

# Diplomamunka

Mészáros Anna

2020



Állatorvostudományi Egyetem  
Kóréletti és Onkológiai Tanszék

**Kutyák emlődaganatainak kemoterápia  
rezisztencia vizsgálata áramlási  
citométerrel**

**készítette:** Mészáros Anna

**témavezetők:** Vajdovich Péter tanszékvezető egyetemi docens  
Karai Edina PhD hallgató

Budapest, 2020

## Tartalom

Tartalomjegyzék.....	1
Rövidítések jegyzéke.....	2
Bevezetés/irodalmi áttekintés.....	4
1. Kutyák emlődaganatai .....	4
2. Terápiarezisztencia .....	12
3. Az áramlási citometria.....	16
Célkitűzés .....	17
Anyag és módszer .....	18
1. A vizsgálatban részt vevő állatok .....	18
2. A mintavétel .....	19
3. A sejtek előkészítése és a calcein assay.....	19
4. Az áramlási citometria.....	20
5. MAF érték.....	21
6. Szöveti feldolgozás .....	21
7. Statisztikai elemzés.....	21
Eredmények.....	22
Következtetések .....	30
Összefoglaló .....	32
Summary .....	33
Köszönetnyilvánítás .....	34
Irodalomjegyzék.....	35

## Rövidítések jegyzéke

ABC – ATP-binding cassette  
BCRP – Breast Cancer Resistance Protein  
BRCA-1, BRCA-2 – Breast Cancer gén 1 és 2  
calcein-AM – calcein-acetoximetilészter  
c-KIT – mast/stem cell growth factor receptor  
c-MET – hepatocyte growth factor receptor  
COX – ciklooxygenáz  
DMSO – dimetil-szulfoxid  
EGFR – epidermal growth factor receptor  
ER – ösztrogén-receptor  
FACS – Fluorescein Activated Cell Sorting  
FNA – vékonytű aspiráció (Fine Needle Aspiration)  
GH – növekedési hormon  
HER-2 – human epidermal growth factor receptor-2  
i.v. – intravénás  
IGF-1 – insulin-like growth factor  
ln. – lymphonodus  
MDR – multidrog rezisztencia  
MRP1 – Multidrug Resistance Protein-1  
MXR – Mitoxantron-rezisztencia gén  
NSAID – nem-szteroid gyulladáscsökkentő  
OE – ovariectomia  
OHE – ovari hysterectomia  
OST – teljes túlélési idő (Overall Survival Time)  
p.o. – per os  
PBS – foszfát-pufferolt sóoldat  
PDGFR1 – platelet derived growth factor receptor-1  
Pgp – P-glikoprotein (Permeability glycoprotein)  
PR – progeszteron-receptor  
RFP – relapszus mentes idő (Relapse Free Period)  
rt-PCR – reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció

supf. – superficialis

TP53 – tumorprotein-53

VEGF – Vascular endothelial growth factor

VEGFR-1, VEGFR-2 – Vascular endothelial growth factor receptor 1 és 2

WHO – World Health Organisation

## Bevezetés/irodalmi áttekintés

### **1. Kutyák emlődaganatai**

#### 1.1. Előfordulás, tumorbiológia

Az emlőtumorok a kutyák igen gyakori daganatai, nőstény kutyákban ez a leggyakrabban előforduló daganattípus (Sorenmo és mtsai., 2011). A betegség leginkább a középkorú és idős állatokat érinti, kifejezetten ritkán találkozhatunk 5 évesnél fiatalabb egyedekben a rosszindulatú folyamatokkal (Vail és mtsai., 2020). Az emlődaganatok kialakulásában fontos szerepet játszik az állatok hormonális háttere, Schneider és munkatársai vizsgálata alapján a kutyák még az első ivarzás előtt történő ivartalanítása esetén mindössze 0,5%-os eséllyel fordult elő emlődaganat a későbbi életük során. Ez az arány a tanulmány szerint az első és a második ivarzási ciklus közötti ovariectomia (OE) esetén 8%, a második és a harmadik ösztrusz között elvégzett ivartalanításkor pedig 26% volt. Az ennél későbbi ovariectomiának nincs szignifikáns hatása a tumorok kialakulására (Schneider és mtsai., 1969). Más kutatások szintén kimutatták, hogy a fiatal életkorban elvégzett ivartalanítás csökkenti az emlődaganatok kifejlődésnek valószínűségét, ám ez a védő hatás az életkor növekedésével egyre kevésbé jelentős, és a 2 és fél éves kor után elvégzett OE már nem befolyásolja a daganatos folyamatokat (Sonnenschein és mtsai., 1991; Koltai and Vajdovich, 2014; Vail és mtsai., 2020). Az emlőtumorok előfordulása leggyakrabban a kistestű kutyafajtákban figyelhető meg, ezt követi a közepes méretű fajták aránya, majd utóbbtól nem sokkal elmaradva a nagytestű kutyák (Salas és mtsai., 2015). Az előfordulást befolyásoló egyéb tényezőként merülhet fel az állatok testkondíciója: humán emlődaganatos páciensek esetében az elhízás kimutatható rizikófaktor (Calle & Kaaks, 2004). Az erre irányuló vizsgálatok azonban kutyáknál csak az ivarérés kori (9-12 hónapos) testkondíció és a későbbi emlődaganatok között találtak összefüggést, a felnőttkori testsúlynak nem volt befolyása a betegség gyakoriságára (Sonnenschein és mtsai., 1991).

Az emlőtumorok fajtához kapcsolódó gyakoriságával kapcsolatban is számos tanulmány született, ezek eredménye azonban földrajzi területenként eltérő. Többek között németjuhász, yorkshire terrier, tacsó, uszár, dobermann és angol springer spániel kutyákban volt megfigyelhető az emlődaganatok gyakoribb előfordulása (Sorenmo, 2003; Vail és mtsai., 2020).

A fajtánként eltérő incidenciát felveti az örökletes komponens gyanúját, ám még nem sikerült kimutatni olyan mutációt, amely bizonyítottan felelős lenne kutyákban a betegség kialakulásáért (Sorenmo, 2003; Rivera, 2010). Az egyik legismertebb tumorszuppresszor gén a

TP53 gén, amely a p53 fehérjét kódolja. Ez a fehérje a DNS-károsodást szenvedő sejtek apoptózisáért felelős. Az állatorvosi onkológiában számos kutatás foglalkozott a p53 fehérje immunhisztokémiai vizsgálatával, amelynek felhalmozódása gyakran megfigyelhető a rosszindulatú elváltozásokban, ám kutyák emlődaganatai esetében egyelőre nem bizonyult megbízható prognosztikus markernek (Lopuszynski és mtsai. 2010; Terra és mtsai. 2012; Koltai & Vajdovich, 2014; Munday és mtsai. 2019). A BRCA-1 és BRCA-2 gének, melyeknek örökletes mutációja bizonyítottan szerepet játszik a humán mellrák kialakulásában (Oláh, 2005), Rivera és munkatársai angol springer spánieleken végzett vizsgálatai alapján kutyák emlődaganatos megbetegedéseivel is kapcsolatba hozhatók (Rivera és mtsai., 2009). A protooncogénként ismert c-erbB-2 gén, amely a HER-2 (human epidermal growth factor-2) nevű tirozin-kináz receptor fehérjét kódolja, kutyák emlődaganatos mintáiban nem mutatott a humán mellrákos betegekéhez hasonló amplifikációt, bár a HER-2 protein fokozott expressziója kutyák emlőszövetében is hasonló százalékos arányban fordult elő, mint az emberi tumorokban (de las Mulas és mtsai., 2003).

Az emlőmirigyben az ivari ciklus során komplex morfológiai és szövettani változások zajlanak, melyek irányítását legfőképpen a petefészekhormonok, az ösztrogén és a progeszteron végzik. Ezek a hormonok a tubularis és ductalis epithelium proliferációját, illetve a kötőszövetes állomány sejtjeinek szaporodását okozzák, emellett az ösztrogénnek és metabolitjainak direkt genotoxikus és karcinogén hatása is ismert (Russo & Russo, 2006). A progeszteron rákkeltő hatása feltételezhetően a növekedési hormon (GH) termelés serkentésén keresztül valósul meg. A növekedési hormon nem csak közvetlenül gyakorol stimuláló hatást az emlőszövetre, hanem az insulin-like growth factor-1 (IGF-1) produkció fokozásával is, amely serkenti az epithelialis sejtek proliferációját és növeli az életidejüket is, valamint részt vesz a karcinogenezis szempontjából fontos gének szabályozásában is (Queiroga és mtsai., 2010; Vail és mtsai., 2020). Más növekedési faktorok is szerepet játszanak az emlőtumorok fejlődésében: Restucci és munkatársai a rosszindulatú daganatos sejtekben a VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) fokozott expresszióját figyelték meg, amely a daganatos szövet angiogenesiséért felelős (Restucci és mtsai., 2002). Koltai és munkatársai 2018-as tanulmánya 7 különböző növekedési faktor tirozin-kináz receptorának (VEGFR1, VEGFR2, EGFR, HER-2, PDGFR1, c-KIT és c-MET) mRNS expresszió szintjét vizsgálta kutyák emlődaganatos mintáiban real-time PCR módszerrel, és kimutatták ezek megnövekedett jelenlétét a kontroll egészséges emlőszövethez képest (Koltai és mtsai., 2018).

A gyulladással járó folyamatokban közismerten fontos, de a daganatképződéssel is kapcsolatba hozható ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim vizsgálatok Dore és munkatársai jóval

magasabb előfordulást tapasztaltak mind jóindulatú, mind pedig rosszindulatú emlőtumorokban az ép emlőszövettel összehasonlítva (Doré és mtsai., 2003). Queiroga és munkatársai 2005-ös kutatása pedig negatív korrelációt tárt fel az enzim expressziója és az emlődaganatos betegek prognózisa között (Queiroga és mtsai., 2005).

Kijelenthető tehát, hogy a kutyák emlődaganatainak háttérében lévő molekuláris folyamatok igen sokrétűek, ám a tumorbiológia mutat bizonyos hasonlóságokat az emberi mellrákos megbetegedésekkel.

### 1.2. Klinikai megjelenés, diagnózis, besorolások, prognosztikus mutatók

A legtöbb kutya az emlődaganatok diagnosztizálásakor klinikailag egészséges (Sorenmo, 2003; Vail és mtsai., 2020). Ez alól kivételt képez a gyulladós carcinoma, illetve ha az állatnak előrehaladott metasztázisa van (Sorenmo, 2003). Az elváltozásokat általában vagy az állatorvos észleli egy rutin vagy más okból végzett vizsgálat során, vagy pedig a tulajdonos lesz rá figyelmes. Az emlődaganatok megjelenése igen variábilis. A tumor lehet soliter, de az irodalom szerint a kutyák mintegy 60-70%-ának a diagnózis idején már egynél több emlődaganata van (Sorenmo, 2003; Canadas és mtsai., 2019). Ezek változatos méretűek lehetnek, fixáltak vagy a környezetükben könnyen elmozdíthatók, felszínük ép vagy kifeléyesedő. A daganat kiterjedhet csupán egyetlen vagy több emlőtelepre, leggyakrabban a caudalis abdominalis, illetve az inguinalis mirigy érintett (Cassali és mtsai., 2014). Fontos a kórelőzmény felvétele és az alapos klinikai vizsgálat, amely magába foglalja a terület megtekintését és áttapintását is. A további vizsgálatok közül elengedhetetlen a mellkasról készült két- vagy háromirányú röntgenfelvételek elkészítése, mivel az emlődaganatok metasztázisának leggyakoribb helye a tüdő; valamint a hasi ultrahangos (UH) vizsgálat, mert az inguinalis területen fejlődő daganatok a hasi aorta mellett lévő nyirokcsomókba (*lnn. lumbalis aortici, lnn. iliaci mediales, lnn. sacrales, ln. iliofemoralis, ln. femoralis*) adhatnak áttétet (Cassali és mtsai., 2014). Megnagyobbodott és könnyen felkereshető (pl. tapintással, vagy hasi UH-vizsgálattal), regionális nyirokcsomók esetén érdemes elvégezni azok vékonytű aspirációs (FNA) mintavételét és a minta citológiai elemzését, amelynek szenzitivitása 100%, specifitása pedig 96% a daganatos elváltozások kimutatására (Langenbach és mtsai., 2001). A daganatos elváltozásból vett FNA minta citológiai vizsgálata megbízható információval szolgál a tumor szövettani jellemzőiről (Dutra és mtsai., 2008; Simon és mtsai., 2009), azonban nem kötelező elvégezni, mert az eredmény csak ritkán van befolyással az elsődleges terápiára (Németh, 2016). Az emlődaganatos páciens kivizsgálásának részét képezi a vér- (teljes vércép, biokémia) és vizeletvizsgálat, valamint a hasüreg teljes ultrahang-vizsgálata is.



Az emlődaganatok fokozatba sorolása (staging) a WHO által megállapított TNM-rendszer szerint történik, amely a tumor méretét, a regionális nyirokcsomó érintettségét és a távoli metasztázisokat veszi figyelembe (Owen, 1980). Ennek a besorolási rendszernek a Sorenmo és munkatársai által módosított változata (Sorenmo és mtsai., 2011) az állatorvosi onkológiában jelenleg a leginkább használatos (1. táblázat).

