

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Kórjelző mutatók és prognosztikai faktorok vizsgálata
kutyák daganatos betegségeiben

PhD-értekezés

dr. Koltai Zsófia

2020

Témavezető:

.....

dr. Vajdovich Péter

Állatorvostudományi Egyetem

Kórélettani és Onkológiai Tanszék

Készült 8 példányban

Ez a számú példány

.....

dr. Koltai Zsófia

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
Összefoglalás.....	7
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	9
1.1. A vizsgált daganattípusok rövid ismertetése	9
1.1.1. Kutyák lymphomája.....	9
1.1.1.1. A lymphoma előfordulása	9
1.1.1.2. A lymphoma stádiumba sorolása	10
1.1.1.3. Szöveti típusok, immunfenotípus	10
1.1.2. Kutyák emlődaganatai	12
1.1.2.1. Az emlődaganatok előfordulása	12
1.1.2.2. Az emlődaganatok stádiumba sorolása	13
1.1.2.3. Szöveti klasszifikáció	14
1.1.2.4. Grading-rendszer	15
1.2. P-glycoprotein (Pgp) és multidrog rezisztencia (MDR).....	17
1.2.1. Pgp kutyák lymphomájában.....	21
1.2.2. Pgp kutyák emlődaganataiban	22
1.3. A p53 tumorszupresszor fehérje	23
1.4. Ciklooxigenázok.....	25
1.4.1. A COX-2 szerepe a tumorigenezisben	25
1.4.2. COX-2-expresszió emlődaganatok esetén.....	27
1.5. Tirozin-kinázok	29
1.5.1. Tirozin-kinázok szabályozási zavara a daganatos sejtekben	30
1.5.2. Tirozin-kinázok szabályozási zavara kutyák emlődaganatai esetén.....	32
1.6. Célkitűzések	35
2. Anyag és módszer	37
2.1. A Pgp-expresszió vizsgálata kutyák lymphomája esetén	37
2.1.1. A vizsgálatokban szereplő állatok.....	37
2.1.2. Az alkalmazott kemoterápiás protokollok leírása	37
2.1.3. A mellékhatások kiértékelése	38
2.1.4. Szöveti vizsgálatok, immunfenotípus-meghatározás, grading	38
2.1.5. A Pgp kimutatása immunhisztokémiai vizsgálattal	38
2.1.6. Statisztikai módszerek	41
2.2. A Pgp- és a p53-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén.....	44
2.2.1. A vizsgálatokban szereplő állatok.....	44
2.2.2. A p53 kimutatása immunhisztokémiai vizsgálattal.....	44
2.2.3. A Pgp kimutatása immunhisztokémiai vizsgálattal	45
2.2.4. A különböző klinikai paraméterek vizsgálata	45
2.2.5. Statisztikai analízis	46
2.3. A COX-2-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén.....	47
2.3.1. A vizsgálatokban szereplő állatok.....	47
2.3.2. A COX-2 kimutatása immunhisztokémiai vizsgálattal	48
2.3.3. A különböző klinikai paraméterek vizsgálata	49
2.3.4. Statisztikai analízis	49
2.4. Tirozin-kinázok vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén	51
2.4.1. A vizsgálatokban szereplő állatok.....	51
2.4.2. Tirozin-kinázok kimutatása rt-PCR módszerrel	51
2.4.3. Statisztikai analízis	52
3. Eredmények.....	54
3.1. A Pgp-expresszió vizsgálata kutyák lymphomája esetén	54

3.2. A Pgp- és a p53-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén.....	61
3.2.1. Pgp- és p53-expresszió az egészséges, illetve a daganatos emlőszövetben	61
3.2.2. A Pgp- és a p53-expresszió összefüggése különböző klinikai paraméterekkel	69
3.3. A COX-2-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén.....	75
3.3.1. A COX-2-expressziók megjelenése	75
3.3.2. Különböző klinikai paraméterek és a COX-2-expresszióval való kapcsolatuk vizsgálata	77
3.3.3. Az adjuváns kezelés hatásának vizsgálata.....	89
3.3.4. A stádiumbasorolás és a túlélés kapcsolata	94
3.4. A tirozin-kinázok vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén.....	96
4. Megbeszélés.....	101
4.1. A Pgp-expresszió vizsgálata kutyák lymphomája esetén	101
4.2. Pgp- és p53-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén	107
4.2.1. Pgp- és p53-expresszió az egészséges, illetve a daganatos emlőszövetben	107
4.2.2. A Pgp- és a p53-expresszió összefüggése különböző klinikai paraméterekkel	109
4.3. COX-2-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén	111
4.3.1. A COX-2-expressziók megjelenése	111
4.3.2. Különböző klinikai paraméterek és a COX-2-expresszióval való kapcsolatuk vizsgálata	112
4.3.3. Az adjuváns kezelés hatásának vizsgálata.....	116
4.3.4. A stádiumbasorolás és a túlélés kapcsolata	117
4.4. Tirozin-kinázok vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén	120
5. Új tudományos eredmények.....	123
6. Irodalomjegyzék	124
7. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények.....	142
7.1. Lektorált, impakt faktoral rendelkező tudományos folyóiratban megjelent publikációk	142
7.2. Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk.....	142
7.3. Konferencia prezentációk.....	143
8. A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk.....	144
8.1. Lektorált, impakt faktoral rendelkező tudományos folyóiratban megjelent publikációk	144
8.2. Konferencia prezentációk	144
9. Köszönetnyilvánítás.....	145

Rövidítések jegyzéke

- ABC: ATP-kötő kazetta (ATP-binding cassette)
- ALK: anaplasztikus lymphoma kináz (anaplastic lymphoma kinase)
- BCRP: emlőrák-rezisztencia fehérje (breast cancer resistance protein)
- bFGF: bázikus fibroblaszt növekedési faktor (basic fibroblast growth factor)
- COPA-protokoll: Cytoxan (ciklofoszfamid), Oncovine (vincristin), Prednisolon, Adriblastina (doxorubicin)-protokoll
- COX-2: ciklooxygenáz-2
- EGF: hámeredetű növekedési faktor (epithelial growth factor)
- EGFR: hámeredetű növekedési faktor receptor (epithelial growth factor receptor)
- EPHR: Erythropoietin-termelő humán hepatocelluláris receptor (erythropoietin-producing human hepatocellular receptor)
- FGF: fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)
- FGFR: fibroblaszt növekedési faktor receptor (fibroblast growth factor receptor)
- FLT3: fms-szerű tirozin-kináz 3 (fms like tyrosine kinase 3)
- GIST: gastrointesztinális sztróma tumor (gastrointestinal stromal tumor)
- HER-2: humán epidermális növekedési faktor receptor 2, (human epidermal growth factor receptor 2), másnéven ErbB2
- HGF: hepatocita növekedési faktor (hepatocyte growth factor)
- HGFR: hepatocita növekedési faktor receptor (hepatocyte growth factor receptor), másnéven c-met
- HPRT: Hipoxantin-guanin-foszforibozil transzferáz
- IGF: inzulin-szerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
- LRP: tüdőrezisztencia fehérje (lung resistance associated protein)
- MDR: multidrog rezisztencia (multidrug resistance)
- MRP: multidrogrezisztencia-asszociált fehérje (multidrug resistance associated protein)
- MW-protokoll: Madison-Wisconsin-protokoll (vincristin, ciklofoszfamid, doxorubicin, prednisolone, L-asparaginase)
- NGF: neuronális növekedési faktor (neuronal growth factor)
- NGFR: neuronális növekedési faktor receptor (neuronal growth factor receptor)
- NK-sejtek: természetes ölősejtek (natural killer sejtek)
- NSAID: nemszteroid gyulladáscsökkentők (nonsteroidal anti-inflammatory drugs)
- OST: teljes túlélési idő (overall survival time)
- OHE: ovariohisterektómia
- PBS: foszfát pufferes sóoldat (phosphate buffered saline)

PCNA: proliferációs sejtmag antigén (proliferating cell nuclear antigen)
PCR: polimeráz-lánreakció (polymerase chain reaction)
PDGF: thrombocyta eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
PDGFR: thrombocyta eredetű növekedési faktor receptor (platelet-derived growth factor receptor)
PGD2: prosztaglandin D2
PGE2: prosztaglandin E2
PGES: prosztaglandin-E szintetáz
PGF2 α : prosztaglandin F2 α
PGG2: prosztaglandin G2
PGH2: prosztaglandin H2
PGI2: prosztaglandin I2
Pgp: P-glycoprotein
RFP: recidívamentes periódus (relapse-free period)
RTK: receptor tirozin-kináz
ROC: receiver operating characteristic
S-ABC: streptavidin-biotin-peroxidáz komplex
SCF: őssejt faktor (stem cell factor), másnéven KIT-ligand
SCGFR: őssejt növekedési faktor receptor (stem cell growth factor receptor), másnéven KIT
TGF: transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)
Tie: immunglobulin és EGF-szerű doménokat tartalmazó tirozin kináz (tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains)
TXA2: thromboxán A2
VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
VEGFR: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor (vascular endothelial growth factor receptor)

Összefoglalás

A lymphomák és az emlődaganatok a kutyák leggyakoribb daganattípusai közé tartoznak. A terápiaerezisztencia különösen nagy jelentőségű klinikai faktor, főként a nyirokszervi daganatok esetén, mivel döntően ez felelős a kemoterapiás kezelés kudarcáért. A multidrog rezisztencia (MDR) egyik fő kiváltó faktora egy ATP-függő pumpafehérje, a P-glycoprotein (Pgp). 33 lymphomás kutya kezelésének megkezdése előtti nyirokcsomómintájának vizsgálatával megerősítettük az emelkedett Pgp-expresszió negatív prognosztikai értékét. 35%-os cut-off érték meghatározásával validáltuk az általunk használt festési módszert, így a Pgp-immunhisztokémia erős diagnosztikai értékkel rendelkezett, markáns különbséget jelzett mind a teljes, mind a recidívamentes túlélésben és még a kezelés megkezdése előtt alkalmas volt a terápiaerezisztencia előrejelzésére. Megerősítettük a Pgp-festődési intenzitás prognosztikus értékét is. A Pgp-expresszió kiértékelése ugyanakkor csak a daganatsejtek terápiaerezisztenciájáról adott releváns információt, nem pedig az egész állat terápia válaszáról (különös tekintettel a kemoterápia során kialakult mellékhatásokra).

