.
- Harker, W. G. és Sikic, B. I.: **Multidrug (pleiotropic) resistance in doxorubicin-selected variants of the human sarcoma cell line MES-SA**, Cancer Res., 45. 4091–4096, 1985.
- Hayes, H. M., Tarone, R. E., Cantor, K. P., Jessen, C. R., McCurnin, D. M. és Richardson, R. C.: **Case-control study of canine malignant lymphoma: positive association with dog owner's use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides**, J Natl Cancer Inst., 83. 1226–1231, 1991.
- Hegedus, C., Ozvegy-Laczka, C., Apáti, A., Magócsi, M., Németh, K., Orfi, L., Kéri, G., Katona, M., Takáts, Z., Váradi, A., Szakács, G. és Sarkadi, B.: **Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties**, Br J Pharmacol., 158. 1153–1164, 2009.
- Heike, Y., Hamada, H., Inamura, N., Sone, S., Ogura, T. és Tsuruo, T.: **Monoclonal anti-P-glycoprotein antibody-dependent killing of multidrug-resistant tumor cells by human mononuclear cells**, Jpn J Cancer Res., 81. 1155–1161, 1990.
- Hifumi, T., Miyoshi, N., Kawaguchi, H., Nomura, K. és 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. 665–668, 2010.
- Higginbotham, M. L., McCaw, D. L., Roush, J. K., Nietfeld, J. C., Wilkerson, M. J., Reeds, K. és Burr, D.: **Intermittent single-agent doxorubicin for the treatment of canine B-cell lymphoma**, J Am Anim Hosp Assoc., 49. 357–362, 2013.
- Holló, Z., Homolya, L., Davis, C. W. és Sarkadi, B.: **Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter**, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes., 1191. 384–388, 1994.
- Homolya, L., Holló, M., Müller, M., Mechetner, E. B. és Sarkadi, B.: **A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells**, Br J Cancer., 73. 849–855, 1996.

- Höllt, V., Kouba, M., Dietel, M. és Vogt, G.: **Stereoisomers of calcium antagonists which differ markedly in their potencies as calcium blockers are equally effective in modulating drug transport by P-glycoprotein**, *Biochem Pharmacol.*, 43. 2601–2608, 1992.
- Hurst, E. A., Pang, L. Y. és Argyle, D. J.: **The selective cyclooxygenase-2 inhibitor mavacoxib (Trocoxil) exerts anti-tumour effects in vitro independent of cyclooxygenase-2 expression levels**, *Vet Comp Oncol.*, 17. 194–207, 2019.
- Hussey, H. J. és Tisdale, M. J.: **Effect of the specific cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam on tumour growth and cachexia in a murine model**, *Int J Cancer.*, 87. 95–100, 2000.
- Ito, D., Brewer, S., Modiano, J. F. és Beall, M. J.: **Development of a novel anti-canine CD20 monoclonal antibody with diagnostic and therapeutic potential**, *Leuk Lymphoma.*, 56. 219–225, 2015.
- Jain, S., Aresu, L., Comazzi, S., Shi, J., Worrall, E., Clayton, J., Humphries, W., Hemmington, S., Davis, P., Murray, E., Limeneh, A. A., Ball, K., Ruckova, E., Muller, P., Vojtesek, B., Fahraeus, R., Argyle, D. és Hupp, T. R.: **The Development of a Recombinant scFv Monoclonal Antibody Targeting Canine CD20 for Use in Comparative Medicine**, *PLoS ONE.*, 11. e0148366, 2016.
- Jeney A. és Kralovánszky J.: **Onkofarmakológia**, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2009.
- Jiang, H., Zhu, M., Li, Y. és Li, Q.: **Association between EGFR exon 19 or exon 21 mutations and survival rates after first-line EGFR-TKI treatment in patients with non-small cell lung cancer**, *Mol Clin Oncol.*, 11. 301–308, 2019.
- Johnson, A. J., Hsu, A.-L., Lin, H.-P., Song, X. és Chen, C.-S.: **The cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks**, *Biochem J.*, 366. 831–837, 2002.
- Juliano, R. L. és Ling, V.: **A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants**, *Biochim Biophys Acta.*, 455. 152–162, 1976.
- Kantarjian, H., O'Brien, S., Jabbour, E., Garcia-Manero, G., Quintas-Cardama, A., Shan, J., Rios, M. B., Ravandi, F., Faderl, S., Kadia, T., Borthakur, G., Huang, X., Champlin, R., Talpaz, M. és Cortes, J.: **Improved survival in chronic myeloid leukemia since the**

- introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience**, *Blood.*, 119. 1981–1987, 2012.
- Karászi, E., Jakab, K., Homolya, L., Szakács, G., Holló, Z., Telek, B., Kiss, A., Rejtő, L., Nahajevszky, S., Sarkadi, B. és 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.
- Katz, R. L., Wojcik, E. M., el-Naggar, A. K., Ordonez, N. G. és Johnston, D. A.: **Proliferation markers in non-Hodgkin's lymphoma. A comparative study between cytophotometric quantitation of Ki-67 and flow cytometric proliferation index on fine needle aspirates**, *Anal Quant Cytol Histol.*, 15. 179–186, 1993.
- Kiupel, M., Teske, E. és Bostock, D.: **Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma**, *Vet Pathol.*, 36. 292–300, 1999.
- Knapp, D. W., Henry, C. J., Widmer, W. R., Tan, K. M., Moore, G. E., Ramos-Vara, J. A., Lucroy, M. D., Greenberg, C. B., Greene, S. N., Abbo, A. H., Hanson, P. D., Alva, R. és Bonney, P. L.: **Randomized trial of cisplatin versus firocoxib versus cisplatin/firocoxib in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder**, *J Vet Intern Med.*, 27. 126–133, 2013.
- Knoechel, B., Roderick, J. E., Williamson, K. E., Zhu, J., Lohr, J. G., Cotton, M. J., Gillespie, S. M., Fernandez, D., Ku, M., Wang, H., Piccioni, F., Silver, S. J., Jain, M., Pearson, D., Kluk, M. J., Ott, C. J., Shultz, L. D., Brehm, M. A., Greiner, D. L., Gutierrez, A., Stegmaier, K., Kung, A. L., Root, D. E., Bradner, J. E., Aster, J. C., Kelliher, M. A. és Bernstein, B. E.: **An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia**, *Nat Genet.*, 46. 364–370, 2014.
- Knottenbelt, C., Chambers, G., Gault, E. és Argyle, D. J.: **The in vitro effects of piroxicam and meloxicam on canine cell lines**, *J Small Anim Pract.*, 47. 14–20, 2006.
- Knudsen, J. F., Carlsson, U., Hammarström, P., Sokol, G. H. és Cantilena, L. R.: **The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent inhibitor of human carbonic anhydrase II**, *Inflammation.*, 28. 285–290, 2004.
- Kopper, L. és Tímár, J.: **Molekuláris onkológia**, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2007.

