

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Karai Edina

Témavezető: Dr. Vajdovich Péter



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2020.

Témavezető:

.....

Dr. Vajdovich Péter
Állatorvostudományi Egyetem
Kórélettani és Onkológiai Tanszék

.....

Karai Edina

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

1.1 Bevezetés

A daganatos betegségek közül a non-Hodgkin limfóma (NHL) az egyik leggyakrabban előforduló daganat emberek és kutyák esetében is. Az USA-ban 100 000 kutyára vonatkoztatva körülbelül 5300 új beteget regisztrálnak évente, amely tízszer több, mint emberek esetében, ahol 100 000 lakosra körülbelül 500 daganatos eset jut. Azonban nemcsak az előfordulási arányban van hasonlóság az emberi és kutya NHL-t tekintve, de a biológiai és genetikai tulajdonságokban is, valamint a betegség kialakulása és különböző fertőző ágensek vagy környezeti tényezők közötti kapcsolatot tekintve. Az emberekben és a kutyákban spontán fejlődő daganatok morfológiai és klinikai megjelenésükben egyenértékűek, amely lehetővé teszi az összehasonlító vizsgálatokat és a patogenezis részletesebb feltérképezését.

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. 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. Az immunfenotípus meghatározására többféle módszert alkalmazhatunk, így az immunhisztokémiai vizsgálatot (IHK), citológiai vizsgálatot, áramlási citométert (FC) vagy akár klonalitás vizsgálatot PCR segítségével (PARR). Az állatorvosi gyakorlatban általános diagnosztikai módszerként az indirekt jelölést alkalmazó immunhisztokémiai vizsgálat terjedt el. Azonban a daganatos betegségek kezelésénél fontos tényező a korai diagnózis felállítása és a helyes terápia mielőbbi megkezdése, melyben az FC segítségünkre lehet. 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. Az áramlási citometria a malignus hematológiai kórképek differenciál diagnosztikáján (immunfenotipizálás, stádiumbesorolás, minimális reziduális betegség követés) felül számos más célra is használható, például a sejtfelszíni P-glikoprotein

efflux transzporter (Pgp) funkcionális mérésére. Az immunhisztokémiai módszerrel detektált Pgp prognosztikai szerepét kutya limfóma esetében több tanulmány is vizsgálta, de nem volt egyértelmű a kapcsolat a túlélési idővel. A Pgp detektálása FC-vel is elvégezhető. A calcein módszer segítségével egyszerűen megvalósítható a Pgp funkcionális vizsgálata. A mérésből származtatott érték, a multidrog rezisztencia aktivitási faktor (MAF). A limfóma esetében a terápiára adott válasszal összefüggésben megállapították, hogy a MAF prognosztikai jelentőséggel bír a klinikumban emberek körében. Azonban limfómás kutyák tumormintáján még nem alkalmazták ezt a mérési módszert.

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). A multidrogterápia 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. Azonban gyakran megfigyelhető, hogy a kezdetben hatásos kezelőszerekkel szemben kialakul a szerzett rezisztencia.

A multidrog rezisztencia (MDR) kialakulásáért számos mechanizmus lehet felelős, de leggyakoribb okozója egy 170 kDa molekulatömegű membrán alkotóelem. A Pgp az ABC családba tartozó fehérje, amely ATP hidrolízisét felhasználva képes az anyagok aktív transzportjára a biológiai membránokon keresztül. A Pgp sokféle gyógyszer felismerésére és eliminálására képes, ideértve a citosztatikus ágenseket is (vinka alkaloidokat, antraciklineket, taxánokat). Az említett CHOP protokoll kezelőszerei közül három is Pgp szubsztrát, így a tumorsejteken megjelenő efflux transzporter képes a kezelőszereket az extracelluláris térbe juttatni, ezzel csökkentve az intracelluláris gyógyszer koncentrációt.

Az ABC transzporterek rezisztencia kialakulásának mechanizmusában betöltött szerepének azonosítását követő 10 éven belül megkezdődtek a

kutatások, amelyek a Pgp és egyéb ABC transzporter gátlók fejlesztésére összpontosultak. A Pgp esetében a gátlószer 3 generációját különíthetjük el, azonban a klinikai gyakorlatban egyik esetében sem sikerült áttörő sikereket elérni. A gátlószer alkalmazásának eredménytelensége abból fakad, hogy a Pgp fiziológiai védelmi szerepe (a különböző barriereken, bélhám sejteken, vesében, májban) nélkülözhetetlen, így annak gátlása számos nem várt mellékhatást eredményezett.