Célkitűzéseink között szerepelt az emlődaganatok terápiaerezisztenciáját okozó faktorok vizsgálata mellett számos humán onkológiából ismert faktor prognosztikai értékének meghatározása, valamint lehetséges új terápia célpontok azonosítása is. Jelenleg kutyák high-grade emlőtumori esetén a betegek adjuváns kezelése nem megoldott, mivel ezek a daganatok nem reagálnak megfelelően a hagyományos citosztatikus kezelésre. 30 emlődaganatos minta Pgp-expressziójának immunhisztokémiai vizsgálatával megerősítettük az MDR kialakulásában betöltött szerepét kutyák esetében is, részben magyarázva ezzel a daganattípus kemoterápiaerezisztenciáját. Leírtuk, hogy az emelkedett Pgp-expresszió emlődaganatok esetén is negatív prognosztikai faktor függetlenül a szövettani típustól, mivel csökkent túlélési idővel és magasabb recidívára való hajlammal jár együtt. Ugyanezeknek a mintáknak a p53-expresszióját is vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel. Megállapítottuk, hogy a Pgp- és a p53-expresszió mértéke egymással összefügg, vagyis a terápiaerezisztenciát okozó fehérjék és a mutációt mutató p53 fokozott expressziója hasonló mértékben jelzi a rosszabb prognózist, de p53-immunhisztokémia önmagában nem rendelkezik megfelelő prediktív értékkel.

42 kutyából származó emlődaganatos minta COX-2-expresszióját vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel. Az eredményeink megerősítették azt az irodalmi adatot, hogy a malignus emlődaganatok COX-2-expressziója a benignusakénál jelentősebb. Vizsgálataink megerősítették, hogy az emelkedett COX-2-expresszió negatív prognosztikai faktor, 50%-os cut-off érték meghatározásával pedig szignifikáns és markáns különbséget találtunk a túlélésben és a recidívamentes periódusban. Detektáltuk a COX-2 emelkedett expresszióját

kutyák előrehaladott és nagyméretű emlődaganatai esetén, valamint egyértelmű összefüggést találtunk a COX-2-expresszió és a tumorméret között. Tendenciájában igazoltuk az emelkedett expresszió és a rosszabb klinikai kimenetel (csökkent teljes és recidívamentes túlélési idő), valamint a malignitás foka közötti összefüggést. Ezekből következően a NSAID-ok (különös tekintettel a szelektív COX-2 gátlókra) a jövőben fontos szerepet tölthetnek majd be a kutyák rosszindulatú emlődaganatainak kiegészítő terápiájában, hatványozottan igaz ez a magas COX-2-expressziót mutató high-grade formákra. Ez utóbbit a firocoxib pozitív terápiás hatásának megerősítésével nekünk is sikerült igazolni. Különösen jelentős ez annak ismeretében, hogy ezeknek a daganatoknak a kemoterápiarezisztenciája miatt eddig nem állt rendelkezésre kellően hatékony adjuváns kezelési mód.

Céljaink között szerepelt a tumorgenezisben szerepet játszó tirozin-kinázok vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén és ezáltal új, jövőbeli terápiás célpontok azonosítása. Humán emlődaganatok esetében régóta ismert tény bizonyos receptor tirozin-kinázok diszregulációja és fokozott expressziója. Ezek közül legismertebb a tumorgenezisben is szereplő HER-2 (ErbB2), amely az emlőrákok 20–30%-ában megtalálható és negatív prognosztikai faktorként rövidebb túléléssel jár. Ennek célzott gátlása emberek esetén a rutin terápia része. Mi a következő tirozin-kinázokat, valamint a VEGF-et detektáltuk realtime PCR eljárás segítségével: VEGFR1, VEGFR2, EGFR, ErbB2 (HER-2), PDGFR α , KIT, illetve MET. Megállapítottuk, hogy a felsorolt faktorok mindegyike szignifikánsan magasabb mennyiségben van jelen a daganatos emlőszövetben, mint ugyanazon egyed egészséges emlőjében. Vizsgálataink megerősítették azt a tényt, hogy az onkogén tirozin-kinázok fontos szerepet játszanak a daganat növekedésben, proliferációban, angiogenezisben és metasztázisképzésben. Kutyák esetében elsőként mutattuk be a tirozin-kinázok komplex és szimultán szabályozási zavarát, nem csak egyetlen receptor, hanem gének sokaságának érintettsége révén. Eredményeink igazolták azt is, hogy a jövőben az emlődaganatok gyógykezelésekor figyelembe kell venni a tirozin-kinázok potenciális diszregulációját és a hatékony terápia tervezéséhez szükséges lehet ezek szintjének mérése, majd azok célzott gátlása.

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. A vizsgált daganattípusok rövid ismertetése

1.1.1. Kutyák lymphomája

1.1.1.1. A lymphoma előfordulása

A lymphoma a kutyák körében a leggyakrabban előforduló haematopoieticus daganattípus, melynek gyakorisága a hazai kutyapopulációban az utóbbi évek során folyamatosan nőtt. A kutyák összes daganatos betegségének 7–24%-át, haematopoieticus tumoraiknak pedig 83%-át teszi ki, incidenciája 20–100/100000 kutya (Zandvliet és Teske, 2015; Vail és mtsai., 2019).

Bár ez a kórkép gyakran az idősebb (> 9 év) korosztálynál fordul elő, elvileg minden életkorban és bármely ivarú, illetve fajtájú egyedben kialakulhat (Vail és mtsai., 2019). Az incidencia az életkor előrehaladtával nő: 1 éves kor alatt 1,5/100000, míg 10 éves kor felett 84/100000 kutya. Közepes/nagytestű kutyák esetében a kialakulási valószínűsége nagyobb és néhány fajta esetén (pl. rottweiler, bullmasztiff) familiáris halmozódást is leírtak (Zandvliet, 2015). Kialakulásának hátterében a fiatal, blasztos transzformációt mutató lymphoid sejtek proliferációja áll, amely a nyirokcsomókban, illetve egyes viscerális szervekben okozhat elváltozásokat (Vail és mtsai., 2019). Kutyákban az említett kórkép az emberek közepes vagy nagy malignitású (medium-, illetve high-grade) non-Hodgkin-típusú lymphomájával mutat hasonlóságot (Vail és mtsai., 2019; Zandvliet, 2015). A leggyakoribb a perifériás nyirokcsomókban mutató ún. multicentrikus forma (az esetek kb. 75%-a), amely kezdetben jellemzően a fejkörnyéki (submandibuláris és retropharyngealis) nyirokcsomókban okoz elváltozásokat (magnagyobbodást), de potenciálisan bármely nyirokcsomót, nyirokszervet érinthet. Ebben az esetben általában a perifériás nyirokcsomók több helyen, sőt gyakran testszerte tapasztalható magnagyobbodását észleljük. Ismert a kórkép alimentáris formája is (7%-ban), ilyenkor a belekben, a mesenterialis nyirokcsomókban és/vagy a májban találunk elváltozásokat. Ezen kívül létezik bőrre terjedő (6%-ban), mediastinalis (3%-ban), illetőleg a lépforma (0,5%) is. Ha a viscerális szervekben (pl. a lépben, a májban) és a mesenterialis, illetve a mediastinalis nyirokcsomókban is van elváltozás, akkor generalizált formáról beszélünk. A betegség ritkán megjelenhet extranodálisan még más szervekben is, így pl. a

központi idegrendszerben, a csontokban, a szívben, az orrüregben, a szemben és a vesében (Vail és mtsai., 2019; Zandvliet, 2016).

A lymphoma gyógykezelésének alapját kutyák esetében a citosztatikumok képezik, a terápiás kudarc legfőbb oka pedig a kemoterápiás szerekkel szemben kialakuló gyógyszerrezisztencia, ami az esetek többségében a páciens korai halálához vezet.

1.1.1.2. A lymphoma stádiumba sorolása

A WHO (TNM Classification of Tumors in Domestic Animals, Geneva, 1980.) ajánlása alapján kutyák lymphomájának a stádiumbesorolása a következő:

I.: egy nyirokcsomót érintő elváltozás,

II.: egy azonos régióba tartozó több nyirokcsomót érintő elváltozás,

III.: generalizált nyirokcsomó-duzzanat,

IV.: a lép és/vagy a máj érintettsége (a III. stádium fennállása vagy nem megléte mellett),

V.: a csontvelő érintettsége vagy a vérben daganatsejtek megjelenése és/vagy bármely nem lymphoid szerv érintettsége.

Mindezeken túl alstádiumok is meghatározhatók: „a”-val jelölik azt az alstádiumot, amelyben nem jelentkeznek a betegséggel szoros összefüggésben lévő állapotromlással, étvágytalansággal, lesoványodással, kedvetlenséggel, dyspnoevel, anaemiával stb. járó tünetek, „b”-vel pedig, amikor már ezek a tünetek is megfigyelhetők (Vail és mtsai., 2019).

1.1.1.3. Szöveti típusok, immunfenotípus

A nagy malignitású (ún. high-grade) formák közé tartozik többek között a diffúz nagy B-sejtes, a B-lymphoblastos és a T-lymphoblastos lymphoma. Kutyákban ezek a gyakoribbak (70,5–74%). A folliculáris, a T-zóna, illetve a lymphoplasmocytomás alakokat az alacsony malignitású (ún. low-grade) formák közé soroljuk. Kutyákban ezek ritkábbak, az esetek 26–29,5%-ában fordulnak elő (Valli és mtsai., 2011, 2013). Ezenkívül a daganatsejtek CD3, CD8, CD20, CD21 és CD79a felületi markereinek meglétének immunhisztokémiai vizsgálatával történő immunfenotípus-meghatározás is a diagnosztika részét képezi. Általánosságban elmondható az is, hogy a T-sejt-eredetű lymphomák ritkábbak, mint a B-sejtekből kiindulók (ez utóbbi az esetek 62–90%-a) (Vail és mtsai., 2019; Valli és mtsai., 2011, 2013).