- Kosmidis, P., Mankel, B., Fend, F. és Adam, P.: **The t(14;18) translocation is absent from endothelial and follicular dendritic cells of follicular lymphoma (FL) and shows heterogeneous presence in preserved FL mantle zones**, *Diagn Pathol.*, 13. 2018.
- Krishna, R., de Jong, G. és Mayer, L. D.: **Pulsed exposure of SDZ PSC 833 to multidrug resistant P388/ADR and MCF7/ADR cells in the absence of anticancer drugs can fully restore sensitivity to doxorubicin**, *Anticancer Res.*, 17. 3329–3334, 1997.
- Kulp, S. K., Yang, Y.-T., Hung, C.-C., Chen, K.-F., Lai, J.-P., Tseng, P.-H., Fowble, J. W., Ward, P. J. és Chen, C.-S.: **3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells**, *Cancer Res.*, 64. 1444–1451, 2004.
- Kurata, T., Tamura, K., Kaneda, H., Nogami, T., Uejima, H., Asai Go, G. o, Nakagawa, K. és Fukuoka, M.: **Effect of re-treatment with gefitinib („Iressa”, ZD1839) after acquisition of resistance**, *Ann Oncol.*, 15. 173–174, 2004.
- Lavalle, G. E., De Campos, C. B., Bertagnolli, A. C. és Cassali, G. D.: **Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors**, *In Vivo.*, 26. 375–379, 2012.
- Lee, J. J., Hughes, C. S., Fine, R. L. és Page, R. L.: **P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance**, *Cancer.*, 77. 1892–1898, 1996.
- Lee, J.-Y., Tanabe, S., Shimohira, H., Kobayashi, Y., Oomachi, T., Azuma, S., Ogihara, K. és Inokuma, H.: **Expression of cyclooxygenase-2, P-glycoprotein and multi-drug resistance-associated protein in canine transitional cell carcinoma**, *Res Vet Sci.*, 83. 210–216, 2007.
- Libby, E. és Hromas, R.: **Dismounting the MDR horse**, *Blood.*, 116. 4037–4038, 2010.
- Lin, J. H. és Yamazaki, M.: **Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications**, *Clin Pharmacokinet.*, 42. 59–98, 2003.
- List, A. F., Kopecky, K. J., Willman, C. L., Head, D. R., Persons, D. L., Slovak, M. L., Dorr, R., Karanes, C., Hynes, H. E., Doroshow, J. H., Shurafa, M. és Appelbaum, F. R.: **Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study**, *Blood.*, 98. 3212–3220, 2001.

- Liu, B., Qu, L. és Tao, H.: **Cyclo-oxygenase 2 up-regulates the effect of multidrug resistance**, *Cell Biol Int.*, 34. 21–25, 2009.
- Liu, B., Qu, L. és Yan, S.: **Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity**, *Cancer Cell Int.*, 15. 106, 2015.
- Maekawa, N., Konnai, S., Takagi, S., Kagawa, Y., Okagawa, T., Nishimori, A., Ikebuchi, R., Izumi, Y., Deguchi, T., Nakajima, C., Kato, Y., Yamamoto, K., Uemura, H., Suzuki, Y., Murata, S. és Ohashi, K.: **A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma**, *Sci Rep.*, 7. 8951, 2017.
- Mann, B. S., Johnson, J. R., He, K., Sridhara, R., Abraham, S., Booth, B. P., Verbois, L., Morse, D. E., Jee, J. M., Pope, S., Harapanhalli, R. S., Dagher, R., Farrell, A., Justice, R. és Pazdur, R.: **Vorinostat for treatment of cutaneous manifestations of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma**, *Clin Cancer Res.*, 13. 2318–2322, 2007.
- Marconato, L., Martini, V., Aresu, L., Sampaolo, M., Valentini, F., Rinaldi, V. és Comazzi, S.: **Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine large B cell lymphoma: prognostic significance and proposal of a cut-off value**, *Vet J.*, 197. 776–781, 2013.
- Mealey, K. L., Bentjen, S. A., Gay, J. M. és Cantor, G. H.: **Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene**, *Pharmacogenetics.*, 11. 727–733, 2001.
- Meng, X., Zhang, Q., Zheng, G., Pang, R., Hua, T., Yang, S. és Li, J.: **Doxorubicin combined with celecoxib inhibits tumor growth of medullary thyroid carcinoma in xenografted mice**, *Oncol Lett.*, 7. 2053–2058, 2014.
- Merlo, D. F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., Ratto, A., Sambucco, P. L., Sestito, V., Tanara, G. és Bocchini, V.: **Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy**, *J Vet Intern Med.*, 22. 976–984, 2008.
- Milman, G., Smith, K. C. és Erles, K.: **Serological detection of Epstein-Barr virus infection in dogs and cats**, *Vet Microbiol.*, 150. 15–20, 2011.