	<b>Tumor</b>	<b>Nyirokcsomó</b>	<b>Metasztázis</b>
<b>Stage I</b>	T1 <3cm	N0 = nincs elváltozás	M0 = nincs metasztázis
<b>Stage II</b>	T2 3-5cm	N0	M0
<b>Stage III</b>	T3 >5cm	N0	M0
<b>Stage IV</b>	bármely T	N1 = elváltozás a ny.cs.-ban	M0
<b>Stage V</b>	bármely T	bármely N	M1 = van metasztázis

**1. táblázat:** TNM staging

Egy egészen friss tanulmány a TNM-rendszert vizsgálva jó prognosztikus értékűnek találta azt és javaslatokat tett a módszer lehetséges további fejlesztésére (Chocteau és mtsai., 2019). Az újítás, hogy a tumorméretet nem egyszerű tolómércével állapították meg, hanem a kórszövettani metszeten a haematoxylin/eosin festéssel meghatározható tumorméretet vették figyelembe. Ugyanígy, a nyirokcsomó metasztázist a nyirokcsomó immunhisztokémiai elemzésével az epithelialis marker (cytokeratin 5 and 6 /CK5/6, mouse monoclonal, clone D5/16B4, Dako, dilution 1:50/) alkalmazásával erősítették meg, vagy zárták ki. Ebben az új rendszerben a szövettani stádiumokat a következőképpen határozták meg: 0. stádium (emlő karcinómák *in situ*, folyamatos p63 + myoepithelialis sejtréteggel körülvett daganat), I. stádium [invazív, patológiai tumorméret  $\leq$  20 mm (pT1) negatív vagy ismeretlen nyirokcsomó állapot (pN0 – pNX) és limfovaszkuláris invázió nélkül, LVI–], II. stádium [invazív, patológiai tumorméret > 20 mm (pT2), pN0 – pNX nyirokcsomóállapot és LVI–], IIIA. stádium [invazív, pT1, pozitív nodális állpottal (pN +) és / vagy limfovaszkuláris invázió jelenlétével], és IIIB stádium [invazív, pT > 20 mm (pT2), LVI + és / vagy pN +] (Chocteau és mtsai., 2019).

Kutyák emlődaganatainak kórszövettani tipizálása a Misdorp által publikált besorolási rendszer (Misdorp, 1999) Goldschmidt és munkatársai által továbbfejlesztett változata (Goldschmidt és mtsai., 2011) alapján történik:

*I. hámszövet eredetű rosszindulatú daganatok*

In-situ carcinoma

Egyszerű carcinoma

- tubularis
- tubulo-papilláris
- cisztikus-papilláris
- cribriform

Mikropapilláris invazív carcinoma

Szolid carcinoma

Comedocarcinoma

Anaplasztikus carcinoma

Komplex adenomából/kevert tumorból származó carcinoma

Komplex carcinoma és rosszindulatú myoepithelioma

Kevert carcinoma

Ductalis carcinoma

Intraductalis papilláris carcinoma

*II. speciális rosszindulatú hámeredetű daganatok*

Laphámrák

Adenosquamosus carcinoma

Mucinózus carcinoma

Lipid-rich (szekretoros) carcinoma

Orsósejtes carcinomák

- malignus myoepithelioma
- orsósejtes laphámrák
- orsósejtes carcinoma

Gyulladásos carcinoma

*III. Rosszindulatú kötőszövetes tumorok*

Osteosarcoma

Chondrosarcoma

Fibrosarcoma

Hemangiosarcoma

*IV. Rosszindulatú kevert tumor: carcinosarcoma*

*V. Jóindulatú daganatok*

Egyszerű adenoma

Intraductalis papilláris adenoma (ductalis papilloma)

Ductalis adenoma

Fibroadenoma

Myoepithelioma

Komplex adenoma

Jóindulatú kevert tumor

*VI. Besorolatlan daganatok*

*VII. Hyperplasiák és dysplasiák*

Ductectasia

Lobuláris hyperplasia

Epitheliosis

Papillomatosis

Fibroadenomatosis

Gynecomastia

*VIII. A csecsbimbók daganatai*

Adenoma

Carcinoma

Carcinoma epidermális infiltrációval

A daganat kórszövettani fokozatba sorolására (histopathological grades) az Elston és Ellis által módosított Nottingham-rendszer használható (Elston & Ellis, 1991). Ez a módszer a tumorból készült a kórszövettani metszeten a sejteken belüli tubulus képződés, a sejtmagok

pleomorfizmusa, illetve a sejtek mitotikus aktivitása alapján pontoz, és az összpontszám adja meg az elváltozás kórszövettani besorolását (2. táblázat).

A kórszövettani tipizálás és a fokozatba sorolás nagyon fontos a tumor természetének és a terápiás lehetőségeknek a felmérésére. Több tanulmány is bizonyította, hogy a tumor típusa és a prognózis között jelentős összefüggés van (Sorenmo, 2003; Rasotto és mtsai., 2017; Canadas és mtsai., 2019). A mitotikus index (Dutra és mtsai., 2008), a regionális nyirokcsomó érintettsége (de Araújo és mtsai., 2015; Tran és mtsai., 2016), a távoli metasztázis (Sorenmo, 2003), illetve a tumor mérete önmagában is prognosztikus értékű lehet (Ferreira és mtsai., 2009; Vail és mtsai., 2020). Általánosan megfigyelhető, hogy a jóindulatú tumorok kisebbek, mint a malignus elváltozások (Al-Mansour és mtsai., 2018). Egyre inkább elfogadott az a feltételezés, hogy a rosszindulatú daganatok hajlamosak egy jóindulatú formából kifejlődni és ritkán alakulnak ki *de novo* (Sorenmo és mtsai., 2011).

<b>szempont</b>	<b>érték</b>	<b>pontszám</b>
tubulusképződés	a tumor >75%-ában	1
	a tumor 10-75%-ában	2
	a tumor <10%-ában	3
nukleáris pleomorfizmus	a sejtmag mérete egy normál sejthez hasonló	1
	kismértékű méretbeli eltérés és variabilitás	2
	nagymértékű variabilitás	3
mitotikus aktivitás	0-8 mitózis/10 látótér	1
	9-16 mitózis/10 látótér	2
	>16 mitózis/10 látótér	3
Pontszámok összegzése: 3-5 pont = Grade I 6-7 pont = Grade II 8-9 pont = Grade III		

**2. táblázat:** Az emlődaganatok kórszövettani fokozatba sorolása

A hormonreceptorok – ösztrogén- (ER) és progeszteron-receptorok (PR) – jelenléte az egyik legfontosabb molekuláris marker kutyák emlőtumori esetén. A receptorok expressziója pozitívan korrelál a prognózissal: a jóindulatú, jobban differenciált daganatokban gyakrabban detektálható PR és ER mint a malignus elváltozásokban (Sorenmo, 2003; Millanta és mtsai., 2005; Chang és mtsai., 2009). Egyéb gyakran használt molekuláris markerek a fentebb tárgyalt HER-2 és EGFR növekedési faktor receptorok, a COX-2 enzim, illetve a Ki-67 sejtproliferációs marker (Zuccari és mtsai., 2008; Lavallo és mtsai., 2012; Cassali és mtsai., 2014).

### 1.3 Terápia

Kutyák emlődaganatainak terápiája elsődlegesen mindig sebészi; kivéve gyulladással járó carcinomák esetén, illetve olyan előrehaladott metasztatizáló betegeknél, ahol a műtét már nem befolyásolja a nagyon kedvezőtlen prognózist (Karayannopoulou & Lafiontatis, 2016; Vail és mtsai., 2020). A tumor sebészi eltávolítása a radikalitás növekvő sorrendjében: nodulectomia (csak 5 milliméternél kisebb, szoliter daganatok esetén használható), mamnectomia (egyetlen emlő eltávolítása), részleges- illetve teljes mastectomia. Fontos, hogy a tumoros elváltozás teljes egészében eltávolításra kerüljön, és ügyelni kell az ép sebszélekre, valamint a minimum 2 cm-es biztonsági távolság betartására (Tran és mtsai., 2016; Vail és mtsai., 2020). A ln. inguinalis supf. mindig kivételre kerül az inguinalis és abdominalis emlőkkel együtt, a ln. axillaris azonban csak megnagyobbodás vagy igazolt metasztatizáció esetén kell eltávolítani (Cassali és mtsai., 2014). Amennyiben mindkét oldali emlőléc érintett, az egyik és a másik oldali mastectomia között 4-6 hétnek kell eltelnie (Németh, 2016).

A tumoreltávolítással egyidőben elvégzett ivartalanítással kapcsolatban megoszlik a szakemberek véleménye. Több szerző is publikálta, hogy a daganat eltávolításakor, illetve azt nem sok idővel megelőző vagy követő OHE esetén hosszabb volt a betegek túlélési ideje (Sorenmo és mtsai., 2000), illetve csökkent az esély az újabb elváltozás megjelenésére (Kristiansen és mtsai., 2013). Ellenben más tanulmányok szerint az ivartalanításnak csak részben volt befolyása a recidívákra és a túlélési időre (Kristiansen és mtsai., 2016). Jelentős különbség csak a korai, 2. tüzelés előtt végzett ivartalanításakor tapasztalható, amely kifejezetten csökkenti az emlődaganatok kialakulásának esélyét. A későbbiekben ez a védőhatás sajnos megszűnik (Schneider és mtsai., 1969). A később végzett ivartalanítás pusztán a benignus daganatok kialakulásának valószínűségét csökkenti (Sorenmo és mtsai., 2019). Ugyanakkor, amikor a kutyákat a műtét idején az ösztrogén-2 (E2) szérumban értékek (magas és alacsony) alapján csoportosították, az ovariohysterectomia (OHE) protektívnek bizonyult a magas E2-es csoportba tartozó kutyákban. Az alacsony E2-vel rendelkezőknél nem volt hatással a recidívára

és a túlélésre. Ugyanebben a tanulmányban az OHE hatását a tumortípusok alapján is vizsgálták és a Grade II daganatokban szenvedő kutyák szignifikánsan hosszabb recidívamentes túlélést mutattak. Az OHE nem volt hatással a Grade I és a Grade III malignitási fokozatú csoportok tagjaira (Kristiansen és mtsai. 2016).

Sok páciens esetében a műtéti kezelés önmagában nem elég. A humán mellrákos betegekben rutinszerűen használt hormonális terápia (pl. az ösztrogén-receptor antagonistá tamoxifen nevű hatóanyag) kutyákban a mellékhatások miatt nem alkalmazható; illetve azért sem, mert kutyáknál többnyire a malignus emlődaganatok nem rendelkeznek ösztrogén- és progesteronkötő receptorokkal, ezeknek a hormonoknak a hatása sem kifejezetten érvényesül, így a hormonatgonisták sem használnak. A nemi hormonok hatásának megszüntetéséhez igénybe vehető módszer szukákban az ivartalanítás.

Számos különböző kemoterápiás hatóanyagot alkalmaznak az emlődaganatos kutyák gyógykezelésére. Egyelőre még nem létezik egységes protokoll, ennek oka valószínűleg a kevés rendelkezésre álló irodalom (Cassali és mtsai., 2014). Klinikai vizsgálatok alapján az 5-fluorouracil (Karayannopoulou és mtsai., 2001), a ciklofoszfamid (Karayannopoulou és mtsai., 2001; Ferrari és mtsai., 2019), a carboplatin (Lavalle és mtsai., 2009), a dezmpresszin (Hermo és mtsai., 2008; Hermo és mtsai., 2011) és több nem-szteroid gyulladáscsökkentő (Lavalle és mtsai., 2009; de M. Souza és mtsai., 2009; Arenas és mtsai., 2016; Ferrari és mtsai., 2019) bizonyult hatékonynak. Az állatorvosi onkológiában igen gyakran alkalmazott doxorubicinnel kapcsolatban ellentmondásos eredmények vannak: Simon és munkatársai doxorubicin illetve docetaxel alkalmazása esetén nem találtak különbséget a túlélési időben a kizárólag műtétilag és a kemoterápiásan kezelt betegek között (Simon és mtsai., 2006); egy mexikói tanulmány ellenben pozitív eredményt ért el doxorubicin és molekuláris jódnéoadjuváns adásakor (Zambrano-Estrada és mtsai., 2018). Hasonlóképpen a rokon vegyület mitoxantron, amely egy 2010-es vizsgálat szerint jelentősen csökkentette az emlődaganatok méretét (Ankur és mtsai., 2010), Tran és munkatársai eredményei alapján azonban nem mutatkozott kedvezőbb túlélés, mint a csak sebészileg kezelt pácienseknél (Tran és mtsai., 2016). A gemcitabin nem bizonyult hatékonynak kutyák emlőtumorainak kezelésében (Marconato és mtsai., 2008). Több *in vitro* (Du és mtsai., 2017), sejtvonalakon végzett (Duijsings és mtsai., 2004; Knottenbelt és mtsai., 2006; Saito és mtsai., 2013; Alkan és mtsai., 2014; Lee és mtsai., 2019) és *in vivo* (Yamashita és mtsai., 2001) kísérlet is történt a különböző gyógyszerek hatékonyságának tanulmányozására. Ezek eredményei azonban csak laboratóriumi körülmények között értékelhetőek, élő állatokon gyakran akadályba ütközik a felhasználásuk – például a hatékony

dózis élő szervezetben már toxikus lenne (Knottenbelt és mtsai., 2006; Karayannopoulou & Lafioniatis, 2016).

