

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Kutya limfómák drog rezisztenciájának kialakulása

Készítette: Karai Edina

Biológia szak, Msc. I.

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar

Biológiai Intézet

Témavezető: Dr. Vajdovich Péter

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar

Kórélettani és Onkológiai Tanszék

Dr. Szakács Gergely

Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont

Enzimológiai Intézet

Budapest

2014

Tartalomjegyzék

Tartalom

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítésjegyzék	3
Bevezetés.....	4
Anyagok és módszerek.....	12
1.Tumor sejtek előkészítése.....	13
2. Calcein jelölés.....	13
3.Immunfenotipizálás	13
4.In vitro kísérlet.....	14
5.Immunfestés.....	14
6.MAF érték számszerűsítése	14
Eredmények.....	15
Megbeszélés/Diszkusszió.....	26
Összefoglaló	28
Abstract	29
Köszönetnyilvánítás	30
Irodalomjegyzék.....	31
Tételes szerzői hozzájárulás	33

Rövidítésjegyzék

7-AAD – 7-Amino-aktinomicin D

ABC – ATP binding cassette transporter

ÁHOK – Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ

ATP – adenosin-trifoszfát

CD – cluster of differentiation

DMSO – dimetil-szulfoxid

DNS – deoxiribonukleinsav

FACS – fluorescence activated cell sorting

GAM – Goat-antimouse

kDa – kilodalton

MAF – multidrug rezisztencia aktivitási faktor

MDR – multidrug rezisztencia

MDR1 – Pgp, multidrug resistance protein 1

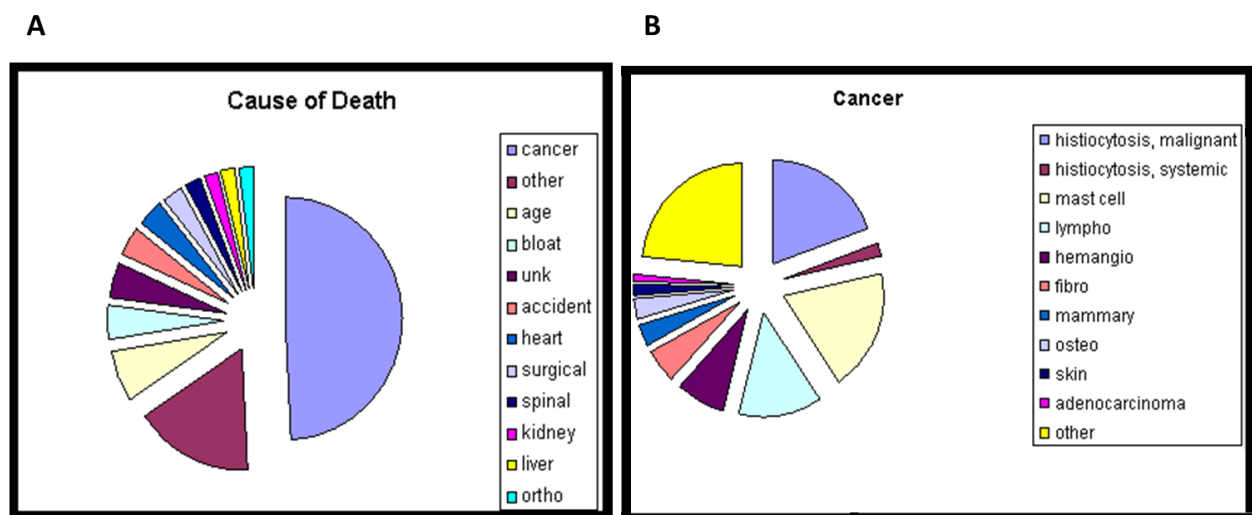
NSCLC – non-small cell lung cancer

PBS – foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldat (phosphate-buffered saline)

Pgp – permeability glükoprotein

Bevezetés

A daganatos betegségek nemcsak a humán klinikumban jelentenek komoly népegészségügyi problémát, de társállataink körében is jelentős előfordulásuk. Az Egyesült Királyságban korábban végzett felmérések alapján a daganatos kórképek a kutyáknál is vezető halálozási tényezők. A vizsgálatok szerint a kutyák 23%-a hullott el rákos megbetegedés következtében, azonban 10 évesnél idősebb kutyák esetében ez a szám 45%-ra emelkedik [1], [2]. Egy 2000-ben készült amerikai felmérésben 1042 kutyából álló mintán vizsgálták a halálozási okok gyakoriságát, melynek majdnem fele a tumor képződése miatt következett be (1. ábra A) [3]. A leggyakoribb daganattípusok a histiocytosis (53 kutya – 4%), a mastocytoma (44 kutya – 3%), a limfóma (31 kutya – 2%) voltak, de az emlő daganatban elhullottak száma is jelentős volt (1. ábra B). Az egyes kutyafajtákat külön vizsgálva eltérő a daganat típusok megoszlása; a boxerfajta esetében az emlő daganatban megbetegedettek halálozási aránya közel 40%, de a flandriai pásztorkutyáknál, a berni pásztorkutyáknál és a bichon friséknél is magas ez az érték [4].



1. **Ábra:** A kutyák elhullását okozó tényezők megoszlása.
A. A kutyák elpusztulásához vezető okok megoszlása.
B. A kutyák daganatos megbetegedéseinek összetétele tekintettel a tumor típusára.

A tumor (neoplázia) olyan szövetszaporulat, amely a szervezet megváltozott sejtjeinek korlátlan burjánzásából ered. Hanahan és Weinberg 2011-ben összefoglalta a tumor sejtek fontos

ismérveit, így például a korlátlan osztódásra való képességet, valamint a tumor sejtek azon képességét, hogy ellenállnak az apoptózis (irányított sejtelhalást) indukáló jelzéseknek, ösztönzik az érképződés folyamatát (angiogenezis), szétterjednek a szervezet egészében (metasztázis), továbbá képesek a proliferatív aktivitásuk fenntartására. A daganatok kialakulásáért felelős mutációkat többféleképpen csoportosíthatjuk aszerint, hogy a mutációkat milyen tényező indukálja (röntgensugárzás, dohányzás, stb.) vagy a mutáció a kromoszóma mely részein következik be. A daganatokat megkülönböztethetjük agresszivitásuk szerint, így a jóindulatú (benignus) tumorok nem invazívak, és nem képesek áttétképzésére, a helyi szövetszaporulat sebészi úton többnyire eltávolítható. Ezzel ellentétben a rosszindulatú (malignus) daganat legfőbb jellemzője a nagy szaporodó képesség, az invazivitás, ill. szöveti destrukció, valamint a metastázis folyamata, melynek során a tumorsejtek eredeti helyükről (primer daganat) kijutnak és más szövetekben megtelepedve újabb tumorokat hoznak létre (áttét vagy metastázis). Jelenleg nem rendelkezünk olyan kezelési protokollokkal, amelyek biztos megoldást jelentenének a metastatizáló tumorral rendelkező betegeknek. Ezt az a statisztikai megfigyelés is alátámasztja, hogy az emlő daganatok esetében az ötéves túlélés esélye 98%, amennyiben nincs távoli metastázis, de ez az esély 24% alá csökken, amint az első áttétet felfedezik. Ugyanezek az értékek emberi vastagbél daganat esetében 90% és 12%, melanómánál 98% és 15%, prosztatata daganatoknál 100% és 28%, hólyagráknál 70% és 6%, míg méhnyak tumoroknál 91% és 16% [5].

Kutyáknál a leggyakoribb daganattípusok a limfóma, a mastocytoma és az emlődaganat [6], [7]. Dolgozatomban a limfóma kezelését és az ezzel kapcsolatos problémákat, valamint lehetséges megoldásokat tárgyalom.

A limfóma a nyirokrendszer sejtjeit, valamint a lymphocytákat érintő betegség. A betegség a lymphocyták ellenőrizetlen osztódását, növekedését eredményezi, amelyek kiszorítják a normál differenciálódással keletkezett lymphocytákat. A kóros lymphocyták többnyire a nyirokcsomókban gyűlnek össze, tapintható duzzanatot képezve. A limfómának számos altípusa létezik, és ezek többségére igaz, hogy kezdetben mind sugárterápiával mind kemoterápiás szerekekkel jól kezelhető. A kutya limfómának az emberek közepes vagy nagy malignitású ún. non-Hodgkin-típusú limfómájával mutatnak hasonlóságot [8], [9].

A limfóma a kutyák egyik leggyakoribb daganatos betegsége, melyből 70%-ban diffúz nagy B sejt limfóma alakul ki [10]. Ez a kórkép, többnyire az idősebb, 9 év feletti kutyákat érinti, de előfordulhat minden életkorban és bármely kutyafajtában. [11]

A kutyák daganatos megbetegedéseit többféle eljárással is kezelik. Elsőként a daganat műtéti eltávolítása merül fel. A műtétet kiegészítendő vagy kiváltandó sugárkezelést is alkalmaznak elsősorban a helyi, nem áttétes tumoroknál. Sok kutya tumor érzékeny a sugárkezelésre, mint például a hízósejt tumorok (mastocytoma), a laphámsejt karcinómák, a száj- és orrüregi daganatok [12]. A sugárkezelés hátránya, hogy speciális felszerelést igényel és kevés helyen végezhető el. Alternatív megoldások közé sorolható a fényterápia, mely sikeresnek tekinthető a laphám karcinómák esetén [13]. A leggyakrabban használt módszer azonban kemoterápiás kezelés. A legtöbbet használt kemoterápiás szerek a doxorubicin, L-asparaginase, vincristine, cyclophosphamide. Ezek szerepelnek a limfóma kezelésére használt Madison-Wisconsin kombinációs kemoterápiás protokollban is (1. táblázat).