- Miranda-Filho, A., Piñeros, M., Znaor, A., Marcos-Gragera, R., Steliarova-Foucher, E. és Bray, F.: **Global patterns and trends in the incidence of non-Hodgkin lymphoma**, *Cancer Causes Control.*, 30. 489–499, 2019.
- Miyoshi, N., Tojo, E., Oishi, A., Fujiki, M., Misumi, K., Sakamoto, H., Kameyama, K., Shimizu, T. és 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.
- Mochel, J. P., Ekker, S. C., Johannes, C. M., Jergens, A. E., Allenspach, K., Bourgois-Mochel, A., Knouse, M., Benzekry, S., Wierson, W., LeBlanc, A. K. és Kenderian, S. S.: **CAR T Cell Immunotherapy in Human and Veterinary Oncology: Changing the Odds Against Hematological Malignancies**, *AAPS J.*, 21. 50, 2019.
- Modiano, Jamie F. és Breen, M.: **Shared pathogenesis of human and canine tumors - an inextricable link between cancer and evolution**, *Cancer Ther.*, 239–246, 2008.
- Mohammed, S. I., Khan, K. N. M., Sellers, R. S., Hayek, M. G., DeNicola, D. B., Wu, L., Bonney, P. L. és Knapp, D. W.: **Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer**, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, 70. 479–483, 2004.
- Moore, A. S., Leveille, C. R., Reimann, K. A., Shu, H. és Arias, I. M.: **The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance**, *Cancer Invest.*, 13. 475–479, 1995.
- Morizono, K., Xie, Y., Ringpis, G.-E., Johnson, M., Nassanian, H., Lee, B., Wu, L. és Chen, I. S. Y.: **Lentiviral vector retargeting to P-glycoprotein on metastatic melanoma through intravenous injection**, *Nat Med.*, 11. 346–352, 2005.
- Murakami, A., Shibahashi, A., Iwasaki, R., Kawabe, M., Murakami, M., Sakai, H. és Mori, T.: **Combination Chlorambucil/Firocoxib or Chlorambucil/Prednisolone Treatment for Inflammatory Colorectal Polyps in Miniature Dachshunds**, *J Am Anim Hosp Assoc.*, 54. 161–166, 2018.
- Nakaichi, M., Takeshita, Y., Okuda, M., Nakamoto, Y., Itamoto, K., Une, S., Sasaki, N., Kadosawa, T., Takahashi, T. és Taura, Y.: **Expression of the MDR1 gene and P-glycoprotein in canine mast cell tumor cell lines**, *J Vet Med Sci.*, 69. 111–115, 2007.



- NANETS és ENETS: *A Patológiai Szakmai Kollégium ajánlása a gastrointestinális neuroendokrin tumorok leleteinek minimális tartalmára*, Magyar Onkológia., 55. 53–54, 2011.
- Nemoto, Y., Shosu, K., Okuda, M., Noguchi, S. és Mizuno, T.: **Development and characterization of monoclonal antibodies against canine PD-1 and PD-L1**, Vet Immunol Immunopathol., 198. 19–25, 2018.
- O’Shaughnessy, J. A.: **Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer**, Clin Breast Cancer., 4. 318–328, 2003.
- Page, R. L., Hughes, C. S., Huyen, S., Sagris, J. és Trogdon, M.: **Modulation of P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in canine cell lines**, Anticancer Res., 20. 3533–3538, 2000.
- Pang, L. Y., Argyle, S. A., Kamida, A., Morrison, K. O. és Argyle, D. J.: **The long-acting COX-2 inhibitor mavacoxib (Trocoxil™) has anti-proliferative and pro-apoptotic effects on canine cancer cell lines and cancer stem cells in vitro**, BMC Vet Res., 10. 184, 2014.
- Panjwani, M. K., Atherton, M. J., MaloneyHuss, M. A., Haran, K. P., Xiong, A., Gupta, M., Kulikovsaya, I., Lacey, S. F. és Mason, N. J.: **Establishing a model system for evaluating CAR T cell therapy using dogs with spontaneous diffuse large B cell lymphoma**, Oncoimmunology., 9. 1676615, 2020.
- Pasechnikov, V., Chukov, S., Fedorov, E., Kikuste, I. és Leja, M.: **Gastric cancer: Prevention, screening and early diagnosis**, World J Gastroenterol., 20. 13842–13862, 2014.
- Patel, V. A., Dunn, M. J. és Sorokin, A.: **Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2**, J Biol Chem., 277. 38915–38920, 2002.
- Petterino, C., Rossetti, E., Bertocello, D., Martini, M., Zappulli, V., Bargelloni, L. és Castagnaro, M.: **Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (clone C494) in canine mammary gland tumours**, J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med., 53. 174–178, 2006.
- Pisco, A. O., Brock, A., Zhou, J., Moor, A., Mojtahedi, M., Jackson, D. és Huang, S.: **Non-Darwinian dynamics in therapy-induced cancer drug resistance**, Nat Commun., 4. 2467, 2013.

- Pozarowski, P. és Darzynkiewicz, Z.: **Analysis of cell cycle by flow cytometry**, *Methods Mol Biol.*, 281. 301–311, 2004.
- Rizzo, M. T.: **Cyclooxygenase-2 in oncogenesis**, *Clin Chim Acta.*, 412. 671–687, 2011.
- Roy, K. R., Reddy, G. V., Maitreyi, L., Agarwal, S., Achari, C., Vali, S. és Reddanna, P.: **Celecoxib inhibits MDR1 expression through COX-2-dependent mechanism in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line**, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 65. 903–911, 2010.
- Rütgen, B. C., Hammer, S. E., Gerner, W., Christian, M., de Arespachaga, A. G., Willmann, M., Kleiter, M., Schwendenwein, I. és Saalmüller, A.: **Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously occurring diffuse large cell lymphoma**, *Leuk Res.*, 34. 932–938, 2010.
- Saba, C. F., Clifford, C., Burgess, K., Phillips, B., Vail, D., Wright, Z., Curran, K., Fan, T., Elmslie, R., Post, G. és Thamm, D.: **Rabacfosadine for naïve canine intermediate to large cell lymphoma: Efficacy and adverse event profile across three prospective clinical trials**, *Vet Comp Oncol.*, 2020.
- Schabel, F. M., Skipper, H. E., Trader, M. W., Laster, W. R., Griswold, D. P. és Corbett, T. H.: **Establishment of cross-resistance profiles for new agents**, *Cancer Treat Rep.*, 67. 905–922, 1983.
- Schiffman, J. D. és Breen, M.: **Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer**, *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci.*, 370. 2015.
- Schinkel, A. H., Smit, J. J., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A., van der Valk, M. A., Robanus-Maandag, E. C. és te Riele, H. P.: **Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs**, *Cell.*, 77. 491–502, 1994.
- Schleis, S. E., LeBlanc, A. K., Neilsen, N. R. és 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.
- See, Y. P., Carlsen, S. A., Till, J. E. és Ling, V.: **Increased drug permeability in Chinese hamster ovary cells in the presence of cyanide**, *Biochim Biophys Acta.*, 373. 242–252, 1974.

