



Állatorvostudományi Egyetem
Kórélettani és Onkológiai Tanszék

**Kutyák mastocytomájának
terápiarezisztencia vizsgálata áramlás citometriai
funkcionális teszt alkalmazásával**

Készítette: Kórik Csilla

Témavezetők:

Dr. Vajdovich Péter tanszékvezető egyetemi docens

és

Karai Edina PhD hallgató

Budapest, 2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke _____	2
Bevezetés és irodalmi áttekintés _____	3
A mastocytoma ismertetése _____	3
A hízósejtek tulajdonságai _____	4
A MCT-k besorolása _____	4
Az egyes mastocytomák kialakulásának molekuláris háttere _____	7
Terápiás lehetőségek _____	9
A P-gp által mediált rezisztencia _____	11
Célkitűzés _____	12
Anyag és módszer _____	13
A kutatásban résztvevő állatok _____	13
A sejtek izolálása és a calcein-assay _____	13
Fluoreszcencia aktivált sejtválogatás és analízis (FACS), avagy áramlás citometria _____	14
A multidrog rezisztencia aktivitási faktor _____	15
A vizsgált állatok kezelései _____	16
Statisztikai módszerek _____	17
Eredmények _____	18
MAF értékek és calcein negatív sejtek más paraméterekkel való összefüggései _____	18
Grade besorolás más paraméterekkel való összefüggései _____	22
Stádiumok más paraméterekkel való összefüggései _____	25
Kemoterápiás előkezelés más paraméterekkel való összefüggései _____	27
Következtetések _____	31
Összefoglalás _____	35
Summary _____	36
Köszönetnyilvánítás _____	37
Irodalomjegyzék _____	38

Rövidítések jegyzéke

ABC: ATP binding cassette

ÁHOK: Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ

ATP: adenzin-trifoszfát

calcein-AM: calcein-acetoximetil-észter

cBMMC: canine bone marrow mast cells

CML: chronic myeloid leukemia

DMSO: dimetil-szulfid

FACS: fluorescens activated cell sorting (fluoreszcencia aktivált sejtválogatás és analízis)

FSC: forward scatter

GF: growth factor (növekedési faktor)

GIST: gastrointestinal stromic tumor

HPF: high power fields (nagy látótér, vagyis 400x-os nagyítás)

IF: intensity of fluorescence (fluoreszcencia intenzitás)

ITD: internal tandem duplication (belső tandem duplikáció)

KS: Kiupel system

MAF: multidrog rezisztencia aktivitási faktor

MCT: mastocytoma (hízósejtes tumor)

MDR1: multidrog rezisztencia fehérje-1

MRP: multidrog resistance associated protein

OST: overall survival time (teljes túlélési idő)

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

PCR: polymerase chain reaction (polimeráz-lánreakció)

RCF: relative centrifugal force

RFP: relapse free time (recidíva mentes túlélési idő)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SCF: stem cell faktor

SSC: side scatter

STAT3: signal transducer and activator of transcription 3

TKI: tirozin-kináz inhibitor

TNF2 α : tumor nekrozis faktor alfa

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A mastocytoma ismertetése

A mastocytoma (MCT), azaz a hízósejtes tumor a leggyakoribb bőrdaganat típus kutyákban. Kutyák bőrdaganatainak a 7-21%-át teszik ki (Kiupel és mtsai., 2005; Shoop és mtsai., 2015). Egy Angliában végzett felmérés 453/168,636 esetben igazolt hízósejtes tumort a vizsgált kutyáknál (0,27%) (Shoop és mtsai., 2015). Idősebb korú egyedekben és fajtát tekintve legtöbbször keverékekben fordul elő. Angliában a leginkább érintett fajták a következők: boxer, golden retriever, labrador retriever és amerikai staffordshire terrier (Shoop és mtsai., 2015; Warland & Dobson, 2013). Egy USA-ban végzett felmérés szerint az idősebb kutyák esetében a daganat agresszívebb, illetve kanok és idős egyedek túlélési ideje rövidebb volt. Az állatok testsúlya nem mutatott szignifikáns összefüggést a daganat súlyosságával (Kiupel és mtsai., 2005). Bostock (1986) valamint McNeil és munkatársai (2006) tanulmánya alapján kijelenthető, hogy brachycephal kutyákban általában benignus az elváltozás, míg shar pei-ekben legtöbbször malignus (Bostock, 1986; McNeil és mtsai., 2006). A kutyákban detektált MCT-k körülbelül 50%-a a törzsön, 40%-a a végtagokon, a maradék 10%-a pedig a fejen/nyakon lelhető fel. Lokalizációjukat egyéb helyeken is megfigyelték már: kötőhártya, gége, nyálmirigy, testúri nyirokcsomók, csontvelő (Withrow és mtsai., 2013). A tumor lokalizációja is egy fontos prognosztikai faktor a MCT-k esetében. Kutyák mastocytomáinak többsége a bőr felületes rétegében helyeződik, ugyanakkor infiltrálhatja a mélyebb rétegeket is. A törzsön és végtagokon találhatóak meg legnagyobb számban. A fejen és nyakon lévő tumorok esetében a prognózis rosszabb. A legegységesebb prognosztikai faktor a daganatok számának növekedése, mely csökkenő túlélési időt eredményez (Kiupel és mtsai., 2005).

Morfológiai megjelenésük olyannyira változatos, hogy a biztos diagnózis felállításához elengedhetetlen a citológiai vizsgálat. A sokszor lipomához hasonlatos, bőrben, vagy bőr alatt elhelyezkedő tumorok felszínről kiemelkedő elváltozásként jelennek meg. Felületük lehet szőrrel fedett vagy fedetlen (utóbbi esetben nem ritka a fekélyesedés sem). Környezetükben esetenként megfigyelhetünk bőrpírt, mely a hízósejtek palpalis manipuláció miatti degranulálódásának lehetséges következménye. Ezt a jelenséget Darier-tünetnek hívjuk (Withrow és mtsai., 2013).

A hízósejtek tulajdonságai

A mastocyták prekursorai a canine bone marrow mast cells (cBMMC), melyek a csontvelőben termelődnek, majd innen különböző szövetekbe migrálnak, ahol elérik teljes érettségüket. Az érett sejtek tulajdonságait, összetételét az a szövetkörnyezet határozza meg, ahol differenciálódnak, illetve azok a növekedési faktorok, melyek hatnak rájuk. Az érett hízósejtek citoplazmája nagy mennyiségű granulomot tartalmaz, melyek hisztamin, heparint, tumor nekrosis faktor alfát (TNF2 α), egyéb vasoaktív anyagokat, növekedési faktorokat (GF), így citokineket, lipid mediátorokat képesek kibocsájtani magukból stimulus hatására. A sejtek differenciálódásához szükséges a stem cell factor (SCF), mely a sejtmembránon lévő KIT-receptor (Mast/stem cell growth factor receptor /SCFR/, vagy proto-oncogene c-KIT, vagy tyrosine-protein kinase KIT, vagy CD117) ligandja. Kötődésük serkenti a sejtek növekedését, degranulációját, migrációját, osztódását, illetve gátolja az apoptózist, vagyis a programozott sejthalált (Withrow és mtsai., 2013).

A MCT-k besorolása

A hízósejtes tumorokat Bostock (1973), majd Patnaik (1984) sorolta szövettanilag 3 kategóriába (Bostock, 1973; Patnaik és mtsai., 1984). A MCT-k malignitási fokozatát kifejező, leginkább elfogadott Patnaik-féle rendszer (2. táblázat). A gyakorlatban a másik leginkább előnyben részesített rendszer a különböző malignitási fokú MCT-k besorolására a Kiupel által alkotott Kiupel system (KS), vagyis a kétfokozatú (2-tier) szövettani malignitás-besorolási rendszer (Kiupel és mtsai., 2011). A sejtmagok morfológiai megjelenése és az osztódó sejtek száma/10 HPF (high power fields, nagy látótér, vagyis 400x-os nagyítás) alapján sorolhatjuk a vizsgált tumorokat a low grade vagy a high grade csoportba (1. táblázat).

	High grade
mitotikus alakok (db)	legkevesebb 7 db/10 HPF
multinucleáris sejt (db)	legkevesebb 3 db/10 HPF
rendellenes mag (db)	legkevesebb 3 db/10 HPF
kariomegália	+

1. táblázat: A Kiupel System szerinti high grade mastocytoma meghatározása

Grading	Leírás
grade 1	Jól differenciált daganat. Tömör, jól elhatárolódott tumor, a monomorf, kerek magvú neoplasztikus sejtek csoportja a bőrben és az interfollikuláris térben található és kollagén rostokkal jól elszeparált. Mitotikus alakok nem fellelhetők, ödéma/nekrózis nincs, vagy alig tapasztalható.
grade 2	Közepesen differenciált daganat. A bőr felületen és mélyebb rétegében is előfordulhat, infiltrálhatja a bőralját és az izomréteget. A sejtek száma több a grade 1-hez képest, mondhatni, a tumor közepesen sejtdús. A sejtek közepesen pleomorfak, vékony fibrovaszkuláris, vagy vastag kötőszövetes stróma veszi őket körül. A sejtmagok nem egyértelműen kerek, sejtmagvacskák vannak, több mitotikus sejt lelhető fel. Diffúz ödéma és nekrosis is tapasztalható.
grade 3	Rosszul differenciált daganat a bőr alatti kötőszövetben, vagy még mélyebben. Rengeteg a pleomorf sejt, a stróma alig látható. A sejtmagok szabálytalanok, sokszor duplán fordulnak elő egy sejtben. Sok a sejtmagvacska, és a mitotikus alak. Diffúz ödéma, vérzés és nekrosis gyakori.

2. táblázat: A mastocytomák malignitási fokozatai (grade) és azok jellemzése (Patnaik és mtsai., 1984)

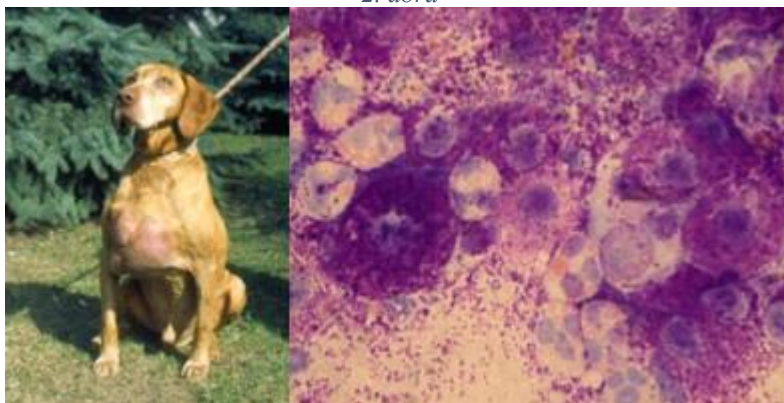
Az összes ettől eltérő megfigyelt tumor low grade meghatározást kap a KS szerint. Az eredeti tanulmányban ez a besorolás 96,8%-os megbízhatóságot mutatott (Kiupel és mtsai., 2011). Vita tárgya azonban, hogy melyik besorolás a praktikusabb, mert az ún. kevésbé malignus tumorok prognózisát a KS nem kellően fejezi ki (Sabattini és mtsai., 2015). A grade 1, 2 és 3 MCT-k citológiai képe, illetve morfológiai megjelenése az 1. és 2. és 3. ábrán látható példákkal szemléltethető.

1. ábra



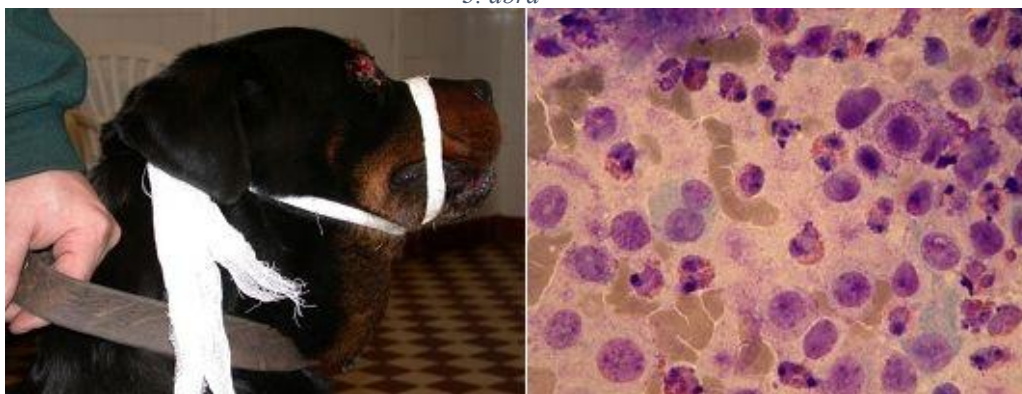
A kép bal oldalán egy grade 1 MCT-ben szenvedő boxer kutya látható (elhanyagolt menhelyi eset). A tumor citológiai képe a jobb oldalon: fibroblast, kisméretű mastocyták citoplazmájukban jellemző granulumokkal, magok kicsik, kromatinállományuk tömött (1000x nagyítás)

2. ábra



A kép bal oldalán magyar vizsla grade 2 MCT-vel (többször műtött, többször visszaeső beteg). Citológiai képe a jobb oldalon: nagyobb mastocyták nagy maggal, közöttük eosinophil granulocyták jelennek meg (1000x nagyítás)

3. ábra



A kép bal oldalán rottweiler kutya jobb oldali conjunctiváján grade 3 MCT-vel, mely a jobb oldali áll alatti nyirokcsomó megnagyobbodását okozta. A kép jobb oldalán a tumor citológiai képén látható sok változatos, nagymagvú, degranulálódott sejt. Magvacskák, binuclearis magvú sejtek láthatók (1000x nagyítás).

A mastocytomás betegeket klinikai vizsgálatok alapján is csoportosíthatjuk aszerint, hogy milyen mértékben terjedt el a betegség a szervezetükben. Ez az ún. stádium (stage), vagy stage-ing (3. táblázat). Az állapotromlással, lázzal, lesoványodottsággal, vérszegénységgel, és légzőszervi tünetekkel együtt jelentkező kórképeket „b” alstádiumba (b substage-be) soroljuk. Azoknál a betegeknél, amelyeknél ezek az általános állapotromlással járó tünetek nem jelentkeznek, azok „a” alstádiumba (a substage-be) sorolhatók (Blackwood és mtsai., 2012).