Kezelés	Hatóanyag		
1. hét:	Vinkrisztin 0,7 mg/m ² , iv	13. hét:	Ciklofoszfamid 250 mg/m ² , iv
	L-Aszparagináz 400 U/ttkg, im	14. hét:	-
	Prednisolon 2 mg/ttkg, po	15. hét:	Vinkrisztin 0,7 mg/m ² , iv
2. hét:	Ciklofoszfamid 250 mg/m ² , iv	16. hét:	-
	Prednisolon 1,5 mg/ttkg, po	17. hét:	Doxorubicin 30 mg/m ² , iv
3. hét:	Vinkrisztin 0,7 mg/m ² , iv	18. hét:	-
	Prednisolon 1 mg/ttkg, po	19. hét:	Vinkrisztin 0,7 mg/m ² , iv
4. hét:	Doxorubicin 30 mg/m ² , iv	20. hét:	-
	Prednisolon 0,5 mg/ttkg, po	21. hét:	Ciklofoszfamid 250 mg/m ² , iv
5. hét:	-	22. hét:	-
6. hét:	Vinkrisztin 0,7 mg/m ² , iv	23. hét:	Vinkrisztin 0,7 mg/m ² , iv
7. hét:	Ciklofoszfamid 250 mg/m ² , iv	24. hét:	-
8. hét:	Vinkrisztin 0,7 mg/m ² , iv	25. hét:	Doxorubicin 30 mg/m ² , iv
9. hét:	Doxorubicin 30 mg/m ² , iv		
10. hét:	-		
11. hét:	Vinkrisztin 0,7 mg/m ² , iv		
12. hét:	-		

1.táblázat: A kutya limfómák kezelésére használt Wisconsin-Madison terápiás protokoll hetenkénti bontásban a dózisok pontos feltüntetésével

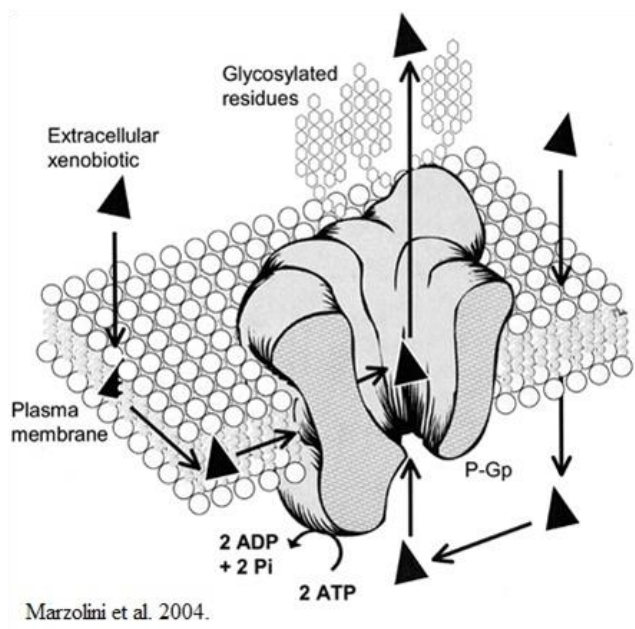
Bár a daganatsejtek kezelésére több módszer létezik (műtét, sugár- és kemoterápia, alternatív módszerek), ezek mégsem teljesen sikeresek és az esetek jelentős részében a daganat kiújul az eltávolítás ellenére, majd rezisztenssé válik az adott kezelésekre [14], [15]. A tumor kezdetben jól reagál a terápiás szerekre, térfogata csökken vagy teljesen eltűnik, a beteg állapota javul, azonban a kezelés későbbi szakaszában ez a hatékonyság csökkenni kezd, a tumor térfogata növekedésnek indul és kialakul a recidíva (relapsus). Ekkor a terápia ellenére, és gyakran még a dózis megemelésével sem lehet sikereket elérni a kezelésben. A kemoterápiás kezelések hatékonysága csökken, amint kialakul a rezisztencia a gyógyszerek széles spektrumára és ahogy ez jelen van az emberi klinikumban, úgy találkozunk vele az állatok terápiája során is. A rezisztencia kialakulhat egyféle citosztatikumra („single-drug resistance”), de megfigyelhető a multidrog rezisztencia

(MDR) jelensége is, mely során a daganatsejtek keresztrezisztenciát mutatnak szerkezetükben és hatásmechanizmusukban különböző citotoxikus szerekkel szemben. A rezisztencia kialakulásának egyik mechanizmusa a szelekciós nyomásnak tudható be. A tumor heterogenitása magyarázza, hogy a daganatban a kezelés megkezdése előtt is előfordulnak MDR-pozitív sejtek és ez a szubpopuláció képes túlélni a kezelést, majd belőlük újra felépül a tumor, amely a továbbiakban már dominánsan a rezisztens sejtpopulációt tartalmazza és a kezelésre nem reagál (szerzett rezisztencia). A kezdetben kisméretű populáció túlélhet úgy is, hogy a transzport fehérjék expresszióját megváltoztatja a kemoterápiás szerekkel történő találkozás hatására és ennek következtében kevesebb gyógyszer jut be a sejtbe, vagy nagyobb mennyiség távozik onnan.

Ilyen transzport fehérje az ATP-t kötő fehérjecsalád tagja a P-glycoprotein (Pgp) is. Az ABC-transzporterek (ATP-binding cassette) olyan fehérjék, amelyek minden élő szervezetben megtalálhatók. Az emberi szervezetben jelenlévő 48 ABC fehérjét 7 alcsaládba sorolták, ABCA-tól ABCG-ig [16]. Ezek a transzmembrán fehérjék az ATP energiáját használják fel a sejt belső membránjai közötti anyagszállításhoz és fiziológiás környezetben a szervezet számára idegen anyagokat pumpálják ki az extracelluláris térbe. A transzportált anyagok lehetnek lipidek, metabolitok, gyógyszerek vagy szteroidok. A fehérjecsalád tagjainak fiziológiás funkciója rendkívül szerteágazó; magába foglalja többek között a lipid metabolizmus segítségét, az antigénprezentációt, valamint kulcsszerepet játszanak a cisztikus fibrózis, multidrog rezisztencia, számos biológiai folyamat és némely örökletes betegségben is [17].

Az ABC transzportfehérjék közül elsősorban a Pgp felelős a multidrog rezisztencia folyamatáért. A „P”, vagyis „permeability” glycoproteint, másnéven multidrug resistance protein 1-t (MDR1) elsőként Juliano, Ling és mtsai írták le [18]. Ez a 170 kDa molekulásúlyú fehérje fiziológiás körülmények között nélkülözhetetlen a szervezet számára. A 2. ábrán látható a Pgp működési mechanizmusát magyarázó rajz: membránból az extracelluláris részbe pumpálja a szervezet számára idegen anyagokat ATP felhasználásával. A pumpafehérje jelen van többek között a bél és a vese hámsejtjeiben, a májsejtekben, a mellékvesében, a placentában, a csontvelőben, a tüdőben, a perifériás vér sejtjeiben, számos endokrin és exokrin szekréciót végző szövetben. Részt vesz a vér-agy és a vér-here gát felépítésében és működésében is. Azonban a tumorsejteken lévő pumpafehérje a kezelés sikerességének akadályozója, mivel felismeri és kipumpálja a daganatellenes szerek jelentős részét a citoplazmából az extracelluláris térbe, csökkentve ezzel a

gyógyszer koncentrációját és segítve a sejt túlélését a toxikus környezetben. Ezáltal a tumort védi a behatoló káros anyagoktól, ami a kezelés sikertelenségéhez vezet.



2. ábra: A P-glycoprotein szerkezetének és működésének vázlatos képe. A fehérje az ATP hasításából nyert energiát a sejtmembránba oldódó vegyületek eltávolítására használja fel

A kutyák különböző típusú daganatai két nagy csoportba sorolhatók aszerint, hogy Pgp mindig jelen van vagy csak bizonyos esetekben mutatható-e ki. Az első csoportba tartoznak például a májdaganatok, a másodikba a limfmák, a hízósejtes daganatok (mastocytomák) és a húgyhólyagkarcinómák [19]. Számos daganat típus esetén mutattak ki Pgp-pozitivitást immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével. A Pgp fontosságát a limfómás kutyák gyógyításában több tanulmány bizonyítja, mely szerint a Pgp-expresszió szintje befolyásolja a remissziós és a túlélési időt, ha a kemoterápiás kezelés előtt mért Pgp szint alacsony, akkor a túlélési idő várhatóan magasabb lesz, míg a visszaeséskor mért Pgp-szint fordítottan arányos a túlélési idővel [20].

A gyógyszer rezisztencia felismerésével egyidős a hipotézis, miszerint a drog rezisztencia kialakulásához olyan, tumor sejteken belül történő genetikai mutációkra van szükség, amit a kemoterápia válthat ki. Habár ez az elképzelés napjainkban is érvényes, vannak alternatív, új elméletek, amik szerint a drog rezisztencia kialakulását irányíthatják epigenetikai folyamatok is. Az utóbbi pár évben több olyan cikk is megjelent [21], [22], [23], melyek az epigenetika érintettségét támasztják alá ebben a folyamatban.