- Seelig, D. M., Avery, A. C., Ehrhart, E. J. és Linden, M. A.: **The Comparative Diagnostic Features of Canine and Human Lymphoma**, Vet Sci., 3. 2016.
- Selliah, N., Eck, S., Green, C., Oldaker, T., Stewart, J., Vitaliti, A. és Litwin, V.: **Flow Cytometry Method Validation Protocols**, Current Protocols in Cytometry., 87. e53, 2019.
- Shah, K. és Rawal, R. M.: **Genetic and Epigenetic Modulation of Drug Resistance in Cancer: Challenges and Opportunities**, Curr Drug Metab., 20. 1114–1131, 2019.
- Sharma, S. V., Lee, D. Y., Li, B., Quinlan, M. P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M. A., Wong, K.-K., Brandstetter, K., Wittner, B., Ramaswamy, S., Classon, M. és Settleman, J.: **A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations**, Cell., 141. 69–80, 2010.
- Shen, D. W., Cardarelli, C., Hwang, J., Cornwell, M., Richert, N., Ishii, S., Pastan, I. és Gottesman, M. M.: **Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins**, J Biol Chem., 261. 7762–7770, 1986.
- Shukla, S., Robey, R. W., Bates, S. E. és Ambudkar, S. V.: **Sunitinib (Sutent, SU11248), a small-molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, blocks function of the ATP-binding cassette (ABC) transporters P-glycoprotein (ABCB1) and ABCG2**, Drug Metab Dispos., 37. 359–365, 2009.
- Singh, S.: **Liposome encapsulation of doxorubicin and celecoxib in combination inhibits progression of human skin cancer cells**, Int J Nanomedicine., 13. 11–13, 2018.
- Sokołowska, J., Urbańska, K., Giziński, S., Zabielska, K. és Lechowski, R.: **Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in various subtypes of canine lymphomas**, Pol J Vet Sci., 18. 123–130, 2015.
- Stasiłojć, G., Felberg, A., Urban, A., Kowalska, D., Ma, S., Blom, A. M., Lundin, J., Österborg, A. és Okrój, M.: **Calcein release assay as a method for monitoring serum complement activity during monoclonal antibody therapy in patients with B-cell malignancies**, J Immunol Methods., 476. 112675, 2020.

- Steingold, S. F., Sharp, N. J., McGahan, M. C., Hughes, C. S., Dunn, S. E. és Page, R. L.: **Characterization of canine MDR1 mRNA: its abundance in drug resistant cell lines and in vivo**, *Anticancer Res.*, 18. 393–400, 1998.
- Su, L., Cheng, Y. C., Lee, W. M., Zhang, M., Yang, F., Zhao, B., Han, D., Liu, Y. és Hu, D.: **Abcb1a and Abcb1b genes function differentially in blood–testis barrier dynamics in the rat**, *Cell Death Dis.*, 8. e3038, 2017.
- Sui, H., Zhou, S., Wang, Y., Liu, X., Zhou, L., Yin, P., Fan, Z. és Li, Q.: **COX-2 contributes to P-glycoprotein-mediated multidrug resistance via phosphorylation of c-Jun at Ser63/73 in colorectal cancer**, *Carcinogenesis.*, 32. 667–675, 2011.
- Syed, S. B., Arya, H., Fu, I.-H., Yeh, T.-K., Periyasamy, L., Hsieh, H.-P. és Coumar, M. S.: **Targeting P-glycoprotein: Investigation of piperine analogs for overcoming drug resistance in cancer**, *Scientific Reports.*, 7. 7972, 2017.
- Szakács, G., Annereau, J.-P., Lababidi, S., Shankavaram, U., Arciello, A., Bussey, K. J., Reinhold, W., Guo, Y., Kruh, G. D., Reimers, M., Weinstein, J. N. és Gottesman, M. M.: **Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells**, *Cancer Cell.*, 6. 129–137, 2004.
- Szakács, G., Hall, M. D., Gottesman, M. M., Boumendjel, A., Kachadourian, R., Day, B. J., Baubichon-Cortay, H. és Di Pietro, A.: **Targeting the Achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance**, *Chem Rev.*, 114. 5753–5774, 2014.
- Szakács, G., Jakab, K., Antal, F. és Sarkadi, B.: **Diagnostics of multidrug resistance in cancer**, *Pathol Oncol Res.*, 4. 251–257, 1998.
- Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C. és Gottesman, M. M.: **Targeting multidrug resistance in cancer**, *Nat Rev Drug Discov.*, 5. 219–234, 2006.
- Szerémy, P., Tauberné Jakab, K., Baráth, S., Apjok, A., Filkor, K., Holló, Z., Márki-Zay, J., Kappelmayer, J., Sipka, S., Krajcsi, P. és Toldi, G.: **Determination of Reference Values of MDR-ABC Transporter Activities in CD3+ Lymphocytes of Healthy Volunteers Using a Flow Cytometry Based Method**, *Cytometry B Clin Cytom.*, 96. 469–474, 2019.
- Talmadge, J. E., Singh, R. K., Fidler, I. J. és Raz, A.: **Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer**, *Am J Pathol.*, 170. 793–804, 2007.