Stage	Leírás/Jellemzés
0.	Egy tumor a bőrből inkompletten kimetszve, szövettanilag beazonosítva, regionális nyirokcsomó áttét nem igazolható.
I.	Egy tumor a bőrben regionális nyirokcsomó áttét nélkül.
II.	Egy tumor a bőrben regionális nyirokcsomó áttéttel.
III.	Több bőrben lévő nagy/infiltratív tumor regionális nyirokcsomó áttéttel vagy anélkül.
IV.	Bármilyen tumor igazolt metasztázissal pl. a vérben vagy a csontvelőben.

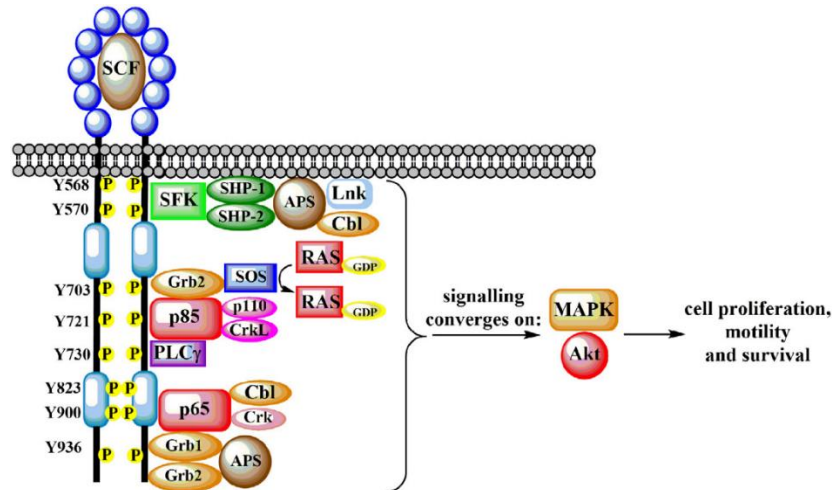
3. táblázat: MCT-k stádium (stage) besorolása a World Health Organization alapján (Withrow és mtsai., 2013)

Daniel és munkatársai (2019) bebizonyították, hogy van szignifikáns összefüggés a strómát alkotó kollagén rostok száma és a tumor agresszivitása között. A kollagén rostok számát az úgynevezett Col-indexben adták meg. Az érték minél nagyobb, annál erősebb a sejtek közötti összetartó erő, így a tumor kevésbé hajlamos a metasztázisra (Daniel és mtsai., 2019).

Az egyes mastocytomák kialakulásának molekuláris háttere

A c-kit proto-onkogén kódolja a KIT-receptort, a tirozin-kináz alcsalád III-as típusú receptorai közé tartozó transzmembrán fehérjét. A KIT egy extra-, egy transz- és egy intracelluláris doménre osztható. Az intracelluláris régió tartalmaz egy juxtamembrán és egy tirozin-kináz szakaszt. A receptor különböző sejteken képes expresszálni beleértve pl. a mastocytákat, melanocytákat, hematopoeticus őssejteket. A KIT ligandja egy citokin, az SCF, mely a kötődés után a receptor dimerizációját, illetve a tirozin-kináz szakasz autofoszforylációját okozza. Ezáltal elindít egy intracelluláris kaszkádot, melynek eredményeként a sejtek differenciálódnak, migrálnak, proliferálódnak és hosszú ideig túlélnek (Ohmori és mtsai., 2008). A KIT-receptor SCF általi aktiválódását az 4. ábra mutatja be.

4. ábra



A humán KIT-receptor SCF kötődése általi aktiválódásának és a fő szignálok szerepének sematikus ábrája (Gil da Costa, 2015)

A kialakult mastocytomák 15-40%-a mutat összefüggést a c-kit gén mutációjával (Takeuchi és mtsai., 2013). A c-kit génben detektált mutációk (általában az exon 11-es, 12-es és intron 11-es szakaszokon) lehetnek pontmutációk, illetve internal tandem duplikációk (ITD). Ezek a folyamatok a juxtamembrán doménben képesek aktiválni a KIT-receptort SCF hiányában is (Ohmori és mtsai., 2008). Takeuchi (2013) tanulmánya szerint az ITD az exon 11-es régiójában (azaz a juxtamembrán részt kódoló szakaszban) szignifikánsan többször fordult elő a KS szerinti high grade tumoroknál, mint a low grade daganatoknál. Az általuk vizsgált kutyáknál 13 esetben (27,7%) mutattak ki c-kit gén mutációt és ebből 8 esetben igazolódott ITD az exon 11-es régióban (Takeuchi és mtsai., 2013). Ugyanakkor, egy vizsgálatban 191 kutya mastocytoma mintája alapján kilenc kutya mutációja volt a 8. exonban, és nyolcnak volt mutációja a 9. exonban (Letard és mtsai., 2008).

A c-kit génben történő rendellenes folyamatokra a KIT-receptor különböző helyeken való expresszációja is utalhat. Az ép hízósejtekben ez egy membránhoz kötött fehérje (1. típusú mintázat, pattern 1), mely immunhisztokémiai vizsgálattal mutatható ki. A jelenlétük a citoplazmában (pattern 2, 3) korrelál a túlélési idő csökkenésével, növekvő sejtproliferációval és magasabb grade besorolással. Tehát minél nagyobb mennyiségben festődnek meg a citoplazmában, a tumor annál agresszívebb (Gil da Costa, 2015). Ennek a szövettani prognosztikai módszernek a bizonytalanságát mutatja, hogy egy korábbi vizsgálatban a citoplazma diffúz festődése jelentett hosszabb túlélést, míg a kifejezetten malignus (Patnaik-féle grade 3) daganatoknál a citoplazmatikus perinukleáris festődést, és a membrán festődést tapasztalták (Preziosi és mtsai., 2004).

Egyre elterjedtebb a csontvelőből való mintavétel, majd citológiai vizsgálat, melynek során megszámlálják, hogy a csontvelői magvas sejtek hány százaléka mastocytá és ebből vonnak le következtetéseket a daganat csontvelői érintettségére vonatkozóan. A csontvelői érintettségű mastocytómás kutyák betegségének fejlődése gyors és végzetes kimenetelű. Az a tény, hogy ezek az állatok cytopeniások (thrombocytopenia, leukopenia, anaemia), megnehezíti a kemoterápia kivitelezhetőségét és csökkenti annak sikerét. A lép és máj mastocytás infiltrációja gyakori a hízósejtes tumor e formájában szenvedő kutyákban (Marconato és mtsai., 2008). Egy tanulmányban a mastocytómák csontvelői érintettsége esetén 41 nap medián túlélési idő határoztak meg az érintett kutyáknál, illetve a cikkből kiderül, hogy 14 állatból 13 hullott el a betegsége következtében (Marconato és mtsai., 2008).

Terápiás lehetőségek

A hízósejtes daganatok esetében többnyire az elsődlegesen választandó terápia a műtéti kimetszés. Ha sem nyirokcsomó áttét, sem csontvelői érintettség nem volt igazolható és a tumor (Patnaik-féle) szövettani besorolása grade 1, esetleg grade 2, akkor a helyesen kivitelezett műtétnak kuratív hatása lehet (Dank, 2016). Dr. Gillian Dank eredményei alapján az így kiműtött grade 1 és 2 daganatos betegek gyógyulása 92-100% volt. A daganatok kimetszésénél célszerű lateralisán 3 cm biztonsági zónát hagyni és mélyebb rétegekből indulni. Ha a tumor ugyanazon a területen újul ki, akkor az eredeti sebszéltnél nagyobb biztonsági zónával kell eltávolítani. Az inkomplett kimetszett MCT-k legcélravezetőbb lokális kezelési lehetősége (ha a második műtét nem kivitelezhető) a sugárterápia, az is leginkább a lábvégeken, hiszen ezen a területen a széles biztonsági zónát követelő műtéti eljárás nem kivitelezhető. A sugárterápia negatívuma a degranulálódás veszélye (Dank, 2016). Ugyanakkor, azt is igazolták, hogy a műtéti kimetszés hatékonysága inkább korrelál a szövettani malignitási fokozattal (grade) és a proliferációs mutatókkal, mint a kimetszés komplett voltával. A tiszta műtéti szélek nem korreláltak az alacsony grade-be tartozó MCT-k kiújulásával (Scarpa és mtsai., 2012).

A műtét előtti (neoadjuváns) prednisolon kezelés széles körben elterjedt. Ezzel elérhető, hogy a tumor mérete csökkenjen, így kevesebb az esély az esetleges inkomplett eltávolításra (Dank, 2016). Stanclift és Gilson (2008) 49 kutyát kezeltek preoperatíván prednisolonnal. Két csoportra osztották az állatokat: akik 1 mg/ttkg dózisban kapták a gyógyszert és akik 2,2 mg/ttkg dózisban. Mindkét csoportban csökkent a tumorok mérete, tehát a kezelés hatásosnak bizonyult (szám szerint 70% volt a siker). A két csoport között ugyanakkor nem

volt szignifikáns különbség, vagyis az 1 mg/ttkg adagolás elegendőnek bizonyult a kívánt hatás eléréséhez (Stanclift & Gilson, 2008).

A kemoterápia abban az esetben javasolt, amikor műtét utáni (adjuváns) terápia szükséges, a sebészeti beavatkozás nem megoldható, illetve a sugárterápia hatástalan, esetleg nem elérhető (Dank, 2016). Davies és munkatársai (2004) vinblastin és prednisolon protokollal 12 héten keresztül kezeltek 20 darab grade 2 és 3 mastocytomás kutyát. Az állatok jól tolerálták a kezelést, húszból 18 kutyának 1 év után sem volt lokális recidívája (Davies és mtsai., 2004). A vinblastin egy P-gp szubsztrát kemoterápiás szer, mely képes leginkább az első dózis adása után jelentős neutropeniát okozni (Zandvliet & Teske, 2015). Thamm és munkatársainak (2006) kutatása alapján elmondható, hogy a vinblastin/prednisolon protokoll alkalmazása során a betegség mentes idő (disease free time, DFT) 1305 nap, a kutyák 65%-ának túlélési ideje kb. 3 év volt. A KS szerint high grade, Patnaik szerint grade 2 dagantos betegek 100%-a élt ugyanennyit (Thamm és mtsai., 2006). Hosoya és munkatársainak (2009) kutatásai prednisolonnal és lomustinnal (CCNU) folytak 12 grade 2 MCT-s kutyán. Hipotézisük az volt, hogy a műtét utáni CCNU/prednisolon adjuváns kemoterápiás protokoll a sugárterápiával egyenértékű alternatív kezelést nyújt az inkompletten kiműtött grade 2 mastocytomás betegeknek. Eredményeik azt mutatták, hogy egyik állatnál sem nőtt vissza a tumor és metasztázis sem volt detektálható (Hosoya és mtsai., 2009). Összességében tehát a CCNU egy megfontolandó ágense lehet a MCT-s kutyák kezelésének (Dank, 2016). Ezek ígéretes eredmények, de nem szabad elfelejteni, hogy a grade 1 és 2 MCT-k legtöbbször éles határuak, metasztázisra alapvetően kevésbé hajlamosak (Withrow és mtsai., 2013). A kemoterápia elengedhetetlen a grade 3, vagy rossz prognózisú grade 2 MCT-s betegek kezelésénél. Számos gyógyszer és kombinációjuk használható. A vinblastin és paclitaxel mikrotubulus gátló szerek, azaz akadályozzák a tumorsejtek osztódását. A c-kit gén mutációjakor az elsődlegesen választandó szerek a tirozin-kináz inhibitorok (TKI): masitinib, toceranib-foszfát, imatinib, melyek a KIT-receptorok ATP-kötő helyeinek kompetitív antagonistái, így képesek gátolni a receptorok aktivitását (Dank, 2016). Az imatinibet, mely alapvetően humán gyógyszer, sikeresen használták a humán Philadelphia-pozitív krónikus myeloid leukémiában (CML) és a humán gastrointestinal stromal tumorok (GIST) esetében. Rezisztencia azonban esetenként kialakulhat az imatinibbel szemben. Állatorvosi gyakorlatban a MCT kezelésére is használt kemoterápiás szer hatásos lehet az exon-11, 9, 8 szakaszain történt ITD, pontmutáció, de akár deléció esetén is. Hasonló rezisztencia, mint a humán CML és GIST esetében, kutyáknál sem kizárt (Nakano és mtsai., 2017). Az említett gyógyszereknek számos

kombinációs lehetősége létezik, illetve sugárterápiával való alkalmazásuk is hatásos lehet. A kezelések mellé gyomorfekélyre utaló tünetek esetében érdemes H1-blokkolókat (difenhidramin), H2-blokkolókat (pl. famotidin) és egyéb gyomorvédőket (protonpumpa-gátlók, bevonók, PGE-analógok) adni (Dank, 2016; Withrow és mtsai., 2013).

A P-gp által mediált rezisztencia

Az ABC-transzporterek olyan létfontosságú membránfehérjék, melyek adenozin-trifoszfátban (ATP) tárolt energia felhasználásával képesek különböző molekulákat átjuttatni a sejtmembránon (Lee & Rosenbaum, 2017). Ide soroljuk a multidrog rezisztencia fehérje-1 (MDR1) génen expresszáldó P170-glükoproteint (P-gp) is, mely a szervezet számára nélkülözhetetlen. Azonban a tumorsejteken lévő membránfehérjék ugyanezen mechanizmussal juttatják ki a membránból az extracelluláris térbe a különböző P-gp szubsztrát kemoterápiás szereket, ezáltal kialakítva a rezisztenciát. A kezelés eredményességének szempontjából tehát fontos lehet megállapítani a P-gp jelenlétét a tumorsejteken (Holló és mtsai., 1994). P-gp szubsztrát gyógyszer többek között a vinblasztin, vinkrisztin, doxorubicin, egyes szteroidok (pl. metilprednizolon, dexametazon, progeszteron) és még a TKI közül az imatinib és a gefitinib is. A kutyákból és emberekből detektált P170-glükoproteinek 90%-os hasonlóságot mutatnak. Egészséges kutyákban immunhisztokémiával és PCR-rel kimutatott protonpumpák a májban, az epeutakban, a vesében, a hasnyálmirigy kivezető csatornájában, a mellékvese kéregállományában és az agyban nagy számban vannak jelen. Ehhez képest jellemzően kevesebb lelhető fel a gyomor és bélcsatornában, a tüdőben és a lymphocytákban (Zandvliet & Teske, 2015).

