

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Biológiai Intézet

**Terápiarezisztenciát okozó transzporterek vizsgálata
daganatos betegségben szenvedő kutyák daganatsejtjeiben**

Készítette: Karai Edina

Témavezető: Dr. Vajdovich Péter
Egyetemi docens
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Kórélettani és Onkológiai Tanszék

Budapest
2014

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----|
| Tartalomjegyzék | 2 |
| Rövidítésjegyzék | 3 |
| 1. Bevezetés | 4 |
| 1.1. Számadatok a daganatos betegségekről | 4 |
| 1.2. Rezisztencia | 6 |
| 1.3. Transzporterek | 7 |
| 1.3.1 Az ABC transzporterek | 7 |
| 1.3.2. P-glycoprotein (Pgp) | 8 |
| 1.3.3. A Pgp szerepe a kutyák daganatos kórképeiben | 9 |
| 1.4. Lymphoma ismertetése és hazai előfordulása | 10 |
| 1.5. Mastocytoma ismertetése | 10 |
| 1.6. Emlődaganat | 10 |
| 1.7. Immunfenotipizálás | 11 |
| 1.8. Vizsgálataink célja | 13 |
| 2.1. Sejt izolálás | 14 |
| 2.2. Calcein jelölés | 14 |
| 2.3. Immunfenotipizálás | 15 |
| 2.4. Citotoxicitási vizsgálat | 17 |
| 2.5. Sejtvonal alapítás | 18 |
| 2.6. Áramlási citométer | 18 |
| 2.7. Statisztikai vizsgálat | 18 |
| 3. Eredmények | 19 |
| 3.1. Sejt izolálás | 19 |
| 3.2. Calcein jelölés | 19 |
| 3.3. Immunfenotipizálás | 22 |
| 3.4. Citotoxicitás vizsgálat | 22 |
| 3.5. Sejtvonal alapítás | 24 |
| 3.6. Statisztikai vizsgálat | 24 |
| 4. Megbeszélés/Diszkusszió | 27 |
| 4.1. Összegzés | 27 |
| 4.2. További célkitűzések | 28 |
| 5. Összefoglalás | 29 |
| 6. Summary | 30 |
| 7. Köszönetnyilvánítás | 31 |
| 8. Irodalomjegyzék | 32 |
| 9. Mellékletek | 34 |
| 9.1. Táblázat | 34 |
| 9.2. Az összes minta áramlás citométerrel történő mérési eredménye | 35 |
| Calcein-assay | 35 |
| 9.2. Témavezetői nyilatkozat | 47 |
| 9.4. HuVetA - SZIA nyilatkozat | 48 |

Rövidítésjegyzék

7-AAD – 7-Amino-aktinomicin D

ABC – ATP binding cassette transporter

ÁHOK – Hematológiai és Onkológiai Központ

ATP – adenzin-trifoszfát

CD – cluster of differentiation

DMSO – dimetil-szulfoxid

FACS – fluorescence activated cell sorting

FSC – forward scatter

kDa – kilodalton

MAF – multidrug rezisztencia aktivitási faktor

MDCK – Madin Darby Canine Kidney

MDR – multidrug rezisztencia

MDR1 – Pgp, multidrug resistance protein 1

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

Pgp – permeability glükoprotein

RNS – ribonukleinsav

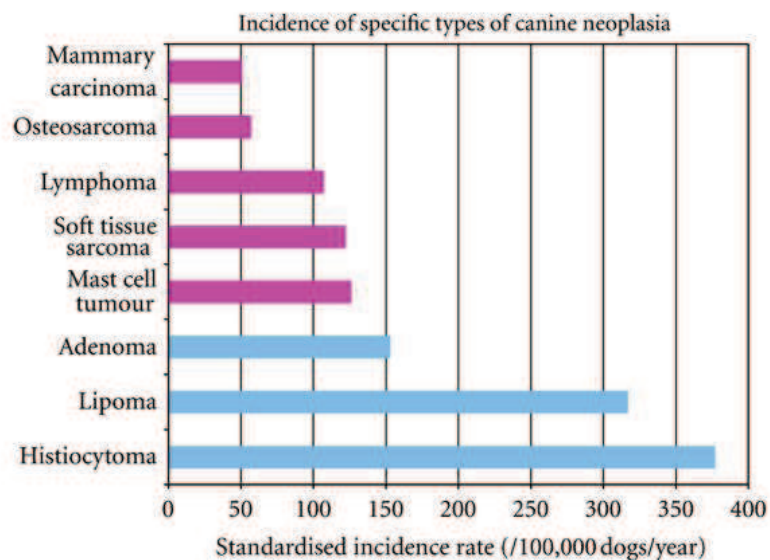
SSC – side scatter

WHO – World Health Organization

1. Bevezetés

1.1. Számadatok a daganatos betegségekről

Magyarországon a legrosszabb a rákban megbetegedettek halálozás aránya. (Oecd) Az OECD által összefoglalt táblázatban látható, hogy Mexikóban a legjobbak ezek az értékek, hiszen férfiak esetében 138 fő 100 000 lakosra nézve, még nőknél 110 fő. Azonban hazánkban ugyanezt az adatot vizsgálva férfiaknál 405 főre emelkedik az érték, nőknél pedig 219 főre ugyanúgy 100 000 lakosra nézve. Ennek a magyarázata nem témája a szakdolgozatomnak. Fontos, azonban kihangsúlyozni, hogy a rák, a tévhitekkel ellentétben, nem modern kori megbetegedés, már számos régészeti lelet bizonyítja megjelenését az ókorban is. Az első megjelent szövettani diagnózist a rákos megbetegedés létezéséről egy egyiptomi múmián mutatták ki. (David and Zimmerman 2010) Annak az oka, hogy mostanában jóval nagyobb arányban jelennek meg a rákos megbetegedések, főként a születéskor várható átlagéletkor megnövekedésével magyarázható. Az idősebb szervezetben a „hibák”, mutációk sokkal nagyobb arányban alakulnak ki, emiatt a sejtek daganatos sejtekké való transzformálódása is nagyobb eséllyel alakul ki idős korban. (Weinberg 1998) Az Egyesült Királyságban korábban végzett felmérések alapján a kutyáknál is a vezető halálozási ok a daganatos kórképek kialakulása. Kategóriák nélkül vizsgálva a kutyák 23%-a hullott el rákos megbetegedés következtében, azonban 10 évesnél idősebb kutyák esetében ez a szám 45%-ra emelkedik. (Bronson 1982) (Dobson, Samuel et al. 2002) Szintén angol felmérésben kimutatták, hogy test bőr és a légyszöveti régiói a leggyakoribb helyszínei a tumor kialakulásnak. Ezekben a régiókban az előfordulási aránya 1437 kutya 100 000 kutyára nézve évente. Az első ábrán látható még, hogy kutyáknál a leggyakoribb daganat típus a bőr histiocytoma volt, standardizált előfordulási aránya 337 100 000 kutya / év.



1. ábra: Kutyák bőr és lágyszöveti daganatának előfordulási aránya

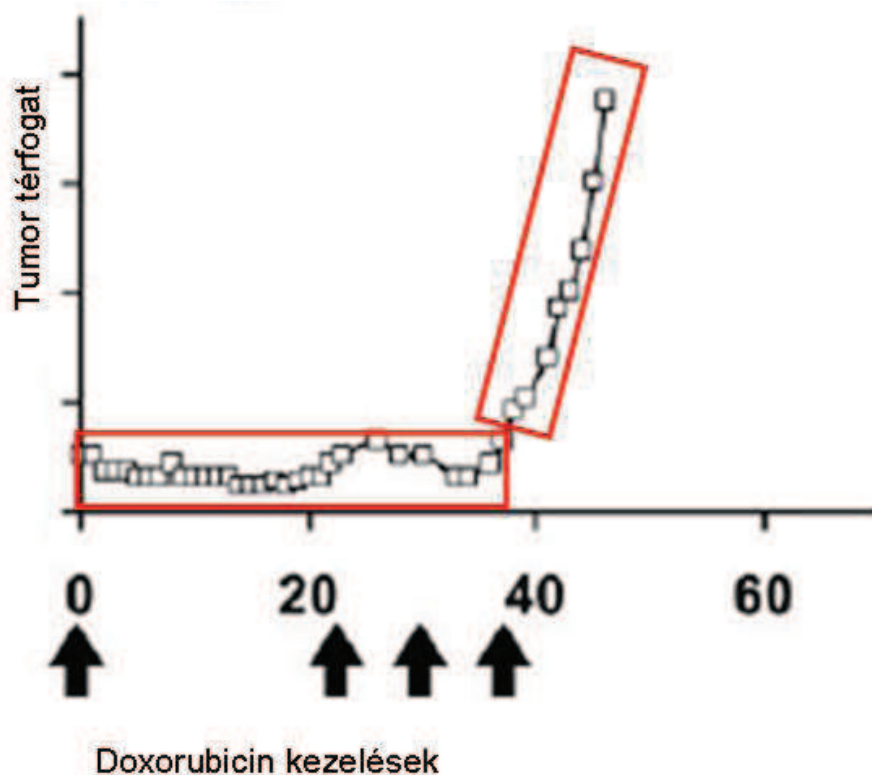
(Dobson, Samuel et al. 2002)

A tumor, daganat vagy neoplázia olyan szövetszaporulat, amely a szervezet megváltozott sejteinek korlátlan burjánzásából származik. Hanahan és Weinberg 2011-ben összefoglalta a tumor sejtek 10 fő tulajdonságát, amelybe beletartozik a korlátlan osztódáson túl, hogy ellenállnak az apoptosist (irányított sejtelhalást) indukáló jelzéseknek, ösztönzik az érképződés folyamatát (angiogenezis), szétterjednek a szervezet egészében (metasztázis), továbbá képesek a proliferatív aktivitásuk fenntartására is. A tumorok agresszivitásuk és életet veszélyeztető jellegük alapján két típusra oszthatóak.. A jóindulatú (benignus) tumorok nem annyira szaporodóképesek, nem invazívak, és nem képesek áttét képzésére, inkább helyi szövetszaporulat alakul ki, ezzel ellentétben a rosszindulatú (malignus) daganat legfőbb jellemzője a nagy szaporodó képesség, az invazivitás, ill. szöveti destrukció, és a metastázis folyamata, mely során a tumor sejtek eredeti helyükről (primer daganat) kijutnak és más szövetekben megtelepedve újabb tumorokat hoznak létre (áttét vagy metastázis). Jelenleg nem rendelkezünk olyan kezelési protokollokkal, amelyek biztos megoldást jelentenének a metastatizáló tumorról rendelkező betegeknek. Ezt az a statisztikai megfigyelés is alátámasztja, hogy az emlő daganatok esetében az ötéves túlélés esélye 98%, amennyiben nincs távoli metastázis, de ez az esély 24% alá csökken, amint az első távoli áttétet felfedezik. Ugyanezek az értékek emberek esetében vastagbél daganat esetében 90% és 12%,

melanómánál 98%, 15%, prosztatata daganatoknál 100% és 28%, hólyagráknál 70% és 6%, míg méhnyak tumoroknál 91% és 16% (Siegel, Naishadham et al. 2013)

1.2. Rezisztencia

A tumor képződése nagyon összetett folyamat, ezért a kezelés is sok problémát vet fel. Az egyik ilyen probléma, amely több esetben fordul elő, hogy a kemoterápiás kezelés kezdetben sikeres, a tumor térfogata csökken, vagy teljesen eltűnik, a beteg jobban érzi magát, de egy idő után újra növekedésnek indul. Ezt hívjuk recidívának (relapsusnak). Ekkor a terápia ellenére, és gyakran még a dózis megemelésével sem tudunk újabb eredményeket elérni. Kialakul a gyógyszer, vagy terápia rezisztencia. A folyamatot a 2. ábra szemlélteti, ahol egy egér emlőtumor modell kezelése látható doxorubicinnal, amely egy gyakran alkalmazott kemoterápiás szer (Rottenberg, Nygren et al. 2007). Látható, hogy az első doxorubicin beadása után csökken a tumor térfogata, majd újra lassú növekedésbe kezd, de ez további doxorubicin kezelésekkel visszaszorítható egészen a 35. napig, azonban a 40. naptól a tumor nem reagál a gyógyszerre, korlátlanul osztódnak a sejtek és a daganattérfogata egyre nagyobb lesz. Ez, az előbb említett gyógyszer rezisztencia kialakulásával magyarázható. A legfőbb probléma az, hogy egy kezelést követően nemcsak egy, hanem többféle gyógyszerre egyszerre alakul ki rezisztencia, ezt a jelenséget nevezzük multidrogr rezisztenciának. A multidrogr rezisztens daganatsejtek keresztrezisztenciát mutathatnak mind hatásmechanizmusukban és mind szerkezetükben különböző citotoxikus szerekkel szemben is, ami gyakorlati szempontból azt jelenti, hogy a beteg tumorját már a kemoterápiás szer változtatásával sem tudjuk megfelelően kezelni.



2. ábra: Tumorban kialakult MDR gyógyszeres kezelésének kimenetele

1.3. Transzporterek

A biológiai rendszerek fennmaradásához nélkülözhetetlen az a tulajdonság, amely segítségével képes megszabadulni a veszélyt jelentő anyagcseretermékektől, valamint a külvilágból bekerülő káros anyagoktól (xenobiotikumok). Az evolúció során már az eukariótáknál kialakult a lizoszóma, amelynek alapvető jelentősége van a sejt védekezési mechanizmusaiban. A sejtek differenciációját követően, bonyolultabb felépítésű élőlényeknél már külön szervek alakultak ki a transzport funkció ellátására, pl. a máj, a vese. Ezek a szervek képesek a xenobiotikumok méregtelenítésére, lebontására.

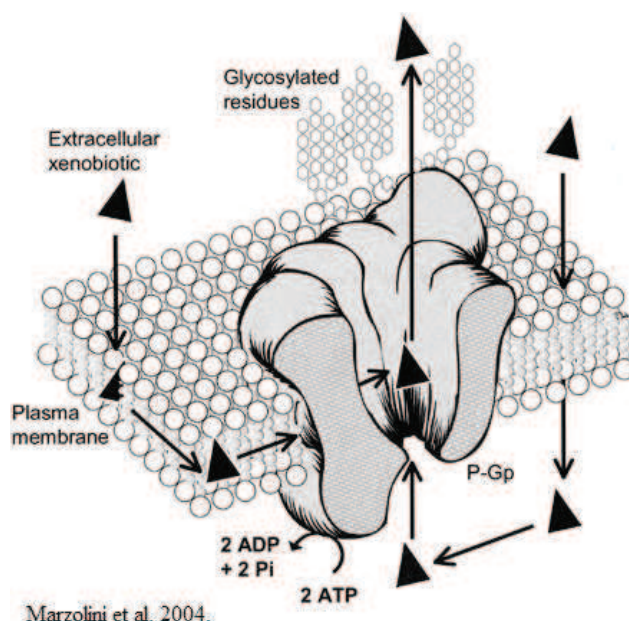
1.3.1 Az ABC transzporterek

Az ABC-transzporterek (ATP-binding cassette transporters) olyan fehérjék, amelyek minden élő szervezetben megtalálhatók. Az emberi szervezetben előforduló 49 ABC fehérjét 7 alcsoportba sorolták, ABCA-tól ABCG-ig (Dean, Hamon et al. 2001). Ezek a transzmembrán fehérjék felelősek a különféle anyagok membránon való átjutásáért vagy a sejt belső membránjai közötti mozgásért ATP-ben tárolt energia felhasználásával. A transzportált anyagok lehetnek például lipidek, szteroidok, metabolitok, gyógyszerek. Tehát a fehérjecsalád egyes tagjainak fiziológiai funkciója rendkívül szerteágazó; magába foglalja többek között a

lipid metabolizmusban való részvételt, az antigénprezentációt, valamint kulcsszerepet játszhatnak a cisztikus fibrózis, tumor rezisztencia, multidrog rezisztencia, számos biológiai folyamat és más örökletes betegség során. (Dean 2005)

1.3.2. P-glycoprotein (Pgp)

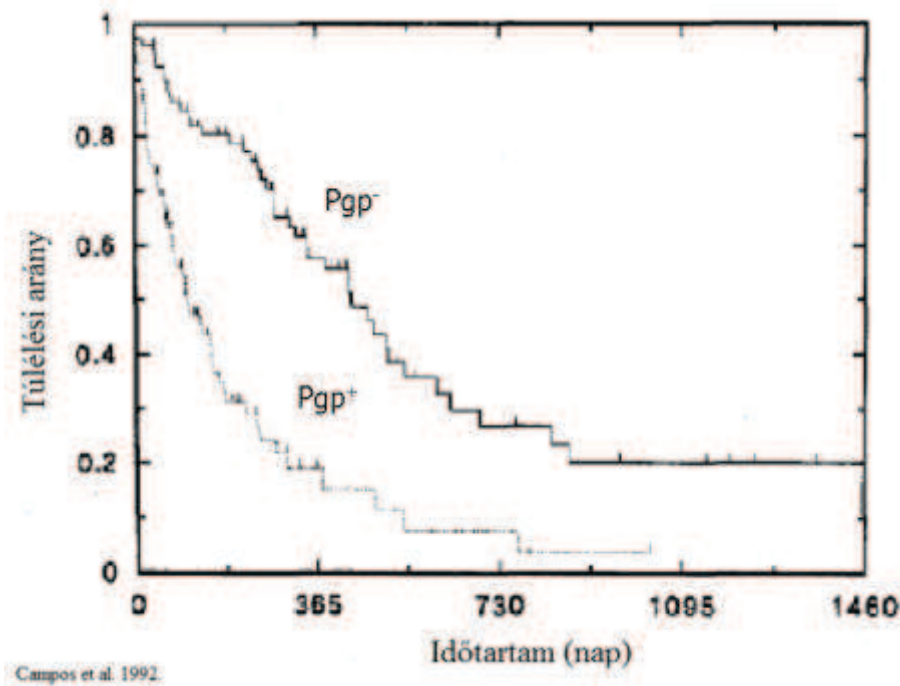
Egy olyan pumpafehérje felelős az említett multidrog rezisztencia folyamatáért, amely alap esetben nélkülözhetetlen a szervezet számára. A „P,, vagyis „permeability” glycoprotein, másnéven multidrug resistance protein 1 (MDR1) Juliano, Ling és mtsai által elsőként leírt 170 kDa molekulásúlyú fehérje. (Juliano and Ling 1976) Az ABC fehérjecsaládba tartozik, mivel ATP felhasználásával végez transzportot. A 3. ábrán látható ez a mechanizmus, illetve a Pgp szerkezete. A pumpafehérje jelen van többek között a bél, a vese hámsejtjeiben, a máj sejtjeiben, a mellékvesében, a placentában, a csontvelőben, a tüdőben, a perifériás vér sejtjeiben, számos endokrin és exokrin szekréciót végző szövetben. Rész vesz a vér-agy és a vér-here gát felépítésében és működésében is. Azonban ha a tumor sejtek kezdik expresszálni, akkor ezek kijuttatják a szövetekből a kezelésben használt gyógyszert, ami így nem tudja kifejteni a hatását. Ezáltal a tumort védi meg a behatoló káros anyagoktól, ami a beteg szempontjából a kezelés sikertelenségéhez vezet.