Egy összefoglaló írás szerint a következő kemoterápiás protokollok alkalmazása megfontolható (Cassali és mtsai., 2014):

- **doxorubicin és ciklofoszfamid:** az első napon doxorubicin ( $30 \text{ mg/m}^2$  i.v. vagy  $10 \text{ kg}$ -nál kisebb tömegű kutyáknak  $1 \text{ mg/kg}$  i.v.); a 3-4-5-6. napon ciklofoszfamid ( $50 \text{ mg/m}^2$  p.o.); a 22. napon az előző 21 napos ciklus ismétlése, összesen 3-6 ciklus
- **gemcitabin és carboplatin:** az első napon  $200 \text{ mg/m}^2$  i.v. gemcitabin 20 percen keresztül adva, majd ezután 4 órával carboplatin ( $10 \text{ mg/kg}$  i.v szintén 20 perc alatt); a 8. napon megint gemcitabin ( $200 \text{ mg/m}^2$  i.v. 20 percen át); majd a 22. napon az egész ciklus ismétlése, összesen 3-6 ciklus
- **carboplatin:**  $250\text{-}300 \text{ mg/kg}$  carboplatin i.v., 21 naponta ismételve, összesen 3-6 kezelés
- **doxorubicin és carboplatin (különösen carcinosarcomák esetén javasolt):** az első napon doxorubicin ( $30 \text{ mg/m}^2$  i.v. vagy  $10 \text{ kg}$ -nál kisebb tömegű kutyáknak  $1 \text{ mg/kg}$  i.v.); a 15. napon carboplatin ( $250\text{-}300 \text{ mg/kg}$  carboplatin i.v.); 2 hetente váltakozva a két hatóanyag adása összesen 3-3 kezelésig
- **metasztázis esetén:** paclitaxel ( $170 \text{ mg/m}^2$  iv. vagy  $5 \text{ mg/kg}$  i.v.), 3 hetente ismétlés, összesen 3-6 kezelés
- **gyulladásos carcinoma esetén:** a kemoterápiás kezelés előtt és után 3 nappal premedikáció dexametazon és difenhidramin segítségével, hogy csökkentsük a mellékhatásokat; docetaxel ( $30 \text{ mg/m}^2$  i.v.) 3 hetente ismételve, összesen 3-6 kezelésig, mellette piroxicam ( $0,3 \text{ mg/kg}$  p.o. naponta vagy  $0,5 \text{ mg/kg/48h}$ ) vagy firocoxib ( $5 \text{ mg/kg}$  p.o. naponta)

## 2. Terápiarezisztencia

A humán és az állatorvosi onkológiában is megfigyelhető jelenség, hogy a kezelést akadályozza a kemoterápiás szerrel szembeni rezisztencia. A gyógyszerrezisztencia előfordulhat egyetlen hatóanyaggal szemben, de akár párhuzamosan több szerre is, ez az úgynevezett multidrog rezisztencia (MDR) (Vail és mtsai., 2020). A rezisztencia jelen lehet kezdettől fogva (intrinsic rezisztencia), de létezik szerzett rezisztencia is, amikor a terápia során alakul ki a gyógyszerrel szembeni csökkent érzékenység. A tumorsejtek kezdetben genetikailag

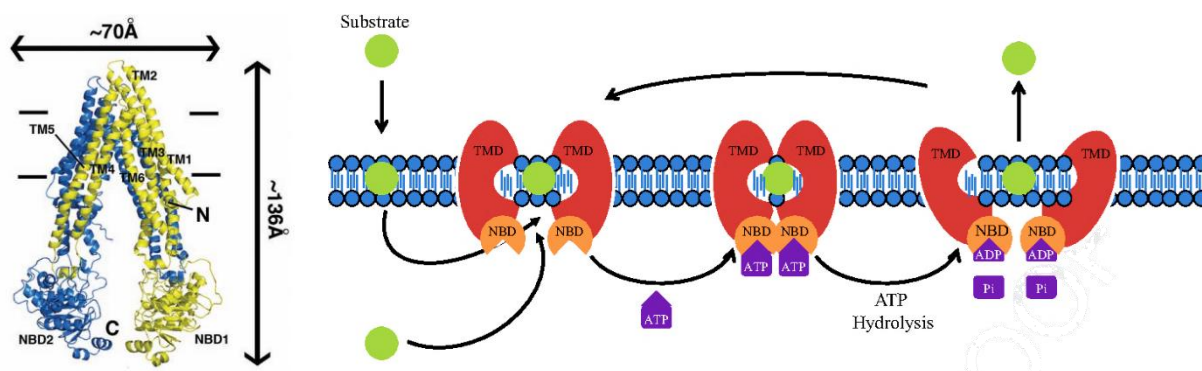
heterogének, ám a kezelés során kiszelektálódhatnak azok a sejtek, amelyek ellenállóak a citosztatikummal szemben, és a relapszus során ebből a populációból épül fel a daganat (Gottesman és mtsai., 2002).

A terápiarezisztencia oka lehet farmakokinetikai vagy farmakodinámiás (Szakács és mtsai., 2006; Bóna, 2010). Farmakokinetikai rezisztencia esetén a gyógyszer nem tud eljutni a célsejthez, illetve nem tud kellő koncentrációt elérni ott; háttérben állhat például a készítmény helytelen adagolása, a felszívódás zavara vagy a szer rossz penetrációja a szövetbe. A farmakodinámiás rezisztenciát, vagyis hogy a citosztatikum nem fejti ki a várt hatást a célsejtre, az okozhatja például, hogy az antiapoptotikus folyamatok felerősödnek, megnövekedik a DNS javítóműködése (pl. DNA repair) vagy szabadgyök képző hatóanyagok esetében a sejt antioxidáns mechanizmusai fokozódhatnak (Gottesman és mtsai., 2002; Filipits, 2004).

Gyakori jelenség tehát, hogy a hatóanyag nem tud megfelelő koncentrációt elérni az intracelluláris térben, ami lehet csökkent felvétel, sejten belüli inaktiváció vagy csökkent aktiválódás eredménye, de leggyakrabban valamilyen efflux pumpa okozza (Szakács és mtsai., 2006). Az ATP-binding cassette (ABC) transzporterek a sejtek különböző membránjaiban találhatóak, és ATP-hidrolízis energiáját felhasználva számos anyag (ionok, peptidek, lipidek, aminosavak, metabolitok, xenobiotikumok) transzportját végzik. Ez a fehérjecsalád filogenetikailag 7 alcsoportra osztható fel, amelyeket az ábécé nagybetűivel (A-G) jelölnek, közülük hat megtalálható az emlősökben (Dean és mtsai., 2001). A legfontosabb és legtöbbet tanulmányozott ABC transzporter a P-glikoprotein (Pgp), más néven ABCB1 vagy MDR1 fehérje, melyet az MDR1 gén kódol (Ambudkar és mtsai., 2003). A Pgp két intracellulárisan elhelyezkedő nukleotid-kötő részből és két transzmembrán doménből épül fel (Dean és mtsai., 2001). Működése során egy ATP molekula hidrolíziséből származó energiát használ fel a kipumpálandó anyagnak a sejthártyán való átjuttatásához, majd egy újabb ATP bontás segítségével kerül vissza eredeti konformációjába (Sauna & Ambudkar, 2000). Kisebb számban intracelluláris membránokban is megtalálható (Lage, 2008). A P-glikoprotein felépítése és működésének vázlatos bemutatása az 1. ábrán látható.

A Pgp élettani körülmények között fontos szerepet játszik a különböző anyagcseretermékek és toxikus anyagok eltávolításában, ezáltal a sejtek védelmében (Barrand, 2001). Megtalálható többek között a mellékvese kéregállományában, a bélhámsejtekben, a placentában, a májban, a vesében és részt vesz a vér-agy gát felépítésében (Gottesman és mtsai., 2002). Hibás működését több örökletes humán betegség okaként kimutatták (Gottesman & Ambudkar, 2001), de a skót juhász, border collie és más fajtájú kutyák ivermektin érzékenysége háttérben is a vér-agy gát P-glikoproteinjének elégtelensége áll. Daganatok

esetében azonban a pumpa működése akadályozza a kemoterápiás kezelést, mert eltávolítja a bejutott gyógyszermolekulákat a sejtekből, így azok nem tudják kifejteni a hatásukat (Lage, 2008). A Pgp-mechanizmus mind az intrinsic, mind pedig a szerzett rezisztenciában szerepet játszik (Klopfleisch és mtsai., 2016). Szubsztrátjai közé tartozó daganatellenes szerek többek között az antraciklinek (pl. doxorubicin), a vinca-alkaloidok (vincristin, vinblastin, vindesin), a taxánok (pl. paclitaxel), a ciszplatin és más alkilálószerke (Lage, 2008). A P-glikoproteinen kívül az ABC transzporter családjának két másik tagja, az MRP1, azaz Multidrug Resistance Protein-1 (más néven ABCG2), illetve az úgy nevezett Breast Cancer Resistance Protein, röviden BCRP (ABCG2, MXR) is kimutathatóan felelős daganatos betegségek terápia rezisztenciájáért (Martinez és mtsai., 2008).



**1. ábra:** Baloldalt a P-glikoprotein szerkezete (*Structure of P-glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. Aller et al., 2009*). Jobboldalon a Pgp működésének modellezése (*Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. Chen et al., 2016*)

TMD = Transmembrane Domain      NBD = Nucleotide Binding Domain

Humán mellrákos páciensek esetén már bizonyított az összefüggés a Pgp expresszió és a kemoterápiás kezelés sikertelensége, illetve a rosszabb prognózis között (Linn és mtsai., 1995). Kutyák emlőtumoraiban is megfigyelhető a P-glikoprotein (Petterino és mtsai., 2006; Badowska-Kozakiewicz & Malicka, 2010; Kim és mtsai., 2012), a BCRP (Nowak és mtsai., 2009; Kumar és mtsai., 2018) és az MRP fehérjék (Honscha és mtsai., 2009; Pawłowski és mtsai., 2013) nagyarányú jelenléte. A transzporterek expressziója eltérő a különböző szövettani típusú daganatok esetében: legnagyobb mértékben a rosszindulatú, hámeredetű tumorok termelnek Pgp-t (Koltai és Vajdovich, 2014; Levi és mtsai., 2016), de a kötőszövetes elváltozásokban is megtalálható (Koltai & Vajdovich, 2014; Kumar és mtsai., 2018). A humán



betegekhez hasonlóan, a Pgp expresszió mértéke kutyák emlődaganatai esetén is negatív korrelációt mutat a túlélési idővel (Koltai és Vajdovich, 2014; Salgado és mtsai., 2015). Honscha és munkatársai kimutatták a BCRP-t kutya emlődaganatos minták doxorubicin rezisztenciájának a hátterében (Honscha és mtsai., 2009), Król és munkatársai pedig kutyák emlőtumoraiból származó, vinblastinra csökkent érzékenységet mutató sejtvonalak megnövekedett Pgp és MRP1 termelését detektálták (Król és mtsai., 2010). Pawlowski és munkatársai tanulmánya alapján kutya emlődaganatos sejtekben a vinblastin efflux a Pgp és MRP1 transzportereknek volt köszönhető, a ciklofoszfamid rezisztenciát BCRP-aktivitás okozta, a ciszplatinra adott csökkent válasz pedig mindhárom pumpával kapcsolatba hozható (Pawłowski és mtsai., 2013).

Amikor felismerték az ABC transzporterek szerepét a multidrog rezisztenciában, számos kutatás vette kezdetét a hatásuk kiküszöbölésére. A pumpák specifikus gátlása ígéretes megközelítésnek tűnt. Az első generációs Pgp inhibitorok közé olyan, más indikációra használatos szerek tartoznak, mint a kinin, a kalcium-csatorna blokkoló verapamil vagy az immunszuppresszáns ciklosporin-A (Klopfleisch és mtsai., 2016). A második generációs készítmények, melyek általában az első generációsok szerkezeti analógjai (pl. cinkonin, dexverapamil, valsopodar) és a harmadik generációs inhibitorok, melyek már nem kompetitív gátláson alapulnak, jóval szelektívebbek. Sajnos a kifejezett mellékhatások miatt klinikai alkalmazásuk nem vált be (Nobili és mtsai., 2012; Füredi, 2017). Más innovatív megoldások, mint például Pgp elleni monoklonális ellenanyagok, transzkripciós modulátorok, vagy olyan gyógyszerek kifejlesztése, amelyhez az efflux pumpa „nem fér hozzá” (pl. liposzómás forma) aktív kutatások tárgyát képezik (Füredi és mtsai., 2017).

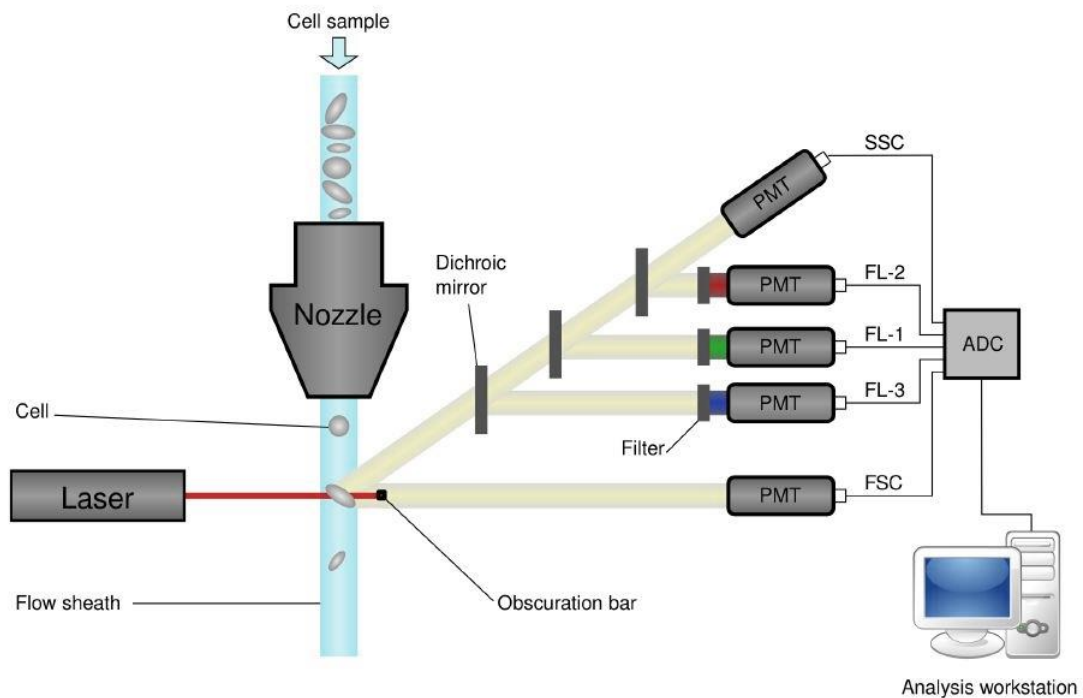
Az ABC transzporterek kimutatására több különböző módszer létezik. Ki lehet mutatni magát a fehérjét immunhisztokémiával, direkt vagy indirekten jelölt monoklonális ellenanyagok felhasználásával. Megállapítható a Pgp mRNS-ének a szintje Northern blot vagy reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció (rt-PCR) segítségével. A funkcionális tesztek a transzporter működését detektálják azáltal, hogy a Pgp szubsztrátjaként szolgáló anyagok (legtöbbször valamilyen festék) kipumpálását, illetve felhalmozódását mérik a sejtekben. Az úgynevezett calcein-próba (calcein assay) is a funkcionális tesztek közé tartozik. A módszer a P-glikoprotein és az MRP1 transzporter aktivitásának mérésére alkalmas. Lényege, hogy a calcein festék nem fluoreszkáló formája, a calcein-AM (calcein-acetoximetilészter) bejut a sejtbe a plazmamembránon át, onnan pedig a Pgp és az MRP1 pumpálják ki. Ha azonban a calcein-AM hosszabb ideig az intracelluláris térben marad, mert a sejt nem rendelkezik megfelelő számú transzporterrel, és nem jut ki a sejtől, az intracelluláris észterázok

hidrolizálják, és a keletkezett hidrolizált calcein a sejten belül fluoreszkál. A calcein fluoreszcens aktivitása mérhető, és ezzel kvantitatívan megállapítható a sejtek MDR aktivitása (Holló és mtsai., 1994; Szakács és mtsai., 1998; Karászi és mtsai., 2001).