A kutyák lymphomáinak aktuális szövettani klasszifikációja a következő (Valli, Bienzle, Meuten, 2017):

1. B-sejtes lymphomák

Precursor B-sejtes daganatok

- Precursor B-lymphoblastos leukaemia/lymphoma
- Érett (perifériás) B-sejtes daganatok
 - B-sejtes krónikus lymphocytás leukaemia/kis lymphocytás lymphoma
 - B-sejtes prolymphocytás leukaemia
 - Lymphoplasmacytás lymphoma
 - Plasmablastos lymphoma
 - Köpeny-sejtes lymphoma
 - Marginalis zóna lymphoma (nodalis, lép, MALT)
 - Folliculáris lymphoma
 - Diffúz nagy B-sejtes lymphoma
 - szubtípus: T-sejt gazdag diffúz nagy B-sejtes lymphoma
 - Angiocentricus B-sejtes lymphoma (lymphomatoid granulomatosis)
 - Burkitt's lymphoma/leukaemia
 - Burkitt's like high-grade B-sejtes lymphoma
 - Plasmasejtes myeloma
 - Plasmacytoma
- 2. T- és NK (natural killer, természetes ölüsejt)-sejtes lymphomák
 - Precursor T-sejtes daganatok
 - Precursor T-lymphoblastos lymphoma/leukaemia
 - Érett (perifériás) T-sejtes/NK-sejtes daganatok
 - T-sejtes krónikus lymphocytás leukaemia/kis sejtes lymphoma
 - T-sejtes prolymphocytás leukaemia
 - Nagy granuláris lymphocytás leukaemia/lymphoma (LGL)
 - Máshová be nem sorolt perifériás T-sejtes lymphomák (PTCL-NOS), szubtípusok:
 - Mycosis fungoides és Sézary szindróma
 - T-zóna lymphoma
 - Angioimmunoblastos T-sejtes lymphoma
 - Angiocentricus (v. intravasculáris) T-sejtes lymphoma
 - Hepatosplenic és hepatocytotroph lymphoma
 - Intestinalis T-sejtes lymphoma
 - Subcutan panniculitis-like T-sejtes lymphoma
 - Agresszív NK-sejtes leukaemia/lymphoma
 - (Adult T-sejtes leukaemia/lymphoma)
 - Anaplasticus nagy sejtes lymphoma (cutan és szisztémás)

1.1.2. Kutyák emlődaganatai

1.1.2.1. Az emlődaganatok előfordulása

Az emlőtumorok a nőstény kutyák leggyakoribb daganatai, az összes daganatos megbetegedéseik kb. 50%-t teszik ki, incidenciája 250/100000 kutya (Vascellari és mtsai. 2016; Sorenmo és mtsai., 2019). Az emlődaganatok 6 évnél fiatalabb kutyákban ritkák, az előfordulásuk valószínűsége az életkor előrehaladtával nő: a 8–13 év közötti szukák kb. 60%-ánál kialakul. A fajtatiszta kutyák rizikója nagyobb, mint a keverékeké, kifejezett fajtapredispozíciót találtak egyebek mellett a szamojédek, Yorkshire terrierek, dobermannok és schnauzerek esetén (Vascellari és mtsai., 2016). A tumor előfordulásának kockázatát jelentősen csökkenti a korai (első tüzelés előtt, illetve az azt követő) ivartalanítás, míg növeli a progesztagén injekciók ivarzás megelőzésére történő alkalmazása (Sorenmo és mtsai., 2019). A klinikai vizsgálat során egy vagy – az esetek több mint a felében – több csomót tapintunk az emlőben. A daganatok 65–70%-át a hátulsó (4.–5.) emlőtelepekben találjuk, feltehetően azért, mert itt nagyobb mennyiségű emlőszövet van jelen. Az emlődaganatok kb. 30%-a benignus, 70%-a malignus (Vascellari és mtsai., 2016). A jóindulatú tumorok általában aprók, jól körülhatárolhatók és tömör tapintatúak. A malignus daganatok rendszerint gyorsan növekednek, nehezen határolhatók körül, szorosan kapcsolódnak a bőrhöz vagy az alatta fekvő szövetekhez, gyakran társul hozzájuk gyulladással és fekélyesedésre is hajlamosak. Különösen rossz a prognózis az ún. gyulladással (inflammatory carcinoma) esetén, amelyek tömör tapintatúak és az emlőszövet diffúz gyulladását, valamint terimenövekedését okozzák, és végtagödémával is járhatnak. Az ilyen típusú daganatokat (a gyógykezelés szempontjából) fontos elkülöníteni a tejmirigy-gyulladástól, amely kisebb területre lokalizált folyamat, és legtöbbször álvemhesség vagy ivarzás esetén jelentkezik. A carcinomák gyakran képeznek áttétet az inguinalis nyirokcsomókba, amelyeken keresztül a pudendalis nyirokérhálózat közvetítésével a belső csípőtájéki (*lymphonodus iliaca interna*) nyirokcsomókban is áttétek jelenhetnek meg. Ez utóbbi nyirokcsomók megnagyobbodása vastagbélszűkületet okozhat. Az emlődaganatok általában a tüdőbe, májba, vesébe, csontokba adnak áttétet (Sorenmo és mtsai., 2019).

A fizikális vizsgálatkor a primer tumor prognosztikai megítélése során az alábbiakat kell figyelembe venni: gyors növekedés, az invazivitás klinikai jelei (bőrrel vagy pólyákkal való összefüggés), fekélyesedés, inflammatory carcinomára utaló tünetek jelenléte. Az emlődaganatok legtöbbször carcinomák, de sarcomák és kevert, vegyes szöveti eredetű daganatok is kialakulhatnak. A sarcomák prognózisa többnyire rossz (Sorenmo és mtsai., 2019).

Az emlődaganatok terápiája elsősorban sebészi, de a high-grade formák esetén azok magas metasztatikus potenciálja miatt adjuváns terápia is szükséges. Ennek ellenére jelenleg nem léteznek általánosan elfogadott és javasolható kemoterápiás protokollok. Ennek oka részben a rendelkezésre álló vizsgálati eredmények kis száma miatti alacsony evidenciaszint, másrészt pedig az emlődaganatok kemoterápia-rezisztenciája (Sorenmo és mtsai., 2019).

1.1.2.2. Az emlődaganatok stádiumba sorolása

A stádiumba sorolás célja a betegség pontosabb prognosztizálása. A stádium meghatározása fizikális vizsgálattal (emlőtelepek tapintása, tapintható nyirokcsomók vizsgálata), valamint kiegészítő vizsgálatokkal mint a 3 irányú mellkas röntgen, hasi UH vizsgálat történik.

TNM klasszifikáció kutyák emlőtumorai esetén (a gyulladós carcinoma kivételével, Sorenmo és mtsai., 2019):

T: primer tumor

T1: < 3 cm maximális átmérő

T2: 3–5 cm maximális átmérő

T3: > 5 cm maximális átmérő

N: regionális nyirokcsomó

N0: szövettanilag vagy citológiaiag áttét nem igazolható

N1: szövettanilag vagy citológiaiag igazolt áttét

M: távoli metasztázis

M0: távoli áttét nem igazolható

M1: igazolt távoli áttét

TNM stádiumokba sorolás:

I. stádium: T1, N0, M0

II. stádium: T2, N0, M0

III. stádium: T3, N0, M0

IV. stádium: bármely T, N1, M0

V. stádium: bármely T, bármely N, M1.

1.1.2.3. Szöveti klasszifikáció

A kutyák emlődaganatainak aktuális szövettani klasszifikációja (Zappulli és mtsai, 2019):

1. Malignus tumorok:

A. Malignus epithelialis daganatok

In situ carcinoma

Simplex carcinomák

Tubuláris cc. (benne a cribriform cc. is)

Tubulopapilláris cc.

Solid cc.

Invazív micropapilláris cc.

Comedocarcinoma

Anaplasztikus cc.

Nem-simplex carcinomák

Komplex adenomában v. benignus kevert tumorban kialakuló cc.

Komplex cc.

Carcinoma és malignus myoepithelioma

Kevert (mix) cc.

Ductus-asszociált carcinomák

Ductális cc.

Intraductális papilláris cc.

Speciális carcinomatípusok

Orsósejtes cc.

Laphám cc.

Adenosquamosus cc.

Mucinosus cc.

Zsír-dús (lipid-rich) cc.

Malignus myoepithelioma

Inflammatory cc.

B. Az emlő malignus mesenchymális eredetű neoplasmái

Osteosarcoma, chondrosarcoma, fibrosarcoma, haemangiosarcoma, egyéb sarcomák

C. Carcinosarcoma

2. Benignus neoplasmák:

A. Simplex benignus neoplasmák

Simplex adenoma

Myoepithelioma

B. Nem-simplex benignus neoplasmák

Komplex adenoma (s. adenomyoepithelioma)

Benignus kevert tumor

Fibroadenoma

C. Ductus asszociált benignus neoplasmák

Ductális adenoma (s. basaloid adenoma)

Intraductális papilláris adenoma (s. ductális papilloma)

3. Az emlő hyperplasiája/dysplasiája:

Ductectasia

Lobuláris hyperplasiák (s. adenosisok)

Epitheliosis

Papillomatosis

Fibroadenomatosus elváltozás

Gynecomastia

4. A csecsbimbó hyperplasticus, dysplasticus vagy neoplasticus elváltozásai

1.1.2.4. Grading-rendszer

A grading célja a szövettani malignitásfokozat megállapítása. Kutyák emlődaganatai esetén aktuálisan 3 fokozatú Grading-rendszert használunk, az egyes daganatok besorolása pontrendszer alapján történik. A pontozás szempontjait az 1. sz. táblázatban foglaltuk össze. 3–5 pont esetén a daganatot az alacsony malignitású Grade I (low-grade) csoportba, 6–7 pont esetén a közepes malignitású Grade II (intermediate-grade) csoportba, 8–9 pont esetén pedig a nagy malignitású Grade III (high-grade) csoportba soroljuk (Sorenmo és mtsai., 2019).

1.táblázat: Kutyák emlődaganatainak aktuális Grading-rendszerében használt szempontok és azok pontértékei (Sorenmo és mtsai., 2019.)

Tubulusképzés	Nukleáris polimorfizmus	Mitózisok száma 10 nagylátóterenként
Tubulusképzési hajlam a minta > 75%-ban: 1 pont	Egységes vagy kis sejtmagok, néhány nucleolus: 1 pont	0–9: 1 pont
Mérsékelt tubulusképzés (minta 10–75%-a) szolid daganatnövekedési területekkel keverve: 2 pont	Mérsékelt fokú variabilitás a nucleusok méretében és alakjában, hyperchromaticus sejtmagok, nucleolusok jelenléte (ezek közül néhány lehet prominens): 2 pont	10–19: 2 pont
Minimális tubulusképzési hajlam vagy a tubulusképzés hiánya (< 10%): 3 pont	Kifejezett variabilitás a sejtmagok méretében, hyperchromaticus sejtmagok egy vagy több prominens nucleolussal: 3 pont	> 19: 3 pont

1.2. P-glycoprotein (Pgp) és multidrog rezisztencia (MDR)

Régóta ismert tény, hogy bizonyos típusú daganatok esetén a citosztatikus terápia a tumorsejtek kialakuló vagy *ab ovo* rezisztenciája miatt nem kellően hatékony. Multidrog-rezisztenciának (MDR) nevezzük ezt a jelenséget, melynek lényege, hogy az adott szövetek vagy sejtek nem reagálnak az alkalmazott gyógyszerekre. Az MDR napjainkban az egyik legfontosabb probléma a daganatos betegek kezelésében, hiszen döntően ez felelős a kemoterápia sikertelenségéért. Az MDR egyik fontos kiváltó faktora egy, az ABC (ATP-binding cassette, azaz ATP-kötő kazetta) transzporter főcsaládba tartozó pumpafehérje, a P-glycoprotein (Pgp), melynek klasszikus formája az MDR-1 gén terméke (Ginn és mtsai, 1996).

