

A kutatás eredeti célja az volt, hogy olyan paramétereket találjunk a kutyákban előforduló daganatok kezelésére, amelyek az eddiginél pontosabban leírják és megbízhatóbb prognózist adnak a gyógykezelésre adott várható válaszra. A kutatás alapkérdése, hogy milyen tulajdonságoktól függ a daganatos sejtek terápia-rezisztens vagy érzékeny volta. Az ezzel összefüggő tényezők közül a rutin klinikai és biokémiai paraméterek meghatározásán felül, a daganatos sejtek szabadgyök-termelő és antioxidáns rendszerének, valamint a multidrug rezisztencia egyes elemeit vizsgáltuk.

A kutyák és az emberek rosszindulatú daganatai között nagyon nagy a hasonlóság, ezért az állatok minden szempontból megfelelő modellként szolgálnak a vizsgálathoz. Alkalmasak a szervezet általános és a tumor szövetek redox státuszának, valamint a terápia kimenetele közötti összefüggések tanulmányozására.

Munkánkhoz a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Tanszékére beérkező daganatos kutyák leleteit és szövetmintáit használtuk fel. A Belgyógyászati Tanszéken rutinszerűen folyik különböző daganatos kórképekben szenvedő kutyák diagnosztizálása és gyógykezelése, illetve itt végzik a szövetminták hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálatát, a tumoros sejtek immunfenotipizálását és vérmintáik rutin klinikai laboratóriumi analízisét. A molekuláris biológiai vizsgálatokat, valamint a szabadgyökök és antioxidáns paraméterek mérését a MTA Kémiai Kutatóközpont Kémiai Intézetében végeztük.

A daganatos folyamatok prognózisának megítélését elősegíti a sejtek oxidációs jellemzőinek ismerete. Az általánosan vizsgált paramétereken felül a multidrug rezisztenciára jellemző egyes markerek vizsgálatát céloztuk meg, mivel ezek is összefüggésbe hozhatók a tumoros sejtek proliferációs és metasztatikus tulajdonságaival, de keveset tudni a prognosztikus értékükről.

### **Redox paraméterek mérése daganatos kutyákba.**

Előkísérleteink során, melyekben 11 előrehaladt non-Hodgkin limfomás és 10 egészséges kutya vér és nyirokcsomó mintáit vizsgáltuk, arra a megállapításra jutottunk, hogy a beteg állatok jelentős oxidatív stressz alatt állnak. Legfontosabb eredményünk, hogy a nyirokcsomókban mért egyes paraméterek, mint a redukált és oxidált glutation

aránya, illetve a biopsziákból készített és *in vitro* körülmények között stimulált sejtek szabadgyök-képző képessége arányban állt a COPA (ciklofoszfamid-oncovirin-prednisolon-adriamicin) kemoterápia kimenetelével, vagyis a kutyák recidiváns életidejével. Ezek a teljesen új eredmények fontos prognosztikai jelentőséggel bírhatnak, amit a Cancer Letters című folyóiratban publikáltunk.

A biztató előkísérletek után egy nagyobb számú és különböző eseteket magába foglaló csoporton vizsgáltuk, hogy a kutyák vérében és leggyakrabban előforduló tumoraiban mért redox és MDR paraméterek milyen összefüggésben állnak a daganatok típusaival, rezisztenciájával, és legfőképp, a terápia eredményességével.

Kimutattuk, hogy előrehaladott kutya non-Hodgkin limfomákban a tumorok proliferációs indexe egyenes arányban áll a szövet glutation háztartásával, illetve stacioner gyök koncentrációjával. Ezek az adatok összhangban vannak más kutatócsoportok által különböző tumorokban mért eredményekkel és alátámasztják azt az elképzelést, hogy a tumoros sejtek egy fokozott metabolikus állapotból eredendően több szabadgyökkel rendelkeznek, mint az egészséges sejtek. A mérési eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a kezelések hatására az antioxidáns védekező rendszer tagjai, a vörös vörösvérsejt-hemben a glutation peroxidáz, a vérplazmában a FRAP (ferric reducing activity of plasma) és a C-vitamin értékei a kezelés első hetén csökkennek, majd ezután kezdenek újra emelkedni, ugyanakkor vörös vörösvérsejtben a lipidperoxidáció termékének, a TBARS (thiobarbituric acid reactive substrates), más néven a malondialdehydnek a koncentrációja a kezelés 2-3. hetében egyértelműen nő. A glutation-redoxrendszer változása a kezelés ötödik hetében volt tapasztalható, mind a vérplazmában, mind a vörösvérsejt hemolizátumban mért paraméterek alapján. A kezelésnek ebben az időpontjában a glutation-rendszerben fokozott oxidációt igazoltunk, valószínűsíthetően a korábban adott ciklofoszfamid hatására.