### **3. Az áramlási citometria**

Az úgy nevezett áramlási citometria (flow cytometry) már a 20. század végére lényeges eszközzé vált az orvosi diagnosztikának, legfőbb felhasználási területei az immunológia és a hematológia (Tarrant, 2005). A vizsgálatok a sejtek fényszórási tulajdonságainak, illetve fluoreszcenciájának mérésén alapulnak. A módszer nagy előnye, hogy a minta sejtjeit egyesével, egymástól elkülönülten tudja vizsgálni, és képes azoknak párhuzamosan több tulajdonságát is mérni (Culmsee & Nolte, 2002).

Az áramlási citométer folyékony halmazállapotú sejtsuszpenzió mintákat igényel, ezért vér-, csontvelő- vagy testfolyadékok mintáit, illetve szilárd biopsziákból készített sejtsuszpenziót tud feldolgozni (Reggeti & Bienzle, 2011). A műszer egy kis mennyiséget felszív a folyadékból, és a benne lévő sejteket egyetlen oszlopba rendezi (Tarrant, 2005). A sejtek egyesével elhaladnak egy gerjesztő fényforrás (általában lézer) előtt, így azok fénytörési tulajdonsága, illetve esetleges fluoreszcenciája mérhetővé válik. Az így keletkezett optikai jeleket lencsék gyűjtik össze, majd fotodiódák és úgy nevezett foton-sokszorozó csövek (Photomultiplier Tubes) fogják fel. A sejtek fénytörési tulajdonságának mérése két érzékelő segítségével történik: az eredeti sugáriránytól való kismértékű eltérést az úgynevezett Forward Scatter (FSC) detektor érzékeli és a sejtek méretének meghatározását segíti. A lézerfény nagyobb szögben való szóródását a Side Scatter (SSC) érzékelő fogja fel és ezáltal a sejtek belső szerkezetéről nyerünk információt (Adan és mtsai., 2017). További érzékelők mérik a különböző fluoreszcens festékkel jelölt sejtek adott hullámhosszú fényintenzitását (Reggeti & Bienzle, 2011). A keletkező analóg feszültséget ezután a gép digitális jelekké alakítja át, így megtörténhet az információ számítógépes feldolgozása (Adan és mtsai., 2017). Az analízis multifaktoriális, számos tényező befolyásolja az eredményeket, emiatt a paramétereket minden egyes mérés során egyedileg, manuálisan kell igazítani (Reggeti & Bienzle, 2011). A mért adatokat az eszköz végül hisztogramokon és „dot plot” ábrákon jeleníti meg (Tarrant, 2005). Előbbi esetében az x tengelyen a jelerősséget ábrázolják, az y tengelyen a sejtszámot, míg a „dot plot” képen minden egyes látott pont egy sejtnek felel meg, ahol a sejtpopulációk jól elkülönítve láthatók és kiválaszthatók a kapuzási technikával. Az áramlási citométer működését a 2. ábra mutatja be vázlatosan.



## 2. ábra:

Az áramlási citométer működésének vázlata (*Flow Cytometry Bioinformatics. O'Neill et al., 2013*).

Léteznek speciális áramlási citométerek, amelyek arra is képesek, hogy a mért paraméterek alapján szétválogassák a sejteket, ez az úgy nevezett Fluorescein Activated Cell Sorting, röviden FACS (Wilkerson, 2012).

## Célkitűzés

Kutatásunk során céljaink között szerepelt feltérképezni kutyák emlődaganataiban a P-glikoprotein okozta rezisztencia előfordulását. Vizsgáltuk, hogy a Pgp működés hogyan számszerűsíthető a multidrog rezisztencia aktivitási faktor (MAF) meghatározásával.

Célunk volt megállapítani, hogy az áramlási citometria használható-e rutindiagnosztikai eszközként, illetve hogy az áramlási citométer hogyan tudja kiegészíteni az egyéb diagnosztikai lépéseket (pl. klinikai, képalkotó, citológiai és szövettani vizsgálatok).

Kerestük a választ arra a kérdésre is, hogy a kapott eredmények milyen prognosztikai értékkel bírnak, és mennyiben használhatóak fel az emlődaganatos páciensek kezelése során.

## Anyag és módszer

### **1. A vizsgálatban részt vevő állatok**

Kutatásunk során 35 emlődaganatos szuka kutya klinikai vizsgálatát (alapvizsgálat, mellkasi röntgen-, hasi ultrahangos és vérvizsgálat) követően az emlődaganatokból és az egészséges emlőszövetekből nyert mintáit vizsgáltuk meg. A daganat eltávolítására és a műtét során a mintavételre az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központban, vagy az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatklinikájának szülészeti részlegén került sor. A műtétet premedikációt követően (midazolam, propofol) inhalációs narkózisban (isofluran), fájdalomcsillapítás (fentanyl cseppinfúzió) mellett végeztük.

11 ivartalanított szuka és 24, az emlőtumor diagnosztizálásakor intakt, ivaros szuka vett részt a kutatásunkban, utóbbiak közül 8 kutyánál került sor a daganat eltávolításával egy időben az ivartalanításra is. Az állatok kormegoszlása 5-14 év közé esett, az átlagéletkor 10,11 év ( $\pm 2,17$  év) volt. Tizenhárom különböző fajta szerepelt a vizsgált egyedek között, leggyakoribb a yorkshire terrierek előfordulása volt, de vizsgáltunk több keveréket, spánielt és francia bulldogot is. A kutatásban részt vevő kutyák fajta- életkor- és testtömeg szerinti megoszlását a 3. táblázat szemlélteti.

<b>mintavétel időpontja</b>	<b>fajta</b>	<b>életkor (év)</b>	<b>testtömeg (kg)</b>
2015.06.16	keverék	9	14,2
2018.03.07	francia bulldog	8	8,4
2013.12.04	keverék	7	3,6
2013.11.20	keverék	12	8
2013.11.27	cocker spániel	11	11,8
2014.01.22	keverék	12	NA
2014.02.19	yorkshire terrier	8	NA
2014.02.26	puli	13	23
2018.11.07	amerikai staffordshire terrier	9	30,8
2018.11.08	bolognese	11	11,5
2018.11.12	yorkshire terrier	9	4
2018.11.26	francia bulldog	7	NA
2019.01.21	yorkshire terrier	9	2,5

2019.01.21	keverék	9	20
2019.02.27	yorkshire terrier	9	2,4
2019.04.03	angol cocker spániel	14	16,5
2019.04.12	golden retriever	13	31,8
2019.04.30	keverék	12	13
2019.06.17	yorkshire terrier	11	NA
2019.08.26	yorkshire terrier	10	3,8
2019.09.16	amerikai cocker spániel	13	14
2019.10.30	bichon havanese	5	6,4
2019.11.04	cocker spániel	12	14,5
2020.01.10	keverék	10	20,5
2020.05.25	közép schnauzer	12	22
2020.05.26	yorkshire terrier	7	1,6
2020.06.02	tacskó	12	10,8
2020.06.09	yorkshire terrier	11	3,2
2020.06.11	bullterrier	6	19,6
2020.06.29	francia bulldog	8	15,5
2020.06.06	yorkshire terrier	12	8,6
2020.07.22	yorkshire terrier	10	3,6
2020.07.15	német juhász	11	31,8
2020.07.21	keverék	12	12,6
2020.07.29	spániel	10	15,5

**3. táblázat:** A vizsgált állatok fajtája, kora és testtömege, valamint a mintavétel ideje

## 2. A mintavétel

A műtéti úton eltávolított emlődaganatokból, illetve ép emlőszövetből szike segítségével steril módon kb. 1x1x1 cm nagyságú biopsziás mintákat metszettünk ki. A mintákat 10 ml Roswell Park Memorial Institute (RPMI) médiumba helyeztük, és ha nem kerültek azonnal feldolgozásra, akkor legfeljebb 48 óráig 4 °C-on tároltuk őket.

## 3. A sejtek előkészítése és a calcein assay

A feldolgozás során a mintákat először manuálisan apró darabokra vágtuk, majd disszociációs médiumba helyeztük, amely 0,6 U/l diszpázzal és 200 U/l II-es típusú

kollagenázzal (Gibco, Life Technologies, USA) kiegészített RPMI volt. A mintákat 30 percen keresztül 37 °C-os vízfürdőben inkubáltuk, majd 40 µm-es szűrő (Falcon® 40 µm Cell Strainer) segítségével elválasztottuk a szövettörmeléket a kisebb méretű sejtektől és 5 percig 300 relatív centrifugális erővel centrifugáltuk azokat. Ezt követően a képződött pelletet 1 ml foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldattal (PBS, pH 7,3) reszuszpendáltuk és Sysmex lézeres sejtszámláló automata segítségével megállapítottuk a mintában található sejtszámot.

A calcein-jelöléshez szükséges minimum  $1 \times 10^6$  db sejtet 3 részre osztottuk: 100-100 µl-t mértünk 3 db áramlási citométer kompatibilis csőbe. A három cső közül egyben mértük a sejtek Pgp aktivitását gátlószer nélkül, egyben Pgp-gátlószer (verapamil) hozzáadásával, a harmadik cső, mely gátlószer és fluoreszcens festékanyag nélkül tartalmazta a sejteket, kontrollként szolgált. A jelöléshez először a gátlószeres csőbe 1 µl verapamilt, a gátlószer nélküli csőbe pedig 1 µl dimetil-szulfoxidot (DMSO) pipettáztunk. 5 perc 37 °C-os inkubációt követően mindkét cső tartalmához hozzáadtunk 0,5 µl calcein-AM festékanyagot (Invitrogen, Life Technologies, USA). További 10 perces, 37 °C-os vízfürdőben történő inkubáció után mindhárom csőbe 1 ml jéghideg PBS oldatot mértünk, leállítva ezzel a reakciót. Közvetlenül az áramlási citometriás mérés előtt 0,8 µl 7-amino-aktinomicin D festékanyagot adtunk a mintákhoz, amely az élő és a holt sejtek elkülönítésére szolgált.

A fenti folyamatot a daganatos és az ép emlőszövetből származó mintákon is elvégeztük, így minden állat esetében 6 db áramlási citometriás cső (3 tumor és 3 ép) került további vizsgálatra.

#### **4. Az áramlási citometria**

A calcein próba során a sejtek felvették a mintához adott calcein-acetoximetilészter molekulákat, amelyeket aztán a sejthártyában található P-glikoprotein felismert és kipumpált a sejtől. Azokban a csövekben azonban, ahol gátlószer is adtunk a mintához, a verapamil megakadályozta a Pgp működését és így fel tudott halmozódni a sejtekben a calcein-AM, amely intracelluláris észterázok hatására zölden fluoreszkáló calceinné változott. A minták fluoreszcens aktivitásának mérését áramlási citométerrel végeztük.

A műszer által létrehozott dot plot ábrán minden esetben manuálisan került kiválasztásra az az élő sejtpopuláció, amelynek az értékeit a mérés során rögzíteni akartuk, a fluoreszcencia intenzitást pedig a hisztogramokról olvastuk le.

A vizsgálatokhoz Becton Dickinson márkájú, FACScan áramlási citométert használtunk.

## 5. MAF érték

A verapamilal gátolt, illetve a nem gátolt sejtek arányából kiszámítható az úgy nevezett multidrog rezisztencia aktivitási faktor (MAF), mellyel számszerűsíthető a Pgp működés. A MAF meghatározására az alábbi formulát használtuk (Holló és mtsai 1994):

$$\text{MAF} = \frac{\text{Fluoreszcencia}_{\text{verapamil}} - \text{Fluoreszcencia}_{\text{calcein}}}{\text{Fluoreszcencia}_{\text{verapamil}}}$$

## 6. Szövettani feldolgozás

A kioperált emlődaganatok rutin szövettani feldolgozásra kerültek. A metszetek hematoxin-eozin festését követően minden esetben elvégeztük az egyes altípusok meghatározását az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszéke és a Mátix Kft segítségével. A malignitási csoportokba sorolás alapja a 2. táblázatban leírtak voltak.

## 7. Statisztikai elemzés

A vizsgált betegeknél számos paramétert elemeztünk, pl. életkor, testtömeg, fajta, a daganat helyeződése, mérete, fokozatba sorolása és szövettani vizsgálatának eredménye, az áramlási citometriával végzett mérések eredményei (calcein fluoreszcencia intenzitása, élő és halott sejtek aránya, MAF-értékek), valamint figyelembe vettük azt is, hogy a vizsgált tumor elsődleges vagy pedig recidíva volt-e. A vizsgálatok eredményeinek kiértékeléséhez többféle statisztikai módszert vettünk igénybe.

Student-féle egymintás t-próba és ANOVA segítségével elemeztük a daganatos és a kontroll populációban a különböző paraméterek átlagait és a szórásokat.

Mann-Whitney féle U-próbával hasonlítottuk össze a daganatos és az ép szövetből származó mintákat a MAF érték, a calcein-pozitivitás és az élő/holt sejtek arányának tekintetében.