Különböző alternatív megközelítésekre is léteznek kutatások, monoklonális antitestek vagy az aktív immunizáció Pgp ellen vagy akár géncsendesítés, de ide tartozik a tirozin-kináz gátlók (TKI) alkalmazása is. A különböző gátlószer mellett felfedezték, hogy a ciklooxygenáz-2 enzim (COX-2) is hatással van a Pgp aktivitására. A COX-2 / PGE2 / PGE receptor jelátviteli útvonal aktiválódásával fokozódik nem csak a Pgp-t kódoló MDR1 gén, de az MDR kialakulásában fontos szerepet betöltő MRP1 és BCRP is. Azonban a különböző COX-2 gátló, nem szteroid gyulladásgátló készítmények (NSAID-ok) alkalmazásával lehetőségünk nyílt 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. Az MDR1 mRNS expresszió növekedése a COX-2 expresszió mértékétől függött. Majd bizonyították áramlási citométer és Western blot segítségével, hogy a COX-2 gátlószer a Pgp expressziót és aktivitást is csökkentette. Azóta számos sejtvonalon és tumortípusban igazolták az összefüggést. Továbbá a daganatos kutya limfoid szövetekben is megfigyelhető a fokozott COX-2 expresszió, azonban nem vizsgálták a szelektív COX-2 gátlószer alkalmazását a gyógyszer rezisztencia leküzdésének összefüggésében.

1.2 Vizsgálati célok

1. Jelen tanulmányban célunk volt, hogy összehasonlítsuk az immunfenotípus meghatározására szolgáló módszereket, így az immunhisztokémiai vagy áramlási citometriai analízis előnyeit és hátrányait. Továbbá 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. Az információ függvényében a kezelőszerek helyes megválasztásával közelebb kerülünk az egyedre szabott gyógyászat kialakításához.

2. További céljaink között szerepelt, hogy vizsgáljuk az állatgyógyászatban használatos terápiás szerek hatékonyságának változását a tumorsejtek felszínén kifejeződő Pgp hatására *in vitro* egér leukémia sejtvonal gyógyszerérzékeny és rezisztens párján, valamint egy diffúz nagy B-sejtes kutya limfóma sejtvonalon is.

3. Célul tűztük ki, 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. Legfőbb célunk volt, hogy az *in vitro* modellrendszerünkben olyan epigenetikai vagy COX-2 gátlószereket alkalmazzunk, amelyek az

állatgyógyászatban használatosak és potenciális kezelőszerei lehetnek a kutya limfómának. Így a doxorubicin terápiát kiegészítettük különböző epigenetikai [temozolomid, trichostatin-A (TSA) és SAHA] és COX-2 gátlószerekkel (celecoxib, firocoxib, meloxicam, mavacoxib). Az *in vitro* kísérletben arra kerestük a választ, hogy a gátlószerek képesek-e a doxorubicinnal együttesen alkalmazva a terápia rezisztencia kialakulásáért felelős Pgp aktivitásának fokozódását megakadályozni.

2. Anyag és módszer

2.1 Az immunfenotipizálási módszerek vizsgálata

Az immunfenotípus meghatározására alkalmas többféle módszer (IHK, FC) összehasonlításának vizsgálatában 35 multicentrikus limfómával diagnosztizált kutya vett részt, 17 nőstény és 18 hím, átlagéletkoruk 8 év volt. Egy T-sejt gazdag B-sejtes limfóma esettanulmányban szintén összehasonlítottuk a két diagnosztikai módszert. Az esettanulmányban szereplő páciens 11 éves nőstény, yorkshire terrier kutya volt, akit a CHOP protokoll szerint kezeltek.