Az epigenetika az örökítő anyag működésére ható környezeti tényezőket vizsgálja, melyek nem mutáció vagy DNS bázissorrend változást okoznak, de hatással vannak a genom aktivitására (pl DNS metiláció szabályozásának megváltozása). Régóta ismert jelenség, hogy a kemoterápián átesett betegek egy bizonyos részében a kezelés alatt megjelenik a terápia rezisztens fenotípus, mely a gyógyszer hatékonyságának csökkenéséhez vagy teljes elvesztéséhez vezet. Nem-kissejtes tüdőrákos (non-small cell lung cancer, NSCLC) betegeknél megfigyelték, hogy a rezisztencia megjelenését követően a terápiát megadott időre elhagyva, majd a pácienseket újrakezelve az eredeti gyógyszerekkel újra sikereket tudtak elérni, holott a rezisztens populáció már egyszer megjelent a tumorban [24]; [25]. A kezelésben kihagyott időt szellemesen *drug holiday*-nak nevezték el. A *drug holiday* jelensége arra utal, hogy a drog rezisztens fenotípus kialakulása nem végleges, sőt reverzibilis lehet. Sharma és kollégái *in vitro* körülmények között bizonyították, hogy a növekedési faktor receptor blokkoló erlotinib és gefitinib, valamint a DNS-károsító ciszplatin gyógyszerek hatására több sejtvonal is gyorsan (napok alatt) és reverzibilisen MDR fenotípust vesz fel [21]. Kísérleteikben sikeresen azonosítottak minden sejtvonalukban (melanóma, tüdő-, végbél- és gyomorrák eredetűek) olyan sejteket, melyek képesek a toxikus gyógyszer koncentráció mellett is osztódni, újra felépíteni a kultúrát és végezetül egy teljesen rezisztens populációt eredményezni (perziszterek). Ugyanebben a cikkben bemutatják, hogy epigenetikai folyamatokat gátló vegyületek (SAHA, Trichostatin A, stb.) képesek meggátolni a perziszterek kialakulását is, ami valószínűsíti a drog rezisztencia kialakulásának epigenetikai hátterét. Egy másik csoport szintén *in vitro* kísérletekkel és a rezisztencia kialakulásának számítógépes modellezésével arra a következtetésre jutott, hogy maga a kemoterápia képes indukálni a sejtek fenotípusának változását és ezáltal az eredetileg szenzitív sejtek mutáció nélkül, reverzibilisen tesznek szert a rezisztenciára [22]. HL60 humán leukémia sejtvonalon vizsgálták a rezisztencia kialakulását, ami napok alatt bekövetkezett vincristine kezelés hatására, majd a kezelést leállítva hetek alatt a rezisztens fenotípus el is tűnt. Ezekhez az eredményekhez szorosan kapcsolódva Knoechel és kollégái kimutatták, hogy humán T-sejtes akut limfoblasztikus leukémiában is tetten érhető az epigenetikai úton kialakuló rezisztencia és azonosítottak egy olyan fehérjét, mely aktívan részt vesz a kromatin szerkezet alakításában és gátlása kedvezően hat a kemoterápia kimenetelére, ha kombinációban alkalmazzák más szerekkel [23]. Ebben és a Sharma által írt közleményben is megtalálták a

gének egy olyan csoportját, melyek az epigenetikai szabályozásért felelősek és gátlásuk lelassítja vagy megakadályozza a perziszterek megjelenését.

A cikkekben leírták a kezelés során felmerülő *drug holiday* jelenségét is. A kemoterápiás kezelésekben is alkalmazzák a szünetet, hiszen a szervezet számára megterhelő gyógyszereket nem célszerű folyamatosan adni a betegeknek.

Munkám során a kutya limfómák drog rezisztenciájának kialakulását tanulmányoztuk, melyhez összesen 16 daganatos kutya tumor mintáit vizsgáltuk áramlási citométerrel Pgp funkció és immunfenotípus szempontjából. Dolgozatomban 2 esetet mutatok be, melyekben megvalósult a Wisconsin-Madison protokoll szerinti kezelés utókövetése, vagyis mind a két esetben sikerült 4 alkalommal mintát venni és vizsgálni a MAF érték változását, illetve az immunfenotípust vizsgálni.

Anyagok és módszerek

Kutatásomban 16 különböző kutya tumor mintát vizsgáltunk. A kutyákat az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központban (ÁHOK) kezelték, a kórképek diagnózisát is ott állították fel. A mintavétel limfómák esetében ún. tru-cut biopsziás eljárással történt, melyen szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokat is elvégeztek. A kutyafajták eltérőek voltak: 3 labrador, foxi, 5 keverék, 3 terrier (west-highland-white, jack russel és yorkshire), cocker spániel, németjuhász, bullmasztiff, magyar vizsla. A kormegoszlás is különböző volt 2-11 éves kor közötti kutyák szerepeltek a vizsgálatban, az átlag életkor pedig 7 év volt a vizsgált kutyák között (2. táblázat).

daganattípus dátum	nem	kor (év)	fajta	állatkód
limfóma				
13/10/02	kan	2	labrador	<u>2388-2581</u>
13/11/20	kan	6.5	foxi	<u>2483-2688</u>
13/11/29	kan	5.5	uszkár-pumi keverék	<u>1867-2012</u>
13/11/29	kan	10.5	west-highland-white terrier	<u>2508-2713</u>
13/12/11	kan	9.5	keverék	<u>2539-2748</u>
14/01/15	szuka	4.5	jack russel terrier	<u>2594-2808</u>
14/01/15	szuka	7	cocker spániel	<u>2591-2805**</u>
14/02/26	kan	4.5	yorkshire terrier	<u>2655-2881</u>
14/03/05	kan	4	németjuhász	2661-2887*
14/03/12	kan	6.5	bullmasztiff	<u>2784-2910</u>
14/06/06	kan	5	labrador	<u>2416-2614</u>
	szuka	10.5	magyar vizsla	<u>2926-3182</u>
	szuka	11	keverék	<u>1453-1551</u>
14/07/09	szuka	9	keverék	2939-3196
14/08/13	kan	11	keverék	<u>2651-2876</u>
	kan	6	labrador	<u>2855-3108</u>

2. Táblázat: A kísérletben szereplő kutyák nem, kor és fajta szerinti megoszlása az egyes állatok kódszámának és diagnózis felállításának dátumának feltüntetésével.

1. Tumor sejtek előkészítése

A biopsziás mintavételt követően, a tumort apró darabokra vágtuk, majd disszociációs médiumba helyeztük (DMEM médium, 200 U/ml II-es típusú kollagenáz és 0,6 U/ml diszpáz; Gibco, Life Technologies, USA) 37°C hőmérsékleten a disszociált tumor sejteket steril fülke alatt 40µm-es szűrőn szűrtük, majd centrifugáltuk. A sejtszámot egy TC10-es automata sejtszámláló (Bio-Rad Laboratories, USA) segítségével határoztuk meg.

2. Calcein jelölés

A sejtszuszpenziót áramlási citométer kompatibilis csövekbe (FACS-csövekbe) osztottuk (250.000 darab sejt/cső); a sejteket centrifugáltuk, majd a felülúszót leöntve szérumentes tápban 3 egyenlő részre osztottuk.

A mintákat 1 percig 37°C-os vízfürdőben preinkubáltuk, majd az inkubációt verapamil (1 µM/cső) jelenlétében, illetve nélkül (oldószeres kontroll) folytattuk. A reakciót 0,5 µM/cső calcein AM hozzáadásával indítottuk (Invitrogen, Life Technologies, USA) 10 perces 37°C inkubáció után a reakciót 1 ml jéghideg PBS-sel állítottuk le. Közvetlenül a FACS mérést megelőzően 0,8 µl-os TO-PRO3 festéket adunk a mintákhoz, mellyel elkülönítjük az élő és a holt sejteket.

3. Immunfenotipizálás

A vizsgálatban nyolc CD (cluster of differentiation) markert használtunk, valamint ezek izotípus kontrolljait (CD3, CD5, CD11/18, CD14, CD21, CD34, CD45, MHC II). Az immunfenotipizálás elvégzéséhez 1 600 000 darab sejtre van szükség, amit nyolc csőbe osztottunk szét és külön-külön hozzáadtuk a direkt jelölt monoklonális ellenanyagokat (AbD serotec, USA).

Az elsődleges antitesttel 30 percig 37°C-os vízfürdőben rázatva jelöltünk, a jelölést 1ml hideg PBS-sel állítottuk le. A FACS mérés megkezdése előtt 0,8µl To-PRO3 (Invitrogen, USA) festéket vagy 7-Amino-aktinomycin D-t (7-AAD, Sigma-Aldrich, USA) festéket adtunk minden mintához. Áramlás citométeren lemértük a sejteket és az eredményeket az egyes CD markerek expressziója alapján különítettük el. A pozitív és negatív sejtek elkülönítése történhet

autofluoreszcens minta vagy izotípus kontroll segítségével. Mi az utóbbi módszert használtuk, ez alapján hasonlítottuk össze a hisztogramokat.

4.In vitro kísérlet

A Pgp expresszió indukcióját in vitro kísérletben vizsgáltuk. P388 B sejtes egér limfoblaszt leukémia és MES-SA humán uterin szarkóma sejteket komplettált RPMI (P388) vagy DMEM (MES-SA) médiumban (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin és 1% L-glutamin) tenyésztettük 37°C-on 100% páratartalom és 5% széndioxid mellett. A drogkezelésekhez tenyésztő flaskákban 10^6 sejtet indítottunk, a sejteket meghatározott koncentrációjú doxorubicinnal kezeltük minimum 5 napon keresztül. A kultúrákat naponta ellenőriztük és adott időközönként calcein mérést alkalmaztunk, hogy meghatározzuk a sejtek Pgp funkcióját.

5.Immunfestés

Lyukanként 10,000 MES-SA sejtet helyeztünk 400µl tenyésztő médiumba 8 lyukú, üveg aljú kamrába, majd a sejteket 48 óráig inkubáltuk 37 °C-on. A médium eltávolítása után DPBS-sel átmostuk a sejteket, majd 4%-os PFA-val fixáltuk őket 15 percig szobahőmérsékleten. Újabb DPBS-es mosás után 0,5%-os BSA PBS és 0,1% TritonX-100 keverékével (komplett blokkoló) a mintákat 24 órán át inkubáltuk. A komplett blokkoló eltávolítása után a sejtekhez elsődleges ellenanyagot adtunk (MRK16 monoklonális antitest (Kamiya Biomedical Company)) 1:250 hígításban. Egy óra szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a mintákat PBS-sel háromszor mostuk, majd másodlagos ellenanyagot adtunk hozzájuk (GAM (Goat-antimouse)-PE IgG2a (Life Technologies)) 1:250 hígításban. Egy óra szobahőmérsékleten, sötétben történő inkubálás után 1:10000 hígításban DAPI-val (Life Technologies) festettük meg a sejtmagot.