- Tamura, D., Saito, T., Murata, K., Kawashima, M. és Asano, R.: **Celecoxib exerts antitumor effects in canine mammary tumor cells via COX-2-independent mechanisms**, *Int J Oncol.*, 46. 1393–1404, 2015.
- Tasca, S., Carli, E., Caldin, M., Menegazzo, L., Furlanello, T. és Gallego, L. S.: **Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002-2006)**, *Vet Clin Pathol.*, 38. 2–12, 2009.
- Teske, E., van Heerde, P., Rutteman, G. R., Kurzman, I. D., Moore, P. F. és MacEwen, E. G.: **Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs**, *J Am Vet Med Assoc.*, 205. 1722–1728, 1994.
- Thalheim, L., Williams, L. E., Borst, L. B., Fogle, J. E. és Suter, S. E.: **Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements**, *J Vet Intern Med.*, 27. 1509–1516, 2013.
- Thomas, R., Smith, K. C., Ostrander, E. A., Galibert, F. és Breen, M.: **Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes**, *Br J Cancer.*, 89. 1530–1537, 2003.
- Torres-Collado, A. X. és Jazirehi, A. R.: **Overcoming Resistance of Human Non-Hodgkin's Lymphoma to CD19-CAR CTL Therapy by Celecoxib and Histone Deacetylase Inhibitors**, *Cancers (Basel).*, 10. 2018.
- Totzke, G., Schulze-Osthoff, K. és Jänicke, R. U.: **Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors sensitize tumor cells specifically to death receptor-induced apoptosis independently of COX-2 inhibition**, *Oncogene.*, 22. 8021–8030, 2003.
- Treggiari, E., Elliott, J. W., Baines, S. J. és Blackwood, L.: **Temozolomide alone or in combination with doxorubicin as a rescue agent in 37 cases of canine multicentric lymphoma**, *Vet Comp Oncol.*, 16. 194–201, 2018.
- Tulassay, Z. és Matolcsy, A.: **Az onkológia tankönyve**, Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió Kft., 2011.
- Tulpule, A., Espina, B. M., Berman, N., Buchanan, L. H., Smith, D. L., Sherrod, A., Dharmapala, D., Gee, C., Boswell, W. D., Nathwani, B. N., Welles, L. és Levine, A. M.: **Phase I/II trial of nonpegylated liposomal doxorubicin, cyclophosphamide,**

- vincristine, and prednisone in the treatment of newly diagnosed aggressive non-Hodgkin's lymphoma**, Clin Lymphoma Myeloma., 7. 59–64, 2006.
- Turek, M., LaDue, T., Looper, J., Nagata, K., Shiomitsu, K., Keyerleber, M., Buchholz, J., Gieger, T. és Hetzel, S.: **Multimodality treatment including ONCEPT for canine oral melanoma: A retrospective analysis of 131 dogs**, Vet Radiol Ultrasound., 2020.
- Türk, D., Hall, M. D., Chu, B. F., Ludwig, J. A., Fales, H. M., Gottesman, M. M. és Szakács, G.: **Identification of compounds selectively killing multidrug-resistant cancer cells**, Cancer Res., 69. 8293–8301, 2009.
- Ullman-Culleré, M. H. és Foltz, C. J.: **Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice**, Lab Anim Sci., 49. 319–323, 1999.
- Uozurmi, K., Nakaichi, M., Yamamoto, Y., Une, S. és Taura, Y.: **Development of multidrug resistance in a canine lymphoma cell line**, Res Vet Sci., 78. 217–224, 2005.
- Vail, D. M., Thamm, D. H. és Liptak, J. M.: **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology** - 6th Edition, Saunders. 2019.
- Vajdovich, P., Koltai, Z., Dékay, V., Kungl, K. és Harnos, A.: **Evaluation of Pgp (MDR1) immunohistochemistry in canine lymphoma - prognostic and clinical aspects**, Acta Vet Hung., 66. 309–328, 2018.
- Valli, V. E., Kass, P. H., San Myint, M. és Scott, F.: **Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival**, Vet Pathol., 50. 738–748, 2013.
- Valli, V. E., San Myint, M., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., Durham, A., Ehrhart, E. J., Johnson, Y., Jones, C., Kiupel, M., Labelle, P., Lester, S., Miller, M., Moore, P., Moroff, S., Roccabianca, P., Ramos-Vara, J., Ross, A., Scase, T., Tvedten, H. és Vernau, W.: **Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria**, Vet Pathol., 48. 198–211, 2011.
- van der Pol, M. A., Broxterman, H. J., Westra, G., Ossenkuppele, G. J. és Schuurhuis, G. J.: **Novel multiparameter flow cytometry assay using Syto16 for the simultaneous detection of early apoptosis and apoptosis-corrected P-glycoprotein function in clinical samples**, Cytometry B Clin Cytom., 55. 14–21, 2003.