Pearson-féle korrelációs analízist végeztünk, hogy megállapítsuk az egyes paramétereknek egymással való összefüggését.

Az adatok összegzésére a Microsoft Excel programot használtuk (Microsoft Office 2016, verziószám: 10364.20059). A statisztikai vizsgálatokhoz felhasznált szoftverek: StatsDirect3 (StatsDirect Ltd, 9 Mountwood Road, Birkenhead, Merseyside CH42 8NQ, UK) és Real Statistics Using Excel (<https://www.real-statistics.com/>).

## Eredmények

Az emlődaganatok szövettani vizsgálatát elvégezve 11 benignus és 19 rosszindulatú tumor fordult elő, a fennmaradó 5 esetben pedig nem volt elég nagyméretű a rendelkezésre álló szövet ahhoz, hogy meg lehessen állapítani az elváltozás szövettani besorolását. A jóindulatú formák között 3 benignus kevert tumor, 4 complex adenoma, egy multiplex megjelenésű ductalis adenoma, egy intraductalis benignus vegyes tumor, valamint egy ductalis hyperplasia fordult elő, és 1 esetben gyulladásos folyamat okozta az emlő megnagyobbodását. A malignus daganatok a következők voltak: carcinoma simplex, anaplasticus carcinoma, 2 tubularis carcinoma, intraductalis adenocarcinoma, complex carcinoma, 2 tubulopapillaris carcinoma, gyulladásos carcinoma, 2 adenocarcinoma, lipid rich carcinoma, soliter emlőmirigy carcinoma, 2 ductalis carcinoma, simplex tubularis-tubulopapillaris carcinoma, benignus vegyes daganatból kiinduló carcinoma és 2 malignus myoepithelioma.

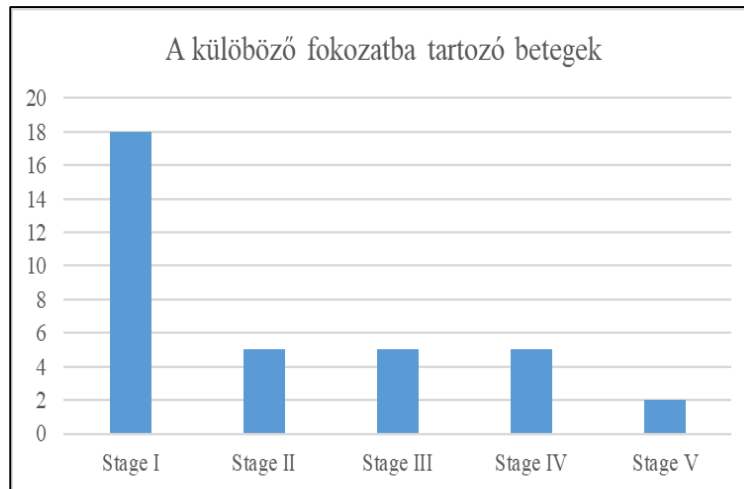
Az eltávolított daganatok mérete igen változatos volt, a legkisebb 0,2 cm-es, a legnagyobb pedig 20 cm-es átmérőjű volt. Szignifikánsan nagyobb volt a tumor átmérője a rosszindulatú daganatos betegek között (átlag  $4,33 \pm 4,30$  cm) mint a jóindulatú csoportban (átlag  $2,10 \pm 0,75$  cm) (t-próba,  $p=0,042$ ), valamint a regionális nyirokcsomó érintettsége is szignifikánsan gyakoribb volt ( $p=0,011$ ). Távoli metasztázis 2 páciensnél fordult elő, mindkét esetben malignus emlődaganat mellett.

7 kutyánál fordult elő, hogy a vizsgálatban való részvételkor nem primer, hanem már recidívált daganat eltávolítására került sor. ANOVA vizsgálat alapján szignifikánsan nagyobb eséllyel volt a tumor rosszindulatú ezeknél a betegeknél, mint az elsődleges daganatok esetében ( $p<0,001$ ).

TNM fokozatba sorolás alapján Stage 1-től 5-ig fordultak elő betegek a vizsgált populációban, a különböző stádiumok gyakoriságát a 3. ábra mutatja be. Student-féle t-próba alapján a daganat előrehaladottságának mértéke szignifikánsan magasabb volt a malignus csoportban, mint a jóindulatú elváltozással műtétre kerülő betegeknél (malignus átlag stage= $2,64 \pm 1,37$  vs. benignus átlag stage= $1,25 \pm 0,43$ ;  $p<0,001$ ).

A 35 kutya közül nyolcnál volt egynél több tumor az emlőben, átlagosan  $1,2 \pm 0,56$  darab daganat/állat volt jellemző.



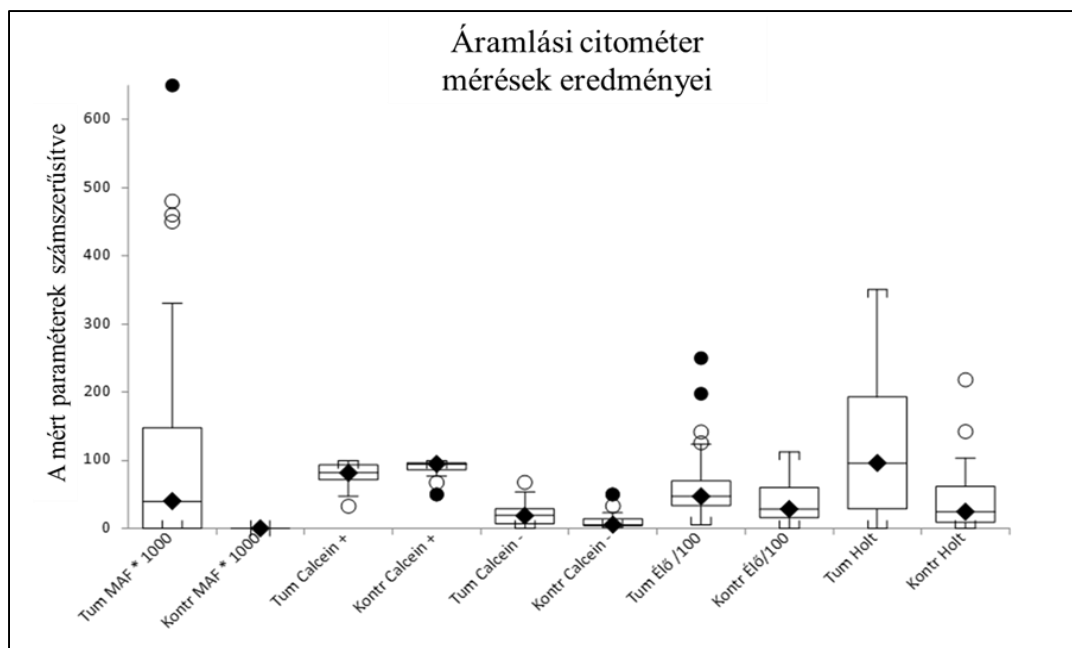


**3. ábra:** A TNM besorolás szerinti fokozatok előfordulása a vizsgált populációban

A kutatás ideje alatt 5 betegnél fordult elő, hogy az emlődaganat recidívált, a legrövidebb relapszus mentes túlélési idő (Relapse Free Period, RFP) 2 hónap volt, a leghosszabb RFP esetén 2 évvel az első tumor eltávolítása után jelent meg az újabb elváltozás.

Egy kutya pusztult el az emlődaganat következtében, ebben az esetben a teljes túlélési idő (Overall Survival Time, OST) 5 hónap volt a műtét után.

A tumorszövetben és az azonos állatokból származó kontroll, ép emlőmintákban számos paraméterben jelentős különbséget tapasztaltunk. Az áramlási citometriával végzett vizsgálatok során kapott eredményeinket a 4. táblázat foglalja össze és a 4. ábra szemlélteti.



**4. ábra:** Az áramlási citometriával vizsgált paraméterek a tumor és az azonos állatból származó ép emlőszövetek között. Az adott vizsgált paramétereket egymás mellé rendeztük.

		MAF	Calcein +	Calcein -	Élő sejtek	Holt sejtek
<b>Tumor</b>	Átlag	0,12	79,31	20,69	6572,93	154,86
	± Szórás	0,17	16,50	16,50	5463,50	245,25
	Medián	0,04	81,45	18,55	46,98	96
<b>Kontroll</b>	Átlag	0,02	87,57	12,43	4317,25	44,60
	± Szórás	0,04	14,64	14,64	3313,05	54,47
	Medián	0	94,545	5,455	28,35	24,5
p-érték	Student-féle t-próba (egymintás)	0,161	0,078	0,078	0,186	0,003
	ANOVA (one-way)	0,011	0,084	0,084	0,113	0,059
	Mann-Whitney teszt	0,0022	0,0381	0,0381	0,0487	0,0034

**4. táblázat:** A fluoreszcencia alapú mérések és azok statisztikai vizsgálatának eredményei a tumor és az azonos állatból származó ép emlőszövetek között.

A calcein próbával kapott értékeket ANOVA vizsgálattal (one-way ANOVA) kielemezve azt találtuk, hogy az emlőtumorokból származó minták MAF értékeinek átlaga szignifikánsan magasabb volt, mint ugyanazon állatok ép emlőszövetéé, vagyis a kontroll mintáké (emlőtumor MAF átlag =  $0,12 \pm 0,17$ ; kontroll MAF átlag =  $0,02 \pm 0,04$ ;  $p=0,011$ ). Az emlődaganatos MAF értékek szignifikánsan nagyobbak bizonyultak Mann-Whitney-féle U-próbával is ( $p=0,0022$ ).

Az 5. ábrán jól megfigyelhető, hogy a kék színnel jelölt daganatos MAF értékek jóval magasabbak a narancssárga egészséges emlő MAF értékekhez képest.



Pearson-féle korrelációs analízissel megállapítottuk, hogy szingifikáns összefüggés van a calcein negatív tumorsejtek és a MAF-értékek között ( $p= 0,0033$ ,  $R= 0,53$ ). Továbbá az élő tumorsejtek aránya és a MAF-érték között is szignifikáns korrelációt mértünk ( $p= 0,005$ ,  $R= 0,52$ ). Egyazon állatból származó mintákban a kontroll emlőszövet és a tumor élő sejtjei is arányban voltak egymással ( $p= 0,037$ ,  $R= 0,46$ ), ezzel szemben a halott sejtek számában nem mutatkozott szignifikáns összefüggés ( $R= 0,172$ ). A fenti eredményeket az 5. táblázat foglalja össze.

összefüggések	p-érték	R-érték
Tumor calcein- : Tumor MAF	0,0033	0,53
Tumor élő sejtek : Tumor MAF	0,005	0,52
Kontroll élő sejtek: Tumor élő sejtek	0,037	0,46

**5. táblázat:** Szignifikáns korrelációk az áramlási citométeres vizsgálatok különböző paramétereinek között

Az életkor a malignus tumorral rendelkezőknél, mind a benignus tumorral műtött kutyák esetében csaknem szignifikánsan nagyobb a Student-féle, kétmitás, nem egyenlő varianciájú elemeket feltételező t-próbával (6. táblázat).

A daganat mérete szignifikánsan nagyobb t-próbával a malignus tumorral rendelkezőknél, mint a jóindulatú elváltozások esetén (6. táblázat).

A nyirokcsomó érintettség szignifikánsan nagyobb t-próbával a rosszindulatú daganatos betegeknél, mint a benignus tumorral műtött kutyák daganatai esetében (6. táblázat).

A daganat előrehaladottságának mértéke szignifikánsan nagyobb t-próbával a daganatos pácienseknél, mint a benignus tumorral műtött kutyák mintái esetében. Itt a 4., és az 5. stádium nem a tumor méretétől függ, hanem a nyirokcsomó érintettségtől és a távoli metasztázistól. Mindkét próbával szignifikáns különbség adódott (6. táblázat).

Azok a betegek, amelyek már eleve recidiváltak, szignifikánsan nagyobb eséllyel lettek malignus daganattal műtve, amely az ANOVA vizsgálattal mutatott szignifikáns különbséget (6. táblázat).

A vizsgálat során az élő sejtek aránya csaknem szignifikánsan nagyobb volt az ANOVÁ-val a malignus tumorral rendelkezőknél, mint a benignus tumorral műtött kutyák daganatai esetében (6. táblázat).