6.MAF érték számszerűsítése

A MAF (Multidrog rezisztencia aktivitási faktor) kiszámításához a következő formulát használtuk:

$$\text{MAF} = \frac{\text{Fluoreszcencia gátolt Pgp mellett} - \text{Fluoreszcencia szabad Pgp mellett}}{\text{Fluoreszcencia gátolt Pgp mellett}}$$

Eredmények

A kutatásunk célja a kutya limfóma sejtek funkcionális Pgp expressziójának kvantitatív meghatározása volt. A vizsgálatban 16 kutya vett részt, melyek közül két esetben nyílt lehetőség a beteg hosszú távú nyomon követése. Az állatokból nyert tumorsejteken calcein assayt és immunfenotipizálást végeztünk.

A Pgp funkció kvantitatív meghatározását Calcein esszével végeztük. A Calcein esszé célja a Pgp expresszió meghatározása, melyet 3 csoport összehasonlításával tettünk lehetővé. A kontroll csoporttal meghatároztuk a sejtek autofluoreszcenciáját, a Calcein-AM festékekkel és a Verapamil Pgp gátlószerekkel pedig meghatároztuk a Pgp aktivitásának mértékét, vagyis, hogy fehérje milyen mértékben képes eltávolítani a calcein festéket a sejtekből. Áramlás citométeren lemérve a sejteket 2 görbét látunk, az X tengelyen a mérettartomány az Y tengelyen a sejtszámot ábrázoltuk. Kék hisztogrammal a Verapamillal gátolt sejtek fluoreszcencia intenzitása látható, pirossal a csak Calcein-AM festékekkel kezelt sejtek fluoreszcenciája. A két görbe közötti különbség a Pgp expresszió intenzitását jelenti, melynek számszerűsítésére használható a MAF érték.

Ezzel az értékkel tudjuk kifejezni a Pgp által transzportált festék mennyiségét. Mivel ez az érték 0 és 1 között változhat, így az érték 0, ha a calcein teljes mértékben akkumulálódik a sejtekben, vagyis a transzporter nincs jelen a membránban, illetve az érték 1, ha a Pgp minden festék molekulát kivisz az intracelluláris térből. Így minél nagyobb a két hisztogram közötti különbség, annál nagyobb lesz a membrántranszporter aktivitás, hiszen a fluoreszcens Calcein-AM festék bejut a sejtekbe, azonban Pgp jelenlétében ki is pumpálódik.

A tumorsejtek Pgp funkcióját tükröző MAF értékeket a 3. táblázat mutatja.

állatkód	MAF	állatkód	MAF
<u>2388-2581</u>	0,26	<u>2591-2805</u>	0,52
<u>2483-2688</u>	0,31	<u>2416-2614</u>	0
<u>1867-2012</u>	0,008	<u>2661-2887</u>	0,24
<u>2508-2713</u>	0,02	<u>2591-2805</u>	0,22
<u>2539-2748</u>	0	<u>2926-3182</u>	0,26
<u>2594-2808</u>	0,38	<u>1453-1551</u>	0,49
<u>2591-2805</u>	0,35	2939-3196	0
<u>2655-2881</u>	0,46	<u>2651-2876</u>	0,29
2661-2887	0	<u>2855-3108</u>	0,05
<u>2784-2910</u>	0,15	<u>2591-2805</u>	0,31
<u>2661-2887</u>	0,16	<u>2661-2887</u>	0,56

3. Táblázat: A kísérletben szereplő kutya limfómák calcein esszével mért Multidrog rezisztencia Aktivitási Faktorának (MAF) összefoglalása.

A táblázatban szereplő MAF értékekből következtetni lehet a kezelés hatására kialakuló rezisztencia mértékére. A MAF érték növekedése arra utal, hogy a beteg egyre inkább rezisztenssé válik a kemoterápiás kezelés során használt gyógyszerekre. A multidrog rezisztencia aktivitási faktor (MAF) az in vitro körülmények között tenyésztett, P-glikoproteint extrém magas szinten expresszáló sejtvonalaknál elérheti akár a 0,98-at is, de a klinikumban tapasztalt, kezelésre már nem reagáló akut myeloid leukémiás betegeknél ez az érték jelentősen kisebbnek mutatkozott (0,25-0,32, Kárászi et al., 2001).

A limfómák típusának meghatározását immunfenotipizálással végeztük. A vizsgált 22 mintából 14 esetben sikerült elegendő sejtet izolálni az immunofenotipizálás elvégzéséhez. Nyolc antitestet használtuk, valamint ezek izotípus kontrolljait (CD3, CD5, CD11/18, CD14, CD21, CD34, CD45, MHC II). Azoknál a kutyáknál, ahol többször is tudtunk mintát feldolgozni, követtük az immunfenotípus változását is a kezelés hatására, de abban eltérést egyetlen esetben sem tapasztaltunk. Az eredmények összefoglalva a 4. táblázatban láthatóak.

Az eredményeket az egyes CD markerek expressziója alapján különítettük el. A pozitív és negatív sejtek elkülönítése történhet autofluoreszcens minta vagy izotípus kontroll segítségével. Mi az utóbbi módszert használtuk és áramlás citométeren lemértük a sejteket. Kiértékeléskor figyelembe vettük az izotípus kontroll és a CD markerek hisztogramja közötti különbséget. Egyértelmű elkülönülés esetén pozitív expresszióként jelöltük, abban az esetben, ha nem vagy alig volt különbség negatív jelet rendeltünk hozzá.

daganattípus	állatkód	Immunf	CD 3	CD 4	CD 5	CD 14	CD 11/18	CD 21	CD 34	CD 45	MHCII
limfóma											
13/10/02	<u>2388-2581</u>	1	-	+	+	-	+	-	+	+	+
13/11/20	<u>2483-2688</u>	1	-	-	-	-	+	+	+	+	NA
13/11/29	<u>1867-2012</u>	0									
13/11/29	<u>2508-2713</u>	1	+	+	+	-	+	-	-	+	NA
13/12/11	<u>2539-2748</u>	0									
14/01/15	<u>2594-2808</u>	1	-	-	-	-	-	+	-	+	+
14/01/15	<u>2591-2805</u>	1	-	-	-	-	-	+	-	+	+
14/02/26	<u>2655-2881</u>	1	+	+	+	-	+	-	+	+	+
14/03/05	2661-2887	1	-	-	-	-	-	+	+	+	+
14/03/12	<u>2784-2910</u>	1	-	-	-	-	-	+	-	+	+
14/04/24	<u>2661-2887</u>	0									
14/05/30	<u>2591-2805</u>	0									
14/06/06	<u>2416-2614</u>	1	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	<u>2661-2887</u>	1	-	-	-	-	-	+	-	+	+
14/07/02	<u>2591-2805</u>	1	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	<u>2926-3182</u>	0									
	<u>1453-1551</u>	0									
14/07/09	2939-3196	1	-	-	-	-	-	+	-	+	+
14/08/13	<u>2651-2876</u>	0									
	<u>2855-3108</u>	0									
14/08/19	<u>2591-2805</u>	1	-	-	-	-	-	+	-	+	+
14/09/04	<u>2661-2887</u>	1	-	-	-	-	-	+	+	+	+

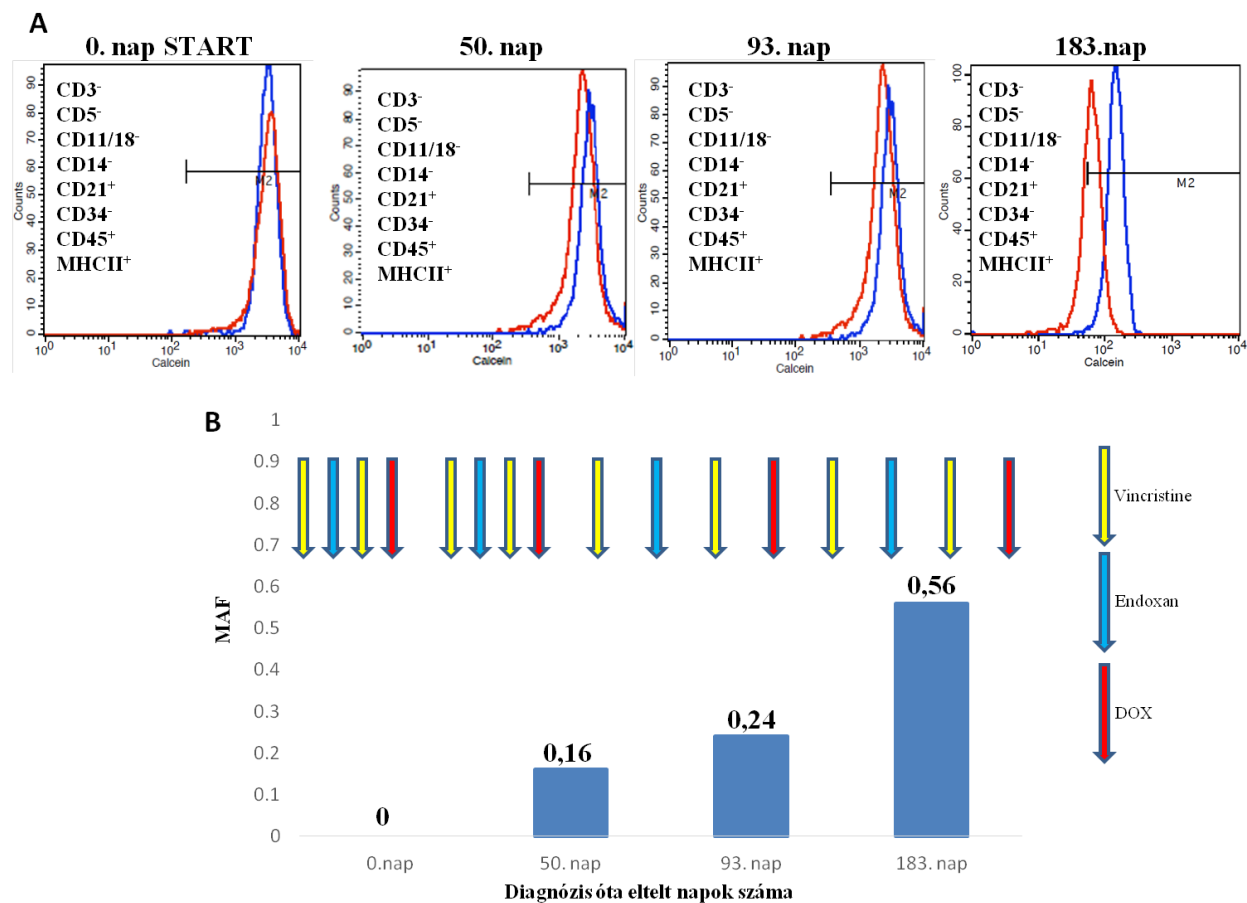
4. Táblázat: A kísérletben szereplő kutya limfómák immunfenotipizálásának összefoglalása, külön ábrázolva az egyes CD markerek eredményét.