Az immunfenotípus meghatározásához a mintavételi eljárás műtét során vagy a citológiai mintavételhez hasonlóan tűaspirációs mintavétellel történt. Előbbi esetében a teljes nyirokcsomót 10%-os pufferolt formalinba helyeztük és külső laboratóriumba küldtük további feldolgozás céljából. A vékonytű-aspirációs mintavétel során 18G tűt használtunk az áramlási citométer vizsgálathoz és 22G tűt a citológiai vizsgálathoz. A mintát kiegészített RPMI (Life Technologies) folyadékot tartalmazó csőbe tettük vagy tárgylemezre applikáltuk. Ezt követően a különböző diagnosztikai módszerek szerint történt a további feldolgozás.

Immunhisztokémiai vizsgálat során a nyirokcsomó mintát fixáltuk, majd a vizsgálathoz paraffinba ágyazott metszeteket használtunk. A T és B-limfociták festéséhez különböző poliklonális ellenanyag KIT-eket használtunk. CD3, CD79a/CD20 festést követően a másodlagos antitestek felvitele történt 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. Az egyes CD markerek százalékos meghatározásához mindkét festés esetében a legnagyobb mértékben expresszálo területeket választottuk ki és 5 nagy nagyítású látótérben, látóterenként 200 sejtet számoltunk meg.

Az áramlási citométeres vizsgálathoz a mintát disszociációs médiumba helyeztük, amely tartalmazott kollagenáz és diszpáz enzimeket, így 37°C hőmérsékleten 30 perc inkubációt követően 40 µm-es szűrővel elválasztottuk a kisebb méretű sejteket a sejtuszpenzió kialakításához. 10⁶ sejtet használtunk a festéshez, melyekhez direkt jelölt monoklonális ellenanyagokat adtunk CD3, CD21 markereket és ezek izotípus kontrolljait. 30 percig 37°C-os vízfürdőben jelöltük a mintákat, melyekhez 1ml hideg PBS-t adva leállítottuk a jelölést és 300G centrifugálást követően 270 µl PBS-ben mértük le a sejteket FACScan segítségével. A CD3 és CD21 markerek százalékos kiértékeléséhez a BD CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, USA) statisztikai programját használtuk.

A citológiai vizsgálathoz alkoholos fixálást alkalmaztunk, majd mindkét tárgylemezt gyors festést lehetővé tevő Panoptic készlettel megfestettük.

2.2 A Pgp funkcionális vizsgálata kutya limfóma esetén

A vizsgálatban 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 év volt. 2 további esetről négy alkalommal is megvalósult a Pgp aktivitás mérése a diagnózistól a terápia végéig. 1. esetben egy 3,5 éves, hím, német juhászkutya vett részt, akit V. stádiumú („b” alstádium) nagy sejtes immunoblasztos limfómával diagnosztizáltak. 2. páciens egy 6,5 éves, nőstény, cocker spániel, kutya volt, IV. stádiumú („a” alstádium) DLBCL-lel diagnosztizálva.

A mintavételt követően a P-glikoprotein funkciójának méréséhez calcein módszert használtunk. A módszer lényege, hogy a nem fluoreszcens Calcein AM festék a sejtekbe jutva intracelluláris észteráz enzimek hatására erősen fluoreszkáló festékké alakul, melynek jelintenzitása mérhető áramlási citométer segítségével. Azonban a P-glikoprotein jelenléte megakadályozza a Calcein AM (0,25 mmol/l) akkumulációját a sejtekben, ezáltal a Pgp pozitív sejtekben a festék jelintenzitása alacsony lesz. A Pgp gátlószer verapamil (10 mmol/l) hozzáadásával az intenzitás jelentősen emelkedik, így a

módszerrel a Pgp funkciója jól követhető a különböző sejtekben. Ehhez a vizsgálathoz 250 000 darab sejtet használtunk csoportonként. A MAF a verapamil jelenlétével (mean fluorescence inhibited [MFI]) és anélkül (noninhibited [MFNI]) mért hisztogram átlagértékéből számítottuk ki a következő képlettel: $MAF = (MFI - MFNI)/MFI$.

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.