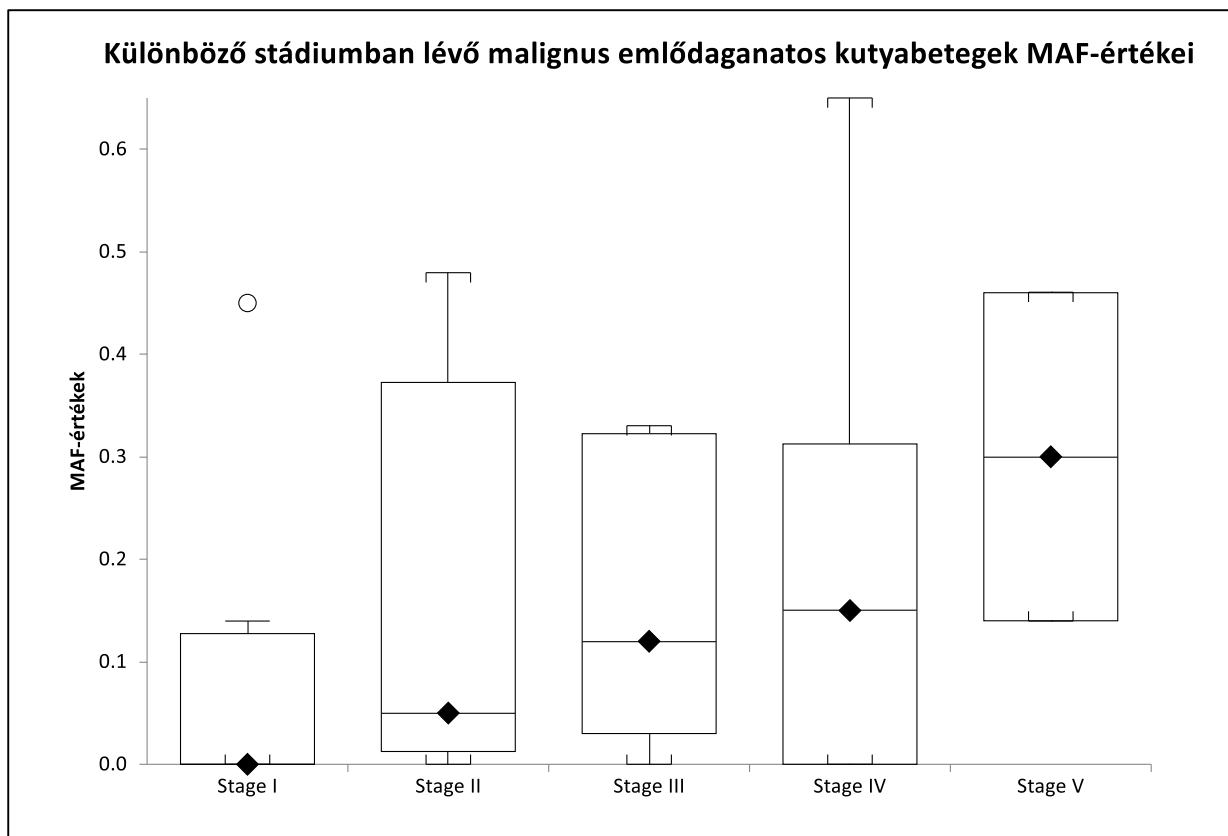
		Életkor (év)	Daganat mérete (cm)	Nyirok- csomó érintett- ség	Stádium	MAF, tumor	Recidívált eredetileg	Élő sejtek, tumor
Malignus	Átlag	10,77	4,33	0,27	2,64	0,16	0,14	7362
	± Szórás	1,76	4,30	0,45	1,37	0,19	0,34	6157
Benignus	Átlag	8,75	2,10	0,00	1,25	0,04	0,13	5656
	± Szórás	2,44	0,75	0,00	0,43	0,05	0,33	4348
p-érték	Student- féle t- próba	0,071	0,042	0,011	< 0,001	0,013	0,939	0,474
	ANOVA	0,293	0,564	0,080	0,031	0,008	< 0,001	0,057

**6. táblázat:** A rosszindulatú és a jóindulatú emlődaganatok közötti klinikai és áramláscitometriai vizsgálatokkal nyert eredményei.

A malignus és a benignus emlődaganatos betegek stádiumai és a MAF-értékek között szignifikáns összefüggés jelentkezik ( $r=0,399$ ;  $P=0,0144$ ). Ugyanakkor, ha csak a malignus tumorról rendelkezőket vizsgáljuk, akkor a szignifikancia elvész ( $r= 0,332$ ;  $p=0,0654$ ). Kétpontos ANOVÁ-val a különböző csoportok között szignifikáns eltérés nem mutatkozott. A stádiumok és a MAF értékek összefüggései a 7. ábrán és a 7. táblázatban láthatóak.

	Stage I n=7	Stage II n=3	Stage III n=5	Stage IV n=5	Stage V n=2
Átlag	0,097	0,177	0,162	0,200	0,300
Szórás	±0,165	±0,264	±0,155	±0,267	±0,226

**7. táblázat:** A rosszindulatú és a jóindulatú emlődaganatok MAF-értékei különböző stádiumokban

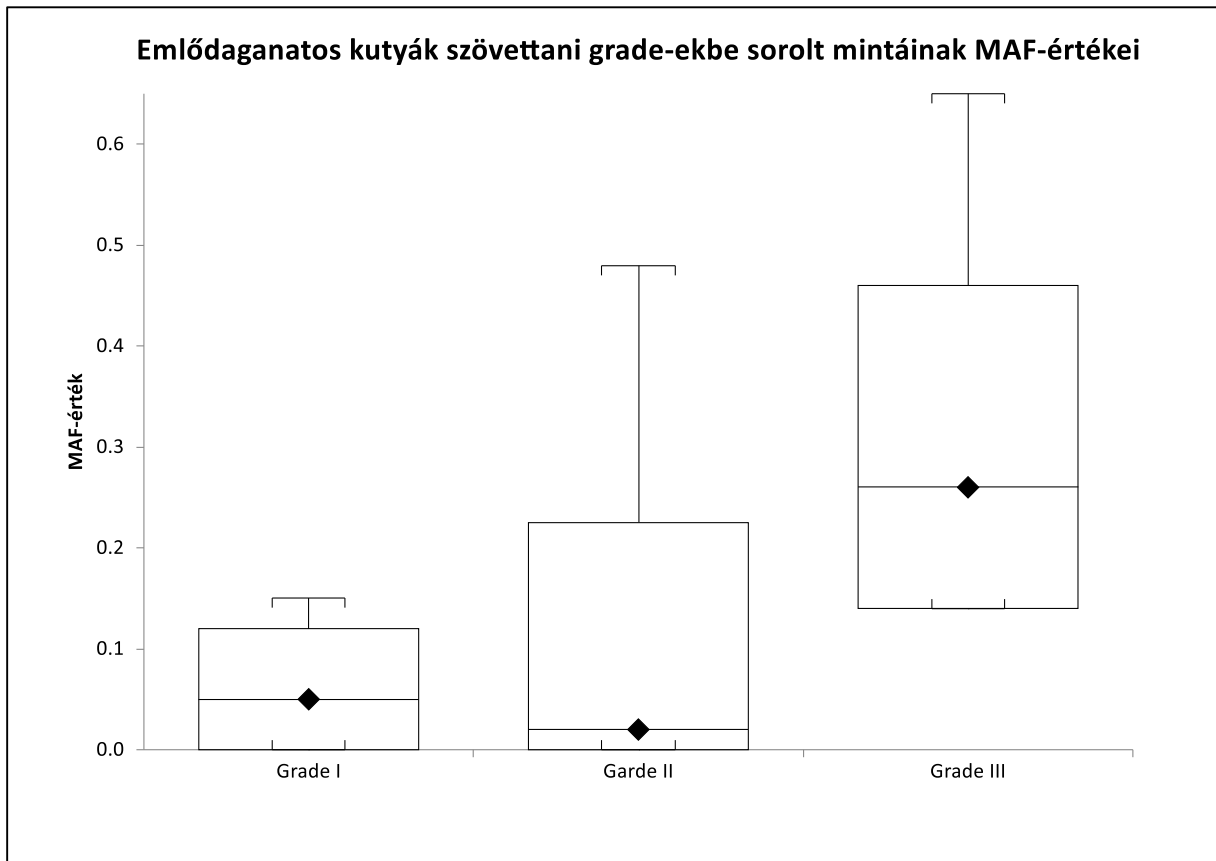


**7.ábra:** A rosszindulatú és a jóindulatú emlődaganatok MAF-értékei különböző stádiumokban

A rosszindulatú emlődaganatok szövettani malignitási csoportokba (grade) sorolása alapján megvizsgáltuk a MAF-értékek változását (8. táblázat, 8. ábra). Szignifikáns eltérés a grade I és a grade III-as csoportokban jelentkezett ( $p = 0,0126$ ).

	Grade I n=7	Grade II n=8	Grade III n=6
Átlag	0,06	0,12	0,32
Szórás	$\pm 0,06$	$\pm 0,17$	$\pm 0,19$

**8. táblázat:** A rosszindulatú és a jóindulatú emlődaganatok MAF-értékei különböző szövettani grade-ekben



**8. ábra:** Malignus emlődaganatos kutyák MAF-értékei különböző szövettani grade-ekben

## Következtetések

Szakirodalmi ismereteink szerint jelen vizsgálatunk során elsőként használtuk az áramlási citometriát kutya emlődaganatok esetében multidrogo rezisztencia vizsgálatokra.

Más tanulmányok eredményeihez hasonlóan az eltávolított emlőtumor sejtjeiben fokozott Pgp expressziót figyeltünk meg az egészséges szövethez képest (Petterino és mtsai., 2006; Badowska-Kozakiewicz & Malicka, 2010; Kim és mtsai., 2012). Az említett tanulmányokban a Pgp vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel történt.

A P-glikoprotein áramlási citométerrel meghatározott aktivitásból származtatott MAF érték szignifikánsan magasabb volt a daganatokból származó sejteknél, mint a kontroll ép szövet esetében. A tumorsejtek Pgp aktivitását jól mutatta az is, hogy a calcein fluoreszcencia intenzitása alacsonyabb volt, mert a sejthártyában található pumpa felismerte és eliminálta a festékanyagot.

Eredményeink alapján az áramlási citometriai mérés alkalmas a Pgp funkció meghatározására és a vizsgálat részét képezheti a rutindiagnosztikai eljárásnak. Az eszköz előnye, hogy gyors analízist tesz lehetővé és az immunhisztokémiával szemben élő sejtek vizsgálatára is alkalmas.

Az általunk vizsgált betegek között a szakirodalmi adatokhoz hasonlóan felülreprezentáltak szerepeltek a kistestű fajták, pl. yorkshire terrierek, spánielek, kistestű keverék kutyák (Salas és mtsai., 2015).

A daganatok típusát elemezve a malignus elváltozások esetében szignifikánsan magasabb volt a betegek átlagéletkora (11 év), mint a jóindulatú formáknál (átlagéletkor 9 év). A szakirodalommal összecseng, hogy a vizsgált egyedek között nem fordult elő 5 évesnél fiatalabb kutya (Vail és mtsai., 2020). A rosszindulatú tumorok agresszívabbnak bizonyultak a méret, a nyirokcsomó érintettség és a metasztázis képzés terén is. A recidívált daganatok nagyobb eséllyel voltak malignusak; és a legmagasabb MAF értékeket is rosszindulatú elváltozások (carcinomák) esetén mértük. Érdekes megfigyelésünk, hogy a malignus tumorok esetében általában magasabb volt a mintában az élő sejtek aránya, és a több élő sejt nagyobb MAF értékkel járt együtt. Ez arra utalhat, hogy a túlélési képessége a daganatos sejteknek nagyobb lehet még az *in vitro* előkészítések során is.

Továbbá az a megfigyelésünk, hogy a recidíva rosszindulatú tumorokat képezhet. Ezt alátámasztja, hogy a malignus tumorok között több volt olyan, amelyek már eleve recidíváltak.



Az élő/holt sejtek arányát tekintve korreláció volt megfigyelhető a daganatos és a kontroll minták között, ami valószínűleg a mintavétel és a feldolgozás között eltelt idővel magyarázható. Ebből következően fontos, hogy a minta minél rövidebb várakozási időt követően kerüljön feldolgozásra.

Kutatásunk során kevés adat állt rendelkezésre a betegek hosszabbtávú túléléséről, ezért a MAF érték emlődaganatok esetében játszott prognosztikai szerepének megállapításához további vizsgálatok szükségesek. Más daganattípusok közül kutyák lymphomái esetén 0,2-es MAF érték felett szignifikánsan rövidebb volt a túlélési idő (Karai, 2016); mastocytomáknál pedig az volt megfigyelhető, hogy a MAF értékek 0,3 cut off esetén szignifikáns összefüggést mutattak a daganatok grade és substage besorolásával (Kórik, 2019). A módszer humán klinikumban történő alkalmazása során, kezelésre már nem reagáló akut myeloid leukémiás betegeknél ez az érték körülbelül 0,25-0,32 volt (Karászi és mtsai., 2001).

A különböző stádiumokba sorolt betegek nem mutattak szignifikáns összefüggéseket a MAF-értékekben, kivéve, ha ebbe a jóindulatú tumorokkal rendelkező betegeket is bevettük. A 8. ábrán azonban látszik, hogy az V. stádium esetén a MAF-értékek nagyobbak (bár csak két ilyen esetünk volt). Ez a tumorok heterogenitására utal a különböző stádiumokban is.

Ugyanakkor érdekes összefüggés, hogy a szövetti malignitási besorolás alapján különbség látszik az I-es és a III-as grade besorolás között, amely arra utal, hogy a fokozott malignitás fokozott rezisztencia kialakulásával jár. Ez összhangban van más kutatók vizsgálataival, akik ezt a Pgp-immunhisztokémiai vizsgálatával is igazolták (Levi és mtsai., 2016).

## Összefoglaló

Az emlőtumorok a kutyák leggyakoribb daganatai közé tartoznak. Legtöbb esetben az elsődlegesen választandó terápia a műtéti eltávolítás, de gyakran van szükség kiegészítő kemoterápiás kezelésre is. A gyógyszeres kezelés hatékonyságát azonban sok esetben befolyásolja a hatóanyagokkal szembeni multidrog rezisztencia (MDR). A rezisztencia mechanizmus hátterében sokszor az úgy nevezett ATP-binding cassette (ABC) transzporterek állnak, közülük is leggyakoribb a P-glikoprotein (Pgp) jelenléte. A transzporter detektálására szolgáló funkcionális tesztek segítségével meghatározható a pumpa aktivitása különböző daganatos sejtek membránjában.

Kutatásunk során célunk volt, hogy megállapítsuk, hogy a Pgp funkció áramlási citometriával történő vizsgálata mennyire alkalmas az emlődaganatos minták terápia rezisztenciájának meghatározására, illetve, hogy a kapott eredmények felhasználható-e a betegség prognosztikájában.

35 kutya egészséges emlőszövetéből és emlődaganatos mintájából származó sejtek Pgp aktivitását mértük, melyhez az úgy nevezett calcein-próbát használtuk. A módszer egy festékanyag (Calcein-AM) segítségével teszi mérhetővé az áramlási citométer számára a fluoreszcencia intenzitást. A calcein pozitív és calcein negatív sejtek arányából kiszámoltuk az úgy nevezett multidrogrezisztencia aktivitási faktort (MAF). A MAF értékeket és egyéb paramétereket (életkor, testtömeg stb.) összehasonlítottuk a két csoportnál.