A CD 21 pozitivitás, mely a diffúz nagy B sejtes limfóma előrejelzője, 11 esetben volt megfigyelhető. Az adatok alapján egyértelműen el tudtuk különíteni az egyes limfóma típusokat. Valamint látható volt, azoknál az eseteknél, ahol többször is lehetőségünk volt minta feldolgozásra, hogy a kemoterápiás kezelés nem okoz immunfenotípusbeli változást.

Összességében a calcein esszé elvégzését követően a FACS mérés eredményével információt kaptunk a Pgp jelenlétéről vagy hiányáról. Valamint a MAF érték kiszámításából következtetni tudtunk a rezisztencia mértékére. Azoknál az eseteknél, ahol megvalósult a többszöri mintavétel, nyomon követhető volt a Pgp expresszió változása a kemoterápiás kezelés hatására. Az immunfenotipizálás elvégzésével pedig megállapítottuk az egyes limfóma típusokat és azt is, hogy a kezelés hatására nem változtak az egyes CD markerek expressziója.

A következőkben két olyan esetet mutatok be, ahol megvalósult a kezelés hosszú távú nyomon követése. Mindkét esetben 4-4 alkalommal sikerült mintát venni és feldolgozni. A kutyákat a Wisconsin-Madison protokoll szerint kezelték 16 alkalommal 25 héten keresztül kaptak kemoterápiát (doxorubicin, vincristine, cyclophosphamid). Minden mintavételnél elvégeztük a calcein esszét és az immunfenotipizálást is, az eredményeket a 3., 4. táblázat és a 3., 4. ábra mutatja.

A 2661 kódú kutyánál a kezelést megelőzően a calcein mérésnél jól látszik, hogy FACS ábrán látható két görbe fedi egymást, a MAF érték 0 volt, ami azt jelenti, hogy kezdetben nem rendelkeztek a tumor sejtek Pgp-vel. A második mintavételkor, mely a kezelés 6. hetében történt, már megfigyelhető a MAF érték emelkedése (0,16), ami arra utalt, hogy a sejtek egyre több transzportfehérjével rendelkeztek, a rezisztencia kezdett kialakulni. A harmadik mintavétel a 12. hétben következett be és a két görbe eltolódása még markánsabbá vált, a MAF érték ennek megfelelően tovább növekedett 0,24-ra. Az utolsó mintavétel a kezelés vége előtt 2 héttel történt, itt volt a legnagyobb a különbség, a MAF érték 0,56-ra emelkedett és a diagnózis alapján a tumor rezisztenssé vált (3. ábra).

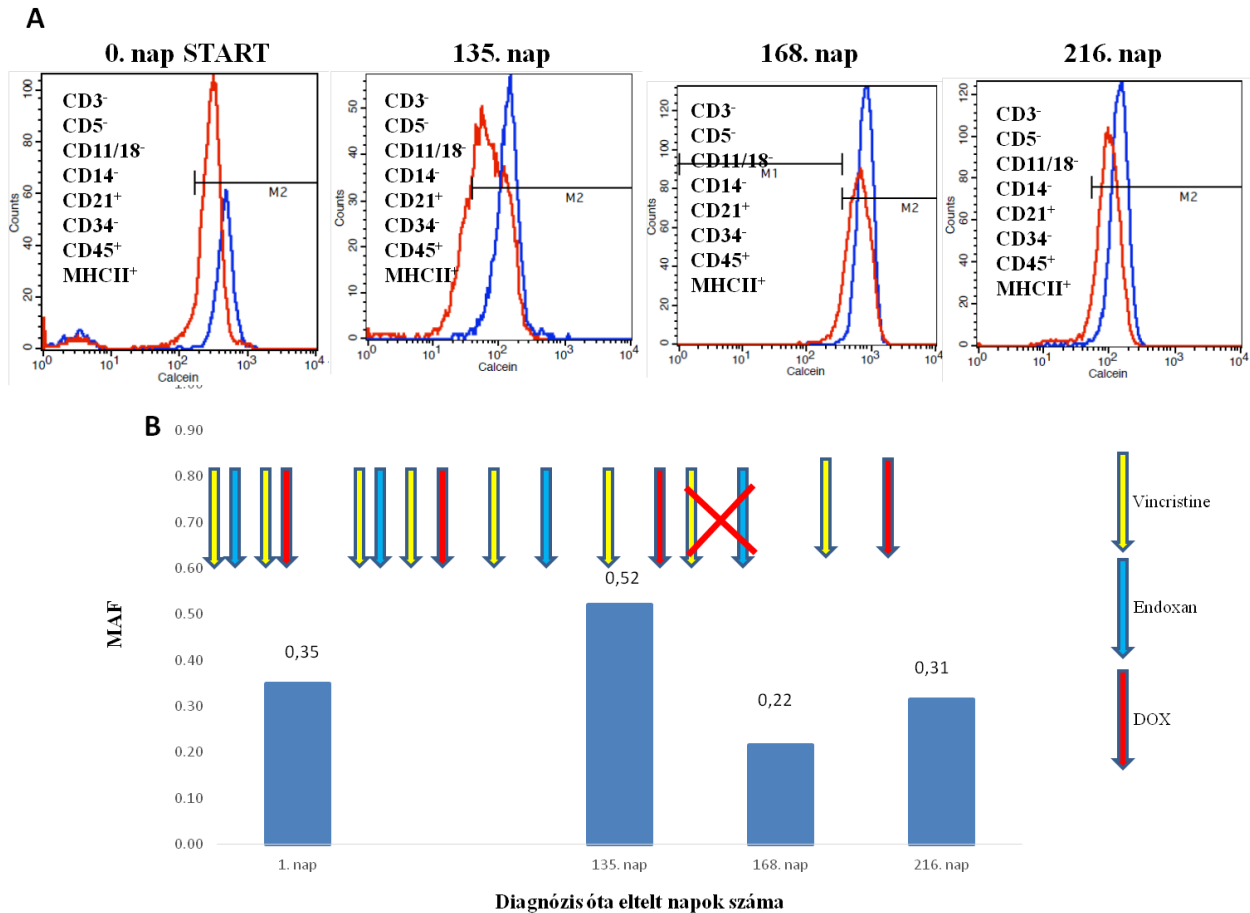


3. Ábra: A 2661-2887 kódjelű kutya terápiájának követése és a MAF értékekben történő változásának ábrázolása a kezelések figyelembe vételével.

- A. A tumor calcein esszével mért eredményei. A kék görbe a verapamillal történő Pgp gátlás mellett történt mérést mutatja (kontroll), míg a piros görbe a gátlás nélküli állapotot tükrözi. A mérések mellett a tumorsejtek aktuális immunofenotípusa látható.
- B. A tumor MAF értékének változása a terápia során a különböző kezelések (vincristine, endoxan és doxorubicin) feltüntetésével.