3. ábra: Pgp szerkezete

A kemoterápiás kezelésben ezáltal sok nehézséget okoz jelenlétük. A 4. ábrán jól látható, a Kaplan-Meier túlélési görbén, a különbség azoknál a betegeknél, ahol van Pgp és akiknél nincsen. A grafikon a kezelést követően vizsgálja a betegek túlélési arányát idő függvényében. A szaggatott vonallal jelölt Pgp pozitív betegeknél egy éves időintervallumot vizsgálva a túlélők száma csupán 20%-a a kezdeti betegszámának a csoportban, azonban a Pgp

negatív betegeknél ugyanebben az intervallumban ugyan ez az arány 60%, hiszen itt nincs, ami kipumpálja a kezelésben résztvevő gyógyszert,.



4. ábra: Pgp szerepe a gyógykezelésben

1.3.3. A Pgp szerepe a kutyák daganatos kórképeiben

Egyes daganatok gyakori intrinzik (eredeti, nem szerzett) kemoterápiarezisztenciája az erőteljes Pgp-expressziónak köszönhető pl. a hepatocellularis carcinoma és a gyomor-bél rendszer carcinoma esetén. Kutyák és macskák esetében a lymphoma citosztatikumokkal történő kezelése során gyakori a szerzett terápiarezisztencia.

A kutyák különböző típusú daganatai két nagy csoportba sorolhatók aszerint, hogy Pgp mindig jelen van vagy csak bizonyos esetekben mutatható ki bennük. Az első csoportba tartoznak például a májdaganatok (emberekben is), a másodikba a lymphomák, a hízósejtes daganatok (mastocytomák) és a húgyhólyag-carcinomák. Számos daganat típus esetén mutattak ki Pgp-pozitivitást immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével. Lymphoma esetén 27,2 %-ban tapasztalatakat pozitivitást. A Pgp fontosságát a lymphomás kutyák gyógyításában több tanulmány bizonyítja, mely szerint a Pgp-expresszió szintje a kemoterápia megkezdése előtt fordítottan arányos a remissziós és a túlélési idővel, valamint a visszaeséskor mért Pgp-szint fordítottan arányos a túlélési idővel. (Szécsényi és mtsai, 2007.). Az előbb említett és egyben a projektben vizsgált daganat típusok ismertetése elengedhetetlen a kísérlet megértése szempontjából.

1.4. Lymphoma ismertetése és hazai előfordulása

A lymphoma a nyirokrendszer sejtjeit, valamint a fehérvérsejteket, vagyis a lymphocytákat érintő betegség. A betegség a lymphocyták ellenőrizetlen osztódását, növekedését eredményezi. A kóros lymphocyták többnyire a nyirokcsomókban összegyűlnek, duzzanatot képezve. A lymphomának számos altípusa létezik, és ezek többségére igaz, hogy mind sugárterápiával mind kemoterápiás szerekekkel jól kezelhető. A lymphoma kutyákban az emberek közepes vagy nagy malignitású ún. non-Hodgkin-típusú lymphomájával mutat hasonlóságot (Vail, Kisseberth et al. 1996) (Fournel-Fleury, Magnol et al. 1997)

A lymphoma a kutyák daganatos betegségeinek 7-24%-át alkotja, míg a haemopoieticus daganatos betegségek között 83%-ban jelentkezik. (Thamm, MacEwen et al. 2002) Gyakorisága folyamatosan nőtt az évek során a hazai kutyapopulációban. (Kunos, V. és mtsai. 2004.). Ez a kórkép, többnyire az idősebb, 9 év feletti kutyáknál fordul elő, de elvileg minden életkorban és bármely ivarú, ill. fajtájú egyedben kialakulhat (Thamm, MacEwen et al. 2002)

1.5. Mastocytoma ismertetése

A hízósejtes daganat (mastocytoma) az egyik leggyakoribb bőrrák típus a kutyáknál, a daganatos megbetegedések körülbelül 1/3-a bőrrák, aminek 20 %-áért a mastocytoma a felelős. Bármilyen korú, nemű, fajtájú kutya testén előfordulhat, de úgy tűnik, vannak bizonyos fajták, melyek hajlamosabbak ennek a daganat típusnak a kialakulására (fox terrier, straffordshire terrier, Baegle, boston terrier, bullmastiff, tascsó, amerikai staffordshire terrier, labrador, schnauzer, golden retriever.) A mastocytomára is igaz, mint ahogy lymphomára is, hogy az életkor előrehaladtával nő a mastocytoma kialakulásának esélye (általában 8-9 éves kortól).

A mastocytoma, vagy hízósejtes daganat legjellemzőbb tünete, egy duzzanat a bőr felszínén. Ez sokféle lehet, a kisebb szemölcsszerűtől a nagy fekélyes sebig. A mastocytoma sejtek nem rendelkeznek intrinsic rezisztenciával, de gyógyszerekkel való kezelésük során nagy az esély a szerzett rezisztencia kialakulására. (Lee, Hughes et al. 1996)

1.6. Emlődaganat

A kutyák és macskák emlődaganata az egyik leggyakrabban előforduló daganat típus, melyek kialakulásának hátterében ivari, illetve hormonális működéssel kapcsolatos tényezők állnak. Ez magyarázza a tényt, hogy azokban a kutyákban és macskákban, amelyeket 2 éves koruk előtt ivartalanítanak, jelentősen kisebb eséllyel alakul ki rosszindulatú emlődaganat. Nagyon

fontos tudomásul vennünk ezt, mivel a statisztikai adatok alapján a kutyákban kifejlődő emlődaganatok 50%-a, a macskákban kialakulóak 90%-a rosszindulatú.

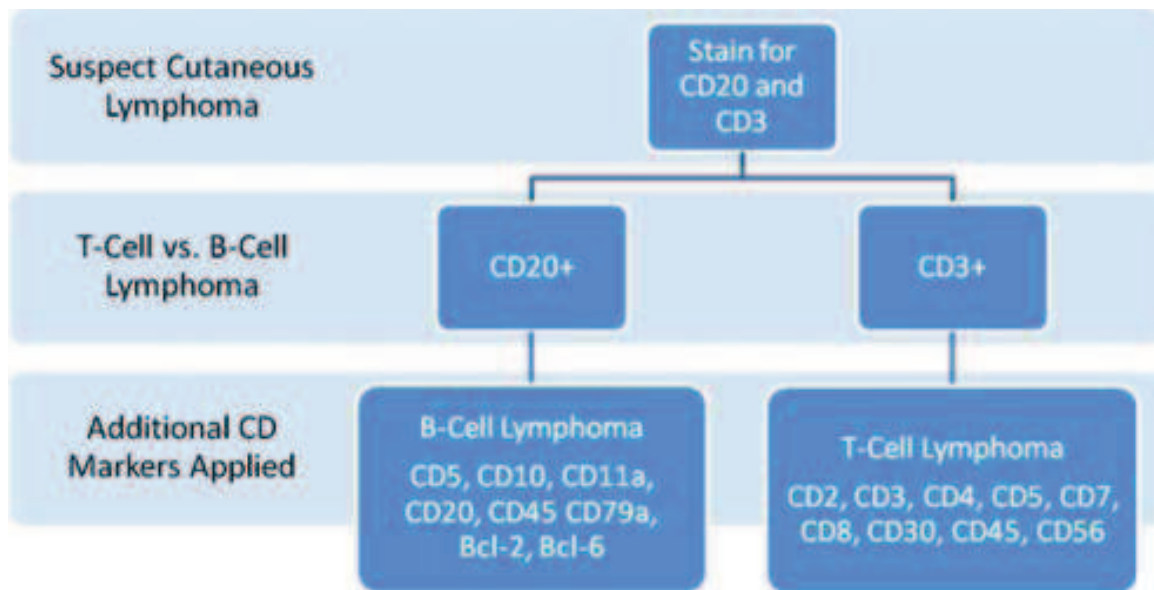
A betegség gyógykezelése sebészi eltávolítással történik, illetve késői diagnózis, vagy kifejezett rosszindulatúság (grade 3 carcinoma) esetén, a műtét utáni kiegészítő kezelésekkel (pl. kemoterápia) lehetséges.

1.7. Immunfenotipizálás

Az eljárás fő célja, hogy meghatározzuk a kóros daganat, a mi esetünkben a lymphoma sejtek B- vagy T/NK-sejtes jellegét, valamint érettségi stádiumát és jellegzetes sejt felszíni struktúráit, így lehetőség nyílik a betegség alcsoportokba sorolására is. Az immunfenotípus-meghatározást gyakran alkalmazzák a lymphohaemopoeticus rendszer rosszindulatú betegségeinek vizsgálatában. A kutyák esetében a non-Hodgkin-lymphomák diagnózisában játszik szerepet ez a módszer.

A „cluster of differentiation” (CD) molekulák általában membránhoz kötött glükoproteinek, amelyek különböző funkcióval rendelkeznek, mint receptor-, szignálfunkció, enzimaktivitás, intercelluláris kommunikáció, valamint részben sejtspecifikusan expresszálódnak. A 5. ábrán látható a CD nomenklatúra, mely eredetileg emberre készült, de más fajok fehérjéinek is azonos „clustereket” adtak. Ezek megkülönböztetésére a CD rövidítés elé a fajnak a kis kezdőbetűjét teszik (pl. hCD4: humán).

Négy fő csoportba sorolhatjuk a ma ismert több mint 330 CD markert. A CD-markerek legnagyobb része az I-es típusú transzmembrán fehérjék csoportjába, kevesebb a II-es és III-as típusúhoz tartozik, valamint van néhány, ami GPI horgonyzott. (Scaglione, Bansal et al. 2007)



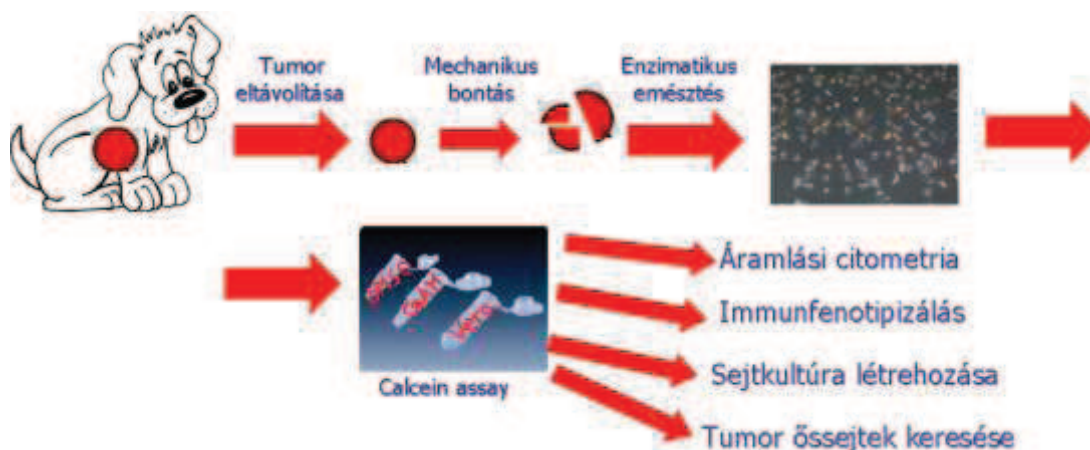
5. ábra: Lymphocyta differenciálódási CD-markerek

A T-sejtek a csontvelői pluripotens őssejtekből származnak. A csontvelőből a thymus kérgi részében telepednek meg. A prekursor sejtek expresszálnak CD7-et, vagyis pozitívak CD7-re. Tovább fejlődve a CD1, majd a CD4 és CD8 molekulák is expresszálódnak a felszínükön. A thymus medullájában elveszítik a CD1 antigént, de helyette megszerzik a CD3-at. A CD4 és a CD8 közül pedig elveszítik valamelyiket. A funkcionálisan érett T-sejteken így CD3 és CD4, vagy CD3 és CD8 sejt felszíni markerekkel rendelkeznek. Ezek a thymocyták kerülnek ki a keringésbe és a perifériás nyirokszervekbe.

Az immunfenotipizálás módszerrel a sejt valamelyik alkotórészét az ellene termelt, fluorokrómmal jelzett monoklonális antitesttel jelöljük. Megkülönböztetünk az immunfenotipizálás technikában direkt és indirekt módszert a fluoreszcens festék és a specifikus kötődést biztosító monoklonális antitest kapcsolata szerint. Direkt immunfenotipizálás esetében a jelölésre használt festék a vizsgálni kívánt Ag-re specifikus monoklonális antitesttel (primer antitest) kapcsolódik, míg indirekt eljárás esetében a primer antitest jelöletlen, ezért a láthatóvá tételéhez valamilyen második, jelzett antitestre van szükség (szekunder jelzett antitest). Az indirekt módszer terjedt el az immunhisztokémiai vizsgálatok esetében, csakhogy itt többnyire nem fluoreszkáló festéket, hanem más jelölő molekulát, vagy enzimet csatolnak az ellenanyagokra.

1.8. Vizsgálataink célja

A terápiarezisztencia kialakulása az emberek daganatos kórképeihez hasonlóan a kutyáknál is csökkenti a túlélési esélyt. Vizsgálataink során a rezisztencia kialakulásának nyomon követését céloztuk. Ehhez kutyákban spontán előforduló, három különböző, morfológiailag és expressziós profil alapján jól elkülöníthető daganattípust választottunk. A daganattípusok közül a lymphomát, az emlő daganatot és a mastocytomát választottuk, mivel ezek lefedik a kutya tumorok jelentős részét, illetve mert ezekben közismert módon kialakul a multidrog rezisztencia a kezelés hatására. (Gramer, Kessler et al. 2013) (Koltai and Vajdovich 2014) A kutyákból a mintavételt követően sejt- és molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltuk a daganatos szöveteket, sejteket valamint a rezisztencia meglétét. Lymphoma esetében úgynevezett immunfenotipizálást is végeztünk annak érdekében, hogy jól elkülönítsük az egyes lymphoma típusokat. Ezáltal nemcsak a T-és B-sejtes változatát tudjuk elkülöníteni, hanem a WHO által karakterizált szubtypusokat is, valamint lehetőség nyílik a rezisztencia kialakulását követően az immunfenotípus változásának követésére. Így egészében tudjuk vizsgálni a kemoterápia hatását a tumorsejtekre. A végső cél ezekből az adatokból egy táblázat létrehozása, mely tartalmazza az összes kutya adatát, akiből mintát vettünk, valamint a diagnózist, a vizsgálati módszereket és azok eredményeit. Ez információt szolgáltat a kezelőorvosnak a helyes terápia megválasztásához. További terveink között szerepel, hogy lymphoma sejtvonalakat hozzunk létre, amelyeken végezhetünk citotoxicitási vizsgálatokat, ezáltal még több információhoz jutunk az adott daganattípusról és a gyógyszeres kezelések hatásairól.



6. ábra: Munkafázis egyes lépéseinek sematikus ábrázolása, célok elérése

2. Anyag és módszer

Kísérletünkben húsz kutya vett részt, amelyeket az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ (ÁHOK) szakrendelésén vizsgáltak és kezeltek. A kutyák fajtája az alábbi volt: 7 keverék, 2 cocker spániel, 2 yorkshire terrier, 9 egyéb fajta (labrador, foxi, terrier, máltai selyemkutya, jack russel terrier, magyar vizsla, puli, németjuhász, bullmasztiff). A vizsgált kutyák életkora kora 3,5-12 éves volt. A lymphomás betegek ivari megoszlása: 8 kan, illetve 2 szuka. A mastocytomában szenvedő kutyák ivari megoszlása: 2 kan és 1 szuka. Az emlődaganat betegsége esetén a vizsgált 7 kutya közül mindegyik szuka. A fontosabb adatokat táblázatban rögzítettünk (Mellékletben lévő táblázat). A kutyákat az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ, Á.H.O.K. Kft.ben vizsgálták. A kórképek diagnózisát is ott állították fel. A daganatos elváltozások (mastocytoma, emlődaganat) esetén műtéti eltávolításra került sor, valamint a lymphomák esetében ún. tru-cut biopsziás eljárással történt mintavétel szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatra.

2.1. Sejt izolálás

A kimetszett daganatokból, ill. biopsziás mintákból tumorsejteket izolálaltunk az ÁHOK Kft.-ben történik, ahol elkezdődik a daganat disszociációja is. A tumort apró darabokra vágtuk, majd disszociációs médiumba tettük, ami DMEM médiumból, 200 U/ml II-es típusú kollagenázból és 0,6 U/ml diszpázból állt (Gibco, Life Technologies, USA), majd 15 percenként 1 percig vortexeltük, a köztes időben 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük. A folyamat célja az volt, hogy a szolid daganatokból egysejtes szuszpenziót állítsunk elő, amit aztán jelölésre tudunk használni.

Ezután átszállítottuk a sejteket az MTA-SE Membránbiológiai Kutatócsoporthoz, ahol a további feldolgozás történt. Steril fülke alatt, először elektromos pipettorral tízszer felleszuszpendáltuk a disszociált tumor darabokat, majd egy 40µm-es szűrőn átszűrtük a sejtes folyadékot. Ezt követően 250g-n centrifugáltuk a sejteket, majd a felülúszót óvatosan leöntöttük, és a csapadék mennyiségétől függően 5-8ml szérummentes DMEM-be visszavettük a sejteket. A sejtszámlálás a következő lépésben történt, melyhez 10µl sejtes folyadékra és 10µl tripánkék festékre volt szükség. A kapott eredményt átszámoltuk 750 000 darab sejtre, mely a jelöléshez volt szükséges.