- Visani, G. és Isidori, A.: **Nonpegylated liposomal doxorubicin in the treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma: where we stand**, *Expert Rev Anticancer Ther.*, 9. 357–363, 2009.
- Vonderheide, R. H. és June, C. H.: **A translational bridge to cancer immunotherapy: exploiting costimulation and target antigens for active and passive T cell immunotherapy**, *Immunol Res.*, 27. 341–356, 2003.
- Wang, X., Waschke, B. C., Woolaver, R. A., Chen, S. M. Y., Chen, Z. és Wang, J. H.: **HDAC inhibitors overcome immunotherapy resistance in B-cell lymphoma**, *Protein Cell.*, 2020.
- Ward, M. S.: **The use of flow cytometry in the diagnosis and monitoring of malignant hematological disorders**, *Pathology.*, 31. 382–392, 1999.
- Wattel, E., Solary, E., Hecquet, B., Caillot, D., Ifrah, N., Brion, A., Milpied, N., Janvier, M., Guerci, A., Rochant, H., Cordonnier, C., Dreyfus, F., Veil, A., Hoang-Ngoc, L., Stoppa, A. M., Gratecos, N., Sadoun, A., Tilly, H., Brice, P., Lioure, B., Desablens, B., Pignon, B., Abgrall, J. P., Leparrier, M. és Fenaux, P.: **Quinine improves results of intensive chemotherapy (IC) in myelodysplastic syndromes (MDS) expressing P-glycoprotein (PGP). Updated results of a randomized study. Groupe Français des Myélodysplasies (GFM) and Groupe GOELAMS**, *Adv Exp Med Biol.*, 457. 35–46, 1999.
- WHO: **Top 10 causes of death**, 2020  
[doi:/entity/gho/mortality\\_burden\\_disease/causes\\_death/top\\_10/en/index.html](https://doi.org/10.1039/c9mh00001a).
- Withrow, S., Vail, D. és Page, R.: **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology** - 5th Edition, Elsevier, USA, 2012.
- Working, P. K. és Dayan, A. D.: **Pharmacological-toxicological expert report. CAELYX. (Stealth liposomal doxorubicin HCl)**, *Hum Exp Toxicol.*, 15. 751–785, 1996.
- Wyld, L., Audisio, R. A. és Poston, G. J.: **The evolution of cancer surgery and future perspectives**, *Nat Rev Clin Oncol.*, 12. 115–124, 2015.
- Xu, H.-B., Shen, F.-M. és Lv, Q.-Z.: **Celecoxib enhanced the cytotoxic effect of cisplatin in chemo-resistant gastric cancer xenograft mouse models through a cyclooxygenase-2-dependent manner**, *Eur J Pharmacol.*, 776. 1–8, 2016.

- Yano, S., Nakataki, E., Ohtsuka, S., Inayama, M., Tomimoto, H., Edakuni, N., Kakiuchi, S., Nishikubo, N., Muguruma, H. és Sone, S.: **Retreatment of lung adenocarcinoma patients with gefitinib who had experienced favorable results from their initial treatment with this selective epidermal growth factor receptor inhibitor: a report of three cases**, *Oncol Res.*, 15. 107–111, 2005.
- Yoshida, H., Yoshimura, H., Matsuda, S., Yamamoto, S., Ohmori, M., Ohta, K., Ryoke, T., Itoi, H., Kiyoshima, T., Kobayashi, M. és Sano, K.: **Celecoxib suppresses lipopolysaccharide-stimulated oral squamous cell carcinoma proliferation in vitro and in vivo**, *Oncol Lett.*, 18. 5793–5800, 2019.
- Zandvliet, M.: **Canine lymphoma: a review**, *Vet Q.*, 36. 76–104, 2016.
- Zandvliet, M. M. J. M.: **Drug resistance in canine multicentric lymphoma**, Utrecht University, 2014.
- Zhang, J., Grubor, V., Love, C. L., Banerjee, A., Richards, K. L., Mieczkowski, P. A., Dunphy, C., Choi, W., Au, W. Y., Srivastava, G., Lugar, P. L., Rizzieri, D. A., Lagoo, A. S., Bernal-Mizrachi, L., Mann, K. P., Flowers, C., Naresh, K., Evens, A., Gordon, L. I., Czader, M., Gill, J. I., Hsi, E. D., Liu, Q., Fan, A., Walsh, K., Jima, D., Smith, L. L., Johnson, A. J., Byrd, J. C., Luftig, M. A., Ni, T., Zhu, J., Chadburn, A., Levy, S., Dunson, D. és Dave, S. S.: **Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma**, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 110. 1398–1403, 2013.
- Zhang, P., He, D., Song, E., Jiang, M. és Song, Y.: **Celecoxib enhances the sensitivity of non-small-cell lung cancer cells to radiation-induced apoptosis through downregulation of the Akt/mTOR signaling pathway and COX-2 expression**, *PLoS ONE.*, 14. e0223760, 2019.
- Zhang, S., Guo, N., Wan, G., Zhang, T., Li, C., Wang, Yongfei, Wang, Yinsong és Liu, Y.: **pH and redox dual-responsive nanoparticles based on disulfide-containing poly( $\beta$ -amino ester) for combining chemotherapy and COX-2 inhibitor to overcome drug resistance in breast cancer**, *J Nanobiotechnology.*, 17. 109, 2019.
- Zrieki, A., Farinotti, R. és Buyse, M.: **Cyclooxygenase inhibitors down regulate P-glycoprotein in human colorectal Caco-2 cell line**, *Pharm Res.*, 25. 1991–2001, 2008.



Zrieki, A., Farinotti, R. és Buyse, M.: **Cyclooxygenase-2 inhibitors prevent trinitrobenzene sulfonic acid-induced P-glycoprotein up-regulation in vitro and in vivo**, Eur J Pharmacol., 636. 189–197, 2010.

## 10. A doktori kutatás eredményeinek közlései

### 10.1 Lektorált, impakt faktoralal bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk

Karai E., Dékay V., és Vajdovich P.: **Az áramlási citométer, mint a lymphoma diagnosztikájában alkalmazható eszköz az állatorvosi onkológiában**, MÁL, 142. 531–544, 2020.; IF (2019): 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

Füredi A., Szabényi K., Tóth S., Cserepes M., Hámori L., Nagy V., Karai E., Vajdovich P., Imre T., Szabó P., Szüts D., Tóvári J. és Szakács G.: **Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer**, Journal of Controlled Release, 261. 287–296, 2017.; IF (2017): 7.877

Dékay V.; Karai E.; Szakács G.; Füredi A.; Szabényi K.; Vajdovich P.: **Calcein Assay for Multidrug Resistance Predicts Therapy Response and Survival Rate in Canine Lymphoma Patients**, in Preparation. 2020.

### 10.2 Konferencia prezentációk

Karai Edina, Füredi András, Szakács Gergely, Vajdovich Péter: **Kutya limfómák drog rezisztenciájának kialakulása**, Akadémiai beszámoló, Klinikumok, 2015.

Füredi András, Szabényi Kornélia, Karai Edina, Vajdovich Péter, Szakács Gergely: **Drog rezisztencia kutyák, egerek és emberek daganataiban**, Akadémiai beszámoló, Klinikumok, 2015.