Fontos tanulság, hogy a szabadgyökök elleni csökkent védekezés az állatokat hajlamosítja az egyéb fertőzőes betegségek kialakulására. A kezelés során tehát, ajánlott az antioxidáns védekező rendszert támogató szerek használata.

**Multidrog rezisztencia kimutatása tumormintákban Western blottal.**

A daganatok kemoterápiás kezeléssel szemben mutatott ellenálló képességének egyik legjelentősebb tényezője az MDR1 transzporter, vagyis P a (permeability) glükoprotein (Pgp), amely képes a kemoterápiás gyógyszereket a sejtekből kipumpálni, még azelőtt, hogy azok hatásukat kifejthetnék. Vizsgálataink célja annak megállapítása, hogy az MDR1 immunhisztokémiai kimutatásának sikeres beállítását követően sikerül-e a fehérje Western blot (Wb)-módszerrel történő kimutatása is. Továbbá arra is választ kerestünk, hogy ezzel a módszerrel is sikerül-e a betegek kezelésére vonatkozó prognosztikai információt szerezni. Ugyanis nem találtunk sem a humán, sem az állatorvosi szakirodalomban adatot arra vonatkozóan, hogy Western blot módszerrel vizsgálták volna a Pgp-t, mint prognosztikai faktort daganatos kórképekben. Összesen 17 lymphomában szenvedő kutya nyirokcsomóit vizsgáltuk. A kutyák életkora átlagosan 8,3 év volt. Mindegyik kutya a betegségének előrehaladott stádiumában került kezelésre, mindegyiknél generalizált perifériás nyirokcsomó duzzanat, és egy kivételével valamennyi esetben lép, vagy máj, illetve hasúri nyirokcsomó duzzanat, valamint a betegséggel összefüggő mellkasi radiológiai elváltozások jelentkeztek. A kemoterápiás kezelés során a daganat visszahúzódása, vagyis a remisszió átlagosan 93%-os volt, az első kiújulásig (recidíváig) eltelt idő átlagosan 10 hónap, és az elhullásig eltelt idő átlagosan 15 hónap volt.

A kimetszett nyirokcsomók egy része szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatra került, míg a másik részét  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a későbbi Wb módszerrel történő vizsgálathoz, amelynek során a humán MDR1 ellen egérben termeltetett C219-es monoklonális ellenanyagot használtuk. Az MDR1 negatív és pozitív esetek különböző paramétereinek Student félé  $t$ -próbával történt vizsgálata során szignifikáns eltérést csak a remisszió %-ában találtunk. A Pgp-pozitív esetekben ez 88, míg a negatív esetekben 100% volt. Az összes beteg összes paraméterének együttes összehasonlítását Pearson-féle módszerrel végeztük. Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az 1. és a 2. recidíva megjelenésének ideje ( $r: 0,833$ ) és az 1. recidíva, valamint a teljes túlélési idő között ( $r: 0,961$ ). Negatív korreláció jelentkezett a remisszió %-a és az állatok életkora ( $r: -0,549$ ), valamint a remisszió %-a és a Pgp mennyisége ( $r: -0,462$ ) között, továbbá a lépduzzanat megjelenése és a túlélési idő között ( $r: -0,558$ ).  $\chi^2$ -próbával igazoltuk, hogy

az MDR1-pozitív egyedekben szignifikánsan több esetben jelentkezik a recidiva a kezeléstől számított 8 hónapon belül ( $p=0,023$ ), mint az MDR1-negatív esetekben. A Pgp kimutatására irányuló Wb-módszer specificitása 85,7 %, és szenzitivitása 70 %, pontossága 76,5 % arra vonatkozóan, hogy az így vizsgált és pozitívnak minősített egyedekben az első recidiva a kezelés kezdetét követő 8,5 hónapon belül jelentkezik.

Az eljárás 71,4 %-os specificitással, 60 %-os érzékenységgel és 64,7 %-os pontossággal jelzi előre azt, hogy az MDR1-pozitív állat elhullása a kezelés kezdetétől számított 12 hónapon belül bekövetkezik.