2.2. Calcein jelölés

A kiszámolt mennyiséget áramlási citométer (FACS) kompatibilis csőbe mértük, és ismét centrifugáltuk a sejteket, melyre majd 300µl DMEM-et pipettáztunk. Ezt követően a sejteket három felé szétosztottuk 100ul-esével, így minden csőben 250.000 db sejt lett.

A calcein jelöléshez szükséges oldatokat eppendorf csövekbe mértük össze a következők szerint: 1. DMSO szérumentes DMEM-ben kontrollnak, 2. verapamil szérumentes DMEM-ben a Pgp gátlásához 3. Calcein-AM szérumentes DMEM-ben a fluoreszcens jelöléshez. Minden vizsgált tumorból 3 minta csövet készítettünk (lsd. feljebb), amiből kettőt jelöltünk meg, egyet pedig kezeletlen kontrollként a sejtek autofluoreszcenciájának méréséhez használtunk fel. Ezeket mind 37°C-os vízfürdőben tartottuk rázatva a jelölés alatt. A két jelölni való cső közül az egyikbe DMSO-t, míg a másikbe verapamilt tartalmazó szérumentes médiumot pipettáztunk, majd 5 percig inkubáltuk, így az egyik csőben a Pgp-t gátoltuk (verapamil), míg a másikban hagytuk tovább működni a membrántranszportert (DMSO). Az 5 perc leteltével minden csőbe Calcein-AM festéket tettünk szérumentes médiumba, ezzel elértük, hogy a sejtek fluoreszcens festékkel jelölődjenek, amennyiben nincs bennük működő Pgp fehérje. Összesen 10 perc inkubáció után a sejteket 250g-n centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük és 270 µl friss PBS-ben visszavettük a sejteket. Közvetlenül mérés előtt 0,8µl To-PRO3 festéket adtuk minden csőhöz, amivel az elpusztult sejteket el tudtuk választani az élőkől.

2.3. Immunfenotipizálás

A lymphoma sejtek izolálását követően 300 000 darab sejtet kellett számolnunk és kimérnünk falcon csőbe. Majd centrifugáltuk 250 g-n és 400µl szérumentes DMEM-et rápipettáztunk. Nyolc darab áramlási citométer (FACS) kompatibilis csőbe kellett szétosztanunk 50µl-esével a sejteket. A nyolc cső kísérleti elrendezése az 7. ábrán látható, erre az áramlás citometria mérés miatt volt szükség.

1. IK: lymphoma felülúszó, 300ezer sejt/cső, Caliburon mérve

FL1: rat IgG2a-FITC (5ul)
FL2: mouse IgG2a-PE (10 ul)
FL3:
FL4: Topro (1 ul)

2. jelölt: lymphoma felülúszó, 300ezer sejt/cső, Caliburon mérve

FL1: CD5-FITC (10ul)
FL2: CD14-PE (10 ul)
FL3:
FL4: Topro (1 ul)

3. IK: lymphoma felülúszó, 300ezer sejt/cső, Caliburon mérve

FL1: mouse IgG1-FITC (10ul)
FL2: mouse IgG1-PE (10 ul)
FL3:
FL4: Topro (1 ul)

4. jelölt: lymphoma felülúszó, 300ezer sejt/cső, Caliburon mérve

FL1: CD3-FITC (10ul)
FL2: CD21-PE (10 ul)
FL3:
FL4: Topro (1 ul)

5. IK: lymphoma felülúszó, 300ezer sejt/cső, Caliburon mérve

FL1: -
FL2: rat IgG2a-PE (5 ul)
FL3:
FL4: Topro (1 ul)

6. jelölt: lymphoma felülúszó, 300ezer sejt/cső, Caliburon mérve

FL1: CD11/18-FITC (10ul)
FL2: CD4-PE (10 ul)
FL3:
FL4: Topro (1 ul)

7. IK: lymphoma felülúszó, 300ezer sejt/cső, Caliburon mérve

FL1: -
FL2: mouse IgG1-PE (10 ul)
FL3: 7AAD (1ul)
FL4: -

8. jelölt: lymphoma felülúszó, 300ezer sejt/cső, Caliburon mérve

FL1: -
FL2: CD34-PE (10 ul)
FL3: 7AAD
FL4: CD45-APC (10ul)

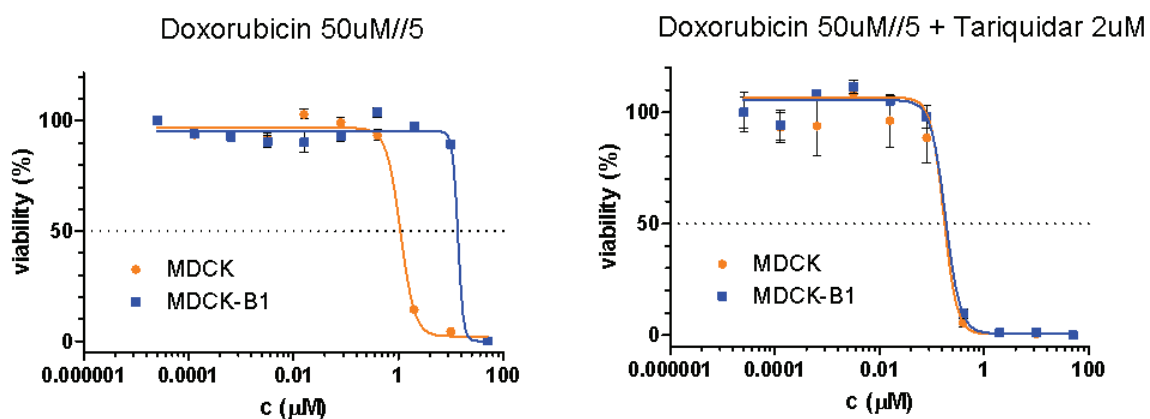
7. ábra: Immunfenotipizáláshoz használt anyagok és azok kísérleti elrendezése

Így minden tumor sejten vizsgáltuk a CD 3, 5, 11/18, 14, 21, 34, 45 sejtfelszíni markereket, melyek alapján el tudtuk különíteni a különböző lymphoma szubtypusokat. Ezeket 37 °C-os vízfürdőben tartottuk rázatva a mérésig. Majd 250g-n centrifugáljuk a sejteket, a felülúszót leöntöttük és 270ul friss PBS-ben visszavettük. A mérés megkezdése előtt 0,8ul To-PRO3

(Invitrogen, USA) festéket vagy 7-Amino-aktinomicin D-t (7-AAD, Sigma-Aldrich, USA) festéket adtunk minden csőhöz (a kísérleti elrendezésben megtekinthető), amivel elkülönítettük az elpusztult sejteket az élőktől.

2.4. Citotoxicitási vizsgálat

Ebben a kísérletben MDCK (Madin Darby Canine Kidney, kutya vese epítél) sejteket és az azokból virális transzfekcióval létrehozott MDCK-B1 párjukat kezeltük doxorubicinnal. Ezek az MDCK-B1 sejtek folyamatosan expresszáltak nagy mennyiségű P-glycoprotein fehérjét, míg a normál MDCK sejtek egyáltalán nem. A kísérletben 96 lyukú platen dolgoztunk, melybe kívülre PBS folyadékot pipettáztunk a párolgás elkerülése miatt, így a belső 60 lyukat használtuk a sejt pár összehasonlítására. Minden lyukba 5000 darab sejtet tettünk, annak érdekében, hogy az előre meghatározott koncentráció sor jól összehasonlítható legyen. Három napig termosztátban inkubálódtak a sejtek, majd viabilitási esszét végeztünk. Megnéztük egy program segítségével, hogy az egyes koncentrációk milyen mértékben pusztították el a sejteket. Ahogy a 8. ábrán is látszik, a Pgp-pozitív sejtek jelentősen nagyobb koncentrációban képesek elviselni a doxorubicint, köszönhetően a működő Pgp fehérjéiknek, melyek kijuttatják a gyógyszert a sejtekből. Ezzel párhuzamosan végeztünk egy másik mérést is, ahol ugyanannyi sejt számot alkalmaztunk lyukanként, de a doxorubicin mellett egy pumpa gátlószert is használtunk, ez volt a tariquidar.



8. ábra: Citotoxicitás vizsgálatok MDCK sejt páron doxorubicin és tariquidar együttes alkalmazásakor

2.5. Sejtvonal alapítás

Három különböző lymphoma mintából próbáltunk meg sejtvonalat alapítani. A kezdeti sejtszám különböző volt, az első flaskába $7,26 \cdot 10^5$ db sejt volt, melyet 2013.02.26-án indítottunk, a második sejtvonalat 03.05-én indítottuk $2,46 \cdot 10^6$ db sejttel, a harmadik flaskába pedig $1,3 \cdot 10^6$ db sejtet tettünk 03.13-án. A sejteket speciális komplettált médiumban tartottuk kezdetben 3% antibiotikumot (penicillin és sztreptomycin), 1% glutamint és 20% FBS-t tartalmazó DMEM (Gibco, USA) oldatban. Hétről hétre mértük a sejtszámot, és hetente egyszer 250g-n centrifugáltuk a sejteket és új médiumba vettük vissza őket. A médium összetételét is változtattuk, 03.28-án már elhagytuk az antibiotikumot, mivel ez idő alatt az esetleges kórokozók elpusztultak. Jelenleg az utóbbi kettő sejtvonalat sikerült életben tartanunk.

2.6. Áramlási citométer

A lymphoma, a mastocytoma és az emlő daganat sejteken végeztünk Calcein assayt, továbbá a lymphoma sejteken megvizsgáltunk különböző CD markerek sejtfelszíni expresszióját áramlási citométer segítségével. Ehhez az áramlási citométer (FACS) kompatibilis csövekben lévő sejteket 250g-n centrifugáltuk, majd 270 μ l hideg PBS-t adtunk hozzá. Közvetlenül a mérés előtt pedig TO-PRO3-at (Invitrogen, USA) vagy 7-Amino-aktinomicin D-t (7-AAD, Sigma-Aldrich, USA) adtuk a sejtszuszpenziókhöz, hogy elkülönítsük az élő és holt sejteket egymástól. Azok a sejtek tekinthetők élőknek, amelyek expresszáltak valamilyen fluoreszcens fehérjét. Az élő és a holt sejtek szétválogatása, tehát a fluoreszcens fehérje expresszióján alapul, mivel a világító fehérjével csak az élő sejtek rendelkeznek. A sejteket egy FACSCalibur (BD Biosciences, USA) készülékkel mértük.

2.7. Statisztikai vizsgálat

Vizsgálati eredményeink kiértékelése céljából statisztikai vizsgálatot végeztünk. A gátlás nélküli és a gátlóanyagokat tartalmazó sejtek eltérő fluoreszcenciás aktivitásának kifejezéséhez használt MAF értékeket hasonlítottuk össze a különböző daganatmintákban, valamint vizsgáltuk a kormegoszlást is.

Kétféle statisztikai módszert választottunk. A MAF-értékek és a betegek életkora közötti összefüggés vizsgálatához Pearson-féle korrelációs módszert alkalmaztunk, a MAF-értékek különbségeinek vizsgálatához, valamint a különböző daganatos elváltozásokban szenvedő betegek kormegoszlásának megállapításához pedig nem egyenlő varianciájú Student-féle t-próbát alkalmaztunk. Az analízisekhez a Microsoft Excel 2007. (Microsoft Corporation

1985-2001.), valamint az SPSS for Windows Release 8.0.0. (Copyright © SPSS Inc.) programokat használtunk.

3. Eredmények

Az első minta feldolgozása 2013.10.02-án történt az utolsó pedig 2014. 03.13-án. Ez idő alatt 20 mintát dolgoztunk fel, ebből 10 lymphoma, 3 mastocytoma, 7 emlő daganat, melyek a szakdolgozat szempontjából szükségesek és még egy macska laphám carcinoma mintát is vizsgáltunk érdekeségből. Az eredményeket excel táblázatban foglaltuk össze, amelyben megtalálható minden kutya adata, melyekből mintát vettünk, az Á.H.O.K. Kft által felállított diagnózis, illetve a mintákon elvégzett vizsgálatok. (Ez a Melléklet 5. táblázataként tekinthető meg.). Továbbá a Calcein-AM mérések és az immunfenotipizálás eredményeit power point segítségével foglaltuk össze.

3.1. Sejt izolálás

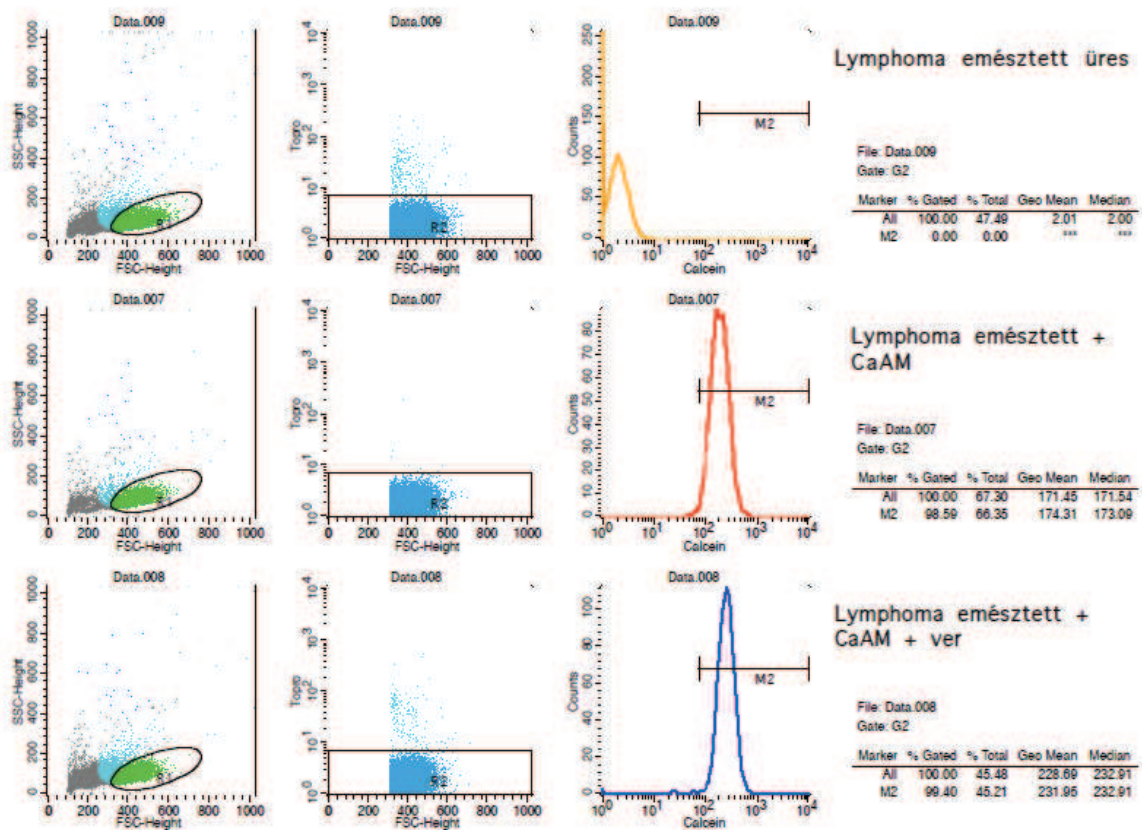
Mind a három minta (lymphoma, mastocytoma, emlő daganat) esetében sikeres volt a feldolgozás. Az általunk használt emésztési eljárás működött. Elegendő élő sejtet tudtunk izolálni egy teljes calcein sor elvégzéséhez, RNS eltárolásához, valamint lymphoma esetén immunfenotipizáláshoz. A húsból egy alkalommal (2521-2728 állatkódú emlő daganat mintánál) nem tudtunk elegendő élő sejtet izolálni, ennek oka a hibás centrifuga volt.

3.2. Calcein jelölés

A mintákból származó, kutya-tumor sejtek felvették és átalakították a Calcein-AM festéket, az így nyert fluoreszcenciájuk pedig mérhető volt az áramlási citométer segítségével. Minden mintában tapasztalható volt egy enyhe shift a verapamil adását követően, amiből az állapítható meg, hogy a tumor sejtek rendelkeznek egy baseline transzporter aktivitással. A 9. ábrán látható a 2388-2581 állatkódú labradorból vett lymphoma minta FACS képe. Az egyes grafikonok x tengelyén mindig az FSC (forward scatter) érték látható, ami a sejt mérettel arányos, az y tengelyen pedig az SSC (side scatter) érték, ami a granuláltsággal van összefüggésben. Mivel a mintákban a mononukleáris sejteken kívül néhány egyéb sejt is előfordult (vörösvérsejt, granulocyták, halott sejtek), melyek téves eredményeket okozhatnak, ezért ezeket két különböző szinten ki kellett szűrniük („kapuzás”). A kapuk R1, melynél a granuláltság alapján különítettük el a nekünk szükséges lymphocytákat, R2 esetén az élő

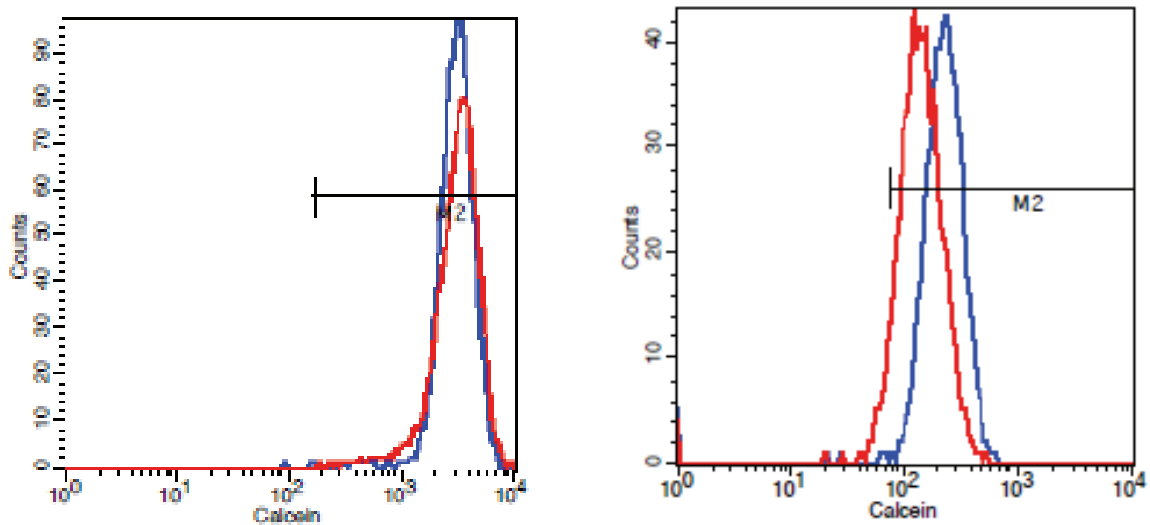
sejteket válogattuk ki. Azokat, amelyeknél alacsony volt a 660 nm-es emittálás, tehát nem vették fel a viabilitás-vizsgálathoz használt vegyületet a To-PRO3-at vagy 7AAD-t, mivel ép volt a sejtmembránjuk. Az elpusztult sejtekben következésképpen magas emissziót mértünk ezen a hullámhosszon a membránkárosodás miatt.