Az MDR-t létrehozó mechanizmusok nemcsak a daganatsejtekben, de az ép testi sejtekben is jelen vannak; ennek alapján el tudunk különíteni veleszületett (intrinsic) és szerzett rezisztenciát. Az előbbi esetben a tumorsejtek olyan szövetből erednek, amely élettanilag is expresszál Pgp-t (ilyen a mellékvese, máj, vastagbél, agy, tüdő, csontvelő sejtjei és a legtöbb magzati sejtvonat), ezek a daganatok már a kemoterápiás szerrel való találkozás előtt drogrezisztensnek tekinthetők. Szerzett rezisztencia esetén a tumorsejtek kezdetben még érzékenyek a citosztatikus kezelésre, majd a terápia során ellenállóvá válnak az alkalmazott gyógyszerrel szemben, ily módon okozva a kezelés kudarcát (Bergman, 2000).

Az MDR kialakulásában szerepet játszik a kemoterápia aluldozírozása vagy nem megfelelő ütemezése, a szájon át adott gyógyszerek esetében a nem megfelelő felszívódás vagy hasznosulás, a csökkent gyógyszeraktiválódás, a fokozott DNS-hibajavítás, vagyis a DNS-repair, a gyógyszer nem megfelelő penetrációja a daganatszövetbe, valamint a gyógyszer fokozott kijuttatása a sejtből (Bergman, 2000.; Zandvliet és Teske, 2015). Az MDR-t kiváltó fontosabb mechanizmusokat a 2. sz. táblázatban foglaltuk össze.

A Goldie-Coldman-hipotézis szerint a daganat növekedésével a spontán mutációk számának emelkedése miatt arányaiban és abszolút számban is egyre több rezisztens sejt keletkezik. Az összefüggés a terápia sikeressége, valamint a tumor mérete és a spontán mutációk száma között a következő: $P = e^{-\alpha N}$, ahol P a kezelés sikerességének valószínűsége (vagyis a rezisztencia kialakulásának elmaradása), N a daganatsejtek száma, α pedig a spontán mutációk aránya. Ebből az következik, hogy a leginkább eredményes kezeléshez a kemoterápiát minél előbb, még a daganat kis méreténél el kell kezdeni, illetve a több különböző, eltérő rezisztencia mechanizmussal rendelkező hatóanyag kombinálásával jobb eredmény érhető el, mint egyetlen citosztatikum monoterápiás alkalmazásával. 1×10^{-6} mutációs rátával számolva 1 cm^3 tumorméret esetén a rezisztens klónok kialakulásának esélye 60% feletti (Zandvliet és Teske, 2015).

Lymphomás kutyák esetében elsősorban azokban a betegekben figyelték meg a kemoterápiás szerekkel szemben kialakuló rezisztenciát, melyeket korábban glükokortikoiddal kezeltek (Vail és MacEwen, 2000). Ezt támasztja alá az is, hogy non-Hodgkin's lymphomás emberek esetében például az előkezelést nem kapott csoportban 2–49%-os értékeket, míg az előkezelést kapott csoportban 64%-os MDR-1-expressziós átlagértéket tapasztaltak, míg mRNS analízissel ezek az adatok $22 \pm 50\%$, illetve $30 \pm 60\%$ voltak (Sonneveld, 2000).

2. táblázat: A terápia rezisztencia kialakulási mechanizmusa a fontosabb kemoterápiás szereknél (Zandvliet és mtsai., 2015)

Kialakulási mechanizmus	Hatóanyagcsoport
Csökkent felvétel	metotrexát, egyéb antimetabolitok, nitrogénmustár, melphalan, ciszplatin
Változások a gyógyszermetabolizmusban (aktiváció/inaktiváció megváltozása)	legtöbb antimetabolit (pl. 5-fluorouracil, citozin-arabinozid), alkiláló szerek, ciszplatin
Fokozott kijuttatás a sejtből (megváltozott pumpafunkció)	metotrexát, melphalan, taxánok, etoposid, vinca-alkaloidok, antraciklinek
Enzimatiszus változások	metotrexát, egyéb antimetabolitok, topoizomeráz-gátlók
Fokozott DNS-repair	alkiláló szerek, ciszplatin, antraciklinek, etoposid
Csökkent érzékenység az apoptózisra	alkiláló szerek, ciszplatin, antraciklinek, etoposid

A sejtszintű MDR kialakulásának több mechanizmusa is ismert (2. táblázat), de a leggyakrabban megfigyelt formája a P (permeability)-glycoprotein túlzott expressziója miatt következik be. Ez egy 160–180 kDa tömegű ATP-függő membránpumpa, amely hidrofób molekulákat juttat ki a sejtől. A membránpumpa a káros molekulákat, köztük a citosztatikumok jelentős hányadát is kipumpálja a sejtekből, emiatt nem tud kialakulni a daganatellenes hatáshoz szükséges intracelluláris gyógyszerkoncentráció. Kutyák kemoterápiájában használt leggyakoribb szerek közül eddig a következőkkel szemben mutatták ki a Pgp hatását: vincristin, doxorubicin, actinomycin-D, mitoxantron, etoposid, vinblastin (1. ábra). Komoly gyakorlati probléma, hogy ezekkel a szerekkel szemben keresztrezisztenciát is leírtak, vagyis amennyiben az itt felsorolt vegyületek valamelyikével szemben kialakul a rezisztencia, a daganatsejt a többi Pgp-szubsztrát citosztatikumra is

rezisztens lesz, függetlenül attól, hogy azt a terápiában addig használták vagy sem. A vincristin és doxorubicin kutyák lymphomájának kezelésében elsőként választandó szerek, ezért az MDR ebben a kórképben különösen nagy jelentőségű, ugyanis a terápiás kudarcok döntő többségéért ez tehető felelőssé (Zandvliet, 2015).

A Pgp a pumpafunkción kívül védelmet nyújt a komplement-függő citotoxicitás ellen és plazmamembránon keresztüli elektrokémiai áramlásokat koordinál (Bergman, 2000).

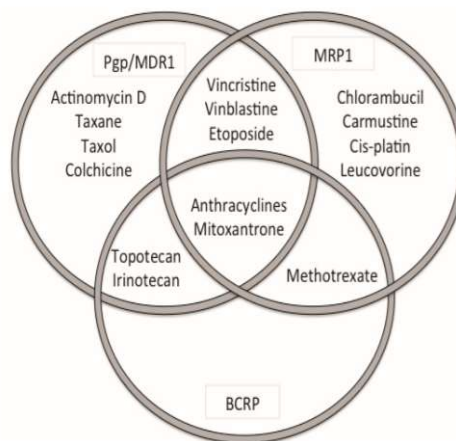
A Pgp-t kódoló gének megtalálhatóak vírusokban, baktériumokban, növényekben, rovarokban és emlősökben. Ez a szélsőséges „konzervatizmus“ is jelzi ezen gének fontosságát (Bergman, 2000). A klasszikus Pgp az MDR-1 gén terméke. Az MDR-1 cDNS pimerek (A, B, C, D) már több mint 95%-a ismert (Mealey és mtsai., 1998). A kutyában található mRNS 4,5 kilobázis méretű és 93%-ban egyezik az ember, valamint 90%-ban az egér mRNS-ével (Steingold és mtsai., 1998). Az MDR-1 mRNS-expressziója *in vitro* korrelál a kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztenciával.

Az örökletes MDR-1-génmutációt számos állatfajban és az emberben is kimutatták. Bizonyos kutyafajták (pl. collie, bobtail, egyéb angol, illetve ausztrál juhászkutyák) esetében familiárisan halmozódva, kifejezetten gyakran előfordul. Ez a magyarázata a felsorolt fajták ivermectin-érzékenységének, ugyanis a csökkent Pgp-funkció miatt az ivermectin és származékai felhalmozódnak az agyszövetben súlyos mérgezéses tüneteket okozva. További, az állatgyógyászatban használt érintett vegyületek a citosztatikumokon kívül az acepromazin, a metronidazol, a metoklopramid, a fentanyl, a morfin, a butorphanol, a ciklosporin és a digoxin (Mealey és mtsai., 2002).

166 kutyából származó daganatmintának egér monoklonális ellenanyagokkal (C494: MDR-1 által kódolt fehérje, C219: MDR-1/MDR-3 által kódolt fehérje, JSB-1: MDR-1/MDR-3 által kódolt fehérje) Pgp-re végzett immunhisztokémiai vizsgálatai során hepatoma, colorectalis adenoma, colorectalis carcinoma, átmeneti sejtes carcinoma és mellékvese adenoma esetén 100%-os pozitívítást tapasztaltak. Histiocytomából, plazmasejtes bőrtumorból, fibrosarcomából, fibromából és leiomyomából származó mintákból pedig egyáltalán nem sikerült kimutatni Pgp-t. Apokrin mirigy adenocarcinómában 80%, lymphomában 27,2%, melanómában 30,8%, leiomyosarcomában 50%, emlő adenocarcinómában 63,2%, emlő adenomában 20%, laphámrákban 80%, bazálsejtes tumorban 71,4%, apokrin mirigy adenomában 50%, biliaris sejtes carcinómában 66,7%, pajzsmirigy adenoma esetén pedig 50%-os pozitívítást tapasztaltak (Ginn, 1996).

Az MDR klinikai jelentőségét alátámasztja, hogy a humán onkológiában alkalmazott kemoterápiás protokollok során prognosztikai faktorként használják, ugyanis a Pgp fokozott expressziója negatív korrelációt mutat a túlélési idővel (OST), illetve a recidívamentes periódussal (RFP). Mindez a Pgp membránpumpa funkciójának köszönhető, ami a kemoterapeutikumok csökkent sejtbeli aktivitását eredményezi (Bergman, 2000).

A Pgp blokkolása kutyák esetében sajnos jelenleg még nem megoldott, de az utóbbi években biztató eredmények születtek. Számos vegyület képes a Pgp pumpafunkcióját gátolni oly módon, hogy kompetitíve a Pgp-hez kötődnek. Kutyaeredetű sejteken *in vitro* körülmények között Pgp-gátló tulajdonsággal rendelkezik a verapamil, tamoxifen, kinidin, kloroprin, rezerpin, ciklosporin és annak egyes analógjai (Bergman, 2000). Azonban ezek a szerek *in vivo* csak nagy dózisban hatékonyak, amelyben meglehetősen toxikusak, többek között myeloszuppressívek. Ez azért is probléma, mert a legtöbb kemoterapeutikum alkalmazásánál a myeloszuppresszív hatás limitáló tényezőként szerepel. Zandvliet és mtsai. (2013) masitinib használatával biztató eredményeket értek el kutyákból származó doxorubicin-rezisztens lymphoid sejtvonalakon. Az eredményeik alapján a masitinib *in vitro* alkalmas a Pgp-funkció gátlására és ezáltal a doxorubicin-rezisztencia visszafordítására.