A másik esetben, 2591 kódú kutyánál is megfigyelhető volt a kemoterápia hatására bekövetkező MAF érték emelkedése egy bizonyos pontig, de ebben az esetben a terápiás protokoll teljes elvégzését a tulajdonos nem tudta finanszírozni, így a kezelések a 135. napon befejeződtek és csak 33 nap múlva folytatódtak. A beteg kezelésében fellépett egy 33 nap hosszúságú szünet (drug holiday). Az első mintavétel itt is a kezelést megelőzően valósult meg, így össze tudtuk vetni a kezelés előtti és utáni állapotot. A tumor már a kezelés előtti első alkalommal mutatta a Pgp funkció jelenlétét, a kezdeti MAF érték 0,35 volt. A második mintavétel a 15. héten valósult

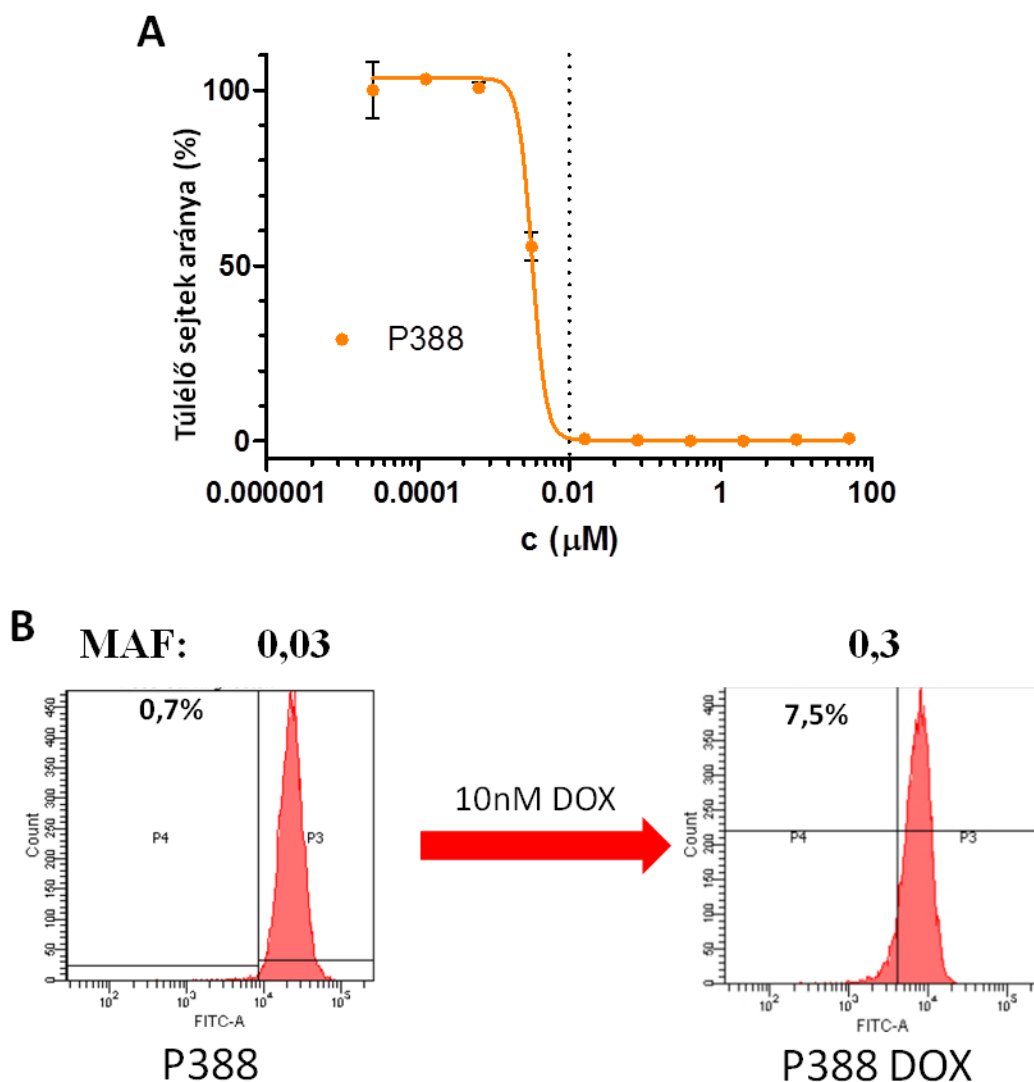
meg, ekkor tovább nőtt a MAF érték (0,51). Ezt követően a *drug holiday*-nek köszönhetően a szünet előtti értékhez képest jelentősen alacsonyabb MAF értéket mértünk, ami ekkor 0,22 volt, ami még a kezelés megkezdése előtti szintnél is alacsonyabb érték. A kezelés utolsó szakaszához érve ismét kaptunk mintát, ahol újra növekedett a különbség, ezt a calcein assay vizsgálattal is bizonyítottuk és a MAF érték is szemléltette, hogy a gyógyszerek ismételt adása megemelte az értéket 0,31-ra, ami már majdnem a kezdeti értékkel megegyező mértékű volt (4. ábra).



4. Ábra: A 2591-2805 kódjelű kutya terápiájának követése és a MAF értékekben történő változásának ábrázolása a kezelések figyelembe vételével.

- A tumor calcein esszével mért eredményei. A kék görbe a verapamillal történő Pgp gátlás mellett történt mérést mutatja (kontroll), míg a piros görbe a gátlás nélküli állapotot tükrözi. A mérések mellett a tumorsejtek aktuális immunofenotípusa látható.
- A tumor MAF értékének változása a terápia során a különböző kezelések (vincristine, endoxan és doxorubicin) feltüntetésével, valamint a gyógyszer szünnap megjelölésével.

A következőkben megkíséreltük reprodukálni a 2661 és 2591 kódjelű kutyákban tapasztalt rezisztencia indukció jelenségét, valamint a *drug holiday* hatását in vitro modelleken. Kísérleteinkhez P388 egér lymphoblast leukemia és MES-SA emberi uterin szarkóma sejteket használtunk. A P388 sejtek esetében kisméretű tenyésztőedényekben tartottuk fenn a kultúrákat és az IC50 érték közel háromszorosának megfelelő 10nM doxorubicin koncentrációval indítottuk a kísérletet (5. ábra, A panel). Meglepő módon, a citotoxikus esszé alapján (5A) választott, magas doxorubicin koncentrációt is túléltek a sejtek. Öt nap elteltével calcein esszét végeztünk, majd az eredményeket összehasonlítottuk a kezeletlen kontroll sejteken mért értékekkel. A mérés eredménye azt mutatta, hogy a kezelés hatására megjelent egy alacsony számú populáció(7,5%), ami a teljes populációt jellemző MAF értéket a kezdeti 0,03-ról közel tízszeresére, 0,3-ra növelte (5. ábra, B panel).



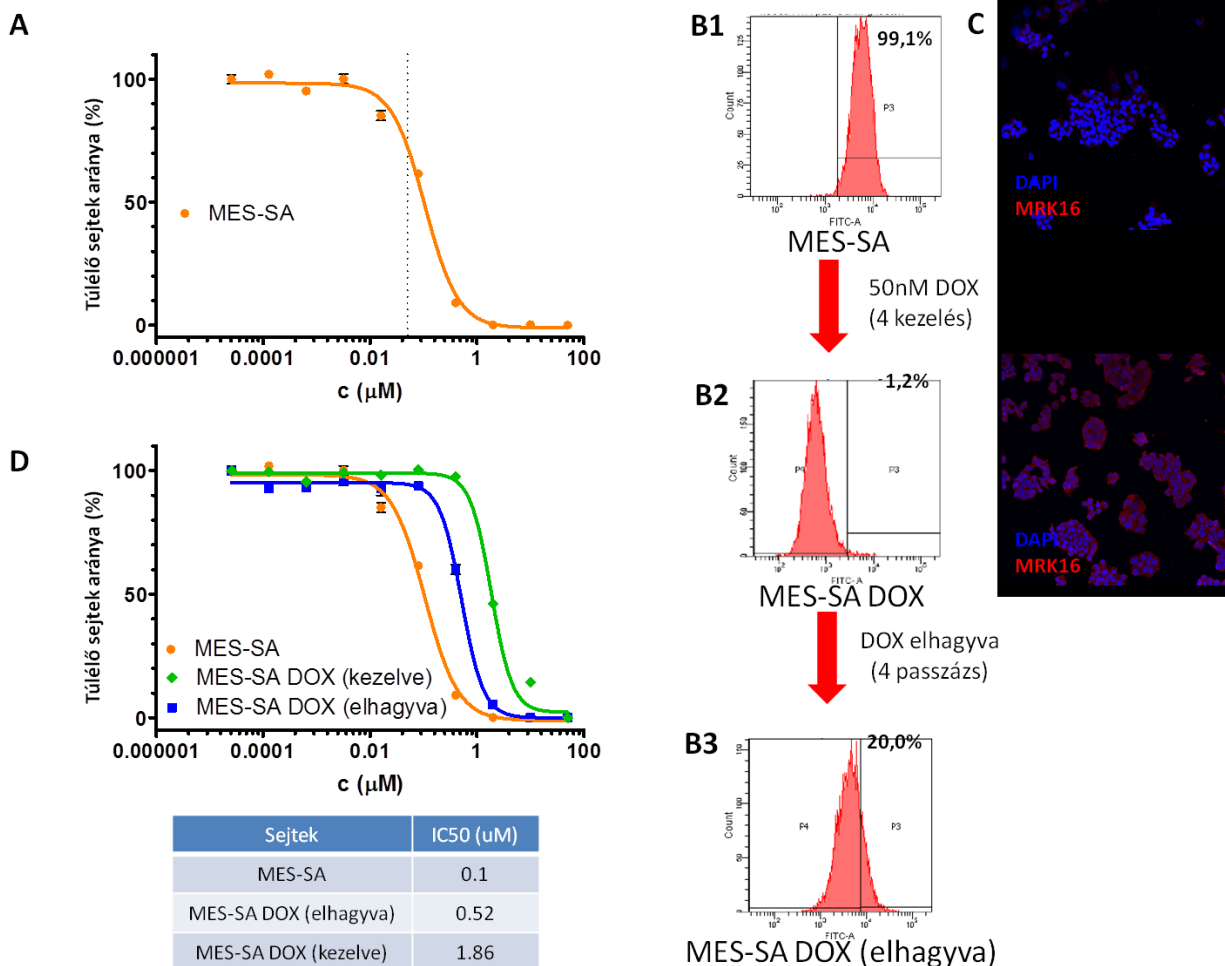
5. Ábra: A P388 egér B-sejtes limfóma sejtvonal végzett kísérletek eredményei.

A. A doxorubicin citotoxicitási vizsgálata a P388 sejtvonalon. A túlélő sejtek arányát a koncentráció függvényében ábrázoltuk, megjelölve a további kísérleteinkben alkalmazott koncentrációt (szaggatott vonal).