### **Multidrog rezisztencia kimutatása tumormintákban PCR technikával.**

A Western blot alkalmazásán kívül kvantitatív real time-PCR technikával is megvizsgáltunk négy ismert és a multidrog rezisztenciában szerepet játszó fehérje mRNS szintjét. Vizsgálataink célja annak megállapítása volt, hogy a nyirokcsomók lymphoid sejtjeinek egyes membrántranszportereinek (Pgp vagy MDR1, MRP1, MRP2 és a BCRP) mRNS expressziójának mértékében van-e különbség a kontroll egészséges és a betegek között, valamint az mRNS-expresszió mértéke hogyan korrelál a lymphomás betegek klinikailag is megfigyelhető terápiás válaszával.

A vizsgálatokhoz 4 csoportot alakítottunk ki: elsődleges, recidivált, szepszisben elhullott és kontroll csoportot. E csoportok között elvégzett statisztikai számítások több terápiarezisztenciát okozó fehérje esetén is szignifikáns eltérés mutattak. A kontrollhoz képest mRNS szintű transzporter csökkenést találtunk az MDR1 szintjében mind az elsődleges daganatok mind a recidívákat tekintve, sőt azon nyirokcsomómintákban, amelyek szepszisben elhullott betegekből származtak. MRP1 esetében szignifikáns különbség adódott a kontroll és a szepszises csoport között. BCRP esetében a recidivált és szepszises csoport között találtunk jelentős különbséget. Az MDR1 expresszió a kontrollhoz képest a recidivált csoportban szignifikánsan nagyobb volt, abban az esetben, amikor azonos állatok nyirokcsomóit hasonlítottuk össze.

A betegek összes paraméterével (transzporter szintek, túlélési idők, kor) elvégzett korrelációs vizsgálat során számos összefüggés adódott. Minél korábban jelentkezett az első recidiva annál rövidebb időn belül esett újra vissza az állat és annál hamarabb

következett be az állat elhullása. A korrelációs vizsgálat szerint az életkor növekedésével a MDR1 expressziója is nő. Az MDR1 szoros negatív korrelációt mutatott a recidívamentes túlélési idővel és a teljes túlélési idővel. A BCRP mRNS expressziója a túléléssel szintén fordítottan arányos.

Vizsgálataink eredményei alapján elmondhatjuk hogy lymphomás kutyák nyirokcsomójából PCR technikával történő transzporterek mRNS szintjének meghatározása fontos prognosztikai információval szolgálhat.

### **Fotodinamikus terápia alkalmazása társállat tumorok kezelésében.**

Napjainkban a klinikai kisállatgyógyászat gyors fejlődése révén a korábbiak mellett új diagnosztikai és terápiás módszerek jelennek meg. A kisállat-onkológiai szakellátás az elmúlt évtizedben számos kezelési módszert vett fel a rutineljárások sorába. Társállataink onkológiai megbetegedéseinek kezelésében a hagyományos műtéti beavatkozások mellett speciális sebészeti ellátásra, kemoterápiára és radioterápiára is lehetőség nyílt az utóbbi időben. A hazai állatorvos-társadalom és az állattartók szemléletváltásának köszönhetően ezek az eljárások mind gyakrabban kerülnek alkalmazásra. Ezért munkánkat kibővítettük a fotodinamikus terápia (nemzetközi rövidítése PDT) bevezetésére a magyar állatgyógyászatba és mechanizmusának tanulmányozására.

A humán onkológiai diagnosztikai és terápiás eljárások sorában az elmúlt évtizedekben ismertté vált PDT már túljutott a kísérleti fázison, és egyes daganatok illetve precancerosus állapotok kezelésében elfogadott, és rutinszerűen alkalmazott módszerré vált. Lényege, hogy a szervezetbe fényérzékenyítő (fotoszenzibilizátor) anyagot juttatunk, mely a daganatszövetben többnyire feldúsul, míg az egészséges szövetekből viszonylag gyorsan kiürül. A fényérzékenyítő anyag feldúsulásának fázisában a daganatot meghatározott hullámhosszú, látható tartományú fényrel megvilágítják. Ekkor a szövetben lévő oxigén molekulák reaktív oxigén-specieszekké (ROS) alakulnak és nagy mennyiségben való felszabadulásuk révén a daganatos sejtek apoptózisba kerülnek, ill. irreverzibilisen károsodnak, amely a tumor regresszióját okozza.