Számos fluoreszcens antraciklin (pl. rhodamine), illetve más festékanyagok használatosak a multidrog-rezisztens és érzékeny sejtek elkülönítésére. A P-gp által mediált drogrezisztencia kialakulásának mértékét meghatározhatjuk áramlás citométerrel is. A calcein-acetoximetil-észter (calcein-AM) egy erősen lipidoldékony, nem fluoreszcens molekula, mely előbbi tulajdonságának köszönhetően gyorsan penetrál a plazmamembránon át a sejtekbe. Az intracelluláris észterázok hasítása révén egy hidrofil és egy fluoreszkáló szabad sav formára esik szét. A fluoreszcens molekula intenzitása (intensity of fluorescence, IF) mérhető áramlás citométer segítségével. A fluoreszcens intenzitás fordítottan arányos a tumorsejteken lévő P-gp mennyiségével. Abban az esetben, amikor a molekula akkumulációja az MDR1-sejtekben akadályozott, azáltal, hogy aktiválja az MDR1-ATPáz enzimet és kipumpálja a molekulát az extracelluláris térbe, a fluoreszcens intenzitása alacsony lesz. A „calcein assay” egy gyors és reprezentatív áramlás citometriai funkcionális

teszt, melynek segítségével meghatározható a daganatsejtek multidrog rezisztencia aktivitási faktora (MAF értéke), mely érték információt adhat a tumorsejtek kemoterápia iránti érzékenységéről. A calcein fluoreszcens származéka nem mutat hajlamosságot a citotoxicitásra és a sejtek pH, Ca^{2+} és Mg^{2+} háztartására sincs befolyással (Holló és mtsai., 1994).

Célkitűzés

Céljaink között szerepelt az egyes állatokból kimetszett daganatok sejteinek multidrog rezisztencia aktivitási faktor (MAF) érték meghatározása, ezáltal pedig a mastocytoma sejtek terápiarezisztenciájának számszerűsítése. Hipotézisünk szerint a kapott érték megmutatja, hogy a tumorsejtek mennyire ellenállóak a kemoterápiás kezelésekkel (vinblastin/prednisolon, masitinib) szemben, illetve mennyire érzékenyek azokra. Célunk volt kideríteni, vajon a kutya MCT sejteinek MAF értéke, tehát a P-gp funkcionális vizsgálatából nyerhető paraméter, megbízhatóan használható-e a tárgyalt betegség prognosztikájában.

Anyag és módszer

A kutatásban résztvevő állatok

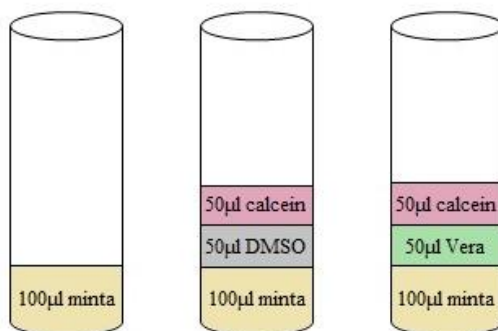
Kutatásunkban 23 db kutyát vizsgáltunk meg, melyek átlagéletkora 10,8 év volt. A kutyák nemek szerinti eloszlása a következő volt: 12 darab kan és 11 darab szuka. A leggyakoribb fajták, amelyekből 3 egyed is szerepelt a vizsgálatunkban az amerikai staffordshire terrier, magyar vizsla és keverék kutyák, illetve két labrador és két mopsz is bekerült az elemzésbe. A többi kutya más fajták egyedei közül került ki. A nem, kor és fajta szerinti megoszlást a 4. táblázat szemlélteti. A vizsgált állatok közül hét kutya halálozott el a kutatás lezárultáig, 2019. szeptember 17-ig.

A sejtek izolálása és a calcein-assay

A kimetszett mastocytoma daganatokból, illetve biopsziával vett mintákból sejteket izoláltunk az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központban (ÁHOK Kft.), ahol elkezdődött a daganatok disszociációja is. A mintát Roswell Park Memorial Institute (RPMI) tápoldatba helyeztük és előkészítettük a további feldolgozáshoz, vagy hűtőben 4 °C-on tároltuk legfeljebb 24-48 óráig. A feldolgozás során a tumort apró darabokra vágtuk, majd disszociációs médiumba tettük, mely összetétele a következő volt: RPMI médium, 200 U/l II-es típusú kollagenáz és 0,6 U/l diszpáz (Gilbo, Life Technologies, USA). A mintát 30 percre 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük és 15 percnként 1 percig vortexeltük. Célunk a daganatokból való sejtes szuszpenzió előállítás volt. A túáspirációval vett minták esetében egyszerűbb volt a feladatunk, hiszen akkor nem szövetdarab, hanem már eleve sejtek álltak a rendelkezésünkre. A szuszpenziót leszűrtük 40 µm-es szűrőn (Falcon® 40 µm Cell Strainer), hogy a mintánk ezzel is homogénebb legyen, majd 5 percig 300 relatív centrifugális erővel (relative centrifugal force, RCF) centrifugáltuk. A kapott pelletet tartalmazó sejteket 1 ml foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldat (PBS, pH: 7,3) hozzáadása után számoltuk meg lézeres sejtszámláló automata (Sysmex) segítségével. A calcein jelöléshez standardan 1000000 db sejtet mértünk ki 300 µl PBS-ben. A sejteket három csoportban vizsgáltuk (5. ábra), 37 °C-on 5 percig inkubáltuk 1 µM leginkább az L-típusú aktivált, vagy inaktivált Ca-csatornákat blokkolni képes verapamil (Sigma), vagy 0.5 µl dimetil-szulfoxid (DMSO) jelenlétében. A reakció a 0.25 µM calcein-AM (Invitrogen, Life Technologies, USA) festék hozzáadásával kezdődött. A sejteket még 10 percig inkubáltuk 37 °C-os vízfürdőben. A harmadik csoport gátlószer és fluoreszcens festék nélkül inkubálódott azonos ideig 37 °C-on, majd 1 ml hideg (4 °C-os) PBS hozzáadásával leállítottuk a jelölést minden

csoportnál. Ezt követően újra 5 percig 300 RCF-en centrifugáltuk és végül 270 µl PBS-be vettük vissza a mintákat. A mérés előtt mindhárom mintát tartalmazó FACS csőhöz hozzáadtunk még 0,8 µl 7-amino-aktinomicin D-t, a holt és élő sejtek elkülönítésére szolgáló festékanyagot. Az élő és a holt sejtek elkülönítése a fluoreszcens fehérje expresszió alapján, ugyanis a festék a halott sejtekbe penetrál, a DNS dupla szál törését mutatja ki. Ezt követően a mintákat áramlás citométer segítségével vizsgáltuk.

5. ábra



A 3 áramlás citométer (FACS) kompatibilis cső és tartalmuk (Készítette: Kórik Csilla)

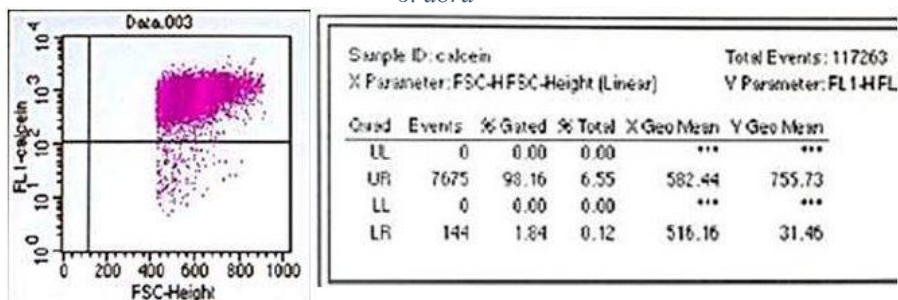
Fluoreszcencia aktivált sejtválogatás és analízis (FACS), avagy áramlás citometria

Az áramlás citometria, vagy angol nevén flow cytometry analysis egy laboratóriumi módszer, mely alkalmazásával egyidőben mérhető a sejtek granuláltsága és nagysága. A vizsgálat azért kapta az áramlási jelzót, mert a szuszpendált sejtek egyesével áramolnak egy folyadék-közegben, az úgynevezett köpenyfolyadékban. A műszerben található lézer gerjeszti a fluoreszcens molekulákat, így azok emittálják a rájuk jellemző hullámhosszúságú fénysugarakat. A forward scatter (FSC) detektor méri a sejtek felszíne által okozott fényszórást, ami értelemszerűen a sejtek méretével arányos. A side scatter (SSC) detektor pedig a sejten belüli membránnal körülvett sejtalkotók által létrejövő fényszórást méri, azaz a sejtek granuláltságát.

A mintákból származó, kutya-tumor sejtek képesek felvenni és átalakítani a calcein-AM festéket, az így nyert fluoreszcenciájuk pedig detektálható és mérhető az áramlás citométerrel. A sejtek fluoreszcenciájának méréséhez Becton Dickinson Facscan márkájú áramlás citométert használtunk.

Az áramlás citometriai méréseket többféleképpen is lehet ábrázolni, így a dot plot esetén a koordináta-rendszerben minden egyes pont egy sejtet jelöl. A hasonló tulajdonságú pontok - azaz sejtek - sejtpopulációkat alkotnak. Az x-tengelyen a méret (FSC), az y-tengelyen pedig a granuláltság (SSC) mértéke van feltüntetve. Példa a dot plot ábrázolásra (6. ábra).

6. ábra



A kép bal oldalán egy dot plot látható. Itt az y-tengelyen a sejtek IF-je van feltüntetve. A calcein negatív, vagyis a rezisztens (festéket kipumpáló) sejtek a választóvonal alatt (1,84%), a calcein pozitív, vagyis érzékeny sejtek a választóvonal fölött (98,16%) helyezkednek el. A kép jobb oldalán többek között a százalékosan kifejezett mennyiségüket olvashatjuk le.

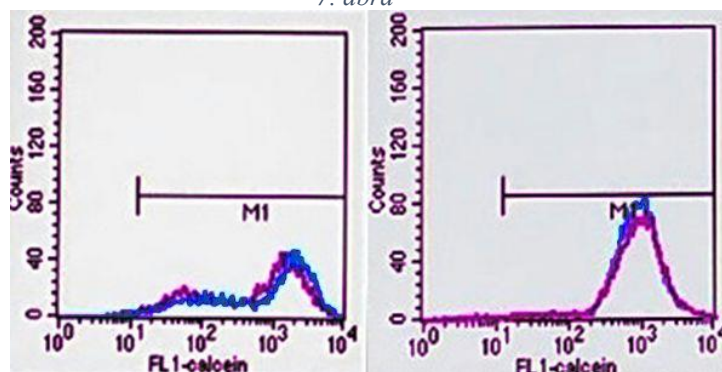
Másfajta ábrázolási mód a hagyományos hisztogram, melyben az x-tengelyen a fluoreszcencia intenzitása (vagyis a jelerősség), az y-tengelyen pedig a sejtek száma látható. Calcein assay méréseink során a megfelelő élő sejtpopuláció kiválasztásához a dot plotot alkalmaztuk, míg a fluoreszcencia intenzitás vizsgálatához az utóbbi ábrázolási módot választottuk.

A multidrog rezisztencia aktivitási faktor

A Cell Quest program segítségével az egyes hisztogramok statisztikai értéke alapján kiszámítható a MAF érték. A gátlószer és gátlószer nélküli minták hisztogramjának medián értékének különbségéből kapott eredményt elosztva a verapamilos minták hisztogramjának medián értékét mutató számértékkel, megkapjuk az egyes egyedek MAF értékeit. A 7. ábrán két hisztogram látható. A fluoreszcencia intenzitásból számított képlet a következő:

$$(IF_{\text{verapamil}} - IF_{\text{calcein}}) / IF_{\text{verapamil}}$$

7. ábra



Hisztogramok két betegből (kék: verapamillal gátolt; lila: csak calceint tartalmazó sejtek fluoreszcencia intenzitása). A kép bal oldalán a MAF 0,28 értékű, jobb oldalon 0. Látható, hogy a bal oldali képen a sejtek IF-je a verapamil hozzáadása után sem nőtt meg, míg a jobb oldali képen láthatóan igen, vagyis ott a pumpagátló működött, a festék a sejtekben maradt.

A vizsgált állatok kezelései

A mastocytoma diagnosztizálásához elengedhetetlen a citológiai vizsgálat. Az ÁHOK Kft.-ben tüáspirációs mintavétel és a citológiai elemzés után állítják fel a diagnózist a hízó sejttes tumorra. A kutatásunkban vizsgált állatok esetében, amennyiben a tumor műthető helyen volt (tehát megoldható volt a széles, kb. 3 cm-es ép határu és egy fascia mélységű sebészi kimetszés), illetve a malignitási foka grade 1, 2 és súlyossági besorolása stage I., II., esetleg III. volt, akkor megtörtént az eltávolítás. A kimetszett daganatot, vagy annak egy részét formalinban tárolva szövettani vizsgálatra küldtük az Állatorvostudományi Egyetem Patológia Tanszékére, ahol a tumorok megkapták a Patnaik és KS szerinti grade-besorolásukat és a c-kit gén mutációjára irányuló vizsgálatok is megindultak.

Amennyiben a tumor grade 1 kategóriába került, a gyógyszeres kezelés elhagyható volt, viszont havonta kontrollra visszavárták az adott állatot. Egyetlen grade 1 malignitási fokozatú daganatos kutya kapott vinblastin előkezelést. Viszont ha grade 2 (nem minden esetben) vagy grade 3 mastocytomáról volt szó, elkezdődött a masitinib (Masivet) adagolása po. és/vagy a vinblastin/prednisolon kemoterápiás protokoll. Az utóbbit a 4. táblázat mutatja be.

Gyógyszer	1. Hét	2. Hét	3. Hét	4. Hét	5. Hét	6. Hét	7. Hét	8. Hét	9. Hét	10. Hét	11. Hét	12. Hét
Vinblastin (mg/m ² IV)	2	2	2	2	-	2	-	2	-	2	-	2
Prednisolon (mg/ttkg PO)	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

4. Táblázat: Vinblastin/Prednisolon protokoll

A kemoterápiás kezelés megkezdése előtt minden betegnél ellenőriztük a vérképet. Amennyiben a fehérvérsejtszám 3,5 G/l alatt volt, az állat nem kaphatott kezelést azon a héten. Ez esetben néhány nappal el kellett halasztani a kemoterápiát, így tehát a továbbiakban minden további kezelés is csúszott. Két kezelés között mindenképpen el kellett telnie egy hétnek. A vinblastint intravénásan kellett a kutya szervezetébe juttatni. Maradék vinblastint nem lehetett újra felhasználni, meg kellett semmisíteni a szabályoknak

megfelelően. A Masivetet tablettában per os kapták az állatok 9.25-12.5 mg/ttkg adagban.