A kísérlet során meg akartunk bizonyosodni róla, hogy a tumorok valóban expresszálják-e a funkcionális Pgp fehérjét, ezáltal alakítva ki a rezisztenciát és a kedvezőtlen túlélési esélyeket, ezért az eltávolított daganatokat az Anyagok és módszerekben leírtak szerint szolubilizáltuk és az így nyert sejtekben funkcionális calcein-AM jelölést csináltunk. Az ábra első sorában, „üres” felirattal a kontroll minta látható. Sárga színnel figyelhetjük meg azt a fluoreszcenciát, mellyel a sejtek alapból rendelkeznek és minden jelölés nélkül emittálnak, ezt nevezzük autofluoreszcenciának. A második sorban, pirossal a calcein alapállapotú jelölése látható. Az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint jelöltük a sejteket, és vizsgáltuk a fluoreszcencia változását Calcein-Am hozzáadását követően. A harmadik sorban sötétkéssel a calcein akkumuláció gátolt, vagyis a Pgp sejtek pumpa funkcióját gátolva mértük le a sejtek fluoreszcenciáját.



9. ábra: Lymphoma minta FACS képe

A calcein mérés összehasonlító eredményét a 10. ábra mutatja. Az x tengelyen a fluoreszcencia intenzitása látható, az y tengelyen pedig a sejtszám. A bal oldali ábrán a két gauss görbe fedí egymást, vagyis a verapamil (gátlószer) adását követően is ugyanakkora a sejtek fluoreszcencia intenzitása. A jobb oldali ábrán viszont látható az a bizonyos enyhe eltolódás verapamil hozzáadása után.



10. ábra: Két különböző lymphoma Calcein assay eredménye

Sötétkékekkel a calcein akkumuláció gátolt, pirossal pedig az alapállapotú Pgp rendelkező sejtek vannak jelölve. Észrevehető, hogy míg a bal oldali tumor sejtek alapállapotban közel ugyanannyi calcein festéket vesznek fel, mint amikor verapamil Pgp gátlószerrel kezeltük a sejteket (sötétkék hisztogram), addig a jobb oldali sejtek hisztogramjai jelentősen eltérnek. Ez azt jelenti, hogy az alapállapotú Pgp-vel rendelkező sejtek (piros hisztogram) kipumpálják magukból a calceint, ezzel csökkentve a fluoreszcencia intenzitásukat, de ha gátoljuk a pumpa aktivitását (sötétkék hisztogram) a festék a sejten belül marad, a fluoreszcencia maximuma pedig újra megnő.

Ezt az eltolódásbeli különbséget az úgynevezett multidrug rezisztencia aktivitási faktorról, MAF értékkel is szemléltethetjük. Amennyiben a kontroll csoport (csak calcein-AM festéket tartalmazó) értékeit a verapamillal gátoltak értékeihez viszonyítjuk, akkor megkapjuk az MDR1 MAF értékét. Vizsgálataink során a kapott fluoreszcencia értékek alapján egy függvény segítségével kiszámoltuk az MDR1 (MAF-mdr1) értéket. $MAF = \frac{[Fluoreszcencia (élő daganatsejtek, gátolt) - Fluoreszcencia (élő daganatsejtek, gátolatlan)]}{Fluoreszcencia$

(élő daganatsejtek, gátolt). A bal oldali ábrán a 2661-2887 állatkódú kutya lymphoma minta Calcein eredménye látható, amelynek MAF értéke -0,089373844. A jobb oldalon pedig a 2388-2581 állatkódú lymphoma minta Calcein kiértékelése figyelhető meg, amelynek MAF értéke 0,263492336.

3.3. Immunfenotipizálás

Csak a lymphoma minták esetén végeztük el ezt a vizsgálatot. Mivel a lymphomának is több más daganathoz hasonlóan nagyon sok típusa van, így a sejtfelszíni markerek alapján lehet jól elkülöníteni az egyes szubtypusokat.

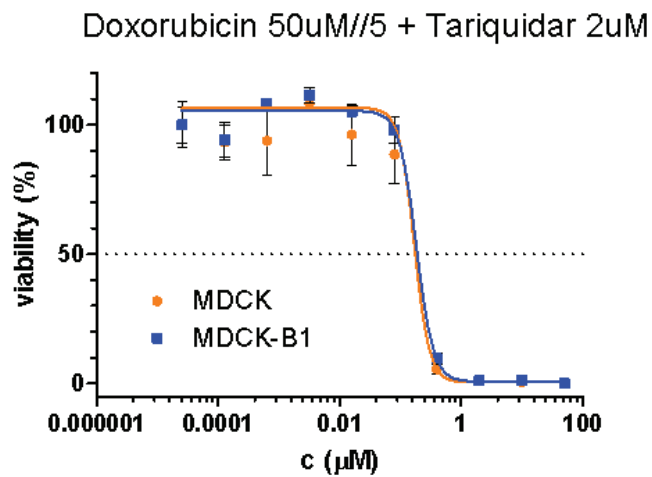
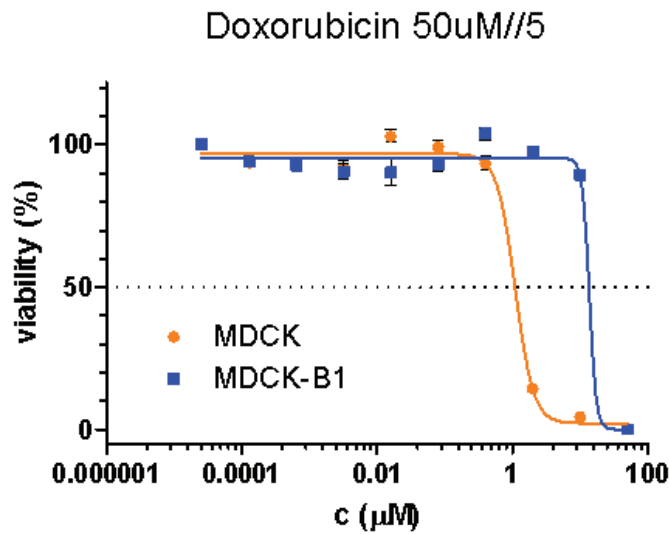
A kezdeti méréseknél még kérdés volt, hogy melyik antitest működőképes. Első alkalommal az ellenanyagok jelentős része működőképes volt (CD3, CD4, CD5, CD11/18), habár voltak súlyosan degradálódott antitestek is, mint például az MHCII-FITC, de ezeket később pótoltuk, valamint izotípus kontrollokat is be kellett szereznünk. Minden mérést követően kiértékeljük az eredményt, melyik CD markerre volt pozitív a minta, melyikre kevésbé. Ezt a táblázatban összefoglaltuk, a csillagok száma az expresszió erősségével egyenesen arányos. Két esetben nem volt elegendő sejt a mintákban, így ott csak Calcein jelölést tudtunk végezni.

| állat kód | CD5 | CD14 | CD3 | CD21 | CD11/18 | CD4 | CD34 | CD45 |
|---------------------------|-----|------|-----|------|---------|-----|------|------|
| 2388-2581 | *** | | *** | | * | *** | | *** |
| 2483-2688 | * | | * | *** | ** | * | *** | *** |
| 1867-2012 | *** | | *** | | *** | *** | | *** |
| 2508-2713 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2539-2748 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2594-2808 | | | ** | *** | ** | ** | | |
| 2591-2805 | ** | | | *** | | ** | ** | |
| 2655-2881 | ** | | ** | | ** | ** | *** | *** |
| 2661-2887 | ** | | ** | ** | | ** | *** | *** |
| 2784-2910 | ** | | ** | *** | *** | ** | *** | *** |

1. táblázat: Immunfenotipizálás eredménye, CD markerek pozitivitásának kiértékelése

3.4. Citotoxicitás vizsgálat

A 11. ábrán az MDCK és MDCK-B1 sejtvonalakon végzett in vitro citotoxicitási esszék eredményei láthatóak, a panelek felett az anyag neve található, melynek különböző koncentrációi mellett zajlott a sejtek inkubációja 72 órán keresztül.



11. ábra: MDCK sejtvonalakon mért citotoxicitási esszék eredményei doxorubicinre és tariquidarra

A 11. ábra felső képén a hagyományos, Pgp szubsztrát citosztatikumok alkalmazott koncentrációjának függvényében a sejtek átlagos viabilitását láthatjuk. Az MDCK esetében 1,1 µM-os doxorubicin koncentrációnál pusztult el a sejtek fele (azaz ekkora az IC₅₀ érték), az MDCK-B1 esetében pedig 13,76 µM ez az érték, vagyis a sejtvonal pár rezisztenciahányadosa (a rezisztens sejtvonal IC₅₀-ének és a szenzitív sejtvonal IC₅₀ -ének hányadosa) pedig 12,4. Ez azt jelenti, hogy a Pgp-t expresszáló sejtek 12,4-szer nagyobb dózist élnek túl a hagyományos kemoterápiás szerekből, mint Pgp-vel nem rendelkező társaik.

Az alsó ábrán pedig a doxorubicin, vagyis a Pgp szubsztrát citosztatikumok mellett a tariquidart használtuk, amely a Pgp gátlószere. Az MDCK esetében 0,17 µM az IC₅₀ értéke doxorubicin és tariquidar együttes alkalmazásakor. Az MDCK-B1 vizsgálatok az IC₅₀

értéke 0,18 μM volt a két citosztatikum használatakor. Tehát a rezisztenciahányadosa 0,9, ez azt jelenti, hogy Pgp gátlás esetén a sejtek ugyanúgy elpusztulnak, mint Pgp mentes társaik.

3.5. Sejtvonala alapítás

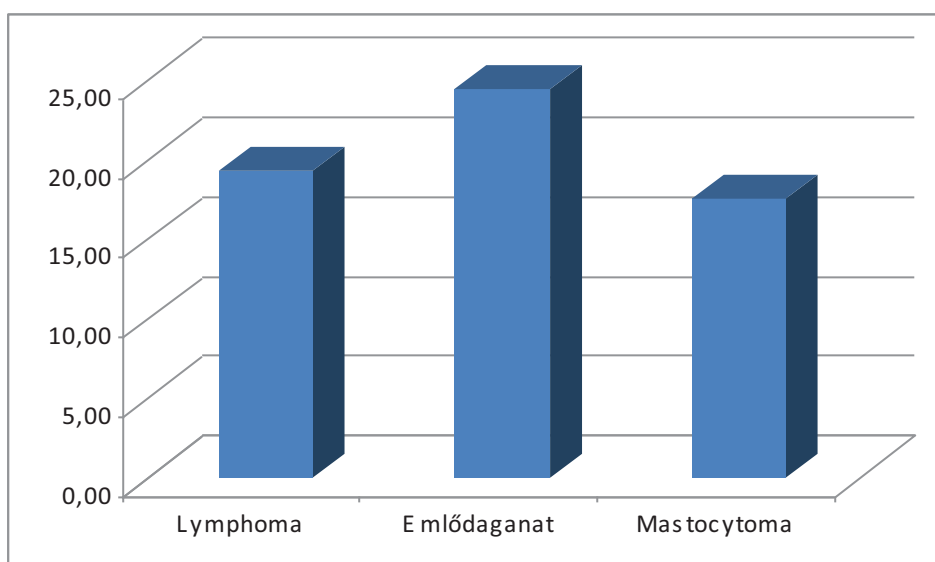
A 2655-2881, a 2661-2887 és a 2784-2910 állatkódú mintákból alapítottunk sejtvonala. A kezdeti DMEM térfogatot 3 hét elteltével növeltük, és folyamatosan ellenőriztük a sejtszámot. Az első flaskában lévő sejtek, melyet 02.26-án indítottunk, elpusztultak. De a másik kettő lymphoma sejtvonala jelenleg is életben van és folyamatosan osztódnak, a sejtszám emelkedik.

3.6. Statisztikai vizsgálat

A MAF-értékek különbségeit vizsgálva különböző daganatmintákban, azt kaptuk, hogy az emlődaganat esetén a legnagyobb a MAF-érték, a lymphomában kevesebb volt és a mastocytomában a legalacsonyabb a három daganattípust vizsgálva. Ezt a 12. ábra szemlélteti, számadatokban pedig a 2. táblázat mutatja. A szignifikancia elmaradása az alacsony elemszámmal magyarázható.

| | Lymphoma n=10 | Emlődaganat n=7 | Mastocytom a n=3 |
|---------|-------------------------|--------------------|------------------------|
| Átlag | 19,23 | 24,38 | 17,56 |
| Szórás | $\pm 14,7$ | $\pm 19,37$ | $\pm 24,06$ |
| P-érték | Lymphoma-Emlődaganat | 0,59 | |
| | Lymphoma-Mastocytoma | 0,92 | |
| | Emlődaganat-Mastocytoma | 0,70 | |

2. táblázat: MAF-értékek különböző daganatmintákban

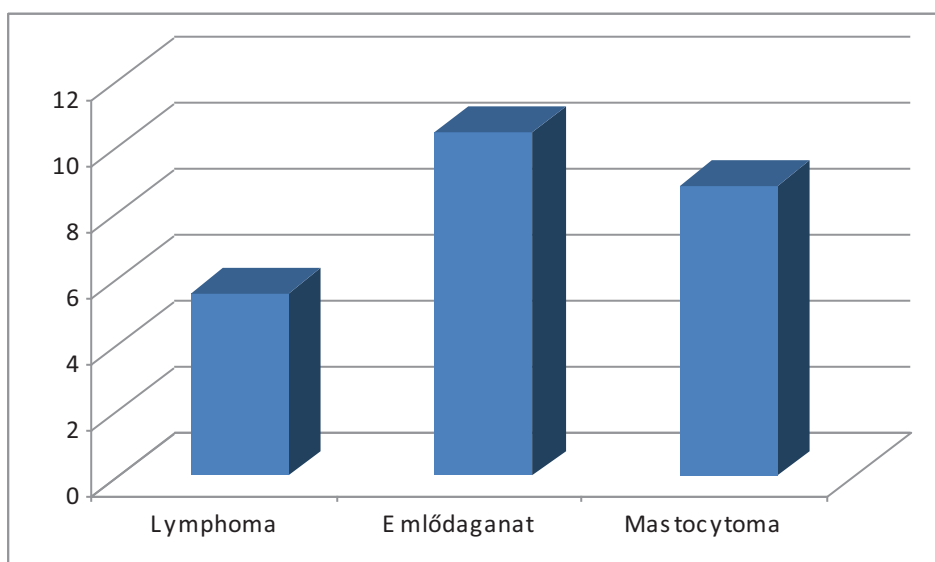


12. ábra: MAF-értékek különbségei különböző daganatmintákban

A kormegoszlás vizsgálatnál a 3. táblázatban, illetve a 13. ábrán látszik, hogy a lymphoma esetében az átlagéletkor öt és fél év, az emlődaganat esetében ez az érték 10 év, míg mastocytomanál majdnem 9 év az átlagéletkor a húsz vizsgált kutya esetén. Mivel a szignifikanciák $p < 0.05$ -nél kezdődnek, így ennél a vizsgálatnál szignifikáns eredményt kaptunk.

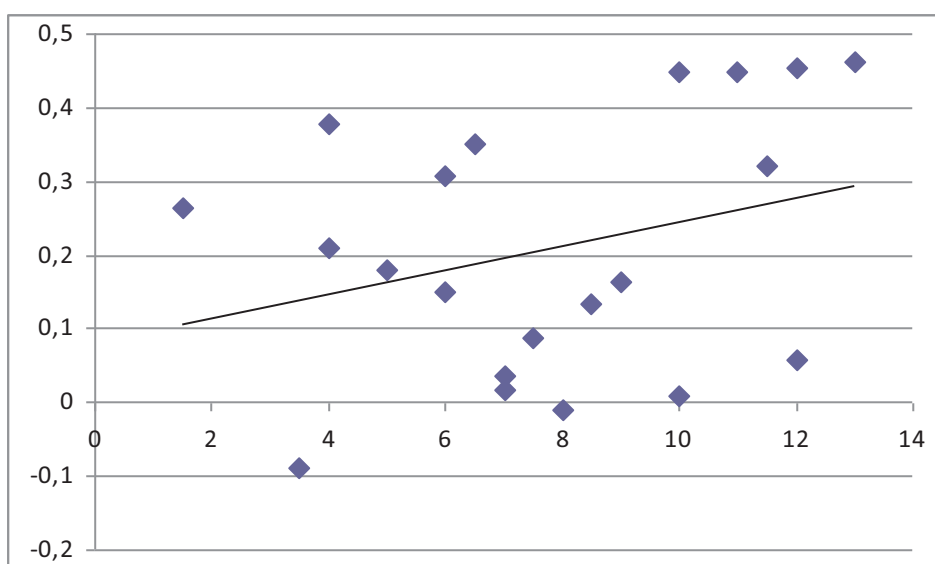
| | Lymphoma n=10 | Emlődaganat n=7 | Mastocytoma n=3 |
|---------|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Átlag | 5,55 | 10,43 | 8,83 |
| Szórás | ±2,55 | ±2,24 | ±1,89 |
| P-érték | Lymphoma-Emlődaganat | | 0,00094 |
| | Lymphoma-Mastocytoma | | 0,06621 |
| | Emlődaganat-Mastocytoma | | 0,30546 |

3. táblázat: Különböző daganatos elváltozásokban szenvedő betegek kormegoszlása



13. ábra: Különböző daganatos elváltozásokban szenvedő betegek kormegoszlása

A Pearson-féle korrelációs analízisnél összehasonlítottuk a MAF-értékeket a betegek életkorával, melyet a 14. ábra mutat. Ez alapján elmondható, hogy minél idősebb a kutya, annál gyakoribb a daganat kialakulása. Azért 21 a minta elemszám, mert egy carcinoma minta feldolgozást is végeztünk a három említett típus mellett, de a kívánt eredmény eléréséhez a minta elemszámot emelni kell.