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

Az *in vitro* vizsgálatokhoz P388 egér B-limfoblasztos leukémia sejtvonulat és az abból létrehozott doxorubicin rezisztens P388/ADR sejteket, CLBL-1 kutya diffúz nagy B-sejtes limfóma úszó sejtvonulat RPMI tápoldatban tenyésztettük, melyet 10% főtális borjú szérummal (FBS), 5mmol/l glutaminnal és 50 egység/ml penicillin/sztreptomycin (Lonza) kombinált antibiotikummal egészítettünk ki. A sejtvonalatokat 37°C-os hőmérsékleten

tartottuk 5% CO₂-ot tartalmazó inkubátorban. A gyógyszer koncentráció meghatározáshoz 96-lyukú mikrolemezre ültettük ki a sejteket és 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 Pgp szerepének további vizsgálatához egér allograft modellen is mértük a doxorubicin és annak egy speciális változatának, a pegilált liposzomális doxorubicin (PLD) hatékonyságát. 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 10⁶ darab sejtet injektáltunk intraperitoneálisan 6-8 hetes BDF1 egerek hasüregébe. 48 óra elteltével fiziológiás sóoldatot, doxorubicint (3 mg/kg) vagy PLDt (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.

Ezt követően a doxorubicin monoterápia során megvizsgáltuk a rezisztencia kialakulásáért felelős gének (Abcb1a, Abcb1b) mRNS expresszióját *in vitro* a gyógyszerérzékeny és rezisztens sejteken. A vizsgálathoz P388 sejteket homogenizáltuk TRIzol™ reagensben (Life Technologies) majd a Direct-zol® MiniPrep kittel (Zymo Research) izoláltunk RNS-t a gyártó által megadott módon. 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 β) 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszerrel határoztuk meg.

2.4 *In vitro* modellrendszer kidolgozása a rezisztencia tanulmányozására limfóma sejtekkel

A legtöbb esetben a sejtek 20%-át elpusztító koncentrációt alkalmaztuk (IC₈₀). Doxorubicin esetében azonban IC₁₀ koncentrációt alkalmaztunk, vagyis a sejtek 90%-át elpusztította az adott kezelés. Ezek alapján a P388 sejteket (10⁶ darab) 13 nmol/l doxorubicinnel

kezeltük 120 órán át T75 szuszpenziós flaskában, a kombinált kezelésben a doxorubicint kiegészítettük celecoxibbal (16 $\mu\text{mol/l}$), firocoxibbal (16 $\mu\text{mol/l}$), trichostatin-A-val (30 nmol/l) vagy SAHA-val (0,4 $\mu\text{mol/l}$), hogy megvizsgáljuk a különböző kezelőszerek hatékonysága hogyan változik a Pgp kifejeződésének hatására. A kísérleti elrendezésben a kezelést követően a sejteket kezelőszert mentes tápoldatban tenyésztettük, melyet 5 naponta cseréltük addig, amíg a túlélő sejtek elérték a kezdeti denzitást $10^6/18 \text{ ml}$ (repopulációs idő). A kezeléseket többször ismételtük, minden harmadik alkalmával mértük a MAF értéket calcein módszer segítségével, valamint a kemoterápiás szerre való érzékenységet citotoxicitási vizsgálattal.

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

2.5 Állatgyógyászatban már alkalmazott COX-2 és epigenetiai gátlószerek kombinálása doxorubicinnal

egér és kutya limfóma sejtvonalon a rezisztencia kialakulásának megakadályozására

A kombinált kezeléseknél alkalmazott kezelőszerek egymásra kifejtett hatását is megvizsgáltuk egy rövid távú 5 napos mérésben. Az egér és kutya sejteket 384 lyukú lemezre ültettük ki. A kezelőszerek kombinációját egy Hamilton StarLet automata folyadékkezelő pipettázó robot segítségével adtuk a sejtekhez. Az inkubálás 37°C-on 5% CO₂ környezetben történt. GI₅₀ (Growth Inhibition/növekedés gátlás) értékeket PrestoBlue® reagens segítségével (Life Technologies) határoztuk meg és EnSpire mikrolemez olvasóval (Perkin Elmer) mértük le. Az 1. kezelőszér GI₅₀ értékeit párosítottuk úgy, hogy a 2. kezelőszér GI₅₀ értékét fixen tartottuk és fordítva, majd GI₅₀ izobolokként ábrázoltuk. A vizsgálat minden adatpontjának szignifikanciáját kiszámítottuk kombinációs indexként (CI) Chou 2006-os tanulmánya alapján.

Az *in vitro* vizsgálatok kiértékeléséhez 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.