1. ábra: Átfedések a fontosabb ABC-transzporterek (Pgp, MRP1 és BCRP) citosztatikus szubsztrátjai között. Számos kemoterápiás szer egyszerre több ABC-transzporter szubsztrátja is lehet (Zandvliet és mtsai., 2015)

A humán és az állatorvosi onkológiában egyaránt bizonyított, hogy a magas P-glycoprotein expresszió negatív prognosztikai faktornak minősül számos daganat esetében. Elsőként a humán onkológiában nyert bizonyítást az, hogy az emelkedett P-glycoprotein szint és az MDR közötti összefüggés az emlődaganatok esetében is fennáll (Sanfilippo és mtsai., 1991).

A Pgp-n kívül számos egyéb mechanizmus is okozhat multidrog-rezisztenciát, ilyenek többek között a multidrogrezisztencia-asszociált fehérje (multidrug resistance associated protein, MRP), a tüdőrezisztencia fehérje (lung resistance associated protein, LRP), emlőrák-rezisztencia fehérje (breast cancer resistance protein, BCRP), a topoizomerázok, valamint a glutation-rendszer (Bergman, 2000; Zandvliet és mtsai., 2015).

1.2.1. Pgp kutyák lymphomájában

A Pgp kutyák lymphomája esetében régóta ismert negatív prognosztikai faktor (Ginn, 1995; Moore és mtsai, 1995; Bergman és mtsai, 1996; Lee és mtsai, 1995). A lymphomás kutyák többsége az első kemoterápiás ciklus után visszaesik és a kiújult daganat általában az eredeténél rezisztensebb a citosztatikumokra. Ennek oka az eredeti daganatsejteknel rezisztensebb, ún. MDR-klónok megjelenése. Ezek a kezdetben nagyon kis létszámban jelen lévő sejtek vagy már a kezelés megkezdése előtt is intrinsic rezisztenciával rendelkeztek és a csontvelőbe visszahúzódva éltek túl a kemoterápiát vagy a citosztatikus terápia során szelektálódtak ki rezisztenciát kifejlesztve (Zandvliet, 2015; Vail és mtsai., 2019). A kutyalyymphomák Pgp-expressziójának intenzív vizsgálata 1995/96-ban indult Lee (1996), Moore (1995), valamint Ginn (1995) munkásságával. Mindhárom vizsgálatban a kiújult lymphomák esetében a daganatsejtek nagyobb mértékben expresszálták az MDR-1 gént, mint a kiindulási állapotban. Moore és munkatársai (1995) a kezelés megkezdése előtt 30 kutyából 1 esetben találtak Pgp-pozitivitást, míg a recidivált minták esetén ez a szám 8-ból 3 volt. Bergman és mtsai. (1996) ugyanazon betegek kemoterápia előtti, majd utáni mintáit összehasonlítva a terápia befejezését követően szignifikánsan magasabb Pgp-expressziót mértek. Lee és mtsai. (1996) a kezelés megkezdése előtt 33%-os *de novo* pozitivitást tapasztaltak, ugyanez a vizsgálat recidivált betegek esetén szignifikánsan magasabb pozitivitást mutatott. Zandvliet és mtsai. (2014) kutyákból származó doxorubicin-rezisztens B-sejtes leukaemia-sejtvonal Pgp-expressziójának vizsgálatakor a rezisztens sejtvonalban szignifikánsan magasabb Pgp-expressziót tapasztaltak mind immunhisztokémiai módszerrel, mind az mRNS-expresszió RT-qPCR vizsgálatakor, mind pedig rodamin festéses funkcionális vizsgálatkor. Ezzel szemben az MRP1, illetve BCRP-szint összehasonlításakor egyik módszerrel sem találtak számottevő eltérést, megerősítve ezzel azt, hogy kutyák esetében az MDR kialakításában az ABC-transzporterek közül a Pgp-nek van döntő szerepe. Zandvliet és mtsai. (2014) egyúttal a doxorubicin-rezisztens sejtvonalban vincristin-keresztrezisztenciát is tapasztaltak. Zandvliet és mtsai. (2015) 63 multicentrikus lymphomás kutya mintáinak Pgp-expresszióját hasonlították össze RT-qPCR vizsgálattal. A betegekből a kezelés előtt, az első recidívakor, valamint a terápia rezisztencia miatti terápia kudarcok vettek mintát. Nem találtak összefüggést a kezelés előtti Pgp mRNS-koncentráció és a később kialakuló terápia rezisztencia között, ez a megállapítás megfelel más tanulmányok tapasztalatainak is (Steingold és mtsai, 1998; Tomiyasu és mtsai, 2010). Ugyanakkor a B-sejtes lymphomák esetén a terápia kudarc idején vett minták Pgp-expressziója szignifikánsan magasabb volt, mint a kezelést megelőzően tapasztalt érték (Zandvliet és mtsai., 2015).

1.2.2. Pgp kutyák emlődaganataiban

Nők terápiarezisztens emlőrákjának emelkedett Pgp-expressziója régóta ismert tény. Mechetner és mtsai. 1998-ban leírták a taxol- és doxorubicinrezisztens emlőrákok emelkedett Pgp-expresszióját. Ezenkívül erős korrelációt találtak a későbbiekben kialakuló terápiarezisztencia és az emelkedett Pgp-expresszió között, amit kifejezett negatív prognosztikai faktorként azonosítottak. Leírták azt is, hogy az előkezeléskor mért 11%-os Pgp-expresszió a kemoterápia hatására 30%-ra nőtt. További problémát okoz az emlőrákok kezelésénél, hogy számos tirozin-kináz gátló, többek között az imatinib is Pgp-szubsztrát (Szakács és mtsai, 2008).

2006-ban Petterino és munkatársai kutyák emlődaganataiban vizsgálták a Pgp-expresszió mértékét immunhisztokémiai módszerekkel. Eredményeik azt mutatták, hogy míg az egészséges, illetve hyperplasiás emlőszövet sejtszejtjei nem vagy alig festődtek, addig a jóindulatú daganatokból származó sejtek diffúz citoplazmafestődést, a malignus tumorok sejtszejtjei pedig főleg membránfestődést mutattak.

1.3. A p53 tumorszupresszor fehérje

A p53 tumorszupresszáló gén a leggyakrabban mutálódott gén a humán daganatokban, mutációját az emberi tumorok több mint 50%-ában kimutatták (Levine és mtsai, 1991). A gén által kódolt fehérje egy sejtmagban található foszoprotein, amely részt vesz a sejtciklus szabályozásában és az apoptózis beindításában. Működése fontos részét képezi a sejtek azon szabályozási mechanizmusainak, amelyek gátolják a daganatos mutációk okozta tumorgenezist a PCNA (proliferating cell nuclear antigen) és az MDR gének expressziójának csökkentése révén (Levine és mtsai, 1991; Blagosklonny, 2002). A p53 gén ún. germ-line (csírasejtvonal) mutációja emberekben különböző daganatos betegségekre hajlamosít, mivel a mutáció következtében a termelt fehérje inaktívvá válik. Ezt a folyamatot leírták például emberek emlőcarcinómája, légyszöveti sarcomája, osteosarcomája és különböző agydaganatai esetén is (Argyle és mtsai, 2019). Kutyák számos daganatában igazolták a p53 túlzott expresszióját. Ezekben az esetekben igazolódott, hogy ezek a fehérjék nem megfelelő funkciójú, mutáns formák voltak. Rossz prognózisra utalhat a p53 daganatszövetben való csökkent vagy fokozott megjelenése is. A mutáció kimutatása pedig valószínűleg még több információt nyújt (Nasir és Argyle, 1999; Veldhoen és mtsai, 1998).

Emberk emlőrákjánál az esetek 15–34%-ában mutatták ki a p53 mutációját, ami rosszabb prognózissal és csökkent túléléssel társult (Bergh és mtsai., 1995; Elledge és Allred, 1998; Yang és mtsai., 2013). Sawaki és mtsai. (2006) leírták azt is, hogy gyulladáscsökkentő emlőrák esetén a p53 mutációja ennél lényegesen gyakoribb (kb. 50%). Az embereknél leírtakhoz hasonlóan a p53 tumorszupresszor gén mutációja kutyák rosszindulatú emlődaganatai esetén is a leggyakoribb genetikai elváltozás. Veldhoen és munkatársai (1998) kimutatták, hogy kutyák rosszindulatú emlődaganataiban a p53-as fehérjekódoló gén germ-line régiója pontmutációt szenved. Az így termelődött hibás fehérjék tumorszupresszor hatása nem jelentkezik, azonban a sejtek citoplazmájában, esetleg magjában fokozott expresszió tapasztalható, ugyanis a kimutatásuk alapját képező hapténben a mutáns fehérje megegyezik az ép fehérjével (Lee és mtsai., 2004). A mutáns p53-as fehérjék expressziójának mértéke arányban áll a daganatok malignitásának mértékével és a rövidebb túlélési idővel (Chu és mtsai., 2004). Lee és mtsai. 2002-ben a p53 5–8 exonját vizsgálva a malignus emlőtumorok 40%-ában, a benignusak 30%-ában találtak elváltozást és több aminosavcserével járó (ún. missense) mutációt is azonosítottak. Ochiai és mtsai. (2018) a CTM-m2 kutya emlődaganat-sejtvonal vizsgálatakor az emberek esetében már leírt Leu344 mutációnak megfelelő, csökkent tetramerizációt, ezáltal funkciócsökkenést kiváltó mutációt találtak (Leu332), amely fokozott proliferációhoz vezetett. Hasonlóan a humán onkológiában megfigyeltekhez, a p53 emelkedett expressziója kutyák emlődaganatai esetén is negatív prognosztikai faktor: Dolka

és mtsai. (2016) megállapították, hogy a pozitív p53-státusz magasabb mitotikus indexszel, alacsonyabb differenciációs fokkal, infiltratívabb növekedési hajlammal és gyakoribb tumornekrózissal járt együtt. Továbbá azt is tapasztalták, hogy a nagytestű kutyákból, valamint a Grade III tumorokból származó mintákban szignifikánsan magasabb volt a p53-expresszió. A magasabb p53-expresszió csökkent túléléssel járt együtt, de ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. A p53 immunhisztokémiai prediktív értékének hiányát kutyák emlődaganatai esetében a mi vizsgálataink után más tanulmányok is megállapították (Munday és mtsai, 2019).