14. ábra: MAF-értékek és a betegek életkora közötti összefüggés. Pearson-korreláció (n=21, $r=0,295$, $p=0,096$)

Az ivarányt tekintve lymphoma esetén 8 kan, 2 szuka szerepelt. Mastocytoma esetén pedig 2 kan és egy szuka. Összességében a két daganattípust vizsgálva a 13 kutyából 10 kan és 3 szuka szerepelt.

4. Megbeszélés/Diszkusszió

4.1. Összegzés

Az elsődleges célunk az volt, hogy a daganatos betegségben szenvedő kutyákból eltávolított tumor mintát vizsgáljuk, aszerint, hogy hogyan reagál a transzporter gátlószerre. Vagyis a Pgp expressziót vizsgáltuk Calcein assayvel, ezáltal információt kaptunk a rezisztenciáról, melynek kialakulása nehezíti a kemoterápiás kezelést. Ezeket az eredményeket összefoglaltuk egy táblázatban. Így segítséget nyújtunk a kezelőorvosnak a helyes terápia megválasztásában. A calcein jelöléshez szükséges előkészületek sikeresek voltak, vagyis az általunk használt emésztési eljárás működött. Húsz kutyából végeztünk minta feldolgozást, melynél egyetlen kivétellel, minden esetben vizsgáltuk Calcein assayt, a lymphomák esetében pedig immunfenotipizálást. A Calcein assay-nél volt egy kontroll csoport, valamint egy csoport, amely csak calcein-AM festéket kapott, a harmadik csoporthoz pedig verapamilt adtunk a transzporter (vagyis a Pgp) gátlás céljából, majd calcein-AM festéket. Ezeket tudtuk összehasonlítani, úgy hogy, kiszámoltuk a hozzájuk tartozó MAF-értékeket, a verapamil adását követően a median értékből kivontuk a csak a calcein-AM festéket kapott sejt median értékét és az eredményt osztottuk a verapamil hozzáadása után kapott median értékkel. Ezekből csináltunk statisztikai vizsgálatot és habár nem volt szignifikáns eredmény a MAF-értékek különbségeit nézve különböző daganattípusokban, az jól látszik, hogy az emlődaganatokban nagyobbak a MAF-értékek, mert ebben a daganattípusban az MDR-expresszió, és a klinikai terápia rezisztencia is fokozottabb.

Az immunfenotipizálásnál sikeresen elkülönítettünk többféle lymphoma típust, hiszen az egyes CD markerek amelyekre jelöltük a sejteket, különbözőek voltak.

Minden eredményt egybevéve létrehoztunk a fentebb említett táblázatot (Mellékletben található), olyan adatbázist, mely szükséges a kezelőorvosnak, információt ad a rezisztencia kialakulásáról, ezáltal a megfelelő terápia megválasztásáról. Folyamatosan számon tartjuk a kutyákat, akiből mintát vettünk, hogyan változott az állapotuk, a tumor kiújult vagy tünet-és panaszmentes az állat.

A citotoxicitási vizsgálatban pedig kimutattuk, hogy a citosztatikum milyen hatással van a Pgp-vel rendelkező sejtekre, illetve azok szenzitív párjára. A 11. ábrán mind a két sejtvonalpáron megfigyelhető, hogy a hagyományos citosztatikumok közül a doxorubicin, jelentősen kisebb koncentrációban képes elpusztítani a szenzitív sejteket, mint azok rezisztens társait. Ennek oka, hogy a doxorubicin P-gp szubsztrát, így az MDCK-B1 sejtek képesek

transzporterek segítségével megvédeni magukat még a magasabb koncentrációk esetén is. Ezt bizonyítja az is, hogy tariquidar, vagyis a Pgp gátlószer hozzáadásával mind a két sejtvonal közel ugyanakkora koncentrációban pusztul el, mivel a pumpa gátlását követően nem tudják a sejtek kijuttatni a gyógyszert.

Érdekes lehet, ha az általunk alapított lymphoma sejtvonalakon végezzük el a citotoxicitási vizsgálatot. Ehhez további tervekre lesz szükség.

4.2. További célkitűzések

A legfőbb terv a lymphoma sejtvonal fenntartása és passzálása, annak érdekében, hogy biztonságosan végezhető legyen kísérlet ezekkel a sejtekkel. További citotoxicitási vizsgálatot szeretnénk elvégezni közvetlenül a lymphoma sejteken, így fény derülhet az egyes citosztatikumok által kifejtett hatásra, ami lehetővé teszi, hogy kiválasszuk a legoptimálisabb gyógyszert adott lymphoma típusra. Valamint karakterizálni is tudnánk a lymphoma típusokat, a gyógyszer beadását követően vizsgálva a fenotípus vagy a morfológia változását. Illetve genetikai manipulációkat is tudnánk tesztelni a sejteken.

5. Összefoglalás

A multidrog rezisztencia jelenségének felfedezése Robert Koch nevéhez fűződik a XIX. századból. Azonban az első bizonyított kapcsolatra, a sejt membrántranszporter vagy pumpafehérje és a drog rezisztencia kialakulása között, csak a XX. században tettek szert. Hörcsög petefészek sejtjeit vizsgálva. Az 1970-es évek közepén mutatták ki a 170kDa molekulású glikoproteint, melyet Pgp-nek neveztek el. Számos sejtvonalon bizonyították, hogy ez a pumpafehérje felelős a multidrog rezisztencia kialakulásáért.

A kísérletünkben a sejtek membrántranszporter aktivitását vizsgáltuk, hogy kimutassuk a pumpafehérje funkciót. Munkánk során húsz kutya tumor mintát dolgoztunk fel. Ha a sejtekhez fluoreszkáló molekulát, vagyis calcein-AM festéket adunk és inkubáljuk, az Anyag és módszerben leírtak alapján, akkor ez az anyag a sejtekbe jut. Abban az esetben, ha a sejt rendelkezik a multidrog rezisztencia funkcióval és pumpafehérjéjével (Pgp), akkor a calcein-AM-t a sejtek kipumpálják magukból. Ha a sejteket kapcsoljuk bizonyos fluoreszkáló anyaggal, melyhez immunológiai módszert alkalmazunk és így jelöljük, akkor az adott sejt fluoreszkáló tulajdonsága megváltoztatja a lézerefény törését, így válik lehetővé a sejt elkülönített vizsgálata. Ez a módszer az ún. FACS (fluorescence activated cell sorting) eljárás. Ez alkalmas arra, hogy összehasonlítsuk a sejtek fluoreszcenciáját abban az esetben, ha csak fluoreszcens festéket kapnak (calcein-AM) és ha gátlószert is, verapamilt. A pumpafehérjék gátlásakor a sejtek nem tudják kipumpálni a calcein-AM festéket, így nagyobb lesz a fluoreszcencia intenzitás, abban az esetben, ha jelen volt a Pgp. A FACS vizsgálat során mértük a sejteken belüli fluoreszcenciás aktivitás mértékét. Ahhoz, hogy összehasonlíthatóvá váljon a gátlás nélküli és a gátlóanyagokat tartalmazó sejtek eltérő fluoreszcenciás aktivitása, ki kellett számolnunk az ún. MAF- (multidrug rezisztencia aktivitási faktor-) értékeket. Ezek jellemzik a sejtek Pgp funkcióját.

A lymphoma esetében pedig immunfenotipizálást is végeztünk, ezáltal nemcsak a T-és B-sejtes lymphomát tudtuk elkülöníteni, hanem a lymphoma szubtypusokat is. Ehhez különböző sejtfelszíni CD markereket használtunk, így megfelelő jelölés és inkubálás után a sejtek expresszálták az adott markert.

6. Summary

Multidrug resistance was first discovered by Robert Koch in the 19th century. The first specific correlations between cell membrane transporters or pumps and a drug-resistant phenotype were made in hamster ovary cell lines. In the mid-1970s the glycoprotein of 170 kD was shown, it called P-glycoprotein. Several cell lines were tested that this pump presence correlated with the degree of drug resistance.

In our study we were interested in whether the membrane transporter activation to show out the pump function. In our project we tested 20 tumour samples. If we add fluorescent molecule (calcein-AM) to the cells, and incubate them as written in the Materials & Methods, then this molecule will get into the cells. If the cells have multidrug resistance function and pumps (P-glycoprotein /Pgp/) than the cells will efflux calcein-AM. If the cells are signed with fluorescent molecules using immunological methods, the cell will change its light scattering, then it can be examined separately. This method called FACS (fluorescence activated cell sorting). This can be available to compare the fluorescent intensity in the case of adding just fluorescent dye (calcein-AM) or adding inhibitor (verapamil) too. When we block the pump function, the cells can not pump the calcein-AM out so the fluorescent intensity will increase if the cells has Pgp. We analysed the intracellular fluorescence of the cells by FACS method. In order to examine the fluorescent activity in the cells which inhibited or non inhibited we calculated the MAF- (multidrug resistance activity factor-) values. This characterizes the Pgp function of the cells.

We made immunophenotyping with lymphoma cells. We can isolate not only the T-or B-cells lymphoma but the subtypes can also be characterized with this method. We used different CD markers so if the test and the incubation is suitable then the cells will express CD markers.

7. Köszönetnyilvánítás

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

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

Külön köszönöm Füredi Andrásnak a labor munka betanítását, segítségét a minták feldolgozásában és tanácsát a szakdolgozat írásában.

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

Hálás vagyok László Zsófia és Baricz Tamás segítségéért, valamint az egész Á.H.O.K. Kft-ben dolgozó csapatnak a türelméért.

8. Irodalomjegyzék

Bronson, R. T. (1982). "Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds." Am J Vet Res **43**(11): 2057-2059.

David, A. R. and M. R. Zimmerman (2010). "Cancer: an old disease, a new disease or something in between?" Nat Rev Cancer **10**(10): 728-733.

Dean, M. (2005). "The genetics of ATP-binding cassette transporters." Methods Enzymol **400**: 409-429.

Dean, M., Y. Hamon, et al. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." J Lipid Res **42**(7): 1007-1017.

Dobson, J. M., S. Samuel, et al. (2002). "Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs." J Small Anim Pract **43**(6): 240-246.

Fournel-Fleury, C., J. P. Magnol, et al. (1997). "Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas." J Comp Pathol **117**(1): 35-59.

Gramer, I., M. Kessler, et al. (2013). "Determination of MDR1 gene expression for prediction of chemotherapy tolerance and treatment outcome in dogs with lymphoma." Vet Comp Oncol.

Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-162.

Koltai, Z. and P. Vajdovich (2014). "Expression of multidrug resistance membrane transporter (Pgp) and p53 protein in canine mammary tumours." Acta Vet Hung: 1-11.

Lee, J. J., C. S. Hughes, et al. (1996). "P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance." Cancer **77**(9): 1892-1898.

Oecd "Cancer Care."

Rottenberg, S., A. O. Nygren, et al. (2007). "Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(29): 12117-12122.

Scaglione, K. M., P. K. Bansal, et al. (2007). "SCF E3-mediated autoubiquitination negatively regulates activity of Cdc34 E2 but plays a nonessential role in the catalytic cycle in vitro and in vivo." Mol Cell Biol **27**(16): 5860-5870.

Siegel, R., D. Naishadham, et al. (2013). "Cancer statistics, 2013." CA Cancer J Clin **63**(1): 11-30.

Thamm, D. H., E. G. MacEwen, et al. (2002). "Preclinical study of dolastatin-10 in dogs with spontaneous neoplasia." Cancer Chemother Pharmacol **49**(3): 251-255.

Vail, D. M., W. C. Kisseberth, et al. (1996). "Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma." Exp Hematol **24**(7): 807-815.

Weinberg, R. A. (1998). One renegade cell : how cancer begins. New York, NY, Basic Books.

9. Mellékletek

9.1. Táblázat

| dátum | állat kód | állatfajta | kor (év) | diagnózis | Ca assay | RNS | kultúra alapítás |
|------------|---------------------------|-----------------------------|----------|--------------|----------|-----|------------------|
| 2013.10.02 | 1487-1592 | berni pásztor keverék | 11 | mastocytoma | 1 | 1 | 0 |
| | 2388-2581 | labrador | 1,5 | lymphoma | 1 | 1 | 0 |
| 2013.11.20 | 2452-2655 | keverék | 12 | Neopl.mammae | 1 | 1 | 0 |
| | 2483-2688 | foxi | 6 | lymphoma | 1 | 1 | 0 |
| 2013.11.29 | 2463-2667 | cocker spániel | 11,5 | Neopl.mammae | 1 | 1 | 0 |
| | 1867-2012 | uszkár-pumi keverék | 5 | lymphoma | 1 | 1 | 0 |
| | 2508-2713 | west-highland-white terrier | 10 | lymphoma | 1 | 0 | 0 |
| 2013.12.04 | 2493-2698 | keverék emlő daganat | 7 | Neopl.mammae | 1 | | 0 |
| 2013.12.04 | 2493-2698 | keverék (ép emlő minta) | 7 | Neopl.mammae | 1 | 1 | 0 |
| | 2511-2716 | macska eui.rsz | 10 | carcinoma | 1 | 1 | 0 |
| 2013.12.11 | 2539-2748 | kevérek | 9 | lymphoma | 1 | | 0 |
| | 2509-2714 | máltai selyemkutya | 8 | mastocytoma | 1 | 1 | 0 |
| 2013.12.18 | 2521-2728 | keverék | 9 | Neopl.mammae | 0 | | 0 |
| 2014.01.15 | 2594-2808 | jack russel terrier | 4 | lymphoma | 1 | 0 | 0 |
| | 2591-2805 | cocker spániel | 6,5 | lymphoma | 1 | 0 | 0 |
| 2014.01.22 | 2475-2680 | keverék | 12 | Neopl.mammae | 1 | 1 | 0 |
| 2014.02.19 | 2329-2517 | magyar vizsla | 7,5 | mastocytoma | 1 | 1 | 0 |
| | 2644-2867 | yorkshire terrier | 8,5 | Neopl.mammae | 1 | 0 | 0 |
| 2014.02.26 | 2655-2881 | yorkshire terrier | 4 | lymphoma | 1 | 0 | 1 |
| | 1301-1383 | puli | 13 | Neopl.mammae | 1 | 0 | 0 |
| 2014.03.05 | 2661-2887 | németjuhász | 3,5 | lymphoma | 1 | 1 | 1 |
| 2014.03.12 | 2784-2910 | bullmasztiff | 6 | lymphoma | 1 | 1 | 1 |

2. táblázat: Méréseinkhez szükséges minták és a kutyák adatai összesítve

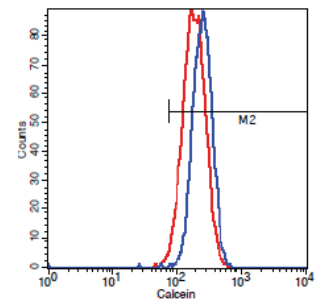
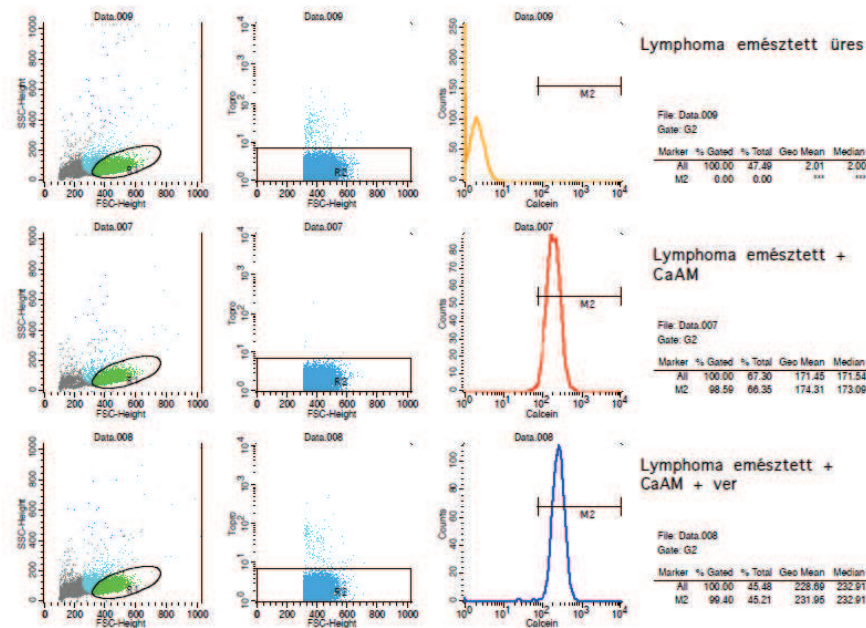
| dátum | állat kód | diagnózis | Ca-AM median | Verapamil median | MAF |
|------------|-----------|--------------|--------------|------------------|--------------|
| 2013.10.02 | 1487-1592 | mastocytoma | 165,48 | 299,61 | 0,447681987 |
| | 2388-2581 | lymphoma | 171,54 | 232,91 | 0,263492336 |
| 2013.11.20 | 2452-2655 | Neopl.mammae | 69,16 | 126,35 | 0,452631579 |
| | 2483-2688 | lymphoma | 111,4 | 161,08 | 0,308418177 |
| 2013.11.29 | 2463-2667 | Neopl.mammae | 179,43 | 264,16 | 0,320752574 |
| | 1867-2012 | lymphoma | 186,01 | 226,71 | 0,179524503 |
| | 2508-2713 | lymphoma | 273,84 | 276,32 | 0,008975101 |
| 2013.12.04 | 2493-2698 | Ép emlő | 156,79 | 159,63 | 0,017791142 |
| | 2493-2698 | Neopl.mammae | 203,51 | 210,97 | 0,035360478 |
| | 2511-2716 | carcinoma | 111,4 | 201,69 | 0,447667212 |
| 2013.12.11 | 2539-2748 | lymphoma | 176,24 | 210,97 | 0,164620562 |
| | 2509-2714 | mastocytoma | 106,5 | 105,54 | -0,009096077 |
| 2013.12.18 | 2521-2728 | Neopl.mammae | - | - | - |
| 2014.01.15 | 2594-2808 | lymphoma | 593,52 | 956,02 | 0,379176168 |
| | 2591-2805 | lymphoma | 266,55 | 410,47 | 0,350622457 |
| 2014.01.22 | 2475-2680 | Neopl.mammae | 1700,08 | 1803,84 | 0,057521731 |
| 2014.02.19 | 2329-2517 | mastocytoma | 1680,77 | 1843,42 | 0,088232741 |
| | 2644-2867 | Neopl.mammae | 2167,39 | 2502,87 | 0,134038124 |
| 2014.02.26 | 2655-2881 | lymphoma | 842,91 | 1064,99 | 0,20852778 |
| | 1301-1383 | Neopl.mammae | 588,21 | 1094,11 | 0,462384952 |
| 2014.03.05 | 2661-2887 | lymphoma | 3050,53 | 2800,26 | -0,089373844 |
| 2014.03.12 | 2784-2910 | lymphoma | 991,05 | 1165,22 | 0,149473919 |