Nagy betegszám vizsgálatával kívánjuk meghatározni az egyes daganattípusok PDT-érzékenységét, és hogy ez az érzékenység mely klinikopatológiai, biokémiai, redox paraméterekkel korrelál. Vizsgálni kívánjuk a tumor stádiumának, szövettani típusának és differenciáltságának a PDT hatékonyságával való összefüggéseit, illetve a multidrog rezisztencia fehérjék expresszióját. Ezeknek ismeretében a későbbiekben már előre jelezhető lenne az egyes tumortípusok PDT-érzékenysége, és végső soron alapot szolgáltatna annak a kisállat-onkológiai protokollokba való beépítésére.

Eddigi vizsgálatainkat elsőként 13 macskán és 3 kutyán végeztük. A macskák között 7 laphámcarcinomás, és 6 sarcomás, míg a kutyák között 1 sarcomás és 2 mastocytomás beteg volt. A kezelések minden állaton azonos módon történtek. Szövettani mintákat vettünk a kezelések előtt, majd azokat követő 1-2. héten. Vérmintákat a kezelés előtt, közvetlenül a kezelés után, valamint 1-2 héttel a kezelések után vettünk.

A betegek átlagos recidívamentes túlélési ideje (RTI)  $14,5 \pm 11,1$  hét (medián: 13), teljes túlélési ideje (TTI)  $23,8 \pm 29,9$  (medián: 12) hét volt. A szövettani malignitás foka alapján kis- és nagymalignitású daganatokra osztottuk a betegeket. Ez alapján a kismalignitású daganatos betegek RTI-je  $16 \pm 11$  (medián: 16) hét, TTI-je  $41,9 \pm 31$  (medián: 30) hét, a nagymalignitású daganatos betegek RTI-je  $1,5 \pm 1,2$  (medián: 1) hét, TTI-je  $2,7 \pm 1,2$  (medián: 2,5) hét volt. A betegeken a PDT-kezeléseket követően gyulladáshozó reakciók is mutatkoztak. A hematológiai paraméterekben a PDT-kezelések után közvetlenül, míg a biokémiai paraméterekben 1 hét után jelentkeztek változások.

Tapasztalataink alapján a PDT-kezelés mind a carcinomás, mind a sarcomás betegek esetén alkalmazható, és kismalignitású daganatok esetében eredményes.

A transzporter fehérjék mennyiségét különböző macskákból származó tumorszövetekből Western blot technikával határoztuk meg. A tumoros szövetekben is megtalálható volt az MDR1, illetve MRP1 transzporter, de ezek mennyisége a PDT kezelések hatására nem növekedett jelentősen. Az BCRP expresszióját vizsgálva, néhány esetben a PDT kezelések után növekedést tapasztaltunk, ami az irodalmi adatok alapján várható volt. Az eddig elvégzett kezelések azt mutatják, hogy a vizsgált multidrog transzporterek a PDT kimenetelét nem befolyásolják. Ennek következménye lehet, hogy a már MDR-rezisztens tumorok is sikeresen kezelhetők PDT-vel.

### **Témában született előadások, poszterek.**

Szabó Bernadett, Molnár Péter, Vajdovich Péter, Szécsényi Dóra, Jakus Judit: Fotodinamikus terápia mechanizmusának tanulmányozása állati tumorok kezelésében. MTA Állatorvos-tudományi Bizottság konferenciája. 2006. január 23-25., Budapest.

Szécsényi Dóra, Vajdovich Péter PhD, Nógrádi Zsófia, Gaál Tibor, Jakus Judit, Szabó Bernadett: A P-glükoprotein vizsgálata lymphomás kutyák nyirokcsomójában, a Western blot és az immunhisztokémiai módszerek eredményeinek összehasonlítása. Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar akadémiai beszámolója, 2007. január 25., Budapest.

Molnár Péter, Németh Tibor, Vajdovich Péter, Szécsényi Dóra, Szabó Bernadett, Jakus Judit: Fotodinamikus terápia alkalmazása kisállatok egyes daganatos betegségeiben. Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar akadémiai beszámolója, 2007. január 25., Budapest.

Szabó Bernadett, Molnár Péter, Vajdovich Péter, Szécsényi Dóra, Jakus Judit: Macska tumorokban vizsgált multidrog rezisztencia 5-ALA indukált fotodinamikus terápia során. Magyar Állatorvosi Onkológiai Társaság Konferenciája. 2007. május 5., Lajosmizse.