Három beteg kivételével mindnél volt sebészeti beavatkozás. Kemoterápiás előkezelésben (vinblastin/prednisolon protokoll, Masivet) 11 állat részesült. Közülük kerültek ki a legmagasabb grade és stage besorolású betegek.

A vizsgált betegek Patnaik-féle malignitási fokozat (grade) és klinikai összbenyomás (stage) alapján való eloszlása az 5. táblázatban látható. Az összegzésből kiderül, hogy a grade 2, stage I. és substage a. tumoros betegek képviseltették magukat a legnagyobb számban. (5. táblázat).

Grade	Elemszám	Stage	Elemszám	Substage	Elemszám
grade 1	9	stage I.	11	a.	14
grade 2	12	stage II.	3	b.	9
grade 3	2	stage III.	7		
		stage IV.	2		

5. táblázat: A betegek grade, stage és substage szerinti megoszlása

Statisztikai módszerek

Vizsgálataink kiértékeléséhez többféle statisztikai módszerre volt szükségünk: Pearson-féle korrelációs analízissel tájékozódás szintjén megállapítottuk az adott paraméterek (nem, MAF értékek, kor, teljes és recidíva mentes túlélési idő, sejtpopulációk, különböző kezelések, valamint stage, substage és grade besorolások) közötti összefüggéseket. Student-féle t-próbával, Kruskal-Wallis és Kolmogorov-Smirnov-teszttel és a khi-négyzet-próbával elemeztük a szignifikancia szinteket a különböző csoportok között (pl. MAF, calcein negatív sejtek). Log-rank teszttel a grade, stage, kezelési csoportok különböző értékeit próbáltuk meghatározni. A Cox-proportion-hazard regression és a Kaplan-Meier teszttel a túléléseket elemeztük, ill. Kaplan-Meier görbékkel ábrázoltuk. A statisztikai vizsgálatokhoz az alábbi számítógépes programokat használtuk: StatsDirect3 (StatsDirect Birkenhead, Merseyside, UK; (<https://www.statsdirect.com/Contact.aspx>), Real Statistics Using Excel (Charles Zaiontz, <http://www.real-statistics.com/contact-us/>).

Eredmények

A kapott MAF értékek a 6. táblázatban láthatók.

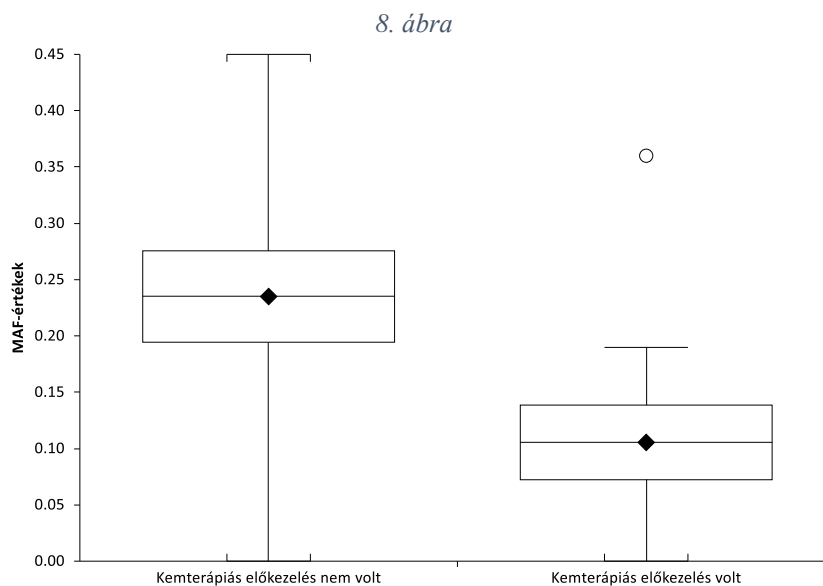
Állatok sorszáma	MAF értékek	Állatok sorszáma	MAF értékek	Állatok sorszáma	MAF értékek	Állatok sorszáma	MAF értékek
1.	0,28	7.	0,1	13.	0,11	19.	0,3
2.	0	8.	0	14.	0,45	20.	0,36
3.	0,29	9.	0,03	15.	0	21.	0,09
4.	0,17	10.	0	16.	0,18	22.	0,18
5.	0,06	11.	0,19	17.	0,24	23.	0,45
6.	0,07	12.	0,3	18.	0,14		

6. táblázat: A vizsgált állatok MAF értékei

MAF értékek és calcein negatív sejtek más paraméterekkel való összefüggései

Pearson-féle korrelációs analízissel hasonlítottuk össze a MAF értékeket más egyéb paraméterekkel, mint például teljes túlélési idő (overall survival time, OST), kemoterápiás előkezelés, daganat malignitási (grade), illetve súlyossági fokozata (stage).

A kemoterápiásan előkezelte betegek száma és a MAF értékek között szignifikánsan negatív korreláció ($r = -0,47$) mutatkozott. A kemoterápiás előkezelésekben résztvevők esetében a MAF értékek kisebbek voltak, mint az előkezelésben részt nem vettek esetében (Kruskal-Wallis, $p = 0,0358$). Ezt az összefüggést a 8. ábra szemlélteti, a hozzá tartozó átlagok és szórások a 7. táblázatban láthatók.



A MAF értékek változása a kemoterápiás előkezelések során

	Kemoterápiás előkezelés nem volt	kemoterápiás előkezelés volt
Átlag	0,235	0,105455
Szórás	± 0,14	± 0,11

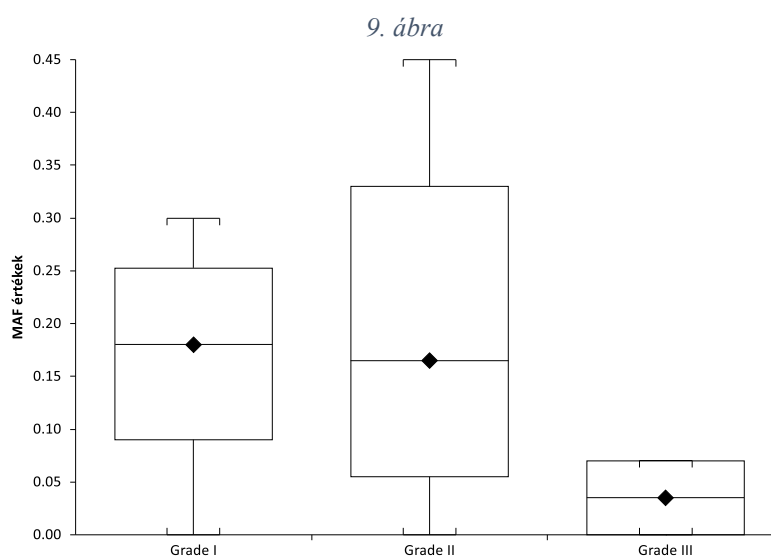
7. táblázat: A kemoterápiás előkezelésben részesültek és nem részesültek MAF értékeinek átlaga, szórása

Tanulmányomban azt találtam, hogy 0,3 cut off MAF értékek esetében Student-féle t-próbával szignifikáns különbség volt a substage ($p= 2,28E-05$) és grade ($p= 0,03$) tekintetében. Kisebb MAF értékekhez kisebb substage- és kisebb grade-értékek társultak. Átlagok és szórások az 8. táblázatban.

		MAF>0.3 (n=3)	MAF≤0.3 (n=20)
Substage	Átlag	2,000	1,300
	Szórás	0,000	0,458
Grade		MAF>0.3 (n=3)	MAF≤0.3 (n=20)
	Átlag	2,000	1,650
	Szórás	0,000	0,654

8. táblázat: A 0,3 cut off MAF értékek átlagai és szórásai a substage és grade tekintetében

A betegek MAF értékei, ha nem vettünk cut off értéket, nem mutattak szignifikáns összefüggést a grade-besorolásokkal. A 9. ábrán megfigyelhető, hogy a legmagasabb grade besorolás, azaz a grade 3 esetében voltak a legkisebb MAF értékek. Az átlagok és szórások a 9. táblázatban követhetők nyomon.



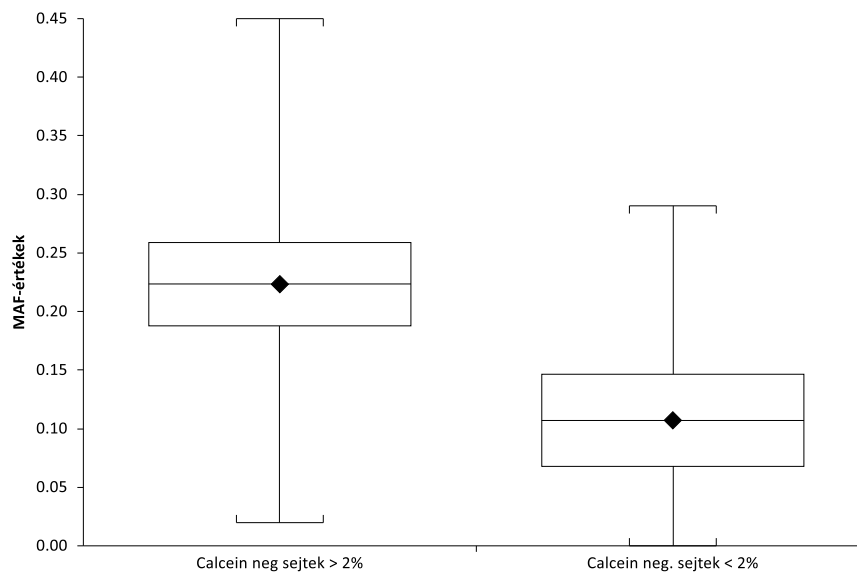
A vizsgált mastocytomás kutyák MAF értékei különböző malignitási fokozatban (grade)

	Grade 1 (n=9)	Grade 2 (n=10)	Grade 3 (n=2)
Átlag	0,168888889	0,199166667	0,035
Szórás	0,095620133	0,158978947	0,035

9. táblázat: A MAF értékek átlagai, szórásai az egyes grade fokozatokban

A MAF értékek a calcein negatív sejtekkel 2%-nál nagyobb arányban rendelkező betegek esetében magasabbnak bizonyultak (10. ábra). Az eltérés szignifikáns ($p=0,0489$). A hozzá tartozó átlagok és szórások a 10. táblázatban találhatóak.

10. ábra



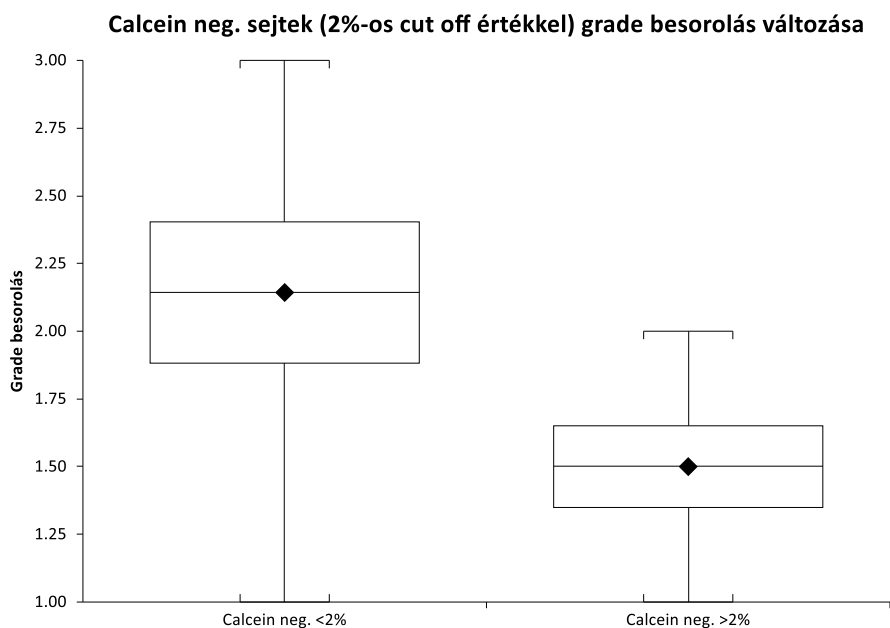
A MAF értékek változása a calcein negatív sejtek 2%-os cut off értékekkel

	Calcein negatív > 0.2%	Calcein negatív < 0.2%
Átlag	0,223333	0,107143
Szórás	$\pm 0,123165$	$\pm 0,104038$

10. táblázat: A MAF értékek átlagai, szórásai a calcein negatív sejtekkel 2%-nál nagyobb, illetve kisebb arányban rendelkező betegek esetében

A rezisztens, azaz efflux pumpával rendelkező calcein negatív sejtek száma negatív korrelációt adott az előkezelt betegek számával ($r=-0,39$) és a malignitási fokkal ($r=-0,37$). Student-féle t-próbával szignifikáns összefüggést igazoltunk a calcein negatív sejtekkel 2%-nál nagyobb, illetve kisebb arányban rendelkező betegek grade besorolásai között ($p=0,0479$) (11. ábra), melyek átlag és szórás értékeit a 11. táblázat szemlélteti.

11. ábra



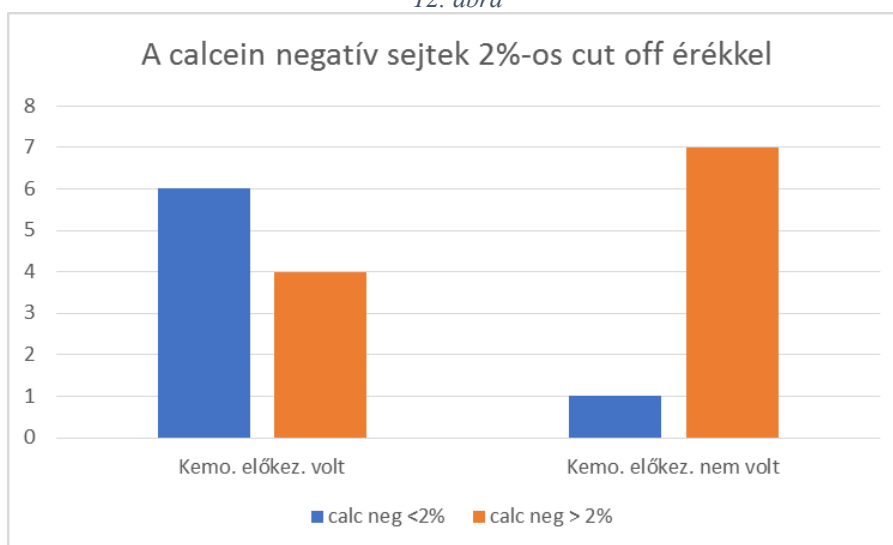
A calcein negatív sejtekkel 2% cut off értéknél kisebb és nagyobb arányban rendelkező betegek grade besorolása

	Calcein negatív <2%	Calcein negatív >2%
Átlag	2,142857	1,5
Szórás	± 0,690066	± 0,522233

11. táblázat: A grade besorolások átlagai és szórásai a calcein negatív sejtekkel 2%-nál nagyobb, illetve kisebb arányban rendelkező betegek esetében

A calcein negatív sejtekkel 2% cut off értéknél kisebb arányban rendelkező betegek kemoterápiás előkezelésben részesültek (12. ábra). A khi-próba p-értéke: 0,039, tehát az összefüggés szignifikáns. Átlagok és szórások a 12. táblázatban.