3. Eredmények és megbeszélés

3.1 Az immunfenotipizálási módszerek vizsgálata

Az immunhisztokémiai (IHK) és az áramlási citometriai (FC) vizsgálatok összehasonlításánál 35 limfómás kutya mintájánál B- és T-sejt markerek százalékos aránya között erős szignifikáns korrelációt tapasztaltunk mindkét marker esetén ($R_{CD21}=0,6560$ ($p=0,00002$), $R_{CD3}=0,8334$ ($p < 0,00001$). Továbbá egy limfóma esettanulmányban megállapítottuk, hogy a CD20 marker expressziója 43% volt, de 27% CD3 pozitivitást is detektáltunk. A CD markerek expressziójának mintázata és a sejtek morfológiája alapján a diagnózis T-sejt gazdag B-sejtes limfóma volt. Az esetet FC módszerrel is mértük, mely szerint a nagyobb méretű sejteket elemezve 62% volt a B-sejt marker expressziója, és 14% a T-sejt markeré. Azonban, ha a kisebb méretű sejteket is vizsgáltuk az arány 33:47%-ra változott. A mérést kiegészítve a citológiai vizsgálattal, ugyanazt a diagnózist kaptuk, mint az IHK esetében. Összeségében az FC alkalmas diagnosztikai módszer a limfóma immunfenotipizálásra. Gyorsan elvégezhető technika és

kevésbé invazív beavatkozást igényel a túaspirációs mintavétel, szemben az IHK-hoz szükséges műtéti eljárással, de sejt-sejt kapcsolaton alapuló információt nem ad. Az FC mérést célszerű citológiai vizsgálattal együttesen értékelni, így a sejtek morfológiájáról is kapunk képet. Az IHK során kevesebb sejtet elemezve állítjuk fel a diagnózist, az FC során 10 000 darab sejtet vizsgál a szoftver, azonban az IHK módszert nem szükséges további vizsgálattal kiegészíteni. A két módszer nem tekinthető egymást teljes mértékben helyettesíthető vizsgálatoknak.

3.2 A Pgp funkcionális vizsgálata kutya limfóma esetén

A limfóma újabb prognosztikai faktorát vizsgálva, 12 kutyánál meghatároztuk a MAF-t. 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, elérve az átlag $0,47 (\pm 0,1)$ értéket. A másik 9 kutyánál a diagnóziskor megállapított MAF érték átlag $0,08 (\pm 0,07)$ volt, de a terápia hatására jelentősen emelkedett, átlag $0,38 (\pm 0,13)$ volt. A betegek átlagos túlélési ideje $396 (\pm 179)$ nap volt, amely összhangban volt más tanulmányokban leírt

adatokkal. Azonban a recidíva megjelenésétől számított periódus csupán átlag 120 (± 104) nap volt. Igazoltuk, hogy az áramlási citométer alkalmas a Pgp funkcionális mérésére is. A tumorsejteken megjelenő transzporter gyakran felelős a multidrog rezisztencia (MDR) kialakulásáért, amely az adott kemoterápiás szerek hosszú távú hatékonyságát akadályozza és befolyásolja a túlélési időt.

A következő vizsgálatban is hasonló folyamatot tapasztaltunk, ahol 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+). 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 terápia hatására azonban folyamatosan emelkedett a MAF érték, a végére elérte a 0,56 értéket, ekkor a nyirokcsomó mérete jelentősen megnagyobodott volt. A második betegnél a Pgp aktivitás már a diagnóziskor kimutatható volt (MAF=0,35), melynek oka a prednizolon előkezelés lehetett, 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 gyógyszerszünetnek neveztük. A nem tervezett gyógyszerszünet 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) és a nyirokcsomók mérete is növekedett a kezelés ellenére. Az immunfenotípus ebben az esetben sem változott a terápia ideje alatt.

Vizsgálatainkból kiderült, hogy az MDR kialakulhat a kezelés hatására (szerzett rezisztencia) vagy megjelenhet már a kezelés kezdetén is (nem szerzett rezisztencia). Azonban mindkét esetben befolyásolja a kezelés eredményességét. Habár más kutatócsoportok által végzett klinikai vizsgálatokban is azonosították a Pgp jelentőségét a kedvezőtlen terápiás választ mutató betegeknél, azonban kutya tumormintákon elsőként alkalmaztuk az áramlási citometriai módszert.