Szabó Bernadett, Molnár Péter, Vajdovich Péter, Szécsényi Dóra, Jakus Judit: MDR proteinek vizsgálata 5-ALA indukált fotodinamikus terápia során macska tumorok kezelésében. MTA Kémiai Kutatóközpont X. Doktori Kémiai Iskola, 2007. május 7-9. Mátraháza.

Szabó Bernadett, Molnár Péter, Vajdovich Péter, Szécsényi Dóra, Jakus Judit: MDR proteinek vizsgálata 5-ALA indukált fotodinamikus terápia során macska tumorok kezelésében. 37. Membrán-Transzport Konferencia, 2007. május 22-25., Sümeg.

Szabó Bernadett, Molnár Péter, Vajdovich Péter, Szécsényi Dóra, Jakus Judit: A fotodinamikus terápia szabadgyökös vonatkozásai. Magyar Szabadgyök Kutató Társaság IV. Kongresszusa, 2007. október 11-13., Pécs.

Vajdovich Péter, Szabó Bernadett, Szécsényi Dóra, Jakus Judit, Sunyál Orsolya: Terápiarezisztencia fehérjéket kódoló mRNS kvantitatív kimutatása PCR-technikával lymphomás kutyák nyirokcsomójában. Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar akadémiai beszámolója, 2008. január 29., Budapest.

Szabó Bernadett, Jakus Judit: Multidrog rezisztencia fehérjék hatása 5-aminolevulénsav kezelésre és fotodinamikus terápiára HT29 adenocarcinoma sejtvonalakban. Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar akadémiai beszámolója, 2008. január 29., Budapest.

Szabó Bernadett, Molnár Péter, Vajdovich Péter, Szécsényi Dóra, Jakus Judit: Redox paraméterek változásai tumoros állatokban fotodinamikus kezelés során. Magyar

Szabadgyök Kutató Társaság és MTA Mikroelem Munkabizottság Munkaértekezlet, 2008. szeptember 26, Budapest

Bernadett Szabó, Péter Molnár, Péter Vajdovich, Dóra Szécsényi, Judit Jakus: Involvement of MDR proteins and of the redox status in the outcome of canine and feline tumor PDT: 7<sup>th</sup> International Symposium on Photodynamic Therapy and Photodiagnosis in Clinical Practice, 2008. október 7-11, Olaszország, Bixen/Bressanone.

Judit Jakus, Bernadett Szabó, Peter Molnar, Peter Vajdovich, Dora Szécsényi. Redox status of feline tumors before and after photodynamic therapy. EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ONCOLOGY Annual Congress 2009, 27<sup>TH</sup> – 29<sup>TH</sup> March 2009, Hotel Silvanus, Visegrád, Budapest, Hungary.

Peter Molnar, Bernadett Szabó, Peter Vajdovich, Dora Szécsényi, Laura Merész, Judit Jakus. Application of photodynamic therapy in cases of tumor-bearing companion animals. ESVONC Annual Congress 2009, 27<sup>TH</sup> – 29<sup>TH</sup> March 2009, Hotel Silvanus, Visegrád, Budapest, Hungary.

Szabó Bernadett, Sunyál Orsolya, Szécsényi Dóra, Jakus Judit, Vajdovich Péter: Terápiarezisztencia fehérjék vizsgálata limfómás kutyákban 39. Membrán-Transzport Konferencia, 2009. május 19-22., Sümeg.

Vajdovich Péter, Jakus Judit, Molnár Péter, Szabó Bernadett, Merész Laura: A fotodinamikus terápia alkalmazása macskák carcinomájában és sarcomájában. Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar akadémiai beszámolója, 2009 január 23., Budapest.

Molnár Péter, Merész Laura, Németh Tibor, Vajdovich Péter, Szécsényi Dóra, Szabó Bernadett, Jakus Judit: Klinikai tapasztalatok macskák fotodinamikus terápiájában. Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar akadémiai beszámolója, 2009 január 23., Budapest.

Bernadett Szabó, Péter Molnár, Péter Vajdovich, Dóra Szécsényi, Laura Merész, Judit Jakus: Involvement of ABC transporters during tumor PDT in vitro and in vivo. 15<sup>th</sup> International Congress on Photobiology, 2009. június 18-23, Németország, Düsseldorf.