3. táblázat: MAF érték számításához szükséges adatok és az eredmények

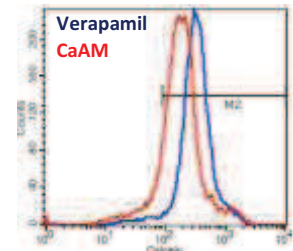
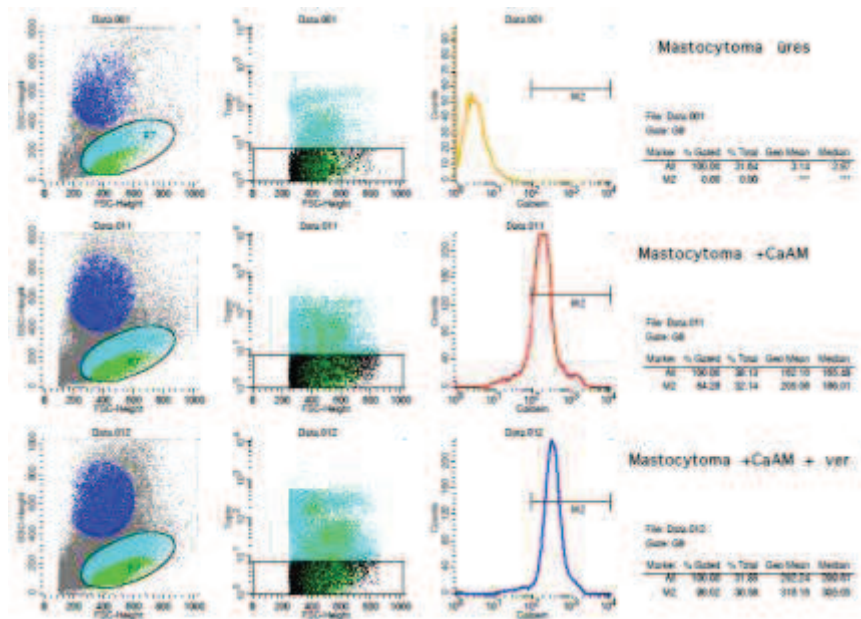
9.2. Az összes minta áramlás citométerrel történő mérési eredménye

Calcein-assay

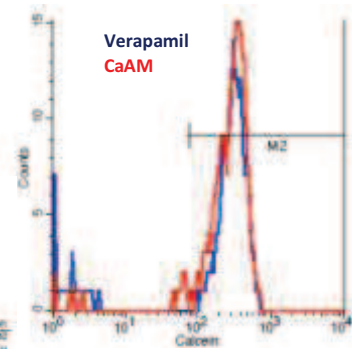
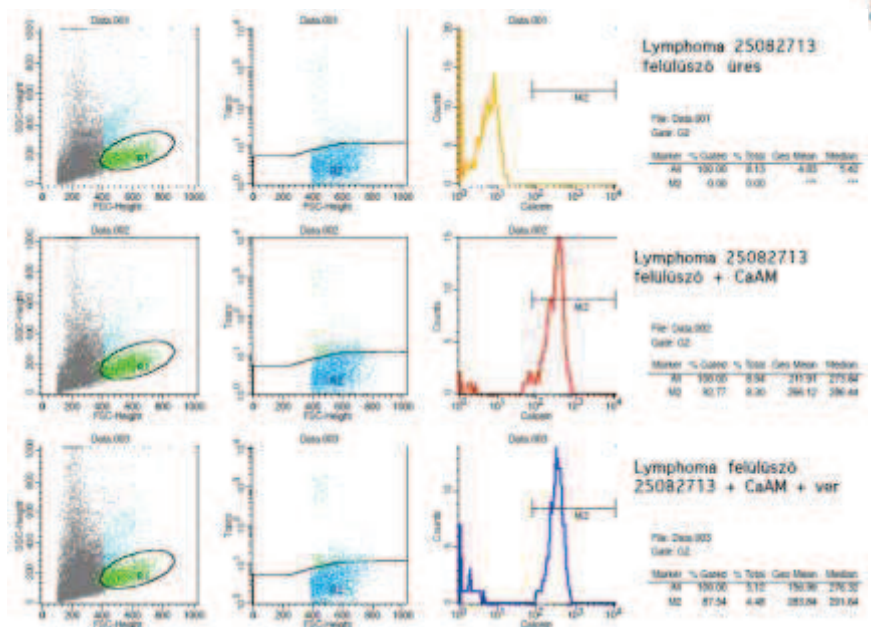
Lymphoma emésztett 2388-2581 – Calcein assay



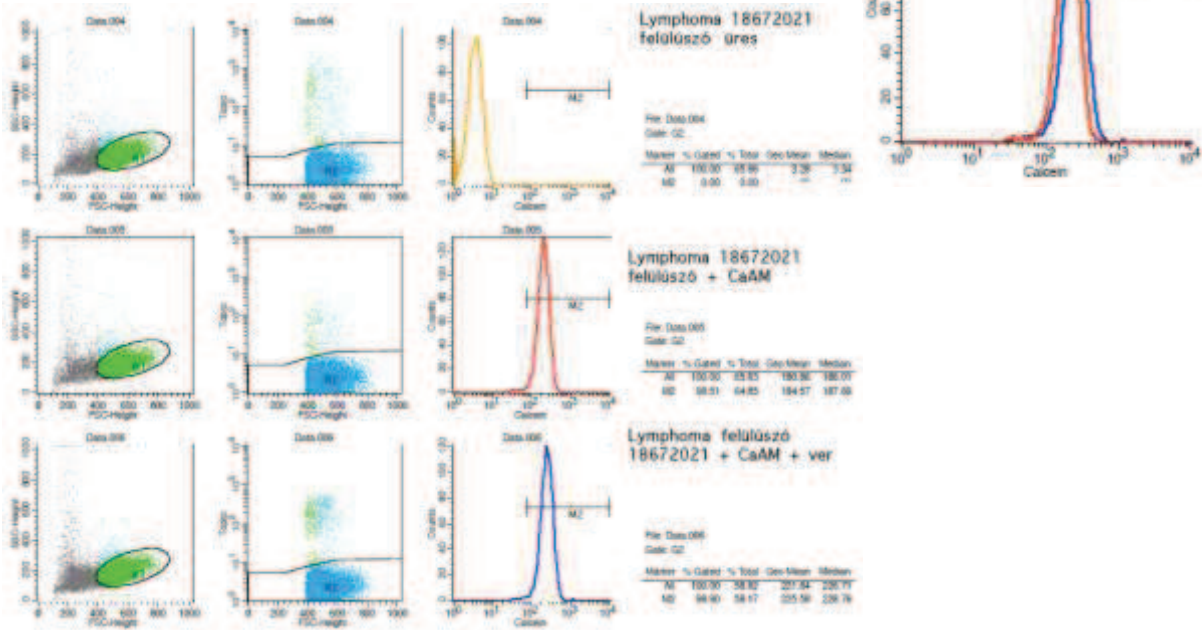
Mastocytoma emésztett 1487-1592 – Calcein assay)



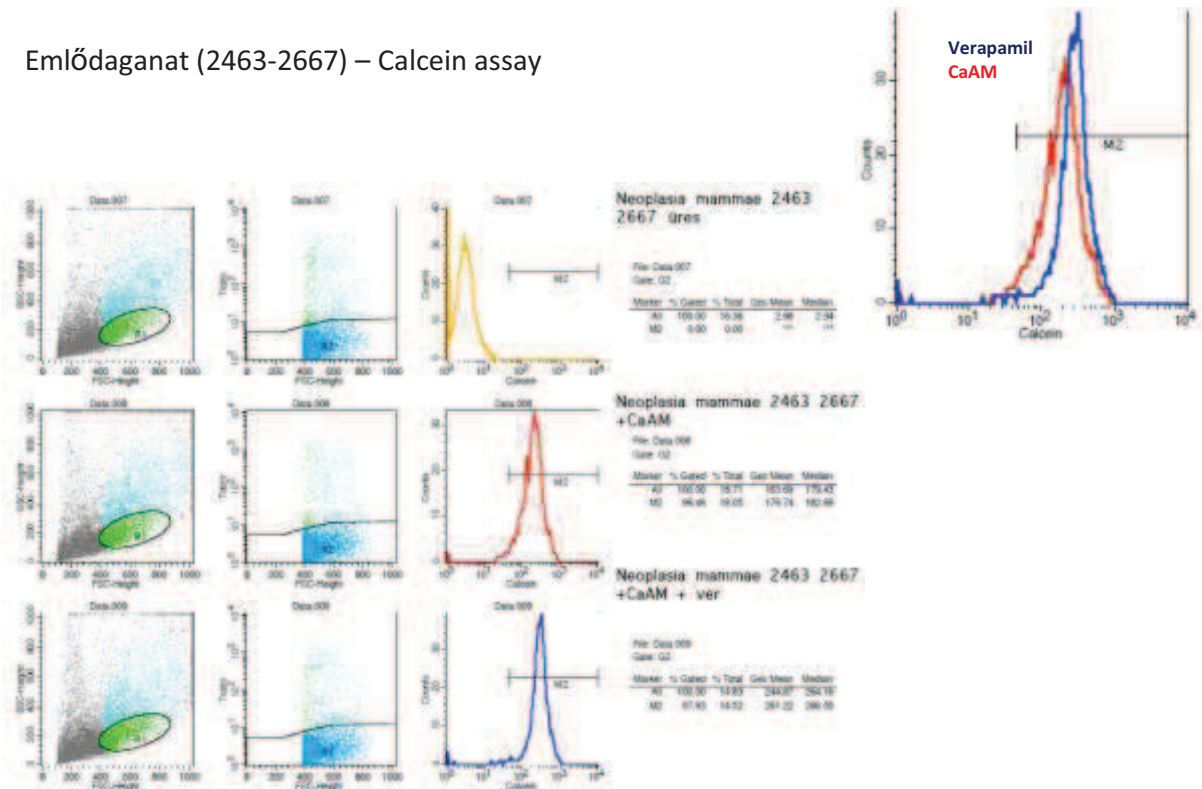
Lymphoma (2508-2713) – Calcein assay



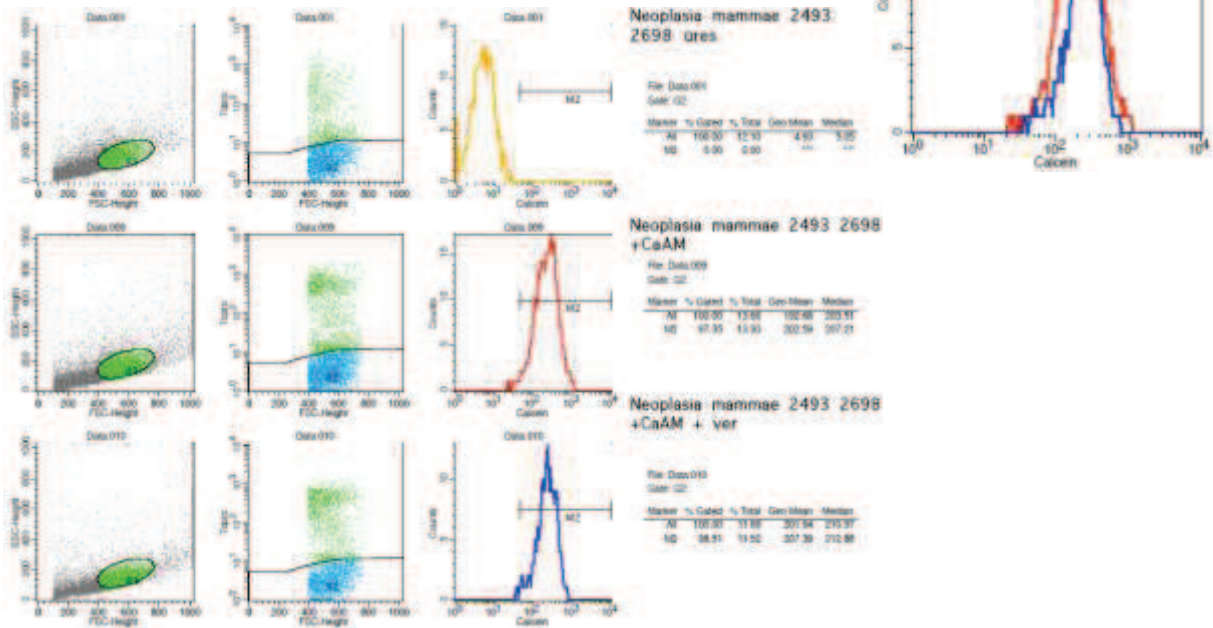
Lymphoma (1867-2012) – Calcein assay



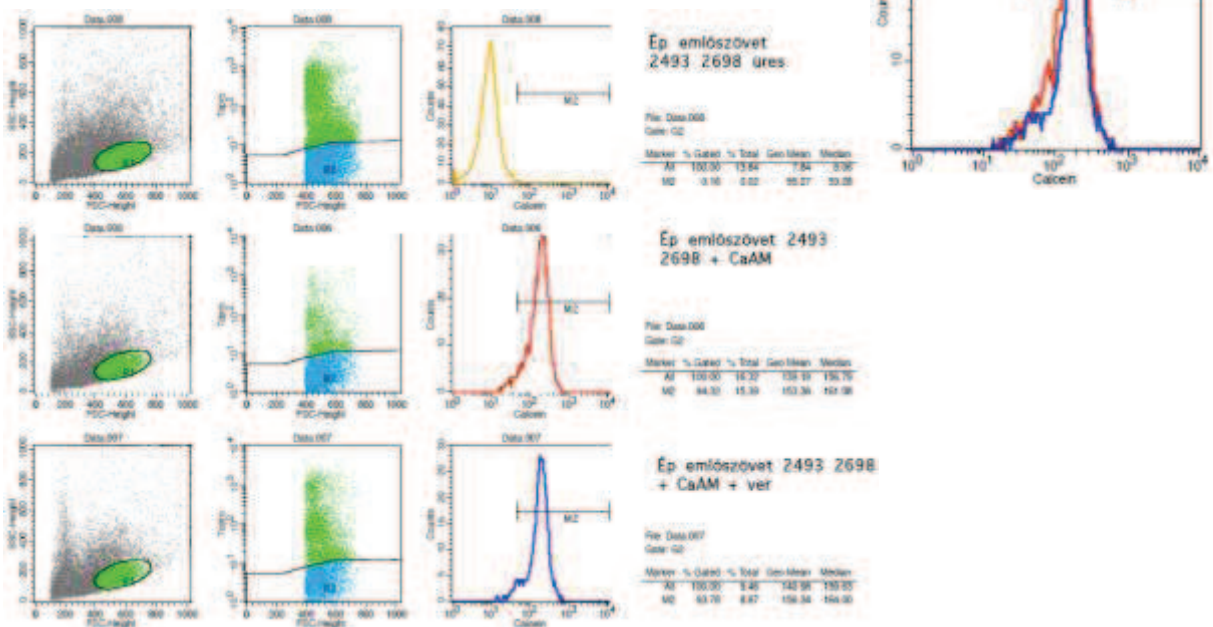
Emlődaganat (2463-2667) – Calcein assay



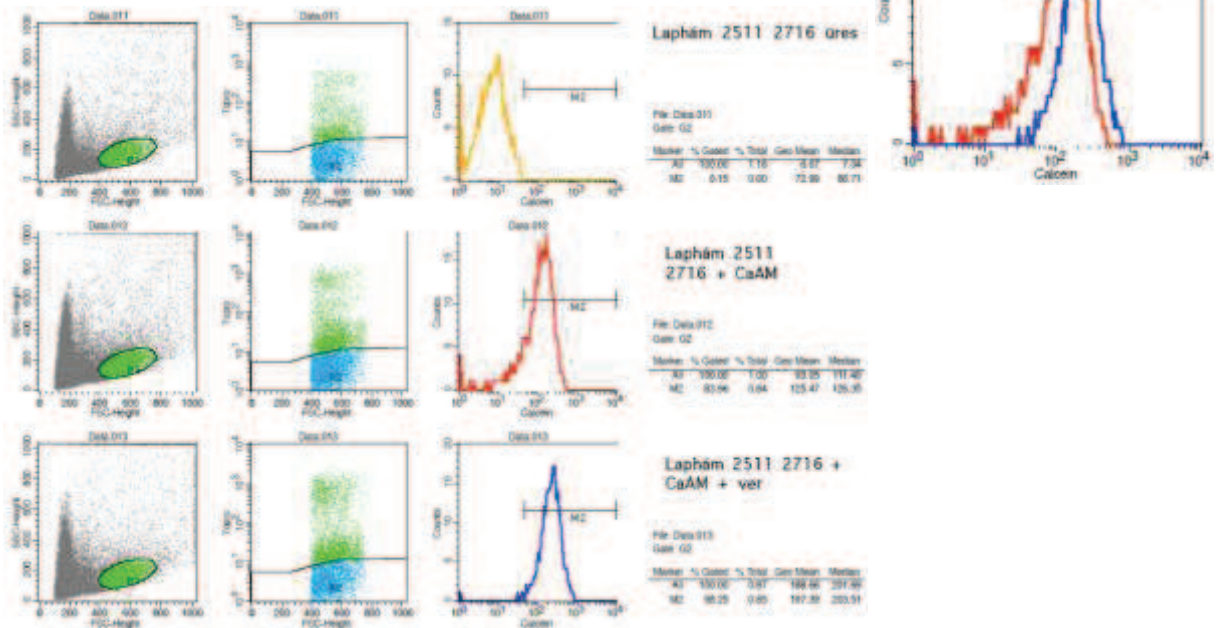
Kutya emlődaganat (2493-2698) – Calcein assay