Karai Edina, Füredi András, Szakács Gergely és Vajdovich Péter: **Kutya-lymphomák drog-rezisztenciájának vizsgálata**, Akadémiai beszámoló, Klinikumok, 2016.

Dékay Valéria, Karai Edina, Verebélyi Tamás, Koltai Zsófia, Vajdovich Péter: **A multidrogrezisztencia fehérje-1 (MDR1) immunhisztokémiai és funkcionális vizsgálatának összehasonlítása lymphomás, emlődaganatos és mastocytomás kutyák vizsgálata során**, Akadémiai beszámolók, Klinikumok, 2016.

Edina Karai, András Füredi, Gergely Szakács, Péter Vajdovich: **Significance of the epigenetic regulation to inhibit the development of chemotherapy resistance**, Budapest Breast Think Tank Conference, 2016.

Karai Edina, Füredi András, Szabó Kornélia, Vajdovich Péter és Szakács Gergely: **Az epigenetikai szabályozás jelentősége a kemoterápia rezisztencia kifejlődésének megakadályozásában**, 46. Membrán-transzport Konferencia Sümeg, 2016.

Edina Karai, András Füredi, Kornélia Szabó, Gergely Szakács, Péter Vajdovich: **Significance of the epigenetic regulation to inhibit the development of chemotherapy resistance**, 1st Veterinary Oncology and Clinical Pathology Meeting Visegrád, 2016.

Edina Karai, András Füredi, Kornélia Szabó, Gergely Szakács, Péter Vajdovich: **Significance of the planned drug holiday in canine lymphoma treatment**, Veterinary Oncology and Clinical Pathology Congress, Nantes, 2016.

Karai Edina, Füredi András, Szabó Kornélia, Szakács Gergely és Vajdovich Péter: **Lehetőségek a kutya kemoterápia rezisztencia kialakulásának megakadályozására**, Akadémiai beszámolók, Klinikumok, 2017.

Edina Karai, András Füredi, Kornélia Szabó, Gergely Szakács, Péter Vajdovich: **Possibilities to inhibit the development of canine chemotherapy resistance**, ESVONC Congress Lyon, 2017.

Karai Edina, Connor Herst és Vajdovich Péter: **Áramlás citometriai analízis validálása kutya tumorok immunfenotipizálása során**, Akadémiai beszámolók, Klinikumok, 2018.

Karai Edina, Windt Tímea, Füredi András, Szabó Kornélia, Szakács Gergely és Vajdovich Péter: **Kemoterápiás vegyületek együttes hatásának vizsgálata egér és kutya lymphoma sejtvonalakon**, Akadémiai beszámolók, Klinikumok, 2018.

Edina Karai, Eszter Szendi, Kornélia Szabényi, András Füredi, Barbara Rütgen, Tímea Windt, Péter Vajdovich: ***In vitro* model system for the emergence of chemotherapy resistance with CLBL-1 cell line**, ESVONC Congress Las Palmas de Gran Canaria, 2018.

Karai Edina, Füredi András, Szabényi Kornélia, Szakács Gergely és Vajdovich Péter: **Kombinációs kemoterápia alkalmazása egér és kutya lymphoma sejtvonalon**, Akadémiai beszámolók, Klinikumok, 2019.

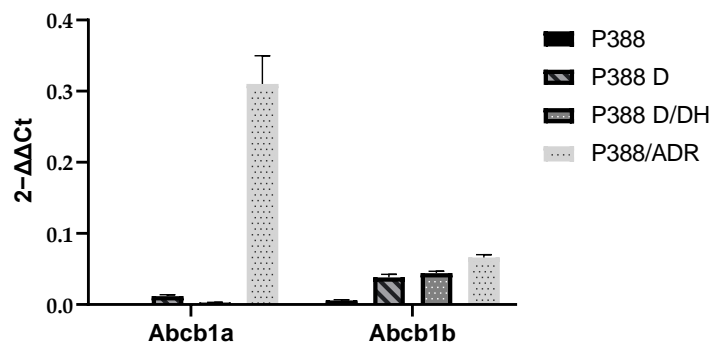
Edina Karai, András Füredi, Gergely Szakács, Kornélia Szabényi, Barbara Rütgen, Péter Vajdovich: **COX-2 inhibitors to overcome drug resistance on canine lymphoma cell line**, 2019 VCS Annual Conference, Houston, 2019.

Karai Edina, Füredi András, Szabényi Kornélia, Windt Tímea, Kucsma Nóra, Szakács Gergely és Vajdovich Péter: **A celecoxib hatásvizsgálata monoterápiában és doxorubicinnel kombinálva egér és kutya lymphoma sejtvonalon**, Akadémiai beszámolók, Klinikumok, 2020.

## 11. Melléklet

1. sz. melléklet: Az immunfenotípus vizsgálatban szereplő 35 limfómás kutya adatainak összefoglalása: fajtája, kora, MAF értéke, ivara, a vizsgálat kezdete, a kezelés, a stádium és alstádium meghatározása. MW: Madison-Wisconsin; L-CHOP: L-aszparagináz CHOP; DLBCL: Diffúz nagy B-sejtes; PTCL-NOS: Perifériás T-sejtes limfóma egyéb csoportba nem sorolható típusa.