1.4. Ciklooxigenázok

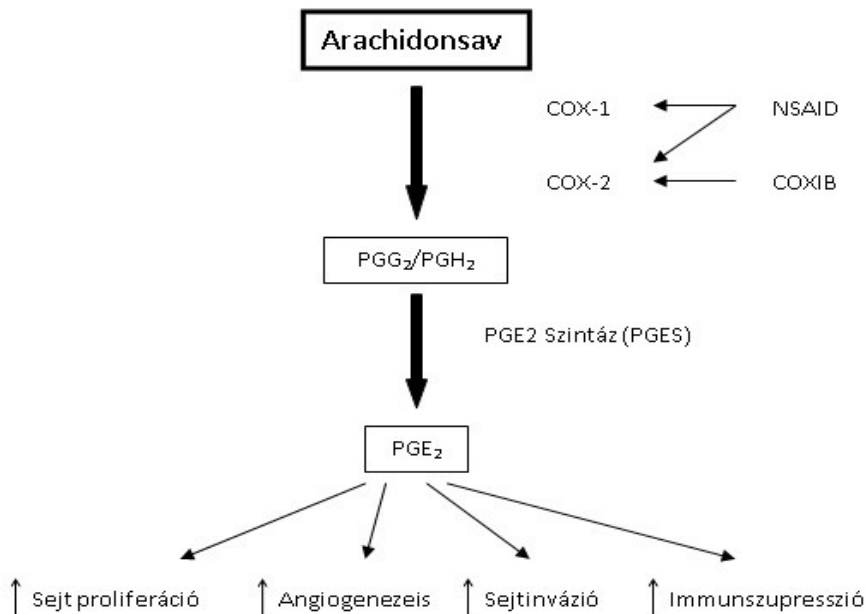
A ciklooxigenázok (COX, Prostaglandin Endoperoxid synthase) a prosztaglandinok biokémiai szintézisének kulcsenzimeik. A prosztaglandinok rövid láncú, lipid eredetű metabolitok, amelyek számos fiziológiai folyamatban részt vesznek. Fontos szerepük van egyebek mellett a gyomor nyálkahártyájának védelmében, az ovulációban, a veseperfúzió fenntartásában és a vérlemezke-funkcióban. Azonban számos prosztaglandin vezető szerepet tölt be daganatos megbetegedések kialakulásában (Doré és mtsai, 2003; Queiroga és mtsai, 2010; Doré, 2011). A ciklooxigenázok glikozilált, homodimer, membránhoz kötött, hemtartalmú enzimek. Két izoenzimük ismert, a COX-1 és COX-2. Bár aminosavszekvenciájuk 60–65%-ban homológ, a génjeik különböző kromoszómákon találhatóak, emiatt az enzimek celluláris, genetikai, élettani, patológiai és gyógyszeres profilja eltérő: míg a COX-1 homeosztatiszikus celluláris funkciókat lát el, addig a COX-2 kóros folyamatokban vesz részt, úgymint gyulladás, hyperalgesia, tumorgenezis (Otto és Smith, 1995; Seibert és mtsai, 1994).

1.4.1. A COX-2 szerepe a tumorgenezisben

A COX-2 egyes sejtekben fiziológiai körülmények között is jelen van, szabályozva az arachidonsav metabolikus transzformációját prosztaglandinokká megfelelő stimulus hatására (Otto és Smith, 1995). PGE₂-n keresztül serkenti a sejtproliferációt, a bcl-2 fehérjén keresztül gátolja a sejtek apoptózisát, fokozza az angiogenezist a vascular endothelial growth factors (VEGF)-szintézisen, valamint a bázikus fibroblast növekedési faktor (bFGF) termelésén keresztül (pl.: hypoxia esetén). A COX-2-szint emelkedése amellett, hogy fokozza a VEGF-, bFGF-termelést, megemeli az egyéb proangiogenikus faktorok szintjét is. Ilyenek a thrombocytá-eredetű növekedési faktor, illetve a matrix-metalloproteináz-2 és matrix-metalloproteináz-9 is, melyek elengedhetetlenek a tumor inváziójához. Emellett a COX-2 elnyomja az immunválaszt, immunszuppressziót okoz, ugyanis a PGE₂ gátolhatja a B- és T-lymphocyták, valamint a NK-sejtek működését. Ennek oka a vegyület kettős szerepe: egyfelől elősegíti a heveny helyi gyulladás kialakulását, valamint a fagocitasejt-mediált immunitás kialakulását, ugyanakkor speciális gátló funkciója is van a celluláris immunválasz potenciálisan káros hatásainak megakadályozására, főként annak későbbi szakaszában (Doré és mtsai., 2003, 2011).

Normál szövetben a COX-2-t többnyire alig lehet kimutatni, de hormonális, gyulladásos vagy daganatos stimulusokra indukálódhat. Ilyen mediátorok a VEGF, a bFGF, valamint egyes onkogének és specifikus intracelluláris állapotok, mint például a hypoxia (Fosslien, 2000; Tamura és mtsai, 2001). A gyulladásos mediátorok hatására a COX-2 enzim szintetizálódik, ami által kimutathatóvá válik, aktivitása lényegesen megnő. A stimulus megszűnése után

azonban az expresszió mértéke az alapvonal alá csökken. Ezzel ellentétben, a tumorokban – főleg a malignus daganatok esetében – a COX-2 aktivitása folyamatosan magas szinten detektálható. Ez a biológiai jel pedig kedvezőtlen klinikai végeredményt feltételez (Chan és mtsai, 2005; Chang és mtsai, 2004; Khuder és Mutgi, 2001; Salinas és mtsai., 2010).



2. ábra: A prosztaglandin-E2 (PGE2) szintézis lefolyása, valamint szerepe a daganatos folyamatokban.

A ciklooxygenáz-1 és ciklooxygenáz-2 enzimek szabályozzák az arachidonsav PGG₂-vé és PGH₂-vé alakulását, majd a Prosztaglandin E szintáz (PGES) a PGH₂-t PGE₂-vé alakítja. A PGE₂ a sejtproliferáció, a tumor angiogenezise, sejtinvázió, metasztázis, valamint az immunmoduláció segítése révén hozzájárul az onkogenesishez. A nemszteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek (NSAIDs) gátolják a COX-1 és COX-2 enzimek aktivitását, miközben a specifikus inhibitorok (COXIBs) kifejezetten a COX-2-t blokkolják.

A COX-2 enzim legmagasabb intracelluláris aktivitása az endoplazmatikus reticulumban mérhető, mivel a gyulladásos folyamatokban fontos szerepet játszó prosztaglandinok (PGG₂, PGH₂) itt képződnek. Ezt követően a cytoplazmában a PGH₂-ből PGE₂, PGD₂, PGF₂α, prosztaciklin (PGI₂) és tromboxán A₂ (TXA₂) keletkezik (Morita és mtsai., 1995). A daganatos sejtek cytoplazmájában az endoplazmatikus retikulumon kívül a COX-2 jelen van a mitokondriumokban és a lipidtestekben is. A mitokondriumban detektálható COX-2-aktivitás az oxidatív stressz okozta apoptózis szabályozásában is részt vesz. A lipidtestekben lévő COX-2 pedig a tumor növekedésének kritikus pontjait befolyásolja (Liou és

mtsai., 2005; Accioly és mtsai., 2008). A citoplazmán kívül magas COX-2-expressziót állapítottak meg a sejtmagban is, ahol a mitogenezis folyik (Morita és mtsai., 1995).

Összességében elmondható, hogy a COX-2 fontos szerepet játszik a tumorgenezisben és a daganatok növekedésében, valamint a malignitás fokának növekedésével a COX-2-expresszió is emelkedik (2. ábra). Számos daganat (pl. humán colorectalis tumorok, méhnyakrák, kutyák emlődaganatai) esetén szignifikáns kapcsolat van a magas COX-2-expresszió, valamint a távoli metasztázisok kialakulása között. Ez rövidebb túlélést eredményez, a COX-2 magas szintje tehát bizonyos daganattípusok esetén negatív prognosztikai faktor, amelynek gátlása klinikai előnyökkel járhat (Tsujii és mtsai., 1997; Stack és DuBois, 2001; Giles és mtsai., 2002; Kim és mtsai., 2002; Thun és mtsai., 2002; Heller és mtsai., 2005; Costa és mtsai., 2012). Kutyák daganatainak vizsgálata során is azonosították a COX-2 magas szintű expresszióját, például intestinális carcinomában (McEntee és mtsai., 2002), átmeneti sejtes hólyagcarcinomában (TCC) (Mohammed és mtsai., 1999; Khan és mtsai., 2001), laphámrákban (SCC) (Pestili és mtsai., 2001), vese carcinomában (Khan és mtsai., 2001), valamint emlőcarcinomában (Doré és mtsai., 2003). Ezek az eredmények alátámasztják a specifikus COX-2-gátló nemszteroidok alkalmazását daganatos betegségek kombinált terápiájában kutyák esetében is (Knapp és mtsai., 1994; Schmidt és mtsai., 2001).

1.4.2. COX-2-expresszió emlődaganatok esetén

A humán emlődaganatok 40–50%-a magas COX-2-expressziót mutat, de ennek kapcsolata a prognózissal ellentmondásos. Schreinemachers és Everson 1994-ben leírta a colorectalis daganatok, a tüdőrák, valamint az emlőrák előfordulási valószínűsége és az aspirin használata közötti fordított összefüggést. Denkert és mtsai. (2003) megerősítették, hogy az emelkedett COX-2-expresszió emberek esetén negatív prognosztikai faktor, amely korrelál a recidívamentes túlélési idővel, valamint a távoli metasztázisok kialakulásának esélyével. Az újabb vizsgálatok azonban a COX-2 expresszió prognosztikai jelentőségét cáfolják. Nassar és mtsai. (2007) leírták ugyan az emelkedett COX-2-expresszió korrelációját a tumormérettel és a szövettani Grade-del, de a prognosztikai értékét nem sikerült megerősíteniük. Simonsson és mtsai. 2016-ban nagylétszámú kohorsz vizsgálata során pedig cáfolta az emelkedett COX-2-expresszió negatív prognosztikai értékét, sőt bizonyos betegcsoportokban a magas COX-2-expresszió kedvezőbb túlélési adatokkal társult. Egyúttal leírták azt is, hogy a COX-expresszió prognosztikai értékét befolyásolja a beteg korábbi NSAID-használata.

A humán medicinában tapasztaltaknak megfelelően kutyák egészséges emlőszövege nem, vagy csak minimális mértékben mutat COX-2-expressziót. Ezzel szemben az emlődaganatok többségénél emelkedett COX-2-expresszió detektálható, amely negatív

prognosztikai faktorként összefüggést mutat a malignitás fokával, a recidívára való hajlammal, valamint a metasztatikus potenciállal (Doré, 2011; Lavalle és mtsai., 2009; Anadol és mtsai., 2017). Számos tanulmány igazolta a COX-2 emelkedett expresszióját kutyák rosszindulatú emlődaganatai esetén, az agresszívebb besorolású, anaplasztikus formák esetén pedig kifejezetten magas értékeket tapasztaltak (Dias Pereira és mtsai., 2009; Anadol és mtsai., 2017). A COX-2 metasztázis képzésben betöltött szerepét igazolja az is, hogy az áttétek többségében szintén emelkedett COX-2-expressziót találtak, aminek intenzitása vagy megegyezett a primer tumoréval, vagy meghaladta azt (Dias Pereira és mtsai., 2009). Ezt erősítette meg Araújo és mtsai. (2016) vizsgálata is, ahol a magas COX-2-expressziót mutató emlődaganatok nyirokcsomó metasztázisaiban szintén magas COX-2-expressziót tapasztaltak, függetlenül attól, hogy a primer tumor COX-2-expressziójának prediktív értékét kutyák esetében ez a tanulmány nem erősítette meg.