B. A doxorubicin kezelés hatása a P388 sejtek Pgp funkciójára. Az adott calcein fluoreszcencia intenzitással (X tengely) rendelkező sejtek száma (Y tengely) a kezeletlen P388 sejtekben és a doxorubicin kezelés után a P388 DOX kultúrákban. Az ábrákon feltüntetett százalékok a Pgp-pozitív sejtek arányát mutatják a kezelés előtt és után.

A MES-SA sejtek esetében a kísérletet hasonlóképpen végeztük, de a doxorubicin koncentrációt stabilan 50nM-on tartottuk, ami az IC₅₀ érték 50%-át jelenti (6. ábra D panel). Ahogy a 6. ábra B1,2 panelén látható a populáció 98,8%-a 4 kezelés (42 nap) hatására, Pgp-pozitívvá vált és már

aktívan kipumpálta a calcein-AM festéket (MESSA-DOX sejtek). Immunfestéssel a sejtekben megjelenő Pgp fehérjét is ki tudtuk mutatni MRK16 antitest segítségével (6. ábra, C panel). A rezisztencia ilyen gyors kialakulása jól korrelált az általunk mért klinikai mintáknál észlelt rapid Pgp funkció változással. A kezelési szünet (drug holiday) in vitro modellezéséhez az immár Pgp-t expresszáló sejteket két csoportra osztottuk. Az egyik csoportot továbbra is folyamatos doxorubicin kezelés alatt tartottuk, míg a kontroll csoportot drog nélkül tenyésztettük. Meglepő módon a doxorubicin elhagyását követő 3. héten már a Pgp funkciójának csökkenését és ezzel együtt a sejtek drog rezisztenciájának gyengülését észleltük (6. ábra, B3 panel). Ezzel szemben a folyamatosan doxorubicinben tartott sejtek Pgp expressziója nem csökkent (6. ábra, B2panel). A sejtek Pgp funkciójának csökkenésével a doxorubicinra mutatott rezisztenciájuk is jelentős mértékben csökkent a drug holiday-t követően. A MES-SA sejtek kezelés nélküli alapállapotában 0,1uM IC50 értéket mértünk a citotoxicitási kísérletünkben, míg a folyamatosan doxorubicinnal kezelt MES-SA DOX kultúrákban ez az érték 18,6-szoros volt (1,86uM). Ezzel szemben, ahol elhagytuk a kezelést (MES-SA DOX elhagyva) a sejtek doxorubicinnal mért IC50 értéke 0,52uM volt, ami már csak 5-szörös különbség a parentális MES-SA sejtvonálhoz képest és közel negyedrésze a drug holiday-ban nem részesült MES-SA DOX-hoz viszonyítva (6. ábra, D panel és táblázat).



6. Ábra: A MES-SA humán uterin szarkóma sejteken végzett kísérletek eredményei.

- A doxorubicin citotoxicitási vizsgálata a MES-SA sejtvonalon. A túlélő sejtek arányát a koncentráció függvényében ábrázoltuk, megjelölve a további kísérleteinkben alkalmazott koncentrációt (szaggatott vonal).
- A doxorubicin kezelés és a doxorubicin elhagyásának hatása a MES-SA sejtek Pgp funkciójára. Az adott calcein fluoreszcencia intenzitással (X tengely) rendelkező sejtek száma (Y tengely) a kezeletlen MES-SA sejtekben (B1), a doxorubicin kezelés után a MES-SA DOX kultúrákban (B2) és a kezelés elhagyását követő 4. passzázsánál (MES-SA DOX elhagyva) (B3). Az ábrán jelzett függőleges vonal a verapamillal gátolt Pgp funkció mellett mért sejtekhez lett beállítva, vagyis a vonal jobb oldalán a calceint akkumuláló Pgp-mentes sejtek vannak, míg a bal oldalon a calceint már kipumpáló Pgp-pozitív sejtek láthatóak. Az ábrákon feltüntetett százalékok a Pgp-negatív sejtek arányát mutatják a kezelés előtt és után.
- Az MRK16 antitesttel (piros) történt immunfestés alapján a kezdeti (MES-SA) sejtek nem expresszálnak Pgp-t, míg a 4 kezelés utáni MES-SA DOX tumorsejtek már mutatják a fehérje jelenlétét. A sejtmagokat DAPI (kék) jelöléssel tettük láthatóvá.

- D. A megnövekedett Pgp expresszió hatása a doxorubicin érzékenységre. A citotoxicitási görbén a MES-SA (narancs), a folyamatosan doxorubicinnal kezelt MES-SA (MES-SA DOX kezelve, zöld) és a doxorubicinnal csak négyszer kezelt, majd a kemoterápiát többet nem kapó MES-SA DOX elhagyva (kék) érzékenysége látható. Az egyes sejteknél mért IC50 értékek táblázatba rendezve láthatóak.

Megbeszélés/Diszkusszió

Vizsgálatunk elsődleges célja a kutya limfóma kemoterápiás kezelése során fellépő rezisztencia kialakulásának tanulmányozása volt. A vizsgálat során 16 különböző kutyából 22 mintát dolgoztunk fel. A calcein assay révén az MDR mögött meghúzódó Pgp funkció kvantitatív értékéről a MAF adott információt. A Calcein-AM a transzportfehérje hiányában képes felhalmozódni a sejtekben, és mérhetővé válik áramlás citométeren. Azonban a rezisztencia kialakulása során a transzportfehérjék száma növekszik, így a fluoreszcens festéket kipumpálja a sejtekből. Áramlás citométeren mérve Pgp gátlásával (Verapamil) kapott FACS ábrát tudtuk összehasonlítani a gátolatlan (calcein AM) FACS ábrájával. A különbség adott választ a Pgp expresszió mértékére. 14 esetben immunfenotipizálást is végeztünk, ahol 8 féle CD markerrel jelöltük a sejteket. Így el tudtuk különíteni a többféle limfóma altípust.

A calcein assay és az immunfenotipizálás evégzése során volt 2 olyan eset, ahol megvalósult a Wisconsin-Madison kombinációs kemoterápiás kezelés hosszú távú nyomon követése, vagyis 4-4- alkalommal dolgoztunk fel mintát a kezelés előtt, közben valamint a kezelés letelte előtt 2 héttel. Mind a két esetben CD 21 pozitív minták voltak. Felfigyeltünk továbbá a kemoterápia rezisztencia és a Pgp jelenléte közötti korrelációra. A kemoterápiás szerek adásával a Pgp expresszió mértéke fokozatosan nőtt. Ezt mind a két esetben bizonyítottuk, az elsónél a kezdeti 0 szintről a MAF érték 0,56-ra nőtt, a második esetében a kezdeti MAF érték, ami 0,35 volt a kezelés folyamatos alkalmazásával 0,52-ra nőtt. Ekkor a kezelést a tulajdonos anyagi okok miatt 6 hétre megszakította, de az újrakezdéskor mért 0,22 szint a kezelés végére újra 0,31 lett.

A 6 hetes gyógyszer megvonás, vagyis gyógyszer szünnap a MAF érték csökkenését eredményezte, amit számos cikkben megjósoltak már in vitro adatokra hivatkozva, de kutyákban ennek direkt bizonyítékát még sosem mutatták ki [21], [22], [23]. A Pgp expresszió mértéke a kezelés előtti szint alá csökkent (6. ábra). Ez a változás rövid időn belül bekövetkezett (6 hét), ami arra utal, hogy a változásért epigenetikai szabályozó folyamatok lehetnek felelősek.

A rezisztencia kialakulását a Pgp expresszió növekedésével, valamint a reverzibilis változást gyógyszerek elhagyásával bizonyítottuk. Ezt P388 egér B sejtes lymphoblast leukemia és MES-SA humán uterin szarkóma sejtekkel végeztük el. A P388 sejteken kapott eredményeink szerint, melyek fenotípusukban nagy hasonlóságot mutatnak a kutya B-sejtes limfómákkal, képesek a doxorubicin IC50 dózisének háromszorosában is túlélni (6. ábra), ami azt sejteti, hogy ebben a

sejtvonalban is jelen lehetnek perziszterek. A drog-kezelés hatására a sejtek MAF értéke tízszeresére növekedett és a 2661 és a 2591 kódjelű kutyák mintáinál látott értékekhez hasonló aktivitást mutatott.

A MES-SA sejtvonallal folytatott kísérleteink során is tapasztaltuk a korábban klinikai mintákban látottakat, miszerint a Pgp expresszió gyorsan kiváltható egy teljesen szenzitív sejtvonalból a kemoterápiával (6. ábra). A kezelt sejtekben mind fehérje, mind funkcionális szinten is megjelenik a P-glycoprotein, amit MRK16 immunfestéssel és calcein esszével is igazoltunk (6. ábra). Ez a változás nem csak meglepően gyors volt, de reverzibilisnek is bizonyult és a terápia elhagyásával mértéke jelentősen csökkent a kezdeti és a folyamatosan kezelt sejtekéhez képest (6. ábra). A parentális MES-SA sejtvonal doxorubicin IC50 értéke (0,1 μ M) 19-szeresére nőtt (MES-SA DOX folyamatos, 1,86 μ M) a folyamatos drog kezelés hatására, de a kezelést befejezve ez az érték csökkenni kezdett és 4 passzázst követően a MES-SA DOX (elhagyva) kultúrákban már csak 0,52 μ M volt (6. ábra B és C panel).