12. ábra

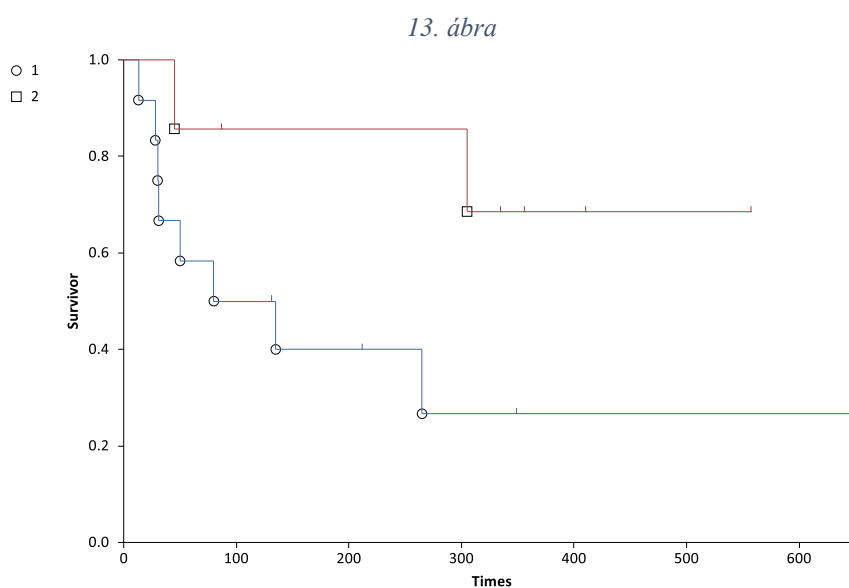


A calcein negatív sejtekkel 2% cut off értéknél kisebb és nagyobb arányban rendelkező betegek kemoterápiás előkezelései

	Kemoterápiás előkezelés volt	Kemoterápiás előkezelés nem volt
Átlag	3,8888	3,1111
Szórás	± 6,1111	± 4,8888

12. táblázat: A calcein negatív sejtek 2%-os cut off értékeinek átlag és szórásai a kemoterápiás előkezelést kapott és nem kapott betegek esetén

A 10%-nál nagyobb arányban calcein negatív sejtekkel rendelkező betegek recidíva mentes medián túlélési ideje nem volt meghatározható, de az átlag túlélési idő 440,6 nap volt, míg a calcein negatív sejtekkel 10%-nál kisebb arányban rendelkező betegek medián túlélési ideje 80 nap volt. A különbség Log-rank teszttel majdnem szignifikáns volt ($p=0,0698$). A Kaplan-Meier túlélési görbe a 13. ábrán látható.

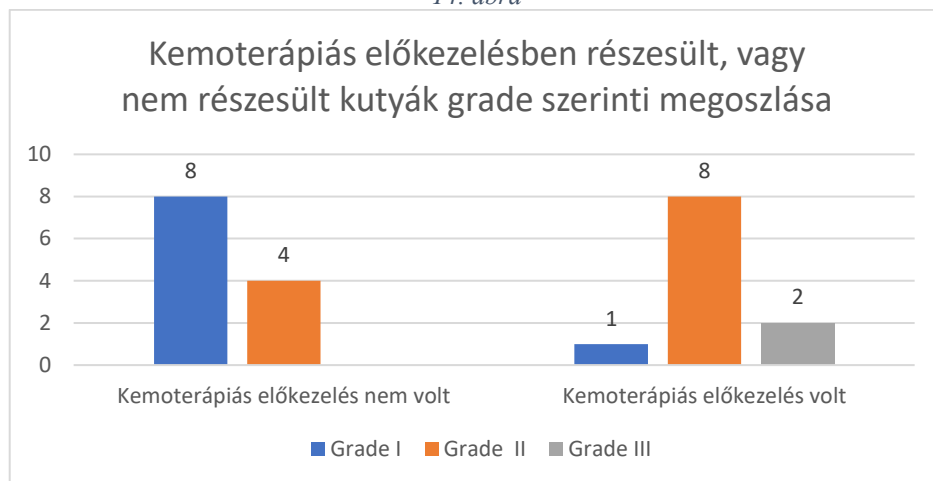


A calcein negatív sejtekkel 10%-nál kisebb (1) és nagyobb (2) arányban rendelkező betegek RFP-je

Grade besorolás más paraméterekkel való összefüggései

Alacsonyabb grade besorolásúak voltak azok a tumoros betegek, amelyek nem részesültek kemoterápiás kezelésben Kruskal-Wallis teszttel ($p=0,0038$) (14. ábra). A korreláció értéke $r=0,61$ volt. Átlagok és szórások a 13. táblázatban láthatók.

14. ábra



Kemoterápiás előkezelésben részesült, vagy nem részesült kutyák grade szerinti megoszlása

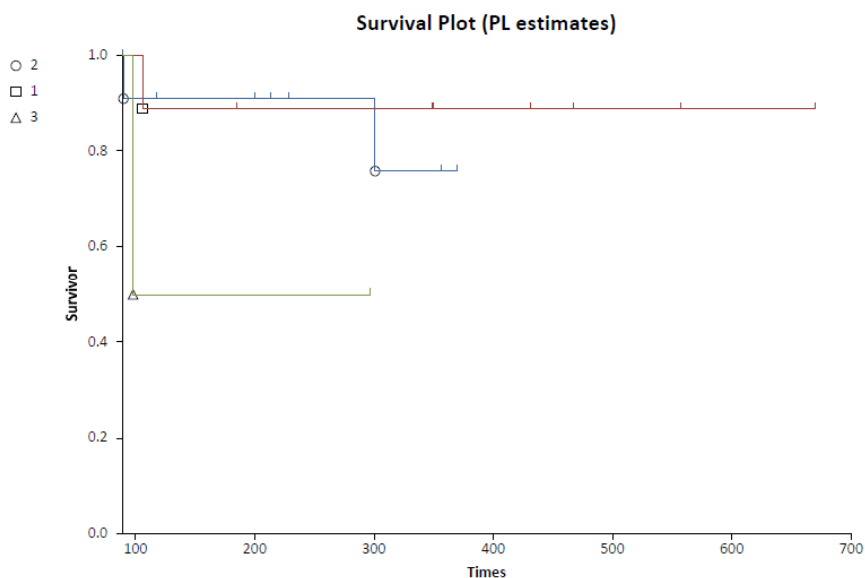
	Kemoterápiás előkezelés nem volt	Kemoterápiás előkezelés volt
Átlag	1,333333	2,090909
Szórás	± 0,492366	± 0,53936

13. táblázat: A kemoterápiás előkezelésben részesült vagy nem részesült állatok grade szerinti megoszlásának átlagai, szórásai

A kemoterápiás előkezeléseket tekintve t-próbával minden esetben szignifikáns különbséget fedeztünk fel: $p=0,0062$ a grade 1 és 2; $p=4,3668E-05$ a grade 1 és 3; $p=0,0388$ a grade 2 és 3 és $p=0,0017$ a grade 1 és 2+3 tumoros betegeket összehasonlítva.

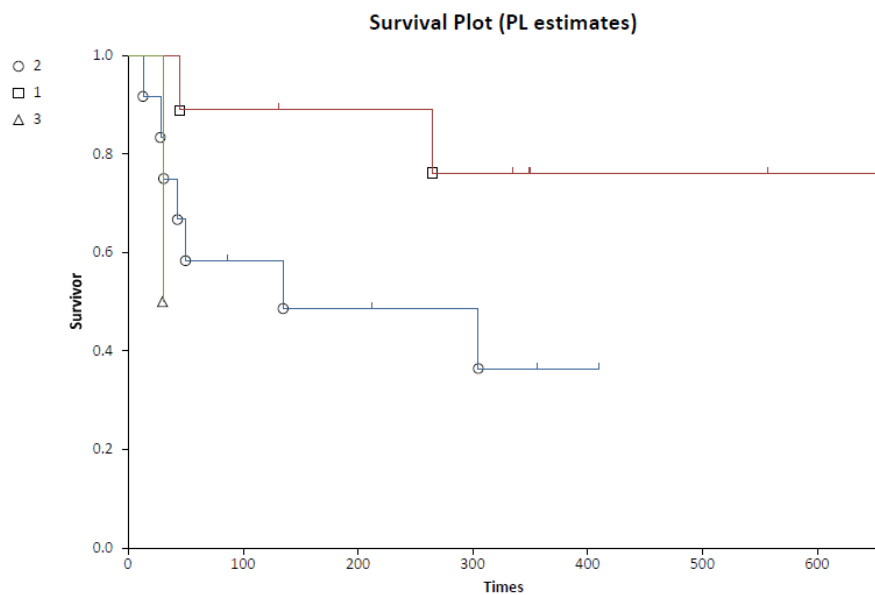
Student-féle t-próbát alkalmazva a grade 2, és 3 besorolású daganatok sejtjeinek MAF értékei szignifikáns különbséget mutattak ($p=0,031167$). A Kruskal-Wallis teszttel a MAF-értékek nem mutattak szignifikáns összefüggést a három grade esetében. Szignifikánsan több kutya recidivált grade 3 tumoros betegek körében a grade 1 és 2 tumorosokhoz képest ($p=0,00395$; $p=0,038814$). Igazoltuk, hogy a grade 3-as betegek RFP és OST értékei szignifikánsabban rövidebbek voltak, mint a grade 1, 2-es besorolású betegeké ($p<0,0001$). Ezt szemlélteti a 15. és 16. ábra. A grade besorolás negatívan korrelált az RFP-vel ($r=-0,35$).

15. ábra



Az OST alakulása (napban) a különböző malignitási fokú (grade) daganatok esetében

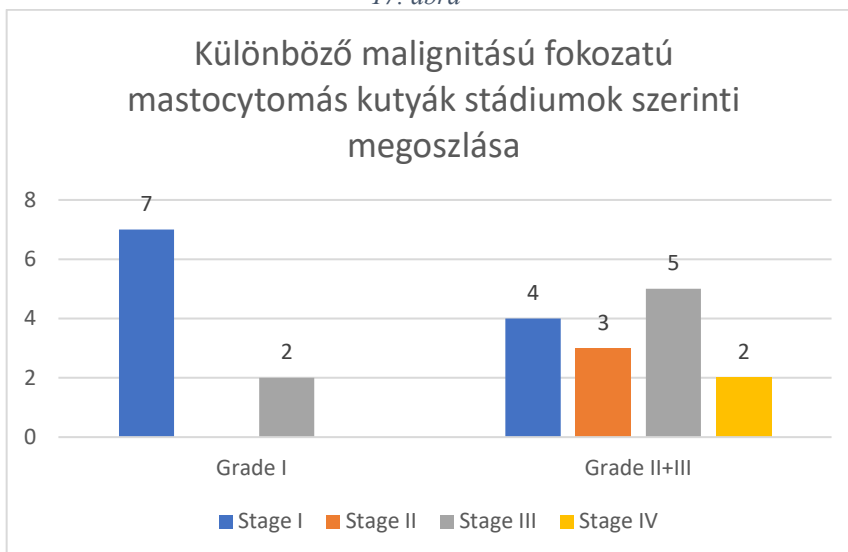
16. ábra



Az RFP alakulása (napban) a különböző malignitási fokú (grade) dagantos betegek esetében

A grade 1 és a grade 2, ill. 3 összevonásával szignifikánsan nagyobb Stage-értékek mérhetők Kruskal-Wallis teszttel ($p= 0,0417$) (17. ábra). A hozzájuk tartozó átlagokat és szórásokat a 14. táblázat szemlélteti.

17. ábra



Különböző grade besorolású vizsgált mastocytomás kutyák stádiumok szerinti megoszlása

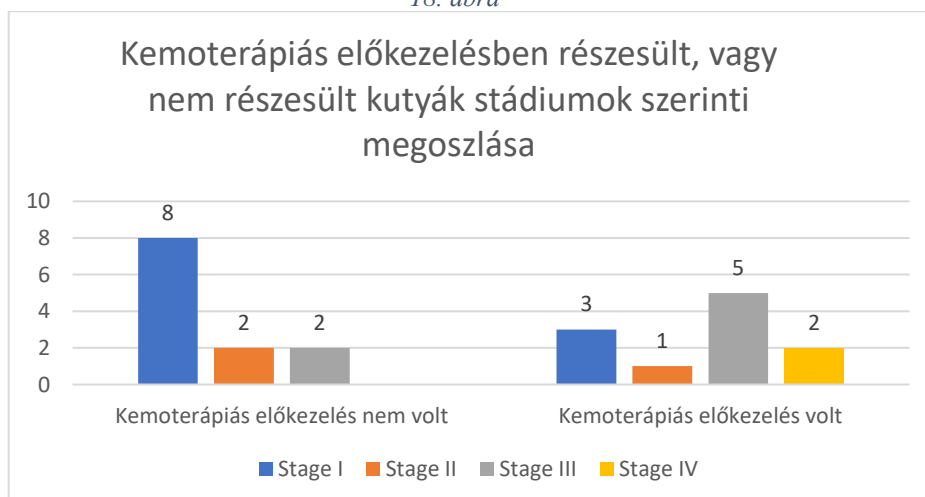
	Grade 1	Grade 2+3
Átlag	1,444444444	2,166666667
Szórás	± 0,831479419	± 0,986013297

14. táblázat: Különböző grade besorolású vizsgált mastocytomás kutyák stádiumok szerinti megoszlásának átlagai, szórásai

Stádiumok más paraméterekkel való összefüggései

Azokban az esetekben, amelyeknél kemoterápiás előkezelés nem volt, a stádium besorolásuk is szignifikánsan kisebb volt Kruskal-Wallis teszttel ($p=0,0241$) (18. ábra). Az átlagok és szórások a 15. táblázatban tekinthetők meg.