3.3 Egér és kutya limfóma sejtek *in vitro* gyógyszerterestelésre való alkalmasságának vizsgálata

Azt követően, hogy *in vivo* bizonyítottuk a Pgp szerepét a terápia rezisztencia kialakulásában *in vitro* kísérletsorozatban is megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a kezelőszerek hatékonyságát. A P388 sejteken 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. Citotoxicitási vizsgálatban is kimutatható volt a különbség, melyben az IC_{50} értéket hasonlítottuk össze, így a P388 és a P388/ADR doxorubicin érzékenysége között a különbség 13 600-szoros volt. A P388/ADR sejteken a doxorubicin kezelés mellé Pgp gátlószert, tariquidart adtunk, így a DOX érzékenység közelített a P388 kezeletlen 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, gátlószer hiányában, felismeri és kipumpálja a DOX-t. Emellett megvizsgáltuk a doxorubicin egy speciális változatát, a pegilált liposzomális doxorubicint (PLD) is. Hasonlóan a doxorubicinhez, a P388 és P388/ADR sejtek között 13 587-szeres volt a PLD érzékenységének különbsége. Azonban a PLD mellett a tariquidar alkalmazásával ez lecsökkent 3,14-szeresre.

A PLD vizsgálatát egér allograft modellben is elvégeztük. A PLD kevesebb mellékhatást okoz, ezért magasabb dózisban is adható volt 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 fiziológiás 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).

In vitro is igazoltuk, hogy a Pgp jelentősen befolyásolja a kezelőszerek hatékonyságát. Az allograft modell eredménye összhangban volt az *in vitro* adatokkal, mely szerint a Pgp mediált rezisztens daganatsejtek esetében a DOX és a PLD magasabb dózis ellenére sem bizonyult hatásosnak.

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 IC₅₀ koncentrációját

P388 egér sejteken, melyek közül a temozolomid nem bizonyult toxikusnak, illetve csak nagyon magas koncentrációknál mutatott toxicitást ($IC_{50}=430 \mu M$), a SAHA és a TSA esetében az a koncentráció, amelyet alkalmazva a sejtek 50%-a elpusztul $0,56 \mu M$ és $41 nM$ volt.

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, $0,22 MAF$ értéket mértünk. A CLBL-1 sejtek érzékenységének vizsgálatát is elvégeztük a különböző kemoterápiás szerekre és epigenetikai gátlószerekre. A DOX IC_{50} értéke $1nM$ volt, míg a SAHA IC_{50} értéke $0,76 \mu M$, a TSA esetében $57nM$ volt, míg a temozolomid IC_{50} értékét $80 \mu M$ -ban állapítottuk meg.

Össességében a P388 és a P388/ADR sejtvonalpár alkalmas a rezisztencia mechanizmusának vizsgálatára, míg a CLBL-1 relevánsabb modell a kutya limfóma tanulmányozására.

3.4 *In vitro* modellrendszer kidolgozása a rezisztencia tanulmányozására limfóma sejtekkel

A következő *in vitro* vizsgálatban célunk volt, hogy a klinikumban megfigyeltet modellezzük. Az új módszerben a gyógyszer érzékeny P388 sejteket 5 napig kezeltük a CHOP protokoll egyik vegyületével, IC₁₀ koncentrációban doxorubicinnal, majd a túlélő sejteken tápoldatot cseréltünk, amivel kimostuk a maradék hatóanyagot a kultúrából (repopuláció). P388 esetében a második kezelést követően is hatásosnak bizonyult a DOX IC₁₀ koncentráció, a sejtszám ismét lecsökkent. Azonban a harmadik kezelésnél már nem volt tapasztalható a sejtpusztulás, a kezelés ellenére is növekedtek a sejtek, jelentősen megnövekedett a Pgp expresszió (MAF = 0,6) 42 nap elteltével. Hasonló eredményt mértünk a kutya B-sejtes limfóma sejtvonalon is. A parentális CLBL-1 sejteken 0,3nM DOX kezelést alkalmaztunk, mely 5 kezelésig bizonyult hatékonynak. A hatodik kezelés ellenére a tumorsejtek korlátlanul kezdtek növekedni és érzéketlenné váltak a DOX használatára, 74 napos kezelés hatására a Pgp aktivitás fokozódott (MAF=0,42). A kezelésre adott válasz és a MAF érték növekedésével összhangban a citotoxicitási vizsgálat eredményéből is egyértelműen kiderült, hogy a kezdeti P388 és CLBL-1 sejtek kilencszer érzékenyebbek voltak, szemben az általunk DOX kezelt sejtekkel (P388 D és

CLBL-1 D). A tariquidar használatával ezekben a kísérletekben is igazoltuk, hogy Pgp-mediált rezisztencia alakult ki.