Sorszám	MAF	Állat kora (év)	Fajta	Ivar	Vizsgálat kezdete	Kezelés	Stádium (alstádium)	szövettan
1	0,00	6	argentín dog	hím	2016.05.09	prednisolon	IIIb	DLBCL
2	0,00	8	golden retriever	nőstény	2016.06.13	CHOP	IVa	DLBCL
3	0,00	11	magyar vizsla	nőstény	2014.03.26	CHOP	IVa	DLBCL
4	0,19	8	keverék	hím	2016.09.15	CHOP	IVa	DLBCL
5	0,57	4	francia bulldog	hím	2016.09.23	CHOP	IVa	DLBCL
6	0,21	9	keverék	nőstény	2016.10.04	MW	IVb	DLBCL
7	0,00	11	keverék	nőstény	2017.01.19	CHOP	IVb	DLBCL
8	0,00	11	keverék	nőstény	2017.02.06	CHOP	IVa	DLBCL
9	0,00	4	keverék	nőstény	2017.04.25	MW	IVb	DLBCL
10	0,44	7	magyar vizsla	nőstény	2017.04.27	CHOP	Vb	DLBCL
11	0,16	3	labrador retriever	hím	2017.06.27	CHOP, rescue	Va	DLBCL
12	0,00	8	shar pei	hím	2017.09.20	nem kapott	III.a	DLBCL
13	0,17	5	labrador retriever	hím	2018.05.23	CHOP	Va	DLBCL
14	0,33	7	am staff terrier	hím	2018.09.17	1 vinkrisztin	IVb	DLBCL
15	0,31	6	golden retriever	nőstény	2018.11.05	CHOP	IVa	DLBCL
16	0,16	4	német juhász	hím	2018.11.12	CHOP	IVa	DLBCL
17	0,36	8	német juhász	nőstény	2018.11.26	CHOP	IVb	DLBCL
18	0,44	9,5	jack russel terrier	nőstény	2019.01.07	CHOP	Vb	DLBCL
19	0,4	7,5	jack russel terrier	hím	2019.02.05	CHOP	vb	DLBCL
20	0,4	7,5	west highland white terrier	nőstény	2019.02.21	L-CHOP	IVa	DLBCL
21	0,00	10,5	golden retriever	nőstény	2019.02.22	CHOP	IVb	DLBCL
22	0,26	11	magyar vizsla	hím	2019.04.02	CHOP	IVa	DLBCL
23	0,29	6	am. staffordshire terrier	hím	2018.03.21	CHOP	IVa	Folikuláris limfóma
24	0,00	8	bullmasztiff	nőstény	2017.01.04	CHOP	IVa	kis B-sejtes
25	0,67	4	dobermann	hím	2016.12.22	CHOP	IVa	nagy sejtes immunoblasztos
26	0,00	8,5	keverék	hím	2019.04.18	szteroid, Endoxan	IVb	PTCL-NOS
27	0,00	13,5	west highland white terrier	nőstény	2018.09.05	L-CHOP	IVa	PTCL-NOS
28	0,00	4	welsh corgi	hím	2018.12.03	CHOP	Va	PTCL-NOS
29	0,3	12,5	spániel keverék	hím	2019.08.05	COPA, MW	IVa	PTCL-NOS
30	0,31	8	shi-tzu	hím	2020.02.10	Meloxicam	IIIa	PTCL-NOS/T-zóna limfóma
31	0,16	9,5	husky	hím	2019.09.30	Meloxicam	Va	PTCL-NOS/T-zóna limfóma
32	0,04	11	yorkshire terrier	nőstény	2019.03.25	CHOP	IIIa	T sejt gazdag B sejtes limfóma
33	0,38	13	fox terrier	nőstény	2018.01.04	nem kapott	IVb	T zóna limfóma
34	0,25	7,5	keverék	nőstény	2018.11.08	prednisolon	IVa	T-limfoblasztos limfóma
35	0,23	8	angol cocker spániel	hím	2019.07.10	doxyciklin, lomustine	IVb	T-sejtes cutan limfóma



2. sz. melléklet: Az Abcb1a és Abcb1b gének mRNS expresszió szintje P388 szenzitív, DOX rezisztens (D) sejtekben, gyógyszer szünetet követően (DH) és P388/ADR sejteknél.

## 12. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Vajdovich Péternek, hogy irányította a munkámat és egyetemi tanulmányaim kezdete óta, már 8 éve számíthatok a segítségére, szakmai tapasztalatára, türelmére és kedvességére egyaránt. Neki köszönhetem, hogy biológusként megtaláltam a helyem az állatorvosi onkológia területén.

Köszönettel tartozom mentoromnak, Füredi Andrásnak, aki bevezetett az *in vitro* kísérletek rejtelmeibe, mindig felkeltette a tumorbiológia iránti érdeklődésemet, megtanította az *in vitro* kísérleti technikák nagy részét. Rengeteg szakmai tanácsot és segítséget nyújtott a tudományos munkáim elkészültében.

Köszönet illeti Szakács Gergelyt, aki biztosította a kutató helyet és lehetővé tette a laboratóriumi kísérleteim megvalósítását. Valamint köszönöm a tudományos munkáim elkészültéhez nyújtott sok kritikus, de nagyon hasznos tanácsát, melyek révén mindig kihoztam magamból a maximumot.

Köszönöm Szebényi Kornéliának, hogy megtanított az áramlási citométer használatára és ezáltal nemcsak sok kutatási anyagot tudtam gyűjteni, de a beteg kutyák és macskák számára diagnosztikai módszerként is elérhetővé tettük ezt a vizsgálatot.

Köszönöm opponenseimnek, Laczka Csillának és Mátis Gábornak az alapos és hasznos bírálati munkájukat, a gyorsaságukat és a segítségüket, melynek révén elkészülhetett a dolgozat végső változata.

Köszönöm az ÁHOK Kft., a Kórleltani és Onkológiai Tanszék, valamint a TTK EI valamennyi munkatársának a munkáimhoz nyújtott segítségét. Külön köszönet Dékay Valériának, aki az immunhisztokémiai vizsgálatok kivitelezésében segített, valamint Szendi Eszternek, aki mindig hű társam volt a konferenciákon a világ bármely pontján.

Köszönöm Lakatos Viktornak a rengeteg támogatását, aki nélkül a dolgozat nem jöhetett volna létre. Bármilyen problémával bátran fordulhatok hozzá, mert tudom, hogy együtt minden akadályt leküzdünk. Magabiztos hozzáállásából igyekeztem erőt meríteni és tanulni.

Minden egyéb segítséget és támogatást köszönök a Családomnak és a Barátaimnak, akik lehetővé tették számomra, hogy idáig eljussak.