18. ábra



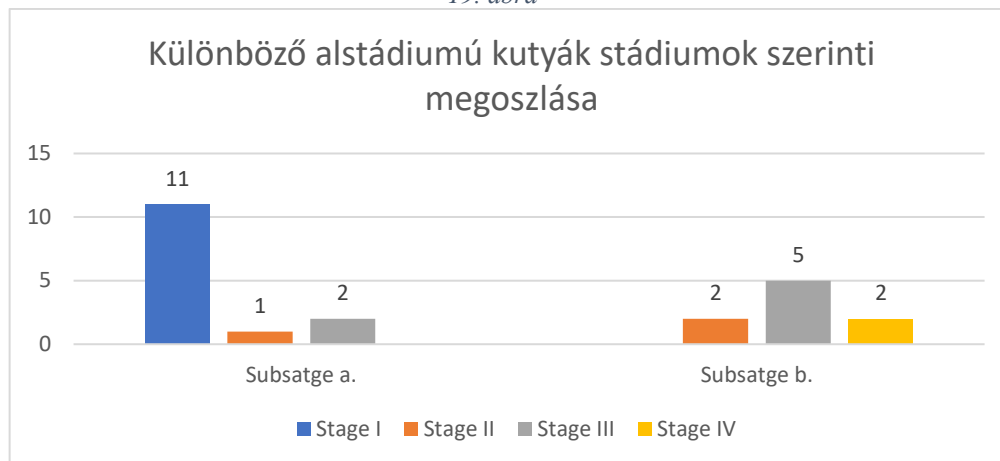
A kemoterápiás előkezelésben részesült, vagy nem részesült kutyák stádium szerinti megoszlása

	Kemoterápiás előkezelés nem volt	Kemoterápiás előkezelés volt
Átlag	1,5	2,545455
Szórás	$\pm 0,797724$	$\pm 1,128152$

15. táblázat: A kemoterápiás előkezelésben részesült, vagy nem részesült kutyák stádium szerinti megoszlásának átlagai, szórásai

A b alstádiumba (klinikai tünetek) tartozó betegek esetében azt tapasztaltuk, hogy ezek többnyire nagyobb stádium besorolásba estek. A Kruskal-Wallis teszttel az összefüggés szignifikánsnak adódott ($p=0,0003$) (19. ábra). Pozitív korreláció $r=0,75$ volt.

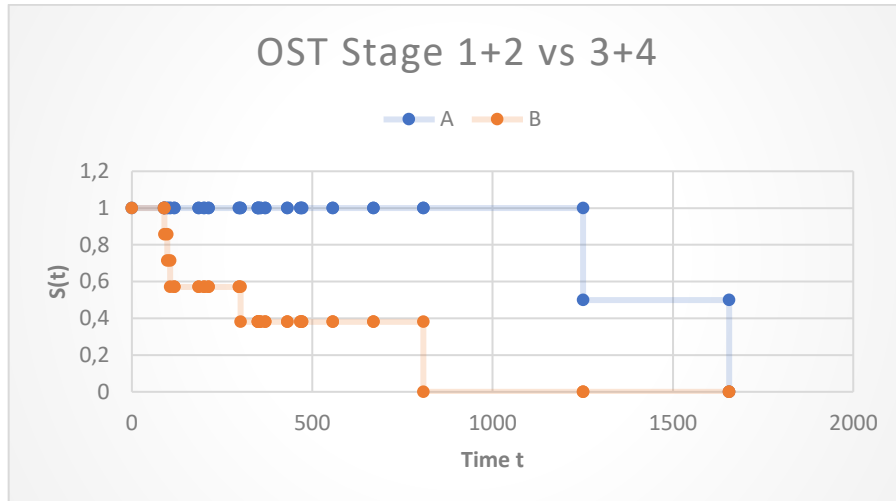
19. ábra



Különböző alstádiumú kutyák stádiumok szerinti megoszlása

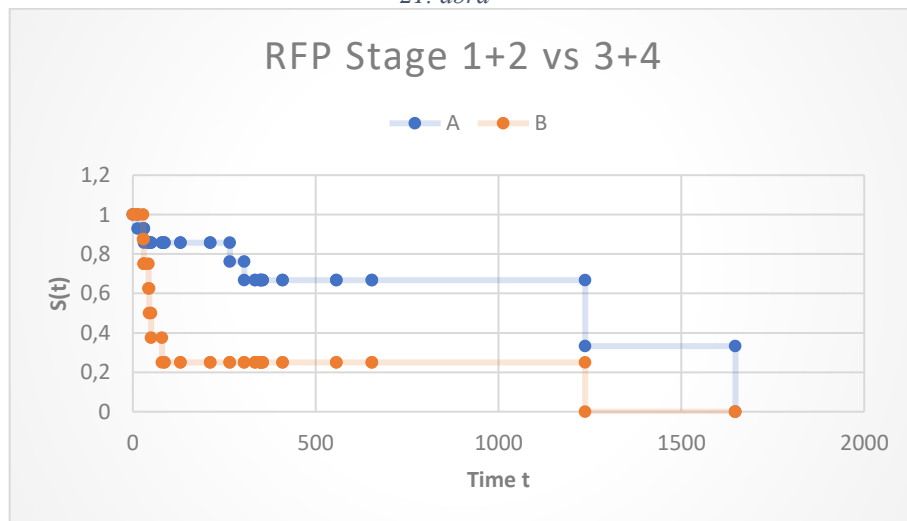
A betegek súlyossági szempontú besorolásának vizsgálata alapján szignifikáns különbséget találtunk a stage I.+II. valamint a III.+IV. betegek OST (Log-rank teszt: $p=0,0027$) és RFP értékei között (Log-rank teszt: $p=0,034$) (20. és 21. ábra). A stage I.+II. betegek medián túlélési ideje 1251 nap, átlag túlélési idő 1453,3 nap volt. A stage III.+IV. betegek medián túlélési ideje 301 nap, átlag túlélési idő 378,6 nap volt. A stage I.+II. betegek recidíva mentes medián túlélési ideje 1237 nap, átlagos túlélési ideje 1019,1 nap volt. A stage III.+IV. betegek esetében az előbbi 50 nap, az utóbbi pedig 191 nap volt.

20. ábra



Stage I.+ II. (A) és III + IV. (B) betegek OST-i

21. ábra



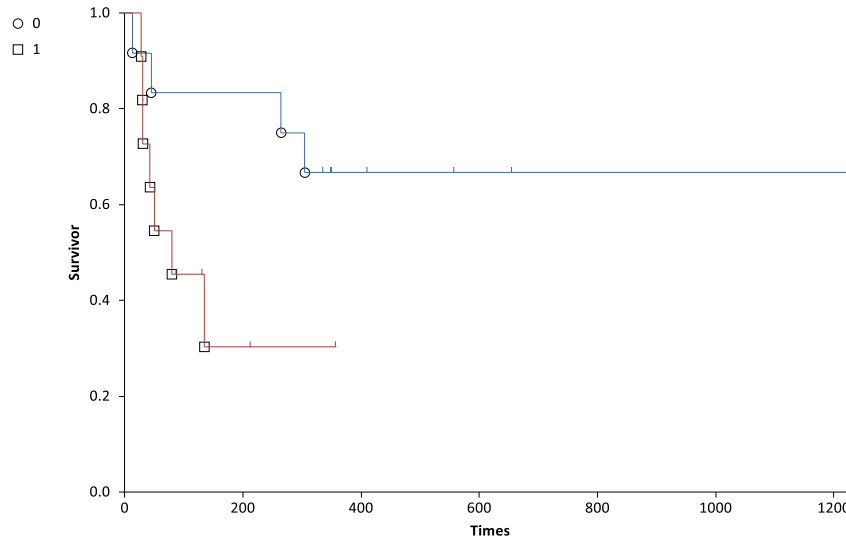
Stage I.+II. (A) és III + IV. (B) betegek RFP-i

A stage IV. számú betegek esetében a stage I-es betegekhez képest szignifikánsan több volt azon betegek száma, amelyeknél volt recidíva ($p=0,016197071$).

Kemoterápiás előkezelés más paraméterekkel való összefüggései

A nem előkezelt betegek recidíva mentes túlélési ideje szignifikánsan hosszabb volt ($p < 0,0427$) (22. ábra).

22. ábra



Kemoterápiás előkezelésben részesülő, vagy nem részesülő állatok RFP-jének alakulása

A kemoterápiás kezelésben részesülők recidíva mentes medián túlélési ideje 80 nap, míg a kezelést nem kapó betegeké 1237 nap volt. Átlagos recidíva mentes túlélési idő a kezelést kapó betegek esetében 152,1 nap, míg a kezelést nem kapó betegeknél ez 1014 nap volt. A vizsgálatban részt vevő állatok 5 féle kombinációban részesültek kezelésben (16. táblázat):

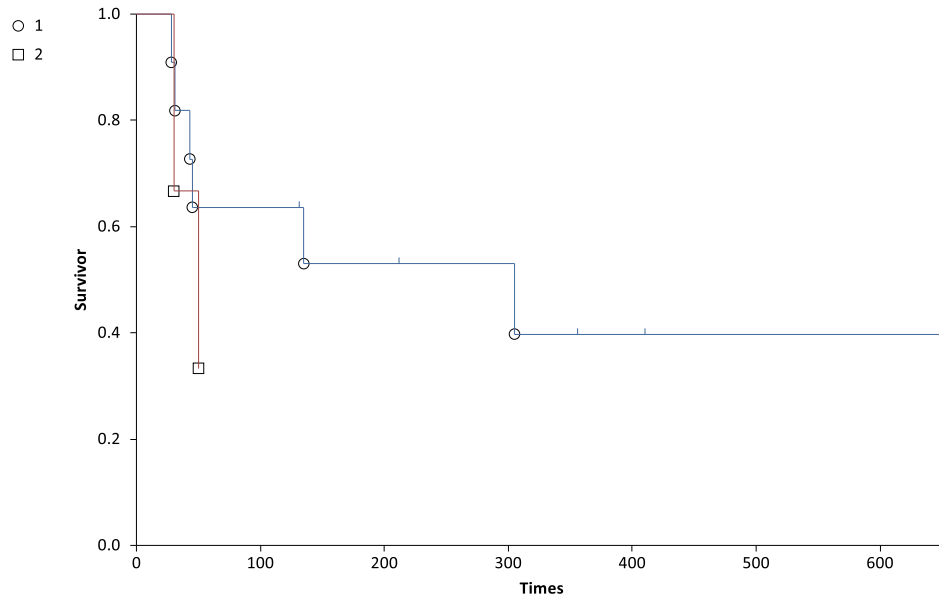
Csoport	Kezelés	n=	OST medián (nap)	RFP medián (nap)
1. csoport	Műtét	9	1251	1237
2. csoport	Műtét + Vinblastin/prednisolon	6	573.3 (átlag)	444.04 (átlag)
3. csoport	Műtét + Masivet	4	301	31
4. csoport	Műtét + Vinblastin/prednisolon + Masivet	1	356	356
5. csoport	Masivet + Vinblastin/prednisolon	3	98	50
Log-rank teszt	death rate, p=		0.194	0.017
Log-rank teszt	trend, P7		0.043	0.016

16. táblázat: A vizsgált állatok kezelésenkénti megoszlása

A kezelések hatása a teljes és recidíva mentes túlélési időre is szignifikánsnak mutatkozott. A műtétben és kemoterápiás kezelésben is részesülő betegek medián túlélési ideje nem volt meghatározható, átlagos túlélési idő 609,7 nap volt. A csupán kemoterápiát kapó páciensek medián túlélési ideje 98 nap, átlagos túlélési idő pedig 197,5 nap volt (Log

rank: $p=0,1043$). A recidíva mentes medián túlélési idő a műtétben és kemoterápiában is részesülő betegek esetén 305 nap, az átlagos túlélési idő 328,2 nap volt. A csak kemoterápiával kezelt kutyák esetében az előbbi 50 nap, az utóbbi 53,3 nap volt (Log-rank: $p=0,0192$). A RFP alakulását az egyes kezelések esetében a 23. ábra szemlélteti.

23. ábra

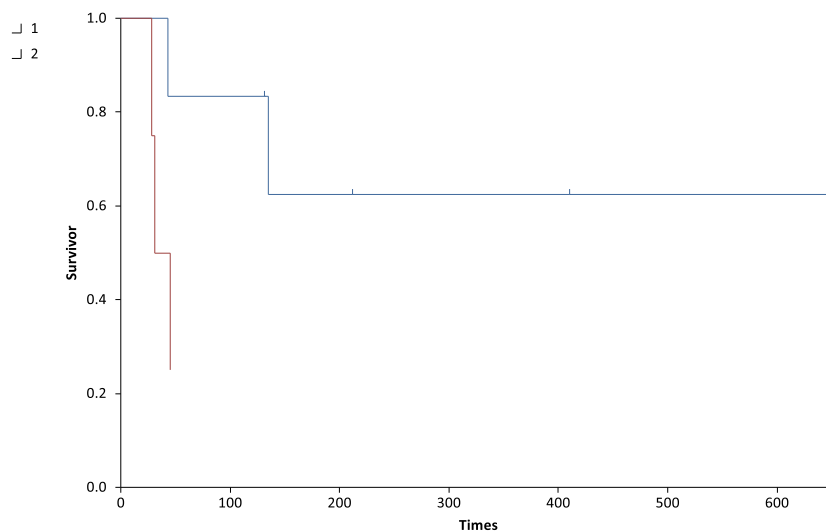


Az RFP alakulása a műtétben és kemoterápiás kezelésben is részesülők (1), illetve a csak kemoterápiás kezelést kapó betegek (2) esetében

Azoknak a betegeknek az RFP értéke hosszabb, volt, amelyek műtéten estek át, majd vinblastin/prednisolon-kombinációt kaptak (átl.: 444,04 nap), mint azok, amelyek a műtétet követően, vagy műtét nélkül Masivet-et (medián: 31, átlag 102 nap, Log rank teszt: $p=0,0481$). Az RFP alakulását az egyes kezelések esetében a 24. ábra szemlélteti.