A klinikumban megfigyeltük, hogy a véletlenszerű gyógyszereszünet beiktatása egy lehetőségnek bizonyult a rezisztencia átmeneti leküzdésére, amely a Pgp pozitív tumorsejtek arányának csökkenését eredményezte. A rezisztencia modellezését követően a gyógyszereszünet hatását is vizsgáltuk ezeken a sejteken. Ehhez az előzőleg DOX kezelt rezisztens P388 D és CLBL-1 D tumorsejteket gyógyszer mentes tápoldatba helyeztük, az P388 D/DH sejteknél 32 nap elteltével tapasztaltuk a MAF csökkenését (MAF=0,47), míg a CLBL-1 sejteken alkalmazott 27 napos gyógyszereszünet hatására a MAF 0,26-ra csökkent 0,42-ről. A citotoxicitási vizsgálat is igazolta, hogy a rezisztens és kezeletlen sejtek között mért 9-szeres különbség a gyógyszereszünetnek köszönhetően lecsökkent 3,6-szeresre ($p < 0,0001$) P388 esetén és csupán 2-szeres volt a CLBL-1 sejteknél.

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 gének expresszió szintje

jelentősen emelkedett a DOX kezelés hatására, míg szignifikáns csökkenést tapasztaltunk az Abcb1a gén expresszió szintjében a gyógyszereszünetet követően P388 sejteken.

Összességében sikerült modelleznünk a klinikumban megfigyelt rezisztencia státusz változást *in vitro*. A modellrendszerünkben hasonló módon váltak rezisztenssé a tumorsejtek, mint a klinikumban alkalmazott terápiás portokoll hatására. Ez a modell relevánsabb a rezisztencia tanulmányozására, szemben a folyamatos szelektációs nyomás alatt tarott sejtekkel, mint például a P388/ADR, amelynek kialakítása 1 évet is igénybe vett.

3.5 Állatgyógyászatban már alkalmazott COX-2 és epigenetiai gátlók kombinálása doxorubicinnal egér és kutya limfóma sejtvonalon a rezisztencia kialakulásának megakadályozására

Az *in vitro* modellrendszerünkben a kísérleti elrendezést úgy módosítottuk, hogy a DOX kezeléssel egyidőben alkalmaztunk különböző epigenetikai gátlószereket (TSA, SAHA). Minden harmadik kezelést követően mértük a MAF-t (MAF 1, 2, 3), majd meghatároztuk azt az időt, amíg a sejtek MAF értéke

alacsony maradt ($<0,2$). 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). 9 kezelést követően pedig a MAF érték jelentősen növekedett a P388 kezelési csoportokban ($MAF \geq 0,6$), de a CLBL-1 esetén is meghaladta a $0,2$ MAF értéket a 6. kezelés után.

A következő kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a különböző COX-2 gátlószereket (celecoxib, firocoxib, meloxicam, mavacoxib) doxorubicinnel kombinálva hogyan hatnak a Pgp aktivitására. Kísérletünk elvégzéséhez első lépésben meghatároztuk a kezelőszerek IC_{50} koncentrációját mindkét sejtvonalon, azonban hamar kiderült, hogy a firocoxib és a mavacoxib még magas koncentrációkban sem volt toxikus az egér és kutya tumorsejtekre.

A hosszú távú kombinált kezelésben összehasonlítottuk 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 (100 nap alatt) sem érte el a 0,2 MAF értéket ($p=0,0073$). 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. A COX-2 gátlók 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. Azonban a leghatékonyabb kombináció szintén a DOX+CEL együttese volt, ahol szignifikáns ($p<0,05$) különbséget mértünk 9 ciklust követően is a DOX monoterápiához képest.

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.