A COX-2-gátlók terápiás használatáról kutyák emlődaganatainak esetében egyre több publikáció áll rendelkezésre. Az inflammatory carcinoma bár ritka (a kutyák emlődaganatainak mindössze 1,4%-a), rendkívül rossz prognózisa miatt nagy klinikai jelentőséggel bíró kórkép. Kutyák esetében ez számít a legrosszabb prognózisú emlődaganatnak: kiújulásban a hazard ratio: 12,22, a tumormentes időszak 1,6–28,5 nap, a túlélés 4,6–28,7 nap (Nguyen és mtsai., 2018). Egy 12 esetszámú inflammatory carcinomás vizsgálat a piroxicam monoterápiára adott választ hasonlította össze doxorubicin+ciklofoszfamid kombinációs kemoterápiás protokollal. Palliatív terápiával általában 25 napos medián túlélés érhető el szemben az egyéb emlődaganatoknál leírt 14,2 hónappal. A vizsgálatba bevont 7 állat mindegyikéből származó daganat minta kifejezett COX-2-expressziót mutatott, illetve valamennyi állat pozitív klinikai választ adott a piroxicam monoterápiára. A progressziómentes túlélés 183, míg a teljes túlélés 185 nap volt. Retrospektív ciklofoszfamid+doxorubicin terápiára nem következett be javulás, mindhárom vizsgált állat 1 hónapon belül elpusztult, a medián túlélés 7 napnak bizonyult (de M. Souza és mtsai., 2009).

2016-ban Arenas és mtsai. firocoxib monoterápia hatékonyságát hasonlították össze mitoxantron kemoterápiával kutyák kifejezetten malignus (Grade III és/vagy Stádium IV) emlődaganatai esetén a tumor sebészi eltávolítását követően. A daganatok mindegyike mutatott COX-2-expressziót. A firocoxib terápiában részesült betegek túlélése és recidívamentes periódusa szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporténál, míg a mitoxantron kezelésben részesült csoport esetében nem találtak szignifikáns különbséget.

Hurst és mtsai. 2019-ben megállapították, hogy mavacoxib használata kutyáemlődaganat-sejtvonalon a sejtek COX-2-expressziójának mértékétől függetlenül *in vitro* körülmények között apoptózist indukál.

Ezek a vizsgálatok megerősítették a COX-2-gátló terápia létjogosultságát kutyák high-grade emlődaganatainak adjuváns kezelésében.

1.5. Tirozin-kinázok

A tirozin-kinázok a sejtnövekedés és -differenciálódás szabályozásában döntő szerepet játszó, specifikus jelátvivő molekulák. Receptoraik a sejtfelszínen található, foszforilációs kaszkádok indításával juttatnak el szignálokat a sejtmagig. Jelentős szerepet játszanak a daganat által előidézett neovasculárisációban, azaz a daganat saját érhalózatának kialakításában.

Azokat a sejtfelszínen található tirozin-kinázokat, amelyek növekedési faktorokat kötnek, receptor tirozin-kinázoknak (RTK) nevezzük. Valamennyi receptor tirozin-kináz rendelkezik egy extracelluláris doménnel, ahová a növekedési faktor kötődik, valamint egy transzmembrán, illetve egy citoplazmában lévő kináz doménnel. Utóbbi szabályozza az autofoszforilációt. A legtöbb RTK monomer formában található a sejtfelszínen, ezek a növekedési faktorok kötődésének hatására dimerizálódnak, ami a receptor szerkezetének térbeli változását eredményezi, ez aztán lehetővé teszi az ATP kötődését és az autofoszforilációt, majd a jelátviteli kaszkád elindulását (Lemmon és Schlessinger, 2010; London, 2013).

A kaszkádot általában külső jel indítja el, pl. növekedési faktorok. Ezek olyan kis molekulasúlyú szolubilis mediátorok, amik a sejtproliferációt, -túlélést, -metabolizmust és a szöveti differenciációt szabályozzák. A legfontosabb növekedési faktorok a PDGF (platelet-derived growth factor, azaz thrombocytá eredetű növekedési faktor), EGF (epithelial growth factor, vagyis hámeredetű növekedési faktor), NGF (neuronal growth factor, azaz neuronális növekedési faktor), FGF (fibroblast growth factor, vagyis fibroblaszt növekedési faktor), TGF (transforming growth factor, azaz transzformáló növekedési faktor), IGF (insulin-like growth factor, vagyis inzulin-szerű növekedési faktor) (London, 2013).

A kinázok megváltozott funkcióját számos folyamat okozhatja, ilyenek a mutációk, a fokozott expressziók, a fúziós proteinek, illetve az autokrin hurkok (amikor a sejt ugyanazt a mediátort választja ki, amelyhez receptora is van, így önerősítő folyamatot gerjeszthet). A mutációk (pl. pontmutáció, törlődés, belső tandem duplikáció) a protein-kinázok foszforilációját okozzák a kiváltó jel hiányában is. Ezek a folyamatok egyebek mellett fokozott sejtnövekedéshez és túléléshez vezetnek (London, 2013).

Az egyik legalaposabban tanulmányozott fúziós protein a humán krónikus myeloid leukaemiás betegek 90%-ában megtalálható BCR-ABL (Breakpoint cluster region protein-Abelson murine leukemia viral oncogene homolog). A rendellenes fúzió kiváltó oka egy kromoszómasérülés. A 22-es kromoszóma megrövidül, ezáltal az ún. Philadelphia-kromoszóma jön létre, amely a sejt malignus transzformációjához vezet (Goldman és Melo, 2003).

1.5.1. Tirozin-kinázok szabályozási zavara a daganatos sejtekben

Számos humán daganatban ismert jelenség a receptor tirozin-kinázok (RTK) szabályozási zavara (diszregulációja) okozta abnormális jelátviteli utak aktiválódása (3. táblázat). A daganatos kórképekben szerepet játszó legfontosabb tirozin-kináz receptorok a KIT (CD117, mast/stem cell growth factor receptor, SCGFR, vagyis őssejt növekedési faktor receptor), a MET (hepatocyte growth factor receptor, HGFR, azaz hepatocita növekedési faktor receptor), HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2, vagyis humán epidermális növekedési faktor receptor), az EGFR (epidermal growth factor receptor, azaz hámeredetű növekedési faktor receptor), PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor, vagyis thrombocytá eredetű növekedési faktor receptor) és az ALK (anaplastic lymphoma kinase, azaz anaplasztikus lymphoma kináz). Ezek aktiválódhatnak mutáció által, fokozott expresszióval vagy kromoszomális transzlokációval (London, 2013).

Az RTK-jelátvitel döntő szerepet játszik a különböző sejtfunkciókban és igen fontos szerepet tölt be az angiogenezis szabályozásában. Ez a folyamat elsődleges jelentőségű a daganatsejtek folyamatos növekedésében. A receptor tirozin-kinázok a következő növekedési faktorokon keresztül idéznek elő angiogenezist: VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor, vagyis vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor), PDGFR, FGFR, Tie-1 (tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1, azaz immunoglobulin és EGF-szerű doménokat tartalmazó tirozin kináz 1), Tie-2 (angiopoietin-1 receptor).

A VEGFR az érbelhártya sejteinek membránjában expresszálódik. Aktiválódása endothel-burjánzást, illetve -vándorlást/migrációt eredményez. A PDGFR az erek strómájában és a pericytákban expresszálódik. Kritikus jelentőségű az újonnan képződött vérerek stabilizálásában. Ezen túl a VEGF transzkripciójának és szekréciójának fokozásával segíti az angiogenezist. Az FGFR az erek endothel falában expresszálódik és a VEGFR-rel együtt elősegíti a VEGF megnövekedett expresszióját. Tie-1 és Tie-2 angioprotein receptorok a daganatok véredényeiben képződnek, fontos szerepük van a pericyták, illetve simaizom sejtek migrációjában, ezáltal az új vérerek képződésében a tumor saját érhálózatának létrehozásakor (Yamada és mtsai., 2011; Cherington és mtsai., 2008).

A receptor tirozin-kinázok fokozott expressziója általában azt eredményezi, hogy a daganatos sejt a normál mennyiségben jelen lévő növekedési faktorokra is erőteljesebb választ ad. Előfordulhat a RTK-k spontán dimerizációja is, így azok a ligand távollétében spontán aktiválódhatnak. Emberek emlőmirigy-, illetve petefészekcarcinomájában ismert tény a HER-2 receptor tirozin-kináz (human epidermal growth factor receptor-2, humán epidermális növekedési faktor receptor 2, ErbB2 néven is ismert, az EGFR család tagja) fokozott expressziója, ami gyakran jóval agresszívabb fenotípussal korrelál (London, 2013).

3. táblázat: Abnormális működésű receptor tirozin-kinázok a humán daganatokban
(Lemmon és Schlessinger, 2010)

Tirozin-kináz	Daganattípus
EGFR-család	emlőmirigy-, petefészek-, gyomor- vastagbél-daganatok, glioblastoma
Inzulin-receptor család	sarcomák, méhnyakrák, vesedaganatok
PDGFR-család	glioblastoma, petefészekdaganat, GIST, krónikus myeloid leukaemia
KIT	akut myeloid leukaemia, GIST, seminoma, melanoma, mastocytoma
Fit3	akut myeloid leukaemia
VEGFR-család	angiogenezis bármely tumorban, Kaposi-sarcoma, haemangiosarcoma, melanoma
PDGFR-család	akut myeloid leukaemia, lymphoma, myeloma multiplex, emlő- és prosztatadaganatok, átmeneti sejtes carcinoma
NGFR-család	pajzsmirigy-daganatok, neuroblastoma, fibrosarcoma, akut myeloid leukaemia
Met/Ron	pajzsmirigy-daganatok, osteosarcoma, rhabdomyosarcoma, máj-, vese-, vastagbél-daganatok, melanoma
EPHR-család	melanoma, gyomor-, vastagbél-, emlő-, nyelőcső-daganatok
AXL	akut myeloid leukaemia
Tie-család	angiogenezis bármely tumorban, gyomorrák, neuroblastoma
RET-család	pajzsmirigy-daganatok, multiplex endokrin neoplasia
ALK	non-Hodgkin's lymphoma, tüdőrák

Az ún. autokrin hurkok esetében a daganatos sejt egyszerre expresszálja a receptor tirozin-kinázt és a ligandjául szolgáló növekedési faktort. Kutyák haemangiosarcomájában leírtak ilyen folyamatot. A tumorsejtek egyszerre expresszálják a c-kit fehérjét és a haematopoieticus progenitor SCF-et (stem cell factor, őssejt faktor vagy KIT-ligand). Ez a folyamat nagymértékben hozzájárul a haemangiosarcomákban zajló extrém mértékű

daganatos endothelioblast burjánzáshoz (Fosmire és mtsai., 2014). Szintén autokrin hurkot feltételeznek kutyák osteosarcomája esetében is, itt a MET és ligandja, a HGF (hepatocyte growth factor, vagyis hepatocita növekedési faktor) expresszálódik egyszerre (MacEwen és mtsai., 2003).