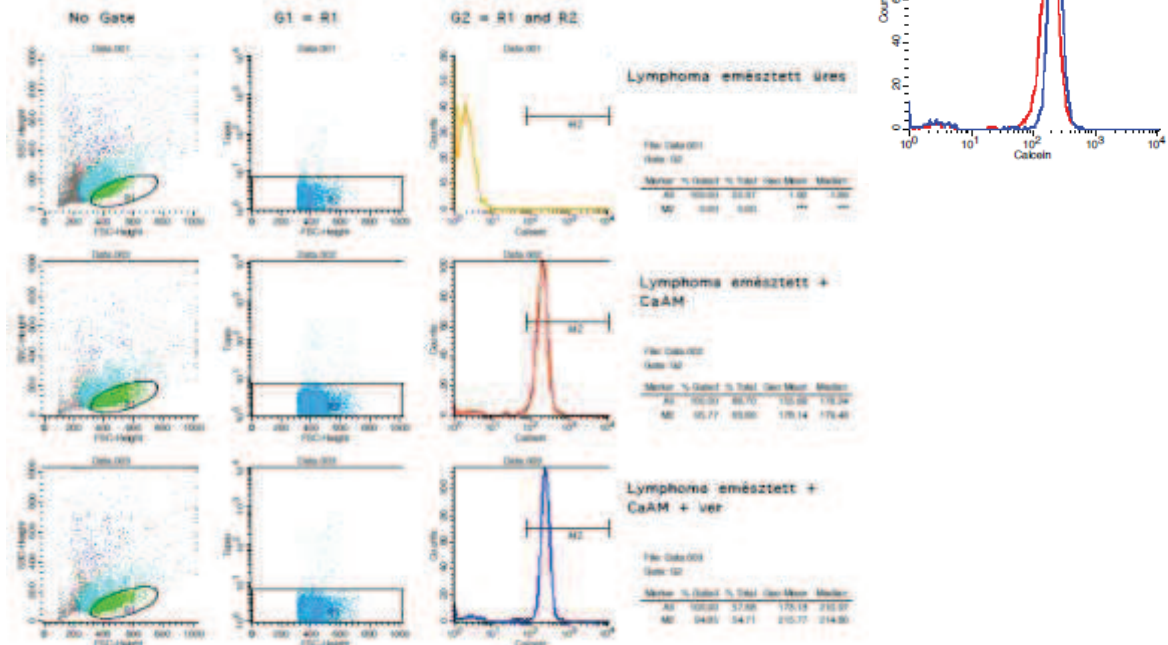
Kutya ép emlőszövet (2493-2698) – Calcein assay



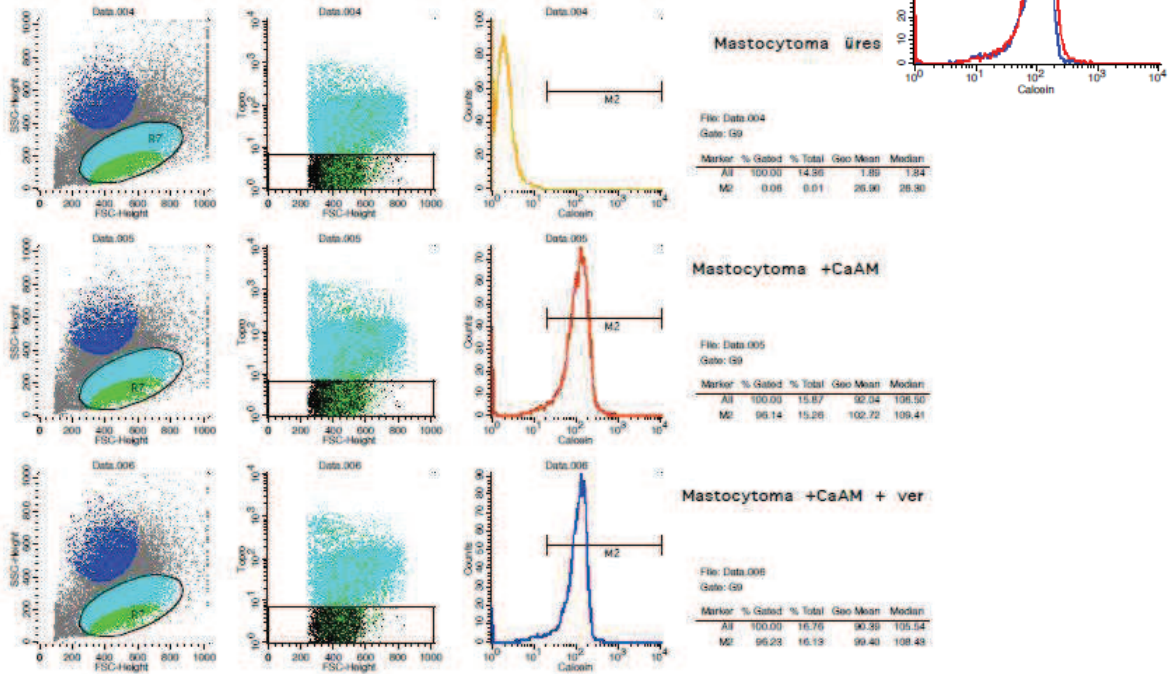
Macska laphám tumor (2511-2716) – Calcein assay



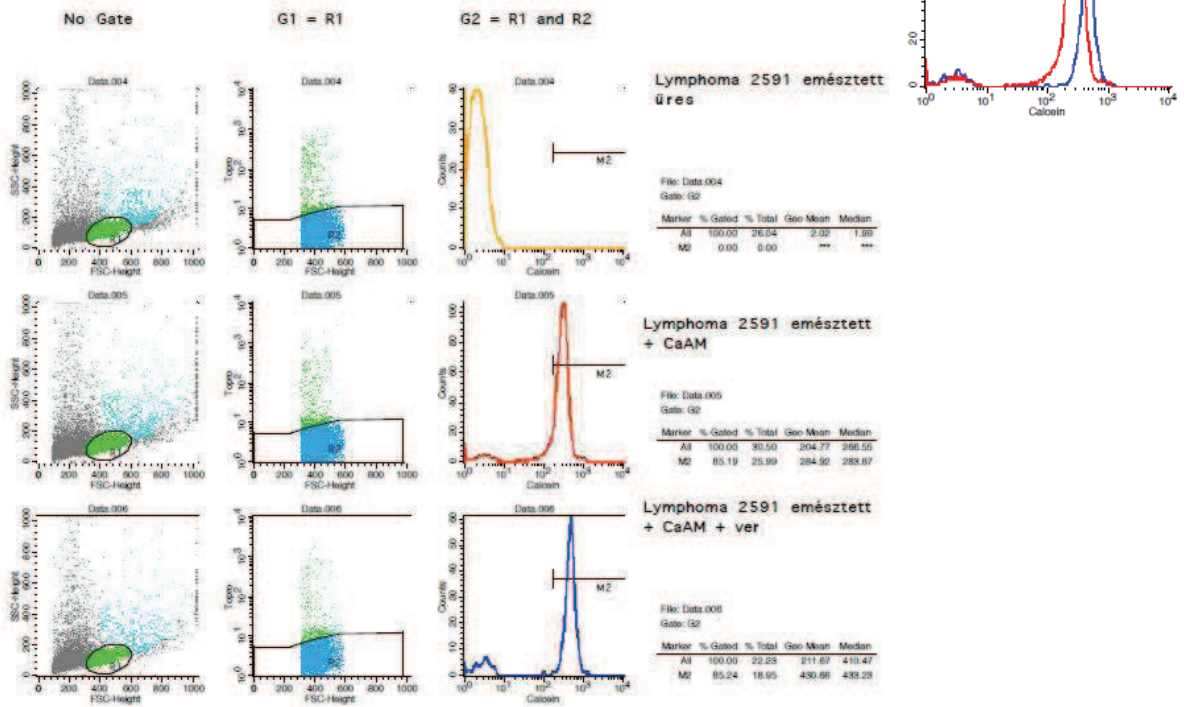
Lymphoma (2539-2748) – Calcein assay



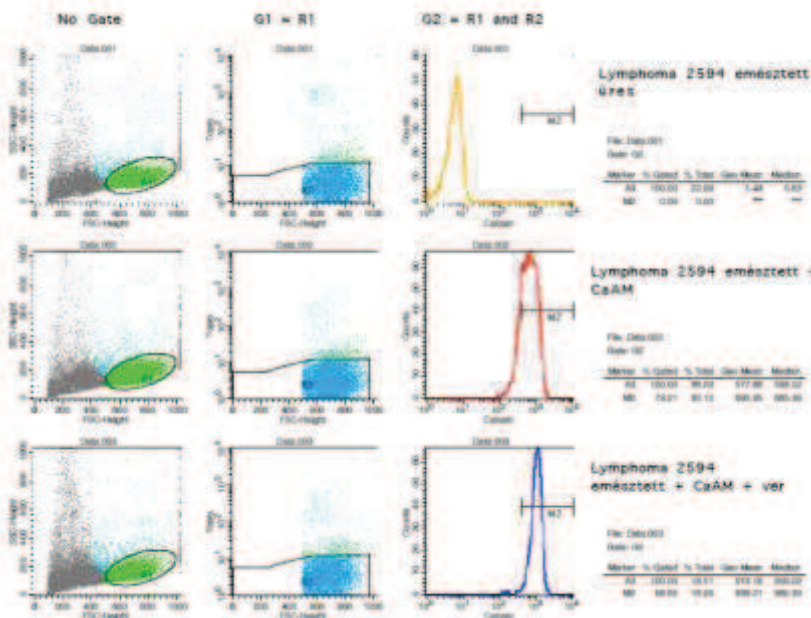
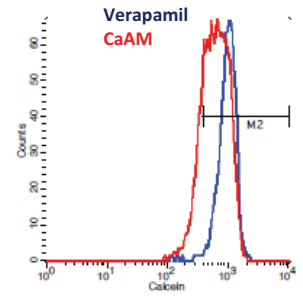
Mastocytoma (2509-2714) – Calcein assay



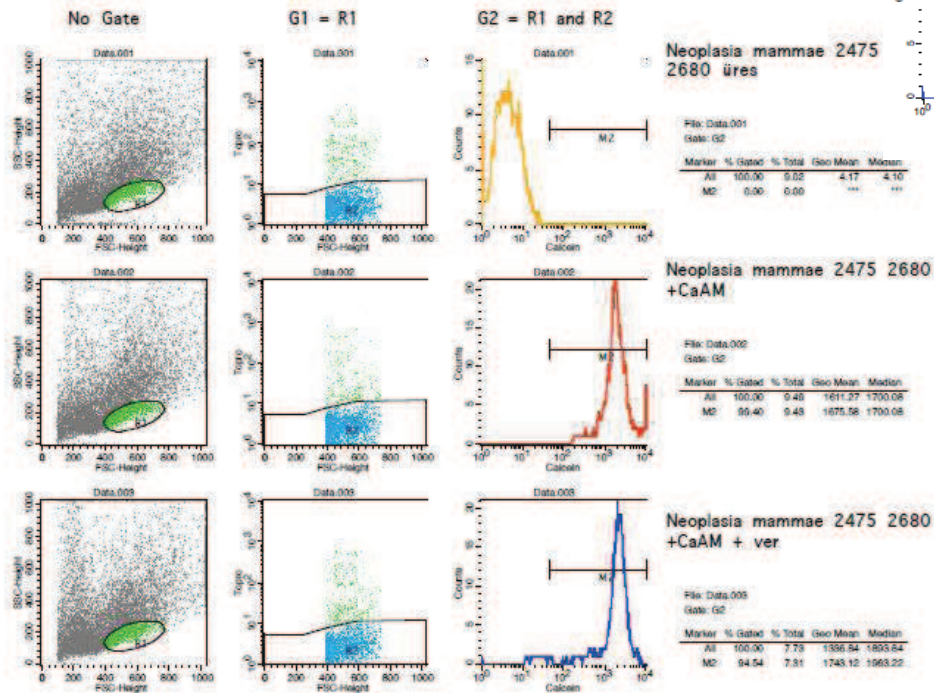
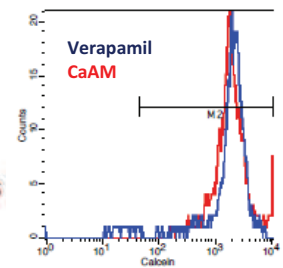
Lymphoma (2591-2805) – Calcein assay



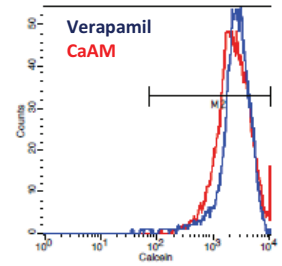
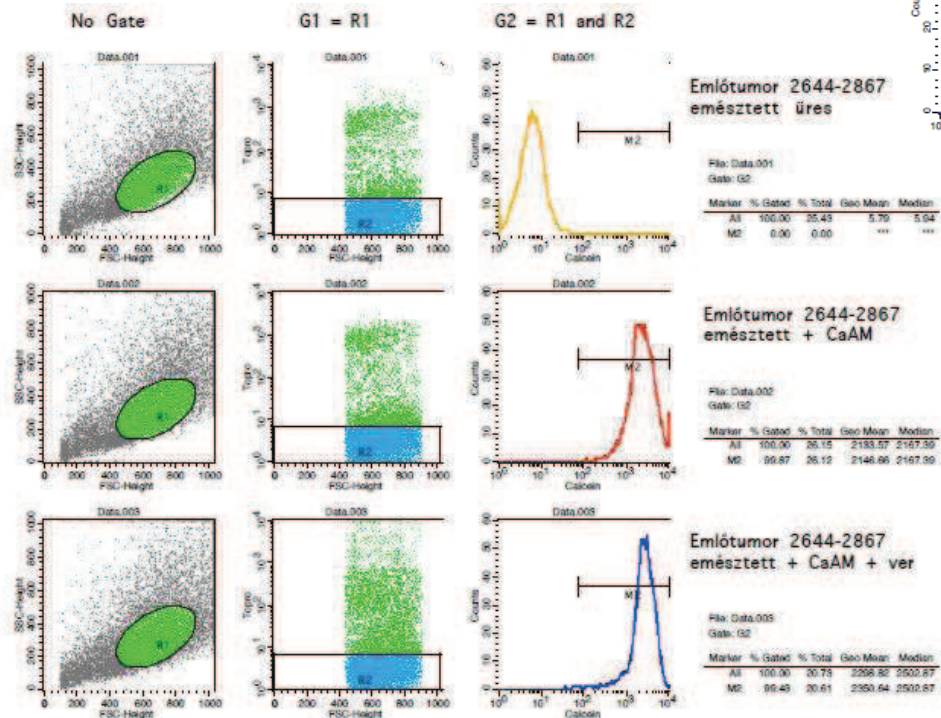
Lymphoma (2594-2808) – Calcein assay



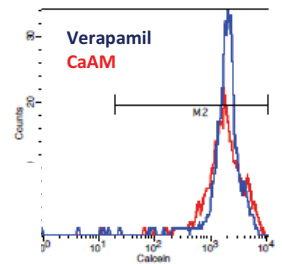
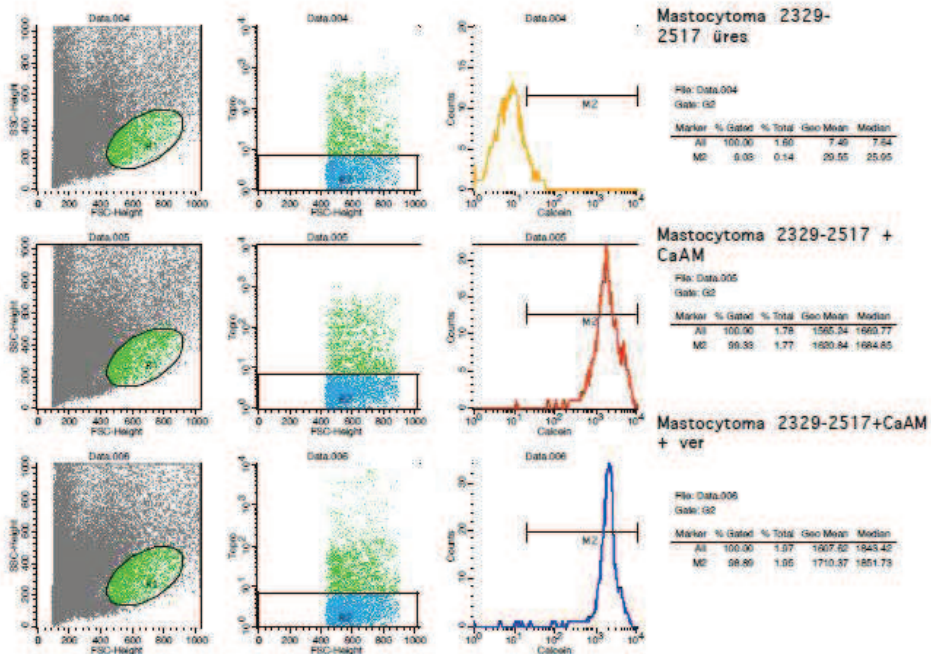
Emlődaganat (2475-2680) – Calcein assay