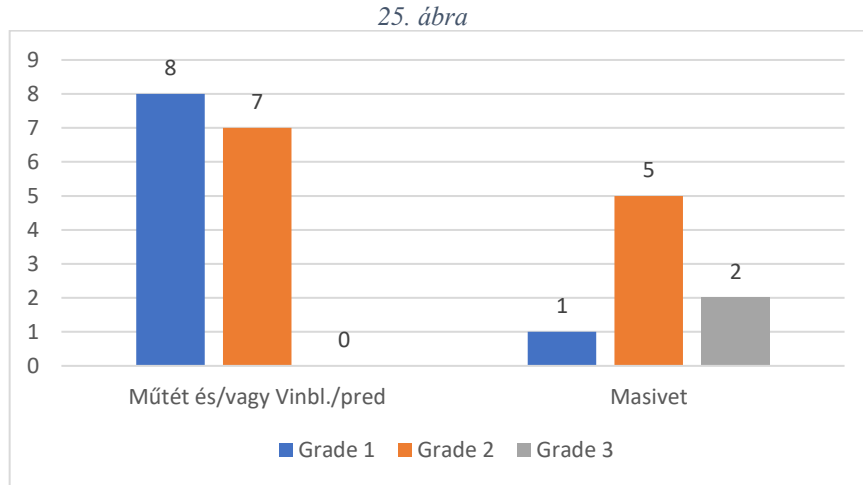
24. ábra

Survival Plot (PL estimates)



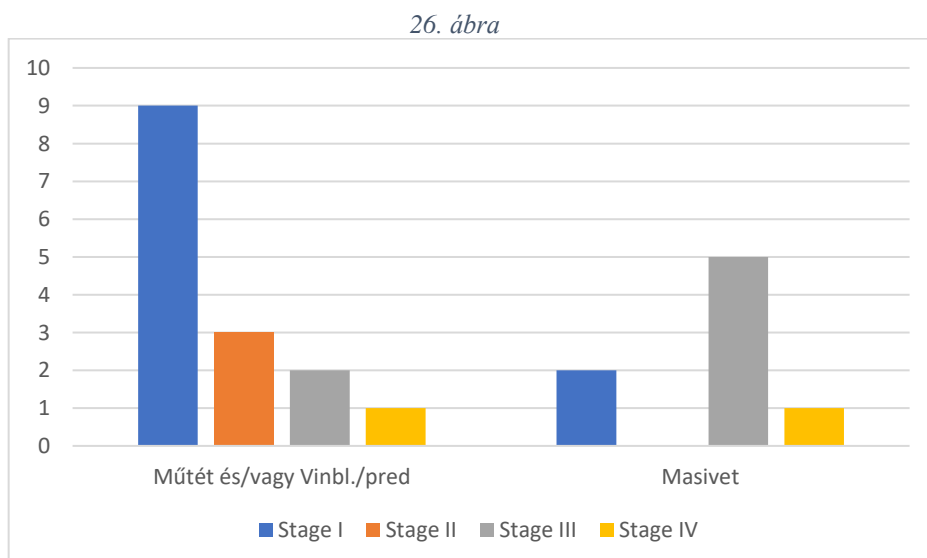
Az RFP alakulása a műtéten átesettek és vinblastin/prednisolon (kék vonal) kezelésben részesülők, vagy Masivet- (piros vonal) kezelésben részesülők esetében

Ugyanakkor, a Masivet-et (műtét után, vagy műtét nélkül) kapó betegek szignifikánsan magasabb grade-be tartoztak, mint azok, akik nem kaptak Masivet-et ($p=0,0277$) (25. ábra).



A Masivet-, és műtét és/vagy vinbl./pred. kezelésben részesülő betegek malignitási fokozat (grade) szerinti megoszlása.

Hasonlóan a Grade-hez a Masivet-et (műtét után, vagy műtét nélkül) kapó betegek stádium-besorolása is csaknem szignifikánsan nagyobb, mint azoké, akik Masivet-et nem kaptak ($p=0,053117422$) (26. ábra).



A Masivet-kezelésben részesülő, és nem részesülő betegek stádium (stage) szerinti megoszlása.

Következtetések

Eredményeink szerint a magasabb MAF értékekkel rendelkező állatok esetében a teljes és recidíva mentes túlélési idő hosszabb volt, illetve a kemoterápiás előkezelés ritkább volt. Korábbi tanulmányban lymphoma esetén vizsgálták a MAF prognosztikai jelentőségét, melynél a 0,2 alatti MAF értékkel diagnosztizált betegek szignifikánsabban tovább éltek szemben a 0,2 feletti MAF értékkel rendelkező betegeknél (Kurai E., 2016). Azonban jelen vizsgálatban ellenkezően alakult a MAF értékek és OST, RFP ideje közötti összefüggés. Tehát azon betegek, akik tumorsejtjei P-gp-vel rendelkeztek, mégis tovább éltek és később alakult ki recidíva. Ezt megerősítette az is, hogy a calcein negatív (rezisztens) sejtekkel 10%-nál nagyobb arányban rendelkező betegek recidíva mentes átlagos túlélési ideje hosszabb volt, mint a 10%-nál kisebb arányban rendelkező pácienseknél. A MAF értékek 0,3 cut off esetén találtunk szignifikáns összefüggést a daganatok grade és substage besorolásával. A kisebb MAF értékhez kisebb grade és substage besorolás tartozott. Viszont minden más esetben a malignitási fokozatok (grade) és MAF értékek között ellentmondásos összefüggéseket tapasztaltunk, mégpedig azt, hogy a grade 2 tumoros betegeknél a MAF értékek magasabbak voltak, mint a grade 3 daganatokhoz tartozó MAF értékek. Ami azt jelentené, hogy a szövettanilag súlyosabb besorolású tumor sejteinek rezisztencia értéke alacsonyabb. A calcein negatív sejtekkel 2%-nál nagyobb arányban rendelkező betegek esetében is kisebb grade besorolást tapasztaltunk. Kemoterápiás előkezelés gyakoribb volt az alacsonyabb MAF értékű tumoros betegek esetében a magasabb MAF értékűekhez képest és calcein negatív sejtekkel 2%-nál kisebb arányban rendelkező betegek többségénél. Feltételezésünk az volt, hogy a klinikai és szövettani vizsgálatok által rossz prognózisra értékelt daganatok sejtejei mutatnak kifejezett rezisztenciát. A kapott eredmény éppen ennek ellenkezője lett.

Mindezek tükrében azt a következtetést vontuk le, hogy a MAF érték meghatározása a kutyák mastocytomájának terápia rezisztenciájának vizsgálatára nem alkalmas módszer, ugyanis az alacsony értékű MAF, illetve kevesebb rezisztens sejt logikusan azt feltételeznék, hogy a sejtek érzékenyek, pumpával nem, vagy alig rendelkeznek, így a terápiás szerekre adott válasz jobb. A magas értékű MAF pedig értelemszerűen ezzel ellentétben rezisztens, pumpával nagy számban rendelkező sejtekre engedne következtetni, melyek által alkotott tumor kezelése mindezek miatt nehéz lenne. Miyoshi és mtsai. (2002) is immunhisztokémiai vizsgálattal tanulmányozták a kutyák mastocytoma sejteiben a P-gp és multidrog resistance associated protein (MRP) jelenlétét, és a következő eredményeket kapták: A Patnaik féle

szövetteni besorolás szerint 15 grade 1, 31 grade 2 és 8 grade 3 beteg tumorsejtjeit vizsgálták. Az 54 db kutyából 8 mutatott P-gp és 10 mutatott MRP pozitivitást. A P-gp pozitív sejtek 5 db grade 1-es és 3 db grade 2-es besorolású páciensből lettek izolálva, míg az MRP pozitív sejtek esetében a grade 1:2:3 arány a következő volt: 4:6:0. Az adatokból látszik, hogy egyetlen grade 3 tumorból izolált sejt sem tartalmazott P-gp vagy MRP protonpumpát. Nem tapasztaltak szignifikáns korrelációt a pumpák jelenléte és a szövetteni besorolás között (Fisher's exact test). Az eredmények tehát azt feltételezik, hogy a jól differenciált tumoroknál gyakoribb a P-gp és/vagy MRP expresszációja a rosszul differenciáltakhoz képest, ami azt feltételezheti, hogy az utóbbi daganatok jobban reagálhatnak a kemoterápiás kezelésekre (Miyoshi és mtsai., 2002). Az 9. ábra alapján látható, hogy mi is hasonlót tapasztalunk a P-gp-funkció tekintetében.

A mi vizsgálatainkból továbbá kiderült, hogy a <2% calcein negatív sejtekkel rendelkező tumorokkal a betegek többnyire már részesültek korábban kemoterápiás előkezelésbe. Arra gondolhatunk, hogy mastocytoma esetében a kemoterápia elpusztította a rezisztens sejteket, így azok nem indukáltak rezisztenciát.

Mindezekből arra következtettünk, hogy a multidrog rezisztencia a hízósejtes tumorok esetében más protonpumpák működésével, esetleg más rezisztenciamechanizmusok útján (pl. CYP450 enzimrendszer) érvényesül. Rodriguez és munkatársainak (2012) vizsgálata az AKT protein jelenlétére irányult a kutya mastocytoma sejteken. 25/24 állatból vett mintában volt a sejteken AKT fehérje foszforilált formában. Ezek gyakoriságát immunhisztokémiai módszerrel határozták meg, de nem találtak szignifikáns összefüggést az foszforilált AKT előfordulásának gyakorisága és a daganat grade besorolása között. Lehetséges ugyanakkor, hogy más paraméterekkel szignifikáns összefüggés fedezhető fel és esetleg AKT inhibitorok alkalmazása a későbbiekben eredményre vezethet az MCT-k kezelésében (Rodriguez és mtsai., 2012). Valószínűnek tartjuk azt is, hogy a kemoterápiás előkezelés, pl. a TKI alkalmazása csökkenti a P-gp-mediálta rezisztenciát, ezáltal javítja a mastocytoma kezelési lehetőségeinek eredményességét. Bár egy tanulmány szerint a TKI terápiás potenciálja az intracelluláris célpontjaikhoz való hozzáféréstől is függ, amelyet bizonyos ABC membrán transzporterek jelentősen befolyásolhatnak (Özvegy-Laczka és mtsai., 2005). Teng és munkatársainak (2012) vizsgálataiból kiderült, hogy a prednisolon kezelés nem volt hatással a P-gp protonpumpa expresszációjára, ugyanakkor a foszforilált signal transducer and activator of transcription 3 (pSTAT3) és KIT-receptorok számában viszont csökkenést fedeztek fel a kezeléseket követően. A tumor térfogatának jelentős csökkenése korrelált a pSTAT3 csökkent expressziójával (Teng és mtsai., 2012). A calcein negatív sejtek 2%-nál kisebb

aránya szignifikánsan kisebb MAF értékeket eredményezett a 2%-nál nagyobb arányú calcein negatív sejtekhez képest. Ez nem meglepő. A calcein negativitás, és a MAF érték összefüggésben van. Tehát, a pumpafunkció statikus (calcein negatív sejtek száma), és dinamikus (verapamilos gátlás után végzett kalkuláció, MAF érték) vizsgálata hasonló eredményt hoz.

A többi vizsgálati eredmény azt mutatta, ami várható volt, és logikusan következik a betegek csoportjaiban. A kemoterápiás előkezelésbe részt vevő betegek grade-je nagyobb volt, hiszen pont azért kellett őket a műtét előtt kemoterápiával kezelni, hogy csökkenjen a gyors növekedésű erélyű daganat mérete, invazivitása, szöveti infiltrációja. A kemoterápiás előkezelésben részesülők túlélése is rövidebb volt. Az ötféle kezelési stratégia illeszkedett a betegek stádiumához és daganatok malignitási fokához, így a csak műtéti kezeléssel kezelt betegek kisebb stage és grade besorolásúak voltak, ezért hosszabb ideig éltek. Hasonló vonatkozik a Masivet-kezelésre, ugyanis azok a betegek kapták ezt a gyógyszert, amelyek előrehaladottabb stádiumúak voltak, ill. nagyobb malignitású daganatos kórképben szenvedtek. A daganat recidívát tekintve érthető összefüggés, hogy szignifikánsan több grade 3 tumoros kutya recidivált a grade 1 és 2 tumorosokhoz képest, hiszen ezeknek a nagy malignitású daganatoknak a műtétjei eredménytelenebbek, ill. a kemoterápiás kezelések nem megfelelően hatnak rájuk. Ugyanez vonatkozik a stádiumra, amely annál előrehaladottabb daganatos állapotot mutat, minél malignusabb a daganat. A daganatok akkor voltak kevésbé előrehaladottak, amikor még nem kezeltük őket a műtét előtt kemoterápiával. Ez is érthető, hiszen a betegek előrehaladott volta miatt kaptak kemoterápiás előkezelést. Az alstádiumok is az előrehaladottságot mutatják. Hiszen az előrehaladottan daganatos betegek általános állapota is rosszabb. Vizsgálatunkban a stage I. és II., ill. a stage III. és IV. összevonásával találunk szignifikáns különbséget. ez is egyezik az irodalmi adatokkal (Warland és mtsai., 2014). Eredményeinkből is kiderült, hogy a grade-ing és stage-ing továbbra is megbízható információkat szolgáltatnak a hízósejtes tumorok prognózisáról.

Végezetül elmondhatjuk, hogy a MCT különböző grade besorolású formái alapvetően más jellegűek a membrántranszporter expressziót és működést tekintve, mint a lymphomák. A jelentősebb P-gp funkció a grade 1 MCT-knél tapasztalható, és a klinikailag megnyilvánuló terápiareszisztencia elsősorban nem a P-gp funkcióval függ össze. A mastocytomák hasonlóan viselkednek, mint pl. a colorectalis tumorok: nagy P-gp expresszió nem jellemző a kifejezetten malignus esetekre, ugyanakkor a jóindulatú tumorokban (polipokban) és a normális epitheliumban nagy P-gp expresszió tapasztalható (Ikeguchi és

mtsai., 1995). Az emlőtumorokhoz képest eltérően viselkednek, ugyanis az emlőtumorok esetében a P-gp-t kódoló MDR1 gén fokozott expressziója összefüggésben van a metasztatikus potenciállal (Raguz és mtsai., 2004). További vizsgálatok szükségesek, hogy a P-gp-nek van-e egyáltalán szerepe a mastocytomák terápia rezisztenciájában, azonban, ha van, akkor biztosan a grade 3, esetleg a grade 2 tumorok esetében érdemes vizsgálni.

Összefoglalás

A hízósejtes tumor (mast cell tumor, MCT) a leggyakoribb bőrtumor kutyákban (prevalencia 0,27%, 129-265/100,000 kutya). Ezek esetében az elsődlegesen választandó terápia többnyire a műtéti excisio. Továbbá alkalmazható kemoterápiás protokoll (vinblastin, prednisolon) és a c-kit gén mutációjakor az elsődlegesen választandó szerek a tirozin-kináz inhibitorok (TKI). Azonban a kezeléseknél használt gyógyszerekkel szembeni rezisztencia esetenként kialakulhat. A rezisztencia kialakulásának hátterében leggyakrabban az MDR1-géneken kifejeződő P170-glükoprotein fokozott szintetizálása áll. A protonpumpák ATP-ben tárolt energia felhasználásával képesek a különböző P-gp szubsztrát kemoterápiás szereket (pl. vinblastin) az extracelluláris térbe juttatni. Kutatásunk célja az volt, hogy megállapítsuk, a P-gp funkcionális vizsgálatából nyerhető paraméterek megbízhatóan használhatók-e a kutyák mastocytomájának prognosztikájában.