Az *in vitro* hosszútávú kombinációs kísérletet követően egy rövid távú, 5 napos mérésben,

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 antagonistá hatást mértünk, vagyis a kezelőszerek nem erősítették a toxikus hatásukat a P388 és CLBL-1 sejteken együttesen alkalmazva. A DOX és firocoxib esetén szintén antagonistá volt a hatás, de ez csak a CLBL-1 sejteken érvényesült, valamint a P388 sejteken DOX+TSA-t alkalmazva. Ezzel szemben szinergista hatás mutatkozott a DOX és firocoxib között P388 sejt vonalon és DOX+TSA között CLBL-1 sejteken, tehát ezeket együttesen alkalmazva a kezelőszerek erősítették egymás hatását.

A DOX+CEL Pgp-re gyakorolt hatásának vizsgálata mellett a sejtek gyógyszerérzékenységét is mértük citotoxicitási vizsgálattal. Mindkét sejt vonalon igazoltuk, hogy a kezeletlen sejtek és a DOX+CEL kezelt tumorsejtek doxorubicin érzékenységében nem volt szignifikáns különbség.

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. A sejtszámot vizsgálva láttuk, hogy a P388 sejteknél körülbelül 50%-os visszaesés mutatkozott a celecoxib kezelés hatására, míg a CLBL-1 tumorsejtek nem is éltek túl az egyébként 20%-t elpusztító kezelést. A DOX előkezelést követően sikerült kimutatni, hogy a sejtek még érzékenyebbé váltak a celecoxibbal szemben.

A következő kísérletben megvizsgáltuk, hogy a CEL gátolja-e a Pgp funkcióját egy doxorubicin-rezisztens sejtvonalon. A fokozott Pgp aktivitás miatt ezeknél a sejteknél alacsony calcein intenzitást mértünk, azonban Pgp gátlószert, verapamilt adva a sejtekhez már magas fluoreszcencia intenzitás volt megfigyelhető. Azonban a verapamil helyett, a modellrendszerben alkalmazott IC₈₀ koncentrációban és annak 10-szeres dózisában használva a celecoxibot, nem tapasztaltunk különbséget a hisztogramok között, vagyis bizonyítottuk, hogy a celecoxib nem képes a Pgp direkt gátlására. A következő lépésben a MAF mérést egy hónapos gyógyszereszünetet vagy celecoxib kezelést követően végeztük el. 28 nap

elteltével a P388/ADR sejteknél 0,97-ről 0,82-re csökkent a MAF a gyógyszeres kezelés hatására, de a celecoxib kezelés még jobban csökkentette a Pgp aktivitás mértékét (MAF=0,74). A CLBL-1 kutya tumorsejteken is hasonló eredményt mértünk, míg a rezisztens sejtek MAF értéke 0,36-ről 0,28-ra változott a 28 napos gyógyszermentes időszaknak köszönhetően, addig a celecoxib hatására a MAF változása ennél is jelentősebb volt (MAF=0,19), amely arra utalt, hogy a sejtek egy része elveszítette a Pgp transzporter aktivitását.

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.

4. 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.

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 gyógyszereszet képes ideiglenesen a Pgp aktivitást csökkenteni.
6. A COX-2 gátlószerke 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.

5. Saját tudományos publikációk

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

Füredi A., Szebényi 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.; Szebényi K.; Vajdovich P.: **Calcein Assay for Multidrug Resistance Predicts Therapy Response and Survival Rate in Canine Lymphoma Patients**, in Preparation. 2020.

5.2 Előadás nemzetközi konferenciákon

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.

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

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

Edina Karai, Eszter Szendi, Kornélia Szebényi, 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.

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

5.3 Előadások hazai konferenciákon

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

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

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

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

Karai Edina, Füredi András, Szebényi Kornélia, Szakács Gergely és Vajdovich Péter: **Lehetőségek a kutya kemoterápia rezisztencia kialakulásának megakadályozására**, Akadémiai beszámolók, Klinikumok, 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, Szebényi Kornélia, Szakács Gergely és Vajdovich Péter: **Kemoterápiás vegyületek együttes hatásának vizsgálata egér és kutya lymphoma sejtvonalakon**, Akadémiai beszámolók, Klinikumok, 2018.

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

Karai Edina, Füredi András, Szebényi 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.