A MAF érték szignifikánsan magasabbnak bizonyult a daganatos sejtekben, mint a kontroll esetében ( $p=0,0022$ ). Jellemzően nagyobb volt a calcein pozitív (efflux pumpával nem rendelkező) sejtek aránya (medián 94,5%) az egészséges szövetben, mint a tumor sejtekben (medián 81,5%), illetve a kontroll mintákban jóval alacsonyabb volt a calcein negatív (efflux pumpával rendelkező) sejtek száma a daganatos mintákkal összehasonlítva (medián 5,5% vs. 18,6%) ( $p=0,0381$ ). A benignus és malignus daganatcsoportok vizsgálatából kiderült, hogy az előbbi esetében szignifikánsan alacsonyabb volt a betegek átlagéletkora (9 év,  $p=0,0397$ ), kisebb volt a daganat mérete (1,75 cm,  $p=0,0261$ ) és alacsonyabb volt a stádium besorolás (átlag 1,  $p=0,0008$ ), szemben a malignus betegeknél mért adatokkal (átlagéletkor 11 év, daganat mérete 2,9 cm, stádium 3).

Eredményeink alapján elmondható, hogy a fluoreszcencia alapú vizsgálattal szignifikáns különbségeket találtunk az egészséges emlőszövet sejtszejtjei és a daganatos sejtek értékei között.

A MAF érték az ép emlőszövetben volt alacsonyabb, szemben a tumorsejtekkel. Azonban a MAF prognosztikai faktorként való alkalmazásához további vizsgálatok szükségesek.

### Summary

Mammary gland tumors are one of the most common malignancies in dogs. First line treatment is usually surgical excision; however, chemotherapy might be also needed. The efficacy of chemotherapeutic agents is often influenced by the emergence of multidrug resistance (MDR) commonly caused by P-glycoprotein (Pgp), a member of the ATP-binding cassette transporter family. The detection of the pump activities in the cellular membranes can be measured by functional tests.

The aim of our study was to determine whether flow cytometry can be used for screening chemotherapy resistance in canine mammary gland tumors, and the results can have prognostic value or not.

Pgp activity was investigated in samples of 35 dogs with mammary tumors by calcein assay. This method uses a fluorescent dye (Calcein-AM) to measure Pgp activity by flow cytometer. Multidrug resistance activity factor (MAF) was derived from the difference of calcein-positive and calcein-negative cells. Control samples originating from the intact mammary tissue of the same animal were compared with the tumor lesions. Other characteristics (e.g. age, body weight, etc) were also considered in the two groups.

MAF value was found to be significantly higher in mammary tumor cells in comparison with control samples ( $p=0,0022$ ). The proportion of calcein-positive cells (without efflux pump) was typically higher (median 94,5%) in healthy tissue than in tumor cells (median 81,5%), and the percentage of calcein-negative cells (with efflux pumps) was much lower in control samples compared to tumor samples (median 5,5% vs. 18,6%,  $p = 0,0381$ ). Studying benign and malignant groups according to the tumor, significantly lower average age (9 years,  $p = 0,0397$ ), smaller tumor size (1,75 cm,  $p= 0,0261$ ) and lower stage (mean 1,  $p = 0,0008$ ) was found in the first group in contrast to data of patients with malignancies (mean age 11 years, tumor size 2,9 cm, stage 3).

Based on our results significant differences were found between the healthy control samples and the tumour samples using the fluorescence-based technique. Regarding MAF as a prognostic factor, however, further investigation is needed.

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Vajdovich Péter témavezetőmnek, hogy lehetővé tette TDK dolgozatom elkészülését. Szakmai és emberi nagysága miatt igazi példaképem, hálás vagyok, hogy vele dolgozhattam és tőle tanulhattam.

Köszönöm Karai Edina témavezetőmnek a vizsgálatok elvégzése és a dolgozat megírása során nyújtott rengeteg segítségét, kedvességét, türelmét és támogatását.

Köszönet illeti dr. Müller Lindát és a Kisállatklinika Szülészeti Osztályának minden dolgozóját a mintavételek során nyújtott segítségért.

Szeretném megköszönni az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ munkatársainak türelmüket és kedvességüket.

## Irodalom

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y. and Nalbant, A. 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. **37**(2), pp.163–176.
- Alkan, F.Ü., Anlas, C., Cinar, S., Yildirim, F., Ustuner, O., Bakirel, T. and Gurel, A. 2014. Effects of curcumin in combination with cyclophosphamide on canine mammary tumour cell lines. *Veterinárni medicína*. **59**, pp.553–572.
- Al-Mansour, M.A., Kubba, M.A.G., Al-Azreg, S.A. and Dribika, S.A. 2018. Comparative histopathology and immunohistochemistry of human and canine mammary tumors. *Open Veterinary Journal*. **8**(3), pp.243–249.
- Ambudkar, S.V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z.E. and Gottesman, M.M. 2003. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*. **22**(47), pp.7468–7485.
- Ankur, S., Dhakate, M.S. and Upadhye, S.V. 2010. Chemotherapeutic Management of Canine Mammary Tumors. *VetScan*. **5**(1), pp.46–51.
- de Araújo, M.R., Campos, L.C., Ferreira, E. and Cassali, G.D. 2015. Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **29**(5), pp.1360–1367.
- Arenas, C., Peña, L., Granados-Soler, J.L. and Pérez-Alenza, M.D. 2016. Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case–control prospective study. *Veterinary Record*. **179**(5), pp.125–125.
- Badowska-Kozakiewicz, A.M. and Malicka, E. 2010. Evaluation of immunohistochemical expression of P-glycoprotein in neoplasms of the mammary gland in bitches. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. **13**(2), pp.343–347.
- Barrand, M.A. 2001. P-Glycoprotein *In: Encyclopedia of Genetics*. Acad. Press, pp.1430–1433.
- Bóna M. 2010. *Terápiarezisztencia fehérvék működésének vizsgálata 'Flowcytometria' alkalmazásával daganatos kutyák nyirokcsomó mintáiban.* [Online] Thesis. [Accessed 12 October 2020]. Available from: <http://www.huveta.hu/handle/10832/197>.
- Calle, E.E. and Kaaks, R. 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Reviews Cancer*. **4**(8), pp.579–591.
- Canadas, A., França, M., Pereira, C., Vilaça, R., Vilhena, H., Tinoco, F., Silva, M.J., Ribeiro, J., Medeiros, R., Oliveira, P., Dias-Pereira, P. and Santos, M. 2019. Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and Grading Methods in a Survival Study. *Veterinary Pathology*. **56**(2), pp.208–219.
- Cassali, G.D., Lavalle, G.E., Ferreira, E., Estrela-Lima, A., Nardi, A.B. de, Ghever, C., Sobral, R.A., Amorim, R.L., Oliveira, L.O., Sueiro, F. a. R., Beserra, H.E.O., Bertagnolli, A.C., Gamba, C.O., Damasceno, K.A., Campos, C.B., Araujo, M.R., Campos, L.C., Monteiro, L.N., Nunes, F.C., Horta, R.S., Reis, D.C., Luvizotto, M.C.R., Magalhães, G.M., Raposo, J.B., Ferreira, A.M.R. and Tanaka, N.M. (és mtsai) 2014. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. **7**(2), pp.38–69.
- Chang, C.-C., Tsai, M.-H., Liao, J.-W., Chan, J.P.-W., Wong, M.-L. and Chang, S.-C. 2009. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **235**(4), pp.391–396.
- Chocteau, F., Abadie, J., Loussouarn, D. and Nguyen, F. 2019. Proposal for a Histological Staging System of Mammary Carcinomas in Dogs and Cats. Part 1: Canine Mammary Carcinomas. *Frontiers in Veterinary Science*. **6**.

- Culmsee, K. and Nolte, I. 2002. Flow cytometry and its application in small animal oncology. *Methods in Cell Science*. **24**(1), pp.49–54.
- Dean, M., Rzhetsky, A. and Allikmets, R. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*. **11**(7), pp.1156–1166.
- Doré, M., Lanthier, I. and Sirois, J. 2003. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*. **40**(2), pp.207–212.
- Du, H., Zhou, B., Zhang, H., Jin, Y., Zhang, D. and Lin, D. 2017. Salinomycin inhibits canine mammary carcinoma in vitro by targeting cancer stem cells. *Oncology Letters*. **14**(1), pp.427–432.
- Duijsings, D., Houweling, M., Vaandrager, A.B., Mol, J.A. and Teerds, K.J. 2004. Hexadecylphosphocholine causes rapid cell death in canine mammary tumour cells. *European Journal of Pharmacology*. **502**(3), pp.185–193.
- Dutra, A., Azevedo, G., Schmitt, F. and Cassali, G. 2008. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia - ARQ BRAS MED VET ZOOTECA*. **60**.
- Elston, C.W. and Ellis, I.O. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. **19**(5), pp.403–410.
- Ferrari, A.R.M., Ferrari, H.F., Carreira, V.S., Frigério, E.D., Luvizotto, M.C.R. and Andrade, A.L. de 2019. Microvessel density assessment in canine mammary carcinomas as a predictive factor for metronomic chemotherapy. *Semina: Ciências Agrárias*. **40**(5), pp.1849–1856.
- Ferreira, E., Bertagnolli, A.C., Cavalcanti, M.F., Schmitt, F.C. and Cassali, G.D. 2009. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*. **7**(4), pp.230–235.
- Filipits, M. 2004. Mechanisms of cancer: multidrug resistance. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. **1**(2), pp.229–234.
- Füredi A. 2017. Új megközelítések a multidrog rezisztens tumorok terápiaájában. , p.11.
- Füredi, A., Szebényi, K., Tóth, S., Cserepes, M., Hámori, L., Nagy, V., Karai, E., Vajdovich, P., Imre, T., Szabó, P., Szüts, D., Tóvári, J. and Szakács, G. 2017. Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*. **261**, pp.287–296.
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R. and Zappulli, V. 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*. **48**(1), pp.117–131.
- Gottesman, M.M. and Ambudkar, S.V. 2001. Overview: ABC Transporters and Human Disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. **33**(6), pp.453–458.
- Gottesman, M.M., Fojo, T. and Bates, S.E. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews. Cancer*. **2**(1), pp.48–58.
- Hermo, G.A., Torres, P., Ripoll, G.V., Scursoni, A.M., Gomez, D.E., Alonso, D.F. and Gobello, C. 2008. Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary gland tumours: A pilot study. *The Veterinary Journal*. **178**(1), pp.103–108.
- Hermo, G.A., Turic, E., Angelico, D., Scursoni, A.M., Gomez, D.E., Gobello, C. and Alonso, D.F. 2011. Effect of adjuvant perioperative desmopressin in locally advanced canine mammary carcinoma and its relation to histologic grade. *Journal of the American Animal Hospital Association*. **47**(1), pp.21–27.
- Holló, Z., Homolya, L., Davis, C.W. and Sarkadi, B. 1994. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1191**(2), pp.384–388.

- Honscha, K.U., Schirmer, A., Reischauer, A., Schoon, H.-A., Einspanier, A. and Gäbel, G. 2009. Expression of ABC-Transport Proteins in Canine Mammary Cancer: Consequences for Chemotherapy. *Reproduction in Domestic Animals*. **44**(s2), pp.218–223.
- Karai, E. 2016. Kutya limfómák drog rezisztenciájának kialakulása.
- Karászi, E., Jakab, K., Homolya, L., Szakács, G., Holló, Z., Telek, B., Kiss, A., Rejtő, L., Nahajevszky, S., Sarkadi, B. and Kappelmayer, J. 2001. Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. **112**(2), pp.308–314.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C. and Dessiris, A. 2001. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. **48**(2), pp.85–96.
- Karayannopoulou, M. and Lafioniatis, S. 2016. Recent advances on canine mammary cancer chemotherapy. *Revue de médecine vétérinaire*. **167**, pp.192–200.
- Kim, N.-H., Hwang, Y.-H., Im, K.-S., Kim, J.-H., Chon, S.-K., Kim, H.-Y. and Sur, J.-H. 2012. P-glycoprotein expression in canine mammary gland tumours related with myoepithelial cells. *Research in Veterinary Science*. **93**(3), pp.1346–1352.
- Klopfleisch, R., Kohn, B. and Gruber, A.D. 2016. Mechanisms of tumour resistance against chemotherapeutic agents in veterinary oncology. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*. **207**, pp.63–72.
- Knottenbelt, C., Chambers, G., Gault, E. and Argyle, D.J. 2006. The in vitro effects of piroxicam and meloxicam on canine cell lines. *The Journal of Small Animal Practice*. **47**(1), pp.14–20.
- Koltai, Z., Szabó, B., Jakus, J. and Vajdovich, P. 2018. Tyrosine kinase expression analyses in canine mammary gland tumours - A pilot study. *Acta Veterinaria Hungarica*. **66**(2), pp.294–308.
- Koltai, Z. and Vajdovich, P. 2014. Expression of multidrug resistance membrane transporter (Pgp) and p53 protein in canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Hungarica*. **62**(2), pp.194–204.
- Kórik, C. 2019. Kutya mastocytomájának terápia rezisztencia vizsgálata áramlás citometriai funkcionális teszt alkalmazásával
- Kristiansen, V.M., Nødtvedt, A., Breen, A.M., Langeland, M., Teige, J., Goldschmidt, M., Jonasdottir, T.J., Grotmol, T. and Sørenmo, K. 2013. Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Benign Mammary Tumors and Hyperplastic Lesions: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **27**(4), pp.935–942.
- Kristiansen, V.M., Peña, L., Córdova, L.D., Illera, J.C., Skjerve, E., Breen, A.M., Cofone, M.A., Langeland, M., Teige, J., Goldschmidt, M. and Sørenmo, K.U. 2016. Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **30**(1), pp.230–241.
- Król, M., Pawłowski, K.M., Skierski, J., Turowski, P., Majewska, A., Polańska, J., Ugorski, M., Morty, R.E. and Motyl, T. 2010. Transcriptomic “portraits” of canine mammary cancer cell lines with various phenotypes. *Journal of Applied Genetics*. **51**(2), pp.169–183.
- Kumar, M., Gupta, K., Sood, N.K. and Singh, A. 2018. Immunolocalization and Cellular Expression of Key ABC Transporter Proteins and Their Correlation with the Grades and Subtypes of Canine Mammary Tumour. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*. **7**(3), pp.001–008.
- Lage, H. 2008. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **65**(20), pp.3145–3167.
- Langenbach, A., McManus, P.M., Hendrick, M.J., Shofer, F.S. and Sorenmo, K.U. 2001. Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **218**(9), pp.1424–1428.