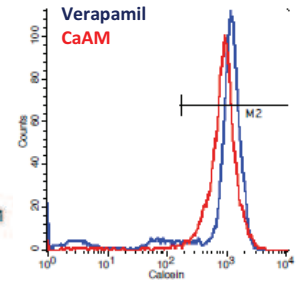
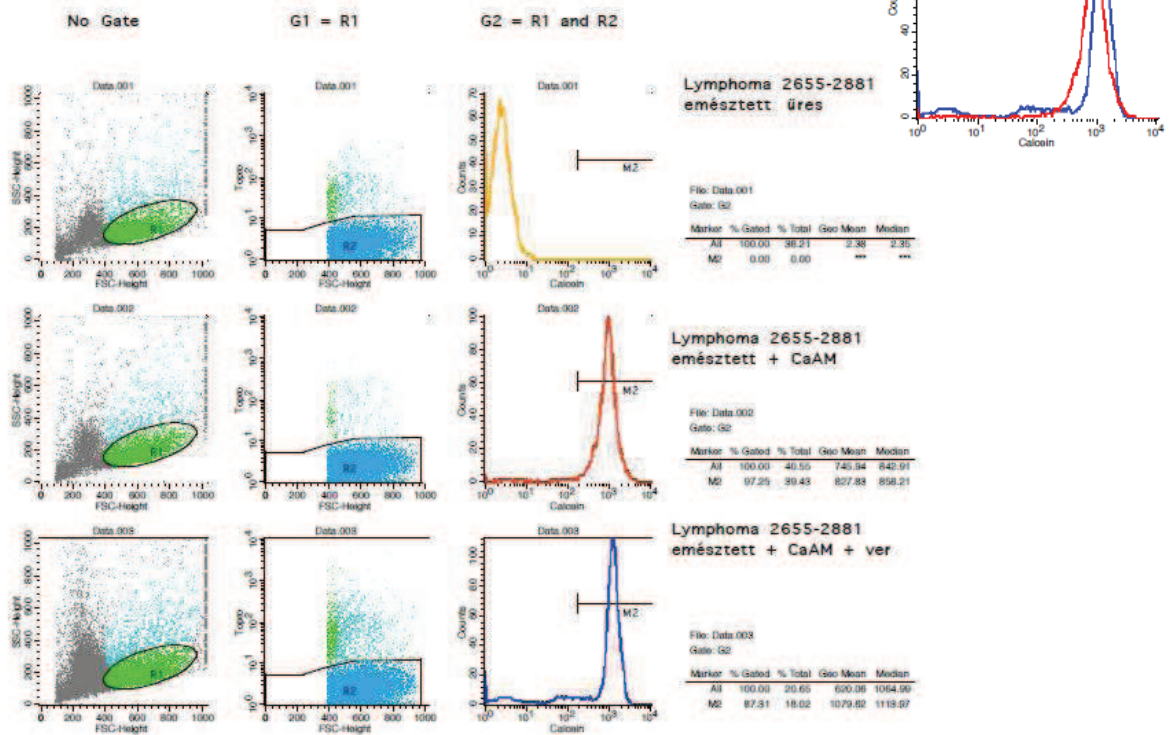
Emlődaganat (2644-2867) – Calcein assay



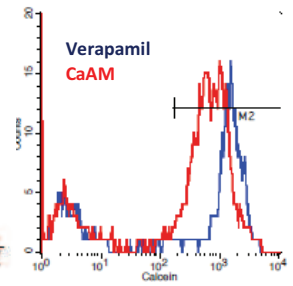
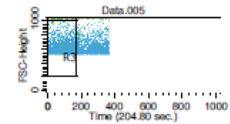
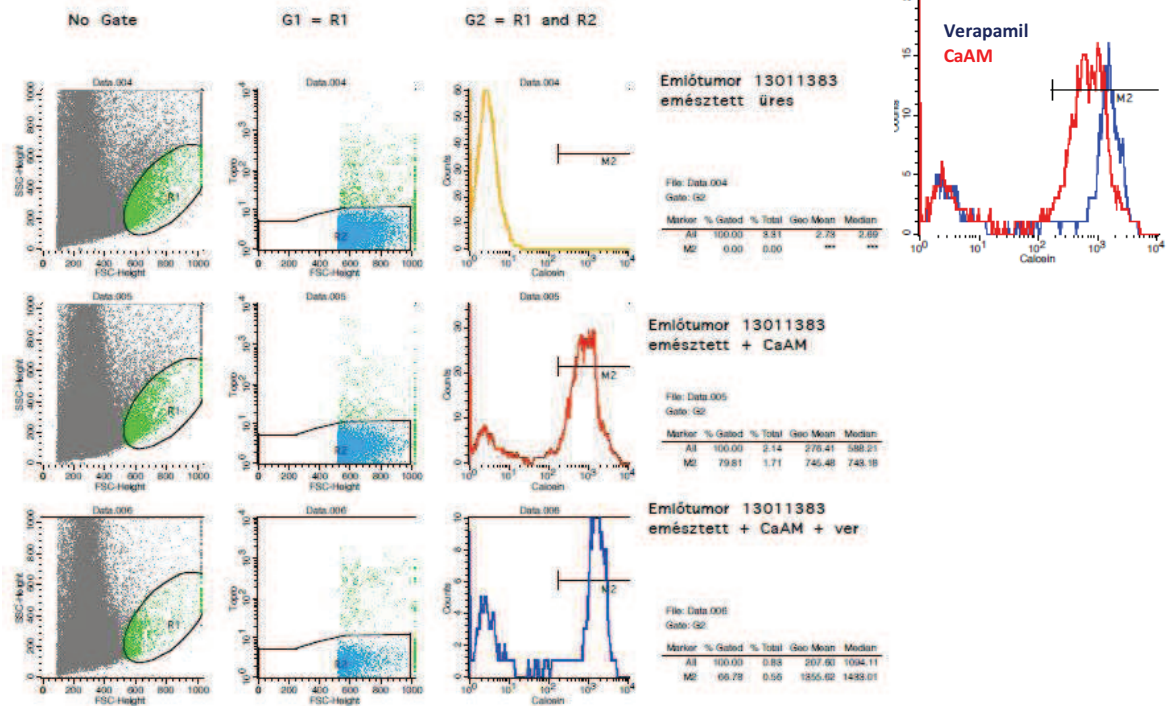
Mastocytoma (2329-2517) – Calcein assay



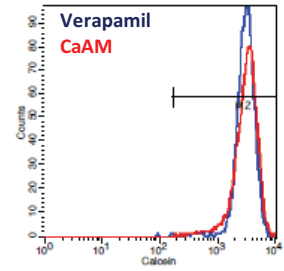
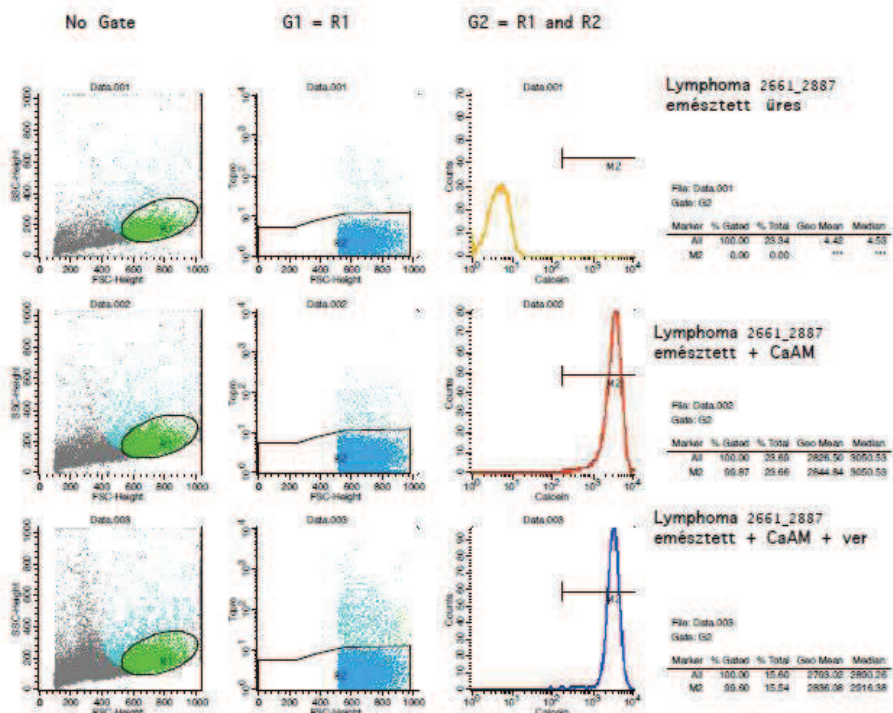
Lymphoma (2655-2881) – Calcein assay



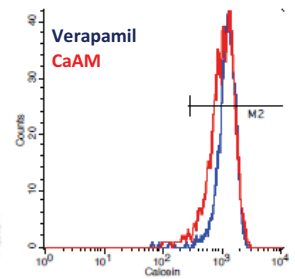
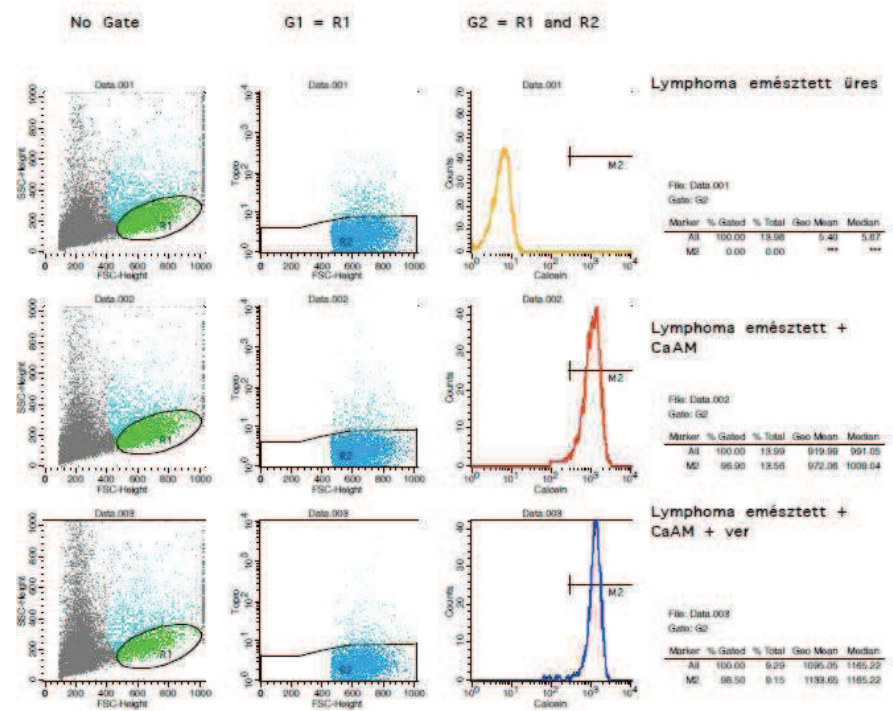
Emlődaganat emészített (1301-1383) – Calcein assay



Lymphoma (2661-2887) – Calcein assay

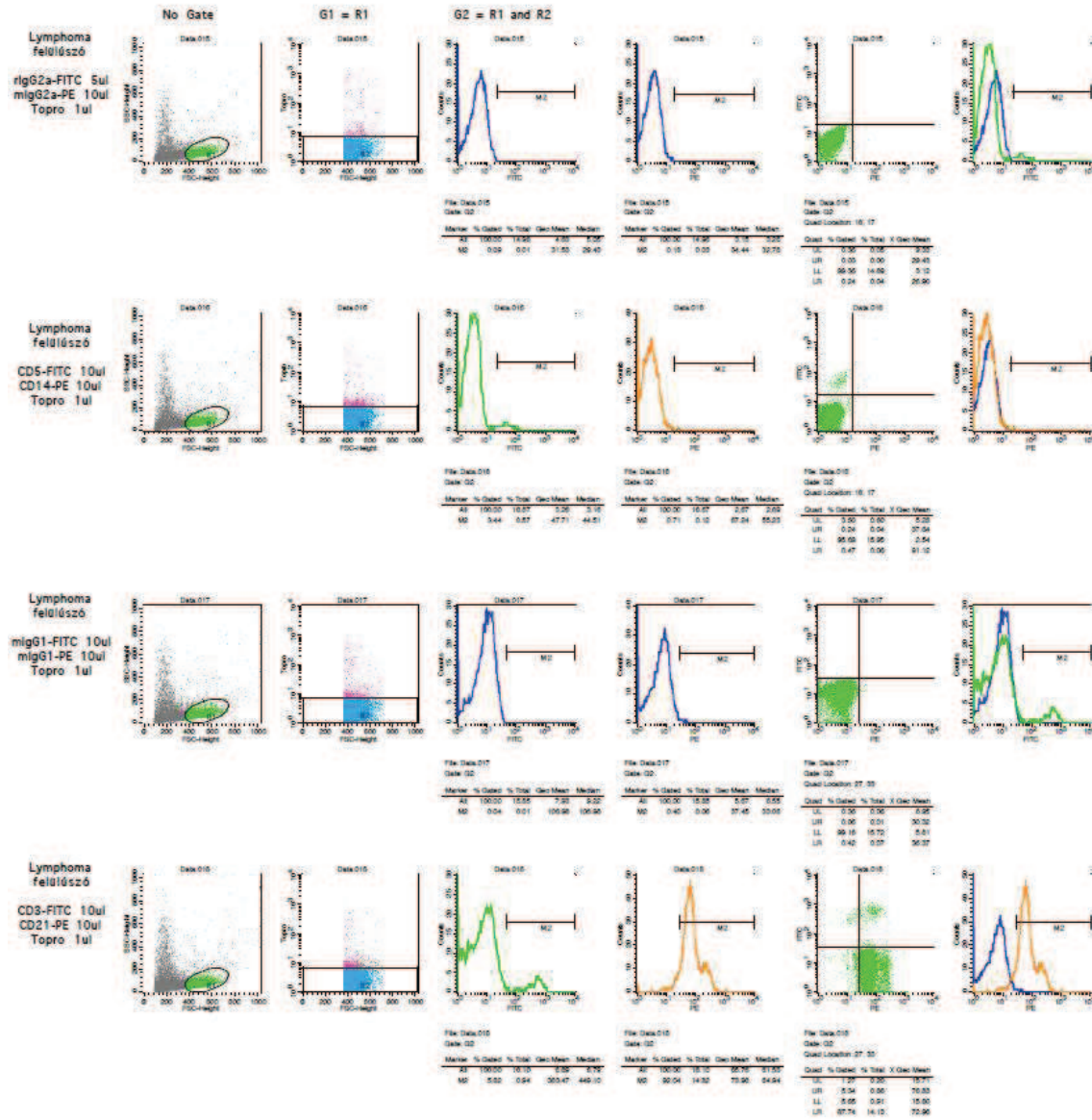


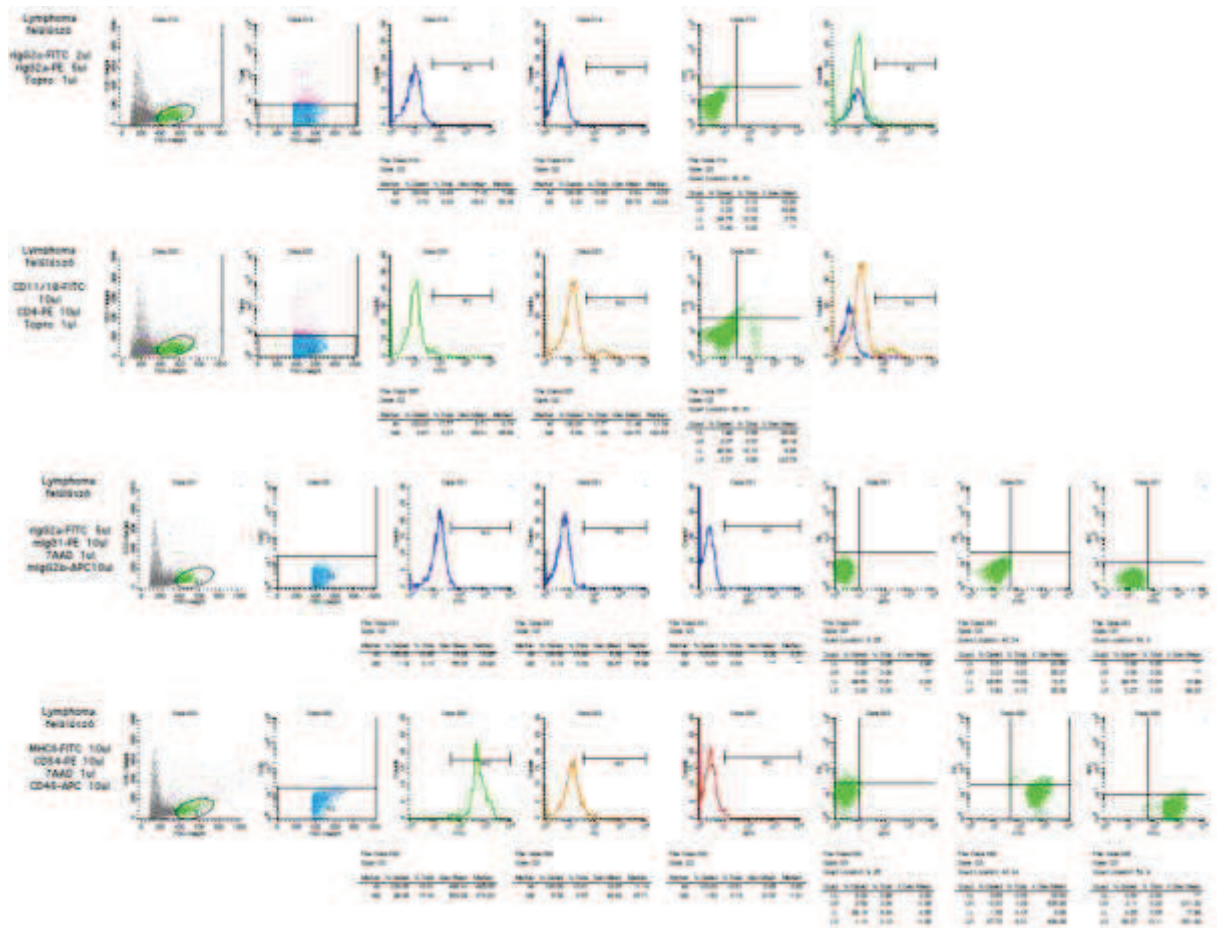
Lymphoma (2784-2910) – Calcein assay



Immunfenotipizálást a tíz lymphoma esetén végeztünk. Szemléltetésképp a 2591-2805 állatkódú minta FACS ábrája látható:

2014. 01. 15. Ellenanyag teszt - Lymphoma 2591 felüliszó





9.2. Témavezetői nyilatkozat

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Vajdovich Péter kijelentem, hogy Karai Edina „Terápiarezisztenciát okozó transzporterek vizsgálata daganatos betegségben szenvedő kutyák daganatsejtjeiben” c. szakdolgozatának tartalmát ismerem, az abban foglaltakkal egyetértek, és a dolgozatot benyújtásra, illetve védezésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2014. április 28.

Dr. Vajdovich Péter

Egyetemi docens

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar,

Kóréletani és Onkológiai Tanszék

9.4. HuVetA - SZIA nyilatkozat

HuVetA - SZIA ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név:.....

Elérhetőség (e-mail cím):.....

A feltöltendő mű címe:.....

.....

A mű megjeleadatai:.....

Az átadott fájlok száma:.....

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

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

Kijelenti, hogy a 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/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,

a SZIE Állatorvos-tudományi 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),

* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, *A Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról* című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

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

Budapest, 201... évhónap

aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetA Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és

hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, 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 Állatorvos-tudományi Kar 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.*

A SZIA Szent István Archívum a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.