Ezek az eredményeink megerősíteni látszanak a drog rezisztencia epigenetikai úton történő kialakulásának lehetőségét. További kutatásainkban emelni fogjuk a vizsgálatban résztvevő kutyák számát, valamint az in vitro látott folyamatokat epigenetikai gátlók egy jól meghatározott paneljével próbáljuk majd befolyásolni, hogy ezzel is megerősítsük a találatainkat. Amennyiben sikerül mind a klinikai, mind a laboratóriumi eredményeinket alátámasztani, úgy ezek a kezelési protokollok lefordíthatóak lennének az állatorvosi gyakorlatba és érdekes új lehetőségeket adnának a kezelőorvos kezébe. A tumorokban lévő perzisztereket célozva esetleg elérhető lenne a drog rezisztencia kialakulásának megakadályozása, illetve ha a rezisztencia már kialakult, úgy a drug holiday (precízen megtervezett) beillesztése a terápiás folyamatba kedvezően hathatna a betegek kezelésre adott válaszára.

Összefoglaló

A rosszindulatú daganatok gyógyítása az utóbbi évtizedekben történt tudományos áttörések ellenére is komoly kihívást jelent mind a humán, mind társállataink klinikumában. A közelmúltban elérhetővé vált ígéretes terápiák (jelátviteli útvonalak gátlása, érképződés gátlók és személyre szabott kezelések) használatának is gátat szab a kemoterápiáknál régóta ismert multidrog rezisztencia (MDR) kialakulása. Gyakori megfigyelés, hogy a kezelésre első alkalommal jól reagáló daganatok elvesztik kezdeti érzékenységet, és képessé válnak a toxikus környezetben való túlélésre. Az MDR egyik legjelentősebb mechanizmusa az ABC (ATP-binding cassette) transzporterek családjába tartozó P-glycoprotein (Pgp, ABCB1, MDR1) fehérje fokozott expressziója. Ez a transzmembrán fehérje képes a sejtmembránba oldódó vegyületek széles csoportját (a kemoterápiás gyógyszerektől a HIV-elleni anyagokig) felismerni és az extracelluláris térbe juttatni, ezzel csökkentve a terápiás szerek sejten belüli koncentrációját. Évtizedek óta tartja magát a nézet, miszerint a drog rezisztencia kialakulásához olyan, tumor sejteken belül történő genetikai mutációkra van szükség, amit a kemoterápia válthat ki. Habár ez az elképzelés napjainkban is érvényes, az utóbbi években megjelent közlemények szerint a drog rezisztencia kialakulása mögött epigenetikai folyamatok is állhatnak.

Munkám során 16 kutya limfóma mintán vizsgáltam a Pgp funkciót és a daganatok immunfenotípusát áramlási citométerrel. Dolgozatomban részletesen bemutatok 2 esetet, ahol megvalósult a hosszú távú utókövetés (25 héten keresztül). A B sejtes limfómával diagnosztizált kutyákat a Wisconsin-Madison protokoll szerint kezelték 16 alkalommal 25 héten keresztül. A tumor sejtek Pgp funkcióját és immunfenotípusát a diagnózis megállapításakor és a visszaesés során vizsgáltuk (4 mintavételnél).

Az egyik esetben a kezelés hatására folyamatosan növekedett a Pgp expresszió, vagyis a rezisztencia mértéke, melyet eddig kutya esetében még nem sikerült végigkövetni, a másik esetben a kezelés során kialakult rezisztencia meglepő módon reverzibilisnek bizonyult, vagyis az ismételt kezelés hatására a rezisztencia mértéke folyamatosan növekedett, de a terápiás szerek hirtelen elhagyásával a rezisztencia mértéke egyre inkább csökkent, bizonyos idő után a kezdeti érték alatti szintet mértük.

A kezelés során kialakuló drog rezisztencia gyors megjelenése és eltűnése mögött valószínűleg epigenetikai szabályozás áll, melynek megértéséhez in vitro kísérleteket végeztünk, vagyis P388 B sejtes egér limfoblasztikus leukemia sejteken és MES-SA humán méhnyakrák

sejteken reprodukáltuk a rezisztens fenotípus megjelenését kezelés hatására, valamint a gyógyszer elhagyásával a reverzibilis folyamatot bizonyítottuk. A jövőben epigenetikai gátlókkal szeretnénk igazolni az epigenetikai szabályozás relevanciáját.

Abstract

Although recent advance in tumor therapies have had a significant impact on patient survival, treatment of malignancies is still a major challenge in the human and canine cancer clinic. The efficacy of new, promising drugs (signaling pathway and angiogenesis inhibitors, targeted therapy) is often hampered by the emergence of multidrug resistance (MDR) of tumors. As a result of MDR, the initial hypersensitivity of cancer is lost as the cells evolve to survive in the highly toxic environment. One of the main contributors to the mechanisms responsible for MDR is the overexpression of a member of the ABC (ATP-binding cassette) transporter family, namely P-glycoprotein (Pgp, ABCB1, MDR1). Pgp extrudes a wide spectrum of cytotoxic compounds (from chemotherapeutics to anti-HIV drugs) from the cell, resulting in the decreased intracellular concentration of the drugs. The best understood mechanism leading to elevated transporter expression is based on the higher mutation rate of cancer cells. Recently, an alternative mechanism has been proposed with an emphasis on epigenetic regulation.

My goal was to examine the influence of Pgp function on the treatment outcome of canine lymphoma. Using flow cytometry I analyzed Pgp expression and function as well as the immunphenotype of 16 canine lymphoma samples. Here I present two case studies with a long term follow up (25 weeks). Dogs diagnosed with B cell lymphoma were treated according to the Wisconsin-Madison protocol 16 times over the course 25 weeks. Pgp function and the immunphenotype of isolated tumor cells were determined at diagnosis and relapse (4 measurements).

In one case, initial Pgp function significantly increased during treatment which was followed first time. In the other case surprisingly, resistance proved to be reversible, as a break in the therapy (“drug holiday”) resulted in the loss of resistance. To study mechanisms underlying the rapid emergence and loss of the drug resistance observed in the canine clinic, I performed in vitro experiments using P388 B cell type mouse lymphoblastic leukemia cells. The contribution of epigenetic regulatory mechanisms will be delineated using a panel of epigenetic inhibitors in the future.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Vajdovich Péternek a dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségével és azért, hogy kezdetektől fogva támogatta a munkámat.

Köszönöm a segítséget a dolgozat megírásához és a labor biztosítását a minta feldolgozáshoz Dr. Szakács Gergelynek és csoportjának az MTA-SE Membránbiológiai Kutatócsoportnál.

Külön köszönöm Füredi Andrásnak a labor munka betanításáért, segítségét a minták feldolgozásában, valamint sok türelmét és tanácsát a dolgozat írásában.

Köszönöm Szabényi Kornélia munkáját, az áramlás citométerrel történő analízist és kiértékelést.

Hálás vagyok Baricz Tamás és Dr. Dékay Valéria segítségével, valamint az egész Á.H.O.K. Kft-ben dolgozó csapatnak a türelméért.

Irodalomjegyzék

1. Dobson, J.M., et al., Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract*, 2002. 43(6): p. 240-6.
2. Bronson, R.T., Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *Am J Vet Res*, 1982. 43(11): p. 2057-9.
3. America, B.M.D.C.o., 200 BMDCA Health Survey. Summary of Data. document on the internet, 2000.
4. Moe, L., Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl*, 2001. 57: p. 439-43.
5. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 2013. 63(1): p. 11-30.
6. Enginler, S.O., et al., Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours. *Vet Res Commun*, 2014. 38(1): p. 21-7.
7. Cekanova, M. and K. Rathore, Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Des Devel Ther*, 2014. 8: p. 1911-1922.
8. Fournel-Fleury, C., et al., Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *J Comp Pathol*, 1997. 117(1): p. 35-59.
9. Vail, D.M., et al., Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol*, 1996. 24(7): p. 807-15.
10. Hahn, K.A., et al., Is maintenance chemotherapy appropriate for the management of canine malignant lymphoma? *J Vet Intern Med*, 1992. 6(1): p. 3-10.
11. Thamm, D.H., et al., Preclinical study of dolastatin-10 in dogs with spontaneous neoplasia. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002. 49(3): p. 251-5.
12. Stephen J. Withrow, D., DACVS, DACVIM (Oncology), and David M. Vail, DVM, DACVIM Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fourth Edition). 2007.
13. Buchholz, J. and H. Walt, Veterinary photodynamic therapy: a review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2013. 10(4): p. 342-7.
14. Wergin, M.C. and B. Kaser-Hotz, Plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) measured in seventy dogs with spontaneously occurring tumours. *In Vivo*, 2004. 18(1): p. 15-9.

15. Abbondati, E., et al., An immunohistochemical study of the expression of the hypoxia markers Glut-1 and Ca-IX in canine sarcomas. *Vet Pathol*, 2013. 50(6): p. 1063-9.
16. Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*, 2001. 42(7): p. 1007-17.
17. Dean, M., The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol*, 2005. 400: p. 409-29.
18. Juliano, R.L. and V. Ling, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, 1976. 455(1): p. 152-62.
19. Krol, M., et al., Why chemotherapy can fail? *Pol J Vet Sci*, 2010. 13(2): p. 399-406.
20. Szécsényi, D.-V., P. - Gaál, T., Terápia rezisztenciát okozó pumpa fehérjék szerepe különböző kórképekben. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2007: p. 361-370.
21. Sharma, S.V., et al., A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*, 2010. 141(1): p. 69-80.
22. Pisco, A.O., et al., Non-Darwinian dynamics in therapy-induced cancer drug resistance. *Nat Commun*, 2013. 4: p. 2467.
23. Knoechel, B., et al., An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 2014. 46(4): p. 364-70.
24. Kurata, T., et al., Combination phase I study of nedaplatin and gemcitabine for advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, 2004. 90(11): p. 2092-6.
25. Yano, S., et al., 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*, 2005. 15(2): p. 107-11.

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Karai Edina a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- tumor sejtek előkészítése
- calcein jelölés
- immunfenotipizálás
- in vitro kísérlet (P388, MES-SA)
- MAF érték számítása

végeztem el.

Budapest, 2015. január.4.

.....

aláírás