- Lavalle, G.E., Bertagnolli, A.C., Tavares, W.L.F. and Cassali, G.D. 2009. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology*. **46**(6), pp.1275–1280.
- Lavalle, G.E., Campos, C.B.D., Bertagnolli, A.C. and Cassali, G.D. 2012. Canine Malignant Mammary Gland Neoplasms with Advanced Clinical Staging Treated with Carboplatin and Cyclooxygenase Inhibitors. *In Vivo*. **26**(3), pp.375–379.
- Lee, J.-H., Li, Q., An, J.-H., Chae, H.-K., Choi, J.-W., Kim, B.-J., Song, W.-J. and Youn, H.-Y. 2019. Antitumor Activity of Rivoceranib Against Canine Mammary Gland Tumor Cell Lines. *Anticancer Research*. **39**(10), pp.5483–5494.
- Levi, M., Brunetti, B., Sarli, G. and Benazzi, C. 2016. Immunohistochemical Expression of P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein in Canine Mammary Hyperplasia, Neoplasia and Supporting Stroma. *Journal of Comparative Pathology*. **155**(4), pp.277–285.
- Linn, S.C., Giaccone, G., van Diest, P.J., Blokhuis, W.M., van der Valk, P., van Kalken, C.K., Kuiper, C.M., Pinedo, H.M. and Baak, J.P. 1995. Prognostic relevance of P-glycoprotein expression in breast cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. **6**(7), pp.679–685.
- Lopuszynski, W., Szczubiał, M. and Renata, K. 2010. Prognostic status of p53 protein accumulation in canine malignant mammary tumours. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. **54**, pp.105–111.
- de M. Souza, C.H., Toledo-Piza, E., Amorin, R., Barboza, A. and Tobias, K.M. 2009. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *The Canadian Veterinary Journal*. **50**(5), pp.506–510.
- Marconato, L., Lorenzo, R.M., Abramo, F., Ratto, A. and Zini, E. 2008. Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*. **6**(2), pp.90–101.
- Martinez, M., Modric, S., Sharkey, M., Troutman, L., Walker, L. and Mealey, K. 2008. The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **31**(4), pp.285–300.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I. and Poli, A. 2005. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science*. **79**(3), pp.225–232.
- Misdorp, W. 1999. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals second series*. **7**, pp.1–59.
- de las Mulas, J.M., Ordás, J., Millán, Y., Fernández-Soria, V. and Ramón y Cajal, S. 2003. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Research and Treatment*. **80**(3), pp.363–367.
- Munday, J.S., Ariyaratna, H., Aberdein, D. and Thomson, N.A. 2019. Immunostaining for p53 and p16CDKN2A Protein Is Not Predictive of Prognosis for Dogs with Malignant Mammary Gland Neoplasms. *Veterinary Sciences*. **6**(1).
- Németh, T. 2016. *Kisállatok lágyszervi sebészete és műtéttana*. Budapest: A3 NYOMDAIPARI ÉS KIADÓI SZOLGÁLTATÓ KFT.
- Nobili, S., Landini, I., Mazzei, T. and Mini, E. 2012. Overcoming tumor multidrug resistance using drugs able to evade P-glycoprotein or to exploit its expression. *Medicinal Research Reviews*. **32**(6), pp.1220–1262.
- Nowak, M., Madej, J.A. and Dziegiel, P. 2009. Expression of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP-1) in canine mammary adenocarcinomas and adenomas. *In Vivo (Athens, Greece)*. **23**(5), pp.705–709.
- Oláh, E. 2005. A BRCA1 és BRCA2 gének. *Magyar Tudomány*. **8**, pp.989–1000.



- Owen, L.N. 1980. TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/ edited by L.N. Owen. *World Health Organisation*.
- Pawłowski, K.M., Mucha, J., Majchrzak, K., Motyl, T. and Król, M. 2013. Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of canine mammary cancer cells. *BMC Veterinary Research*. **9**(1), p.119.
- Petterino, C., Rossetti, E., Bertoncetto, D., Martini, M., Zappulli, V., Bargelloni, L. and Castagnaro, M. 2006. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (clone C494) in canine mammary gland tumours. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. **53**(4), pp.174–178.
- Queiroga, F.L., Pérez-Alenza, D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C.S. and Illera, J.C. 2010. Serum and intratumoural GH and IGF-I concentrations: Prognostic factors in the outcome of canine mammary cancer. *Research in Veterinary Science*. **89**(3), pp.396–403.
- Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C. and Illera, J.C. 2005. Cox-2 Levels in Canine Mammary Tumors, Including Inflammatory Mammary Carcinoma: Clinicopathological Features and Prognostic Significance. *Anticancer Research*. **25**(6B), pp.4269–4275.
- Rasotto, R., Berlato, D., Goldschmidt, M.H. and Zappulli, V. 2017. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. *Veterinary Pathology*. **54**(4), pp.571–578.
- Reggeti, F. and Bienzle, D. 2011. Flow cytometry in veterinary oncology. *Veterinary Pathology*. **48**(1), pp.223–235.
- Restucci, B., Papparella, S., Maiolino, P. and De Vico, G. 2002. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*. **39**(4), pp.488–493.
- Rivera, P. 2010. Biochemical markers and genetic risk factors in canine tumors. . **2010:34**(2010:34). [Accessed 12 October 2020]. Available from: <https://pub.epsilon.slu.se/2280/>.
- Rivera, P., Melin, M., Biagi, T., Fall, T., Häggström, J., Lindblad-Toh, K. and Euler, H. von 2009. Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research*. **69**(22), pp.8770–8774.
- Russo, J. and Russo, I.H. 2006. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **102**(1), pp.89–96.
- Saito, T., Dai, T. and Asano, R. 2013. The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone exhibits antitumor effects against mesenchymal-like canine mammary tumor cells. *Oncology letters*. **5**, pp.1068–1074.
- Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D. and Romero, L. 2015. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PLoS ONE*. **10**(5).
- Salgado, B., Nonogaki, S., Soares, L., Akamatsu, A., Silva, C., Anacleto, T., Malagó, R., Rocha, R., Gärtner, F. and Rocha, N. 2015. Expression of Multidrug Resistance ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters in Canine Mammary Tumors. *Advances in Breast Cancer Research*. **04**, pp.77–85.
- Sauna, Z.E. and Ambudkar, S.V. 2000. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**(6), pp.2515–2520.
- Schneider, R., Dorn, C.R. and Taylor, D.O.N. 1969. Factors Influencing Canine Mammary Cancer Development and Postsurgical Survival. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. **43**(6), pp.1249–1261.
- Simon, D., Schoenrock, D., Baumgärtner, W. and Nolte, I. 2006. Postoperative Adjuvant Treatment of Invasive Malignant Mammary Gland Tumors in Dogs with Doxorubicin and Docetaxel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **20**(5), pp.1184–1190.
- Simon, D., Schoenrock, D., Nolte, I., Baumgärtner, W., Barron, R. and Mischke, R. 2009. Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with

- comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Veterinary Clinical Pathology*. **38**(4), pp.521–528.
- Sonnenschein, E.G., Glickman, L.T., Goldschmidt, M.H. and McKee, L.J. 1991. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *American Journal of Epidemiology*. **133**(7), pp.694–703.
- Sorenmo, K. 2003. Canine mammary gland tumors. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. **33**(3), pp.573–596.
- Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V. and Goldschmidt, M.H. 2011. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*. **48**(1), pp.85–97.
- Sorenmo, K.U., Shofer, F.S. and Goldschmidt, M.H. 2000. Effect of Spaying and Timing of Spaying on Survival of Dogs with Mammary Carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **14**(3), pp.266–270.
- Szakács, G., Jakab, K., Antal, F. and Sarkadi, B. 1998. Diagnostics of multidrug resistance in cancer. *Pathology oncology research : POR*. **4**, pp.251–7.
- Szakács, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C. and Gottesman, M.M. 2006. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. **5**(3), pp.219–234.
- Tarrant, J.M. 2005. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*. **170**(3), pp.278–288.
- Terra, E.M., Rodrigues, M.M.M.P., Magalhaes, G.M., Costa, M.T., Amorim, R.L. and Rocha, N.S. 2012. Immunohistochemical Expression of p53 and p63 in Adenomas and Carcinomas of Canine Mammary Glands. *Open Journal of Veterinary Medicine*. **9**(11).
- Tran, C.M., Moore, A.S. and Frimberger, A.E. 2016. Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. *Veterinary and Comparative Oncology*. **14**(3), pp.252–262.
- Vail, D.M., Thamm, D.H. and Liptak, J.M. 2020. *WITHROW AND MACEWEN'S SMALL ANIMAL CLINICAL ONCOLOGY, 6TH EDITION*. St. Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences.
- Wilkerson, M.J. 2012. Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. **42**(1), pp.53–71.
- Yamashita, A., Maruo, K., Suzuki, K., Shiota, K., Kobayashi, K. and Hioki, K. 2001. Experimental chemotherapy against canine mammary cancer xenograft in SCID mice and its prediction of clinical effect. *The Journal of Veterinary Medical Science*. **63**(8), pp.831–836.
- Zambrano-Estrada, X., Landaverde-Quiroz, B., Dueñas-Bocanegra, A.A., De Paz-Campos, M.A., Hernández-Alberto, G., Solorio-Perusquia, B., Trejo-Mandujano, M., Pérez-Guerrero, L., Delgado-González, E., Anguiano, B. and Aceves, C. 2018. Molecular iodine/doxorubicin neoadjuvant treatment impair invasive capacity and attenuate side effect in canine mammary cancer. *BMC Veterinary Research*. **14**(1).
- Zuccari, D.A.P.C., Pavam, M.V., Terzian, C.B., Pereira, R.S., Ruiz, C.M. and Andrade, J.C. 2008. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: correlation of prognostic factors and clinical outcome. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. **28**(4), pp.207–215.

## Diplomamunka téma-bejelentőlap

Állatorvostudományi Egyetem

Hallgató neve: Mészáros Anna

### A VÁLASZTOTT DIPLOMAMUNKAI TÉMA BEJELENTÉSE

Kérem a Kóréletani és Onkológiai Tanszék vezetőjét, hogy a tanszék által meghirdetett alábbi témában, az alábbi címmel diplomamunka készítését engedélyezze számomra.

Budapest, 2020. 11. 11.



A hallgató aláírása

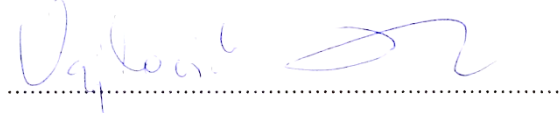
A diplomamunka témája:

*Kutyák emlődaganatainak kemoterápia rezisztencia vizsgálata áramlási citométerrel*

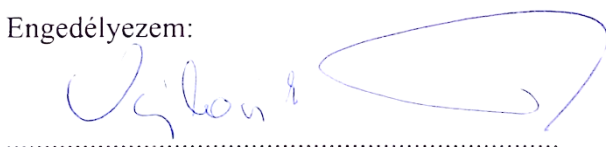
A diplomamunka címe (angolul is):

*Detection of chemotherapy resistance in canine mammary tumors using flow cytometry*

A témavezető aláírása:



Engedélyezem:



Tanszékvezető aláírása

## Konzulensi ellenjegyzés

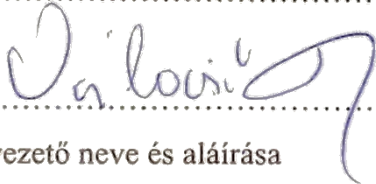
Alulírott *dr. Vajdovich Péter* igazolom, hogy *Mészáros Anna* (a hallgató neve)

*Kutyák emlődaganatainak kemoterápia rezisztencia vizsgálata áramlási citométerrel*

című diplomamunkát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020. 11. 18.

Vajdovich Péter



a témavezető neve és aláírása

## Nyilatkozat TDK- és diplomamunka azonosságáról

### NYILATKOZAT

Alulírott *Mészáros Anna* nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe *Kutyák emlődaganatainak kemoterápia rezisztencia vizsgálata áramlási citometriával* tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2020. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2020. 11. 18.

MÉSZÁROS ANNA  
.....  
Mészáros Anna

a hallgató neve és aláírása

## HuVetA

### ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\*

**Név:** Mészáros Anna

**Elérhetőség (e-mail cím):** m.panni1995@gmail.com

**A feltöltendő mű címe:** Kutya emlődaganaatának kemoterápia rezisztencia vizsgálata áramlási citométerrel

**A mű megjelenési adatai:** 2020

**Az átadott fájlok száma:** 1

---

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédt PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):



engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,

az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,

a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,

csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetÁ-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2020 . év 11. hó 20. nap



aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

---

**A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.**

*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*



## Diplomamunka bírálati lap

# ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM DIPLOMAMUNKA BÍRÁLATI LAP

Név:

A diplomamunka címe:

A beadás időpontja:

Témavezető tanszék (intézet, osztály):

Témavezető(k):

Az írásbeli bíráló neve, beosztása:

### Írásbeli bíráló

1.) Formai, terjedelmi, stiláris szempontok

2.) Szakmai bíráló

3.) Egyéb észrevételek

Javasolt kérdések a jelölt számára

Az írásbeli bíráló érdemjegye: \_\_\_\_\_

A szakmai bíráló bizottság által adott érdemjegy: \_\_\_\_\_

Végső érdemjegy: \_\_\_\_\_

Megjegyzés:

Budapest, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
az írásbeli bíráló aláírása

\_\_\_\_\_  
a Bíráló Bizottság elnöke