Kutatásunkban 23 kutya daganatából nyert tumorsejtek felhasználásával elvégeztük a calcein-assay-t. Ez alapján kiszámoltuk az efflux pumpával rendelkező calcein negatív és a pumpa nélküli calcein pozitív sejtek számát, és a multidrog rezisztencia aktivitási faktort (MAF). Retrospektív vizsgálatomban a MAF-on kívül számos más paramétert vizsgáltam, amelyek összehasonlítása szükséges lehet a folyamatok megértése szempontjából.

Negatív korrelációt találtunk a betegek teljes túlélési ideje (overall survival time, OST), továbbá a relapszus mentes túlélési ideje (relapse free period, RFP) és a kemoterápiás előkezelés tekintetében ($r = -0,53$ és $r = -0,52$, $p < 0,05$). Tovább éltek azok a betegek, amelyeknél nem volt szükség előkezelésre és szignifikánsan hosszabb volt az RFP is ($p = 0,0427$). Súlyossági szempontú besorolás, stage III, IV., valamint a szövettani (Patnaik-féle) malignitási fok alapján a grade 3-as betegeknek, továbbá a 10 éven felüli kutyáknak szignifikánsan rövidebbek voltak az RFP és OST értékei ($p < 0,05$). Azonban a calcein pozitív (efflux pumpával nem rendelkező) sejtek száma szignifikánsan pozitív korrelációt mutatott a kemoterápiás előkezeléssel ($r = 0,41$), azokkal, amelyek már recidiváltak ($r = 0,35$), és a malignitási fokkal ($r = 0,38$). A MAF érték tekintetében negatív korrelációt találtunk, a kemoterápiás előkezelés csoportban ($r = -0,47$). Eredményeink alapján elmondható, hogy a MAF nem egyértelműen úgy használható a kutyák MCT prognosztikájában, ahogy vártuk, ugyanis azok a betegek éltek tovább, akiknél kevés volt a calcein negatív sejt, viszont magas volt a MAF érték. Valószínűnek tartjuk, hogy a kemoterápiás előkezelés, pl. a TKI alkalmazása csökkenti a P-gp-mediálta rezisztenciát, és a hízósejtek más rezisztencia mechanizmusokat alkalmaznak a gyógyszerek hatásának gátlására (pl. CYP450 rendszert).

Summary

Mast cell tumors (MCT) are the most common skin tumours in dogs (prevalence 0.27%, 129-265/100.000 dogs). Surgical excision is mostly the first choice of the treatment options. Besides, chemotherapy protocol (vinblastin, prednisolon) can be also used and in case of mutation in the c-kit, the first choice of the treatment is tyrosine kinase inhibitors (TKI). However resistance can occur against drugs used in the therapy. One of the most common reasons of resistance is the overexpression of P170-glycoprotein, also known as MDR1. Some tumour cells with protonpumps use ATP-hydrolysis to release P-gp substrate drugs (for example vinblastin) to the extracellular space.

Our aim was to determine whether parameters calculated from the functional examination of Pgp are reliable prognostic factors of canine mastocytoma.

Tumor cells were extracted from MCT of twenty three dogs and calcein-assay was used. Based on this assay, the numbers of cells with efflux pumps also known calcein negative cells and cells without pumps, calcein positive cells, were counted finally the multidrug resistance activaty factor (MAF) was determined. In this retrospective study several other parameters were compaired to each other for better understanding the MCT mechanisms.

Negative correlation was found between the overall survival time (OST), relaps free period (RFP) of the patients and the chemotherapy pre-treatment ($r = -0.53$ and $r = -0.52$, $p < 0.05$). Patients without chemotherapy pre-treatment lived longer and their relaps free period was significantly longer ($p = 0.0427$). Based on clinical stage category, stage III., IV., histologic (Patnaik) malignant grade, grade III. patients and dogs older than 10 years had significantly shorter OST and RFP value ($p < 0.05$). However, the numbers of calcein positive cells (cells without efflux pumps) showed significantly positive correlation with patients got chemotherapy pre-treatment ($r = 0.41$), with those who had tumour recurrence ($r = 0.35$) and with malignant grade ($r = 0.38$). In case of the MAF values negative correlation was found in the group of chemotherapy pre-treatment ($r = -0.47$).

Based on our results we can establish that multidrug resistance activaty factor (MAF) can not be used in that way we thought in the prognoses of the canine mastocytoma, because patients with less calcein negativ cells lived longer against their high MAF values. Chemotherapy pre-treatment, such as TKI's reduce P-gp-mediated resistance and mast cells develop other resistance mechanizms to deactivate the effect of drugs.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani **Dr. Vajdovich Péter** témavezetőmnek, a TDK dolgozatomban nyújtott segítségéért. Végtelen türelemmel viseltetett irántam és a kezdetektől fogva kitartóan támogatott munkám során. Hálás vagyok, amiért Vele dolgozhattam és Tőle tanulhattam.

Hálás köszönet illeti **Karai Edina** témavezetőmet, akinek a lelkiismeretes munkája, segítése, jó meglátásai, szüntelen támogatása, türelme, figyelmessége, kedvessége nélkül ez a dolgozat sosem születhetett volna meg.

Szeretnék köszönetet mondani az Á.H.O.K. Kft. csapatának a segítségükért, türelmükért és együttműködésükért.

Köszönöm barátaimnak, édesapámnak, édesanyámnak, nővéremnek, hogy folyamatosan biztattak, érdeklődtek és mindvégig támogattak. Nagy szerepük volt a dolgozat sikeres elkészülésében.

Irodalomjegyzék

- Blackwood, L., Murphy, S., Buracco, P., De Vos, J. P., De Fornel-Thibaud, P., Hirschberger, J., Argyle, D. J. (2012): European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10(3), e1–e29.
- Bostock, D. E. (1973): The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *The Journal of Small Animal Practice*, 14(1), 27–41.
- Bostock, D. E. (1986): Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *The British Veterinary Journal*, 142(1), 1–19.
- Daniel, J., Barra, C. N., Pulz, L. H., Kleeb, S. R., Xavier, J. G., Catão-Dias J. L., Nishiya A. T., Fukumasu H., Strefezzi, R. F. (2019): Intratumoral collagen index predicts mortality and survival in canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Dermatology*, 30(2), 162–e48.
- Davies, D. R., Wyatt, K. M., Jardine, J. E., Robertson, I. D., Irwin, P. J. (2004): Vinblastine and prednisolone as adjunctive therapy for canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40(2), 124–130.
- Dank, G. (2016): Review of the Treatment of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Israel Journal of Veterinary Medicine - Vol. 71 - N°2*.
- Gil da Costa, R. M. (2015): C-kit as a prognostic and therapeutic marker in canine cutaneous mast cell tumours: From laboratory to clinic. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 205(1), 5–10.
- Holló, Z., Homolya, L., Davis, C. W., Sarkadi, B. (1994): Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1191(2), 384–388.
- Hosoya, K., Kisseberth, W. C., Alvarez, F. J., Lara-Garcia, A., Beamer, G., Stromberg, P. C., Couto, C. G. (2009): Adjuvant CCNU (lomustine) and prednisone chemotherapy for dogs with incompletely excised grade 2 mast cell tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 45(1), 14–18.
- Ikeguchi, M., Shirai, H., Kaibara, N., Ito, H. (1995): Expression of p-glycoprotein in the normal colorectal epithelium and in colorectal-carcinoma. *International Journal of Oncology*, 7(2), 319–324.
- Karai E. (2016): Kutya limfómák drog rezisztenciájának kialakulása. Elérési forrás: <http://www.huveta.hu/handle/10832/1647>
- Kiupel, M., Webster, J. D., Bailey, K. L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C. J., Fitzgerald S. D., Gamble D., Ginn P. E., Goldschmidt M. H., Hendrick M. J., Howerth E. W., Janovitz E. B., Langohr I., Lenz S. D., Lipscomb T. P., Miller M. A., Misdorp W., Moroff S., Mullaney T. P., Neyens I., O'Toole D., Ramos-Vara J., Scase T. J., Schulman F. Y., Sledge D., Smedley R. C., Smith K., Snyder P. W., Southorn E., Stedman N. L., Steficek B. A., Stromberg P. C., Valli V. E., Weisbrode S. E., Yager J., Heller J., Miller, R. (2011): Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology*, 48(1), 147–155.
- Kiupel, M., Webster, J. D., Miller, R. A., Kaneene, J. B. (2005): Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 52(6), 280–286.
- Lee, J.-Y., Rosenbaum, D. M. (2017): Transporters Revealed. *Cell*, 168(6), 951–953.
- Letard, S., Yang, Y., Hanssens, K., Palmérini, F., Leventhal, P. S., Guéry, S., Moussy A., Kinet J-P., Hermine O., Dubreuil, P. (2008): Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Molecular Cancer Research: MCR*, 6(7), 1137–1145.
- Marconato, L., Bettini, G., Giacoboni, C., Romanelli, G., Cesari, A., Zatelli, A., Zini, E. (2008): Clinicopathological features and outcome for dogs with mast cell tumors and bone marrow involvement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), 1001–1007.
- McNiel, E. A., Prink, A. L., O'Brien, T. D. (2006): Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 4(1), 2–8.
- Miyoshi, N., Tojo, E., Oishi, A., Fujiki, M., Misumi, K., Sakamoto, H., Kameyama K., Shimizu T., Yasuda, N. (2002): Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64(6), 531–533.

- Nakano, Y., Kobayashi, M., Bonkobara, M., Takanosu, M. (2017): Identification of a secondary mutation in the KIT kinase domain correlated with imatinib-resistance in a canine mast cell tumor. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 188, 84–88.
- Ohmori, K., Kawarai, S., Yasuda, N., Tanaka, A., Matsuda, H., Nishimura, R., Sasaki N., Tsujimoto H., Masuda, K. (2008): Identification of c-kit mutations-independent neoplastic cell proliferation of canine mast cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126(1–2), 43–53.
- Özvegy-Laczka, C., Cserepes, J., Elkind, N. B., Sarkadi, B. (2005): Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: Role of ABC multidrug transporters. *Drug Resistance Updates*, 8(1), 15–26.
- Patnaik, A. K., Ehler, W. J., MacEwen, E. G. (1984): Canine cutaneous mast cell tumor: Morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology*, 21(5), 469–474.
- Preziosi, R., Morini, M., Sarli, G. (2004): Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 16(6), 554–561.
- Raguz, S., Tamburo De Bella, M., Tripuraneni, G., Slade, M. J., Higgins, C. F., Coombes, R. C., Yagüe, E. (2004): Activation of the MDR1 upstream promoter in breast carcinoma as a surrogate for metastatic invasion. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(8), 2776–2783.
- Rodriguez, S., Fadlalla, K., Graham, T., Tameru, B., Fermin, C. D., Samuel, T. (2012): Immunohistochemical Evaluation of AKT Protein Activation in Canine Mast Cell Tumours. *Journal of comparative pathology*, 147(2–3), 171–176.
- Sabattini, S., Scarpa, F., Berlato, D., Bettini, G. (2015): Histologic grading of canine mast cell tumor: Is 2 better than 3? *Veterinary Pathology*, 52(1), 70–73.
- Scarpa, F., Sabattini, S., Marconato, L., Capitani, O., Morini, M., Bettini, G. (2012): Use of histologic margin evaluation to predict recurrence of cutaneous malignant tumors in dogs and cats after surgical excision. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240(10), 1181–1187.
- Shoop, S. J., Marlow, S., Church, D. B., English, K., McGreevy, P. D., Stell, A. J., Thomson P. C., O'Neill D. G., Brodbelt, D. C. (2015): Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. *Canine Genetics and Epidemiology*, 2, 1.
- Stanclift, R. M., Gilson, S. D. (2008): Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(1), 53–62.
- Takeuchi, Y., Fujino, Y., Watanabe, M., Takahashi, M., Nakagawa, T., Takeuchi, A., Bonkobara M., Koboyashi T., Ohno K., Uchida K., Asano K., Nishimura R., Nakayama H., Sugano S., Ohashy J., Tsujimoto, H. (2013): Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 196(3), 492–498.
- Teng, S.-P., Hsu, W.-L., Chiu, C.-Y., Wong, M.-L., Chang, S.-C. (2012): Overexpression of P-glycoprotein, STAT3, phospho-STAT3 and KIT in spontaneous canine cutaneous mast cell tumours before and after prednisolone treatment. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 193(2), 551–556.
- Thamm, D. H., Turek, M. M., Vail, D. M. (2006): Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 68(6), 581–587.
- Warland, J., Amores-Fuster, I., Newbury, W., Brearley, M., Dobson, J. (2014): The utility of staging in canine mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 12(4), 287–298.
- Warland, James, Dobson, J. (2013): Breed predispositions in canine mast cell tumour: A single centre experience in the United Kingdom. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 197(2), 496–498.
- Withrow, S. J., Vail, D. M., Page, R. L. (2013): *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology* (5th edition). St. Louis, Missouri: Elsevier. 335-346.
- Zandvliet, M., Teske, E. (2015): Mechanisms of Drug Resistance in Veterinary Oncology- A Review with an Emphasis on Canine Lymphoma. *Veterinary Sciences*, 2(3), 150–184.

HuVetA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Kórik Csilla

Elérhetőség (e-mail cím): korikcsilla97@gmail.com

A feltöltendő mű címe:

Kutyák mastocytomájának terápiaerezisztencia vizsgálata áramlás citometriai funkcionális teszt alkalmazásával

A mű megjelenési adatai: TDK dolgozat

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 másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, 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 címekre) 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 HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2019. év 10. hó 22. nap



aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutjra 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.*

NYILATKOZAT

Alulírott KÓRIK CSILLA nyilatkozom, hogy diplomamunkám,
melynek címe KUTYK MASTOCYTOMÁJÁNAK TERÁPIAREZISZTENCIA
VIZSGÁLATA ÁRAMLÁS CITOMETRIAI FUNKCIONÁLIS TEST ALKALMAZÁSÁVAL
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2019.
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2020. 11. 16.

Kórik Csilla

a hallgató neve és aláírása