A KIT-mutáció, amely fokozott proliferációt és/vagy csökkent apoptotikus hajlamot okoz, a Grade II, valamint Grade III mastocytomák jelentős részében megtalálható kutyáknál. A KIT gén az SCF-receptor (stem cell factor, őssejt faktor) c-kit fehérjét kódolja (más néven CD117 vagy SCFR). A mutáció során egy ún. internal tandem duplikáció következik be a c-kit tirozin-kináz juxtamembrán doménjában és ez a ligand távollétében is autofoszforilációt okoz (Downing és mtsai., 2002). Mastocytomák esetén a mutáció megléte fokozza a helyi recidíva és a távoli áttétek kialakulásának esélyét. A humán gasztrointesztinális sztróma tumorok (GIST) kb. 50%-ában szintén megtalálható ez a mutáció és leírták kutyák GIST tumoraiban is (Frost és mtsai., 2003).

A MET-gén az epithelialis eredetű sejtek felületén található onkogén c-met (HGFR) receptor tirozin-kináz termelésért felelős, amelynek eddig ismert egyetlen ligandja a HGF (hepatocyte growth factor, azaz hepatocita növekedési faktor). A HGF az invazív, vagyis szóródással kísért sejtproliferáció legismertebb fiziológiás indukáló faktora, emiatt különösen fontos szerepet tölt be daganatok metasztázisa során. Mindezek mellett a c-met fontos feladatot tölt be az embrionális fejlődés és a sebgyógyulás során. Aktiválódása ezen kívül gátolja az apoptózist és indukálja más receptor tirozin-kinázok proliferációját. Fiziológiás körülmények között őssejtek és progenitor sejtek expresszálják, de leírták számos humán daganat esetében is, pl. melanoma, nem kis sejtű tüdőrák, osteosarcoma (itt autokrin hurkot is igazoltak), vastagbélrák, petefészekdaganatok. Fokozott jelenléte rosszabb prognózissal jár együtt, mivel jelentős szerepet tölt be a daganatok proliferációjában, növekedésében, angiogenezisében, illetve a metasztázisok képződésében (Stellrecht és Ghandi, 2009). Melanomák esetében a c-met fokozott expressziója korrelál a tumor növekedésével és metasztatikus potenciáljával, ezáltal ígéretes terápiás célpont (Kenessey és mtsai., 2010). Fontos megjegyezni azt is, hogy a HGF/c-met szoros kapcsolatban áll az EGFR jelátviteli úttal. A HGF kötődése jelátvitelt indukálhat az EGFR-en keresztül, illetve olyan daganatsejtekben, ahol tartósan jelen van az EGFR ligand. A MET foszforilációja HGF távollétében is bekövetkezhet (Stellrecht és Ghandi, 2009).

1.5.2. Tirozin-kinázok szabályozási zavara kutyák emlődaganatai esetén

Humán emlőcarcinomák esetén régóta ismert tény a HER-2 (ErbB-2) fokozott expressziója az esetek 20–30%-ában. A tumorgenezisben is szerepet játszó fehérje fokozott jelenléte embereknél rövidebb recidívamentes és teljes túléléssel, illetve általánosságban

rosszabb prognózissal járt együtt (Slamon és mtsai., 1989), amíg tirozin-kináz gátló kezeléseket nem alkalmaztak. A HER-2 célzott gátlása ma a rutin terápia részét képezi, így a túlzott expresszió megfelelő gyógyszerelés esetén már nem jár szükségszerűen rosszabb prognózissal. A fehérje fokozott expressziója kutyák emlőmirigy-daganataiban is ismert, de a humán onkológiában tapasztaltakkal ellentétben úgy tűnik, hogy a mennyisége pozitívan korrelál a túléléssel. Nagy mintaszámon (91 malignus és 6 benignus emlődaganat, továbbá 2 egészséges emlő) végzett immunhisztokémiai vizsgálatok a malignus daganatok 29,7%-ában igazolták a HER-2 fokozott expresszióját. A kizárólag sebészi úton kezelt, fokozott HER-2 expressziót mutató kutyák egyéves és kétéves túlélési aránya, valamint a teljes túlélési ideje is jobb volt a HER-2 negatív csoportnál, bár a különbség egyik esetben sem volt szignifikáns. Ugyanebben a vizsgálatban real time PCR módszerrel a HER-2 nukleotid-polimorfizmusát is leírták (Hsu és mtsai., 2009).

A szintén receptor tirozin-kináz HER-3 fokozott expressziója humán emlődaganatokban ismert jelenség, de a prognosztikai szerepéről ellentmondásosak az eredmények. Expresszióját kutyák benignus és malignus emlődaganatai esetében egyaránt leírták. A membránban, illetve citoplazmában található HER-3 kutyában nem mutatott összefüggést a prognózissal, ellentétben a nukleális expresszióval, amit csak malignus daganatok esetében detektáltak és negatív prognosztikai markernek bizonyult. Pozitívan korrelált a nyirokér-invazivitással, illetve a rosszabb szövettani besorolással, valamint szignifikáns összefüggést mutatott a tumor progressziójával és metasztatikus hajlamával (Kim és mtsai., 2010).

VEGF és VEGFR-1/-2 (Flt-1/KDR) fokozott expresszióját több tanulmány leírta kutyák emlődaganataiban is, sőt egy autokrin hurok jelenlétét is valószínűsítik, de a prognózissal, túléléssel, malignitással, illetve a tumor mikroér-denzitásával kapcsolatos összefüggéseket tekintve ellentmondásos eredmények születtek (Millanta, és mtsai., 2006; Al-Dissi és mtsai., 2010; Restucci és mtsai., 2004). Nők emlőrákja esetén a VEGF célzott gátlása (bevacizumab) a kombinált terápia része és a VEGF, valamint a VEGFR-2 polimorfizmusát is leírták (Schneider és mtsai., 2008).

EGFR szerepe nők emlőrákja esetén részleteiben ismert és kutyák esetében is hasonló eredmények születtek. Nők esetében a tripla negatív emlőrákok kb. felében, valamint a gyulladásos emlőkarcinómákban is emelkedett expressziót írtak le (Masuda és mtsai., 2012). Az EGFR célzott gátlása jelenleg az emlőrák kombinált terápiájának része. Queiroga és mtsai. (2017) ELISA vizsgálat segítségével hasonlították össze 45 emlődaganatos és 8 egészséges kutya emlőiből származó minták EGFR-szintjét. A daganatos emlőkben az egészségeseknél szignifikánsan magasabb EGFR-szintet detektáltak, valamint szignifikáns összefüggést találtak a magasabb EGFR-szint és a recidívára, illetve az áttétképzésre való hajlam között. A magasabb EGFR-szint ennek megfelelően rövidebb recidívamentes és teljes túléléssel járt

együtt. Az inflammatory carcinomákban ezenkívül szignifikánsan magasabb EGFR-szintet mértek, mint a többi szövettani típusban. Hasonló eredményekre jutottak Carvalho és mtsai. (2013) is 61, kutyából származó malignus emlődaganatos minta EGFR-expressziójának immunhisztokémiai vizsgálatával. Az emelkedett expressziós szint szignifikánsan nagyobb daganatmérettel, gyakoribb tumornekrózissal, magasabb mitotikus aktivitással, magasabb szöveti Grade-del, előrehaladottabb stádiummal és nagyobb mikoérsűrűséggel járt együtt. Ezek a vizsgálatok megerősítették az EGFR-szint prognosztikai jelentőségét és angiogenezisben játszott szerepét, valamint azt is, hogy kutyák emlődaganatai esetén potenciális terápiás célpont lehet.

1.6. Célkitűzések

A lymphoma és az emlődaganatok a kutyák leggyakoribb daganattípusai közé tartoznak. Az emlődaganatok incidenciája 250/100,000 kutya (Vascellari és mtsai., 2016), a lymphomáé pedig 21,4/100,000 kutya (Merlo és mtsai., 2008).

Vizsgálati célok a lymphoma esetén. A terápia- vagy multidrog rezisztencia különösen nagy jelentőségű klinikai faktor, főként a nyirokszervi daganatokban, amelyek kezelése citosztatikus gyógyszerekkel történik, mivel döntően ez felelős a kemoterápiás kezelés kudarcáért. A multidrog rezisztencia (MDR) egyik fő kiváltó faktora egy ATP-függő pumpafehérje, a P-glycoprotein (Pgp). Ez a fehérje képes számos kulcsfontosságú citosztatikumot kipumpálni a daganatsejtből. Vizsgálatunk egyik fő célja volt, hogy megerősítsük a Pgp-immunhisztokémia prognosztikai értékét kutyák lymphomája esetén. Célkitűzéseink között szerepelt ezzel összefüggésben az is, hogy validáljuk az általunk használt festési módszert a lymphomák esetében egy Pgp cut-off érték meghatározásával. Mivel a szakirodalmi adatokban eltérő Pgp-expressziós százalékok szerepelnek, a prognosztikai érték erősítése céljából javasolt a különböző módszerek validálása. Hosszútávú célunk ezzel az volt, hogy a kezelés megkezdése előtt információkat szerezzünk a várható terápia rezisztenciáról, ezzel segítve az egyedre szabott gyógyászat megvalósítását. Vizsgálatunk másik célja a különböző klinikai jellemzők értékelése volt, különös tekintettel a recidíva, illetve gyógyszer mellékhatások okozta halálózásra, valamint az ezekkel kapcsolatos prognosztikai faktorok azonosítása, továbbá az MDR-rel való kapcsolatuk vizsgálata.

Bár az emlődaganatok terápiaja elsősorban sebészi, főleg a high-grade, előrehaladott formák esetén indokolt lenne az adjuváns kezelés is, azonban ez jelenleg nem megoldott, mivel ezek a daganatok nem reagálnak megfelelően a hagyományos citosztatikus kezelésre. Célkitűzéseink között szerepelt a terápia rezisztencia okainak vizsgálata mellett számos humán onkológiából ismert faktor prognosztikai értékének meghatározása, valamint lehetséges új terápia célpontok azonosítása is.

Vizsgálati célok az emlődaganatok esetén. A nők terápia rezisztens emlőrákjának emelkedett Pgp-expressziója ismert tény, kutyák esetében eddig azonban csak limitált számú vizsgálat állt rendelkezésre, ezek a daganatos emlőszövet emelkedett Pgp-expresszióját mutatták. Célkitűzéseink között szerepelt az emlődaganatok Pgp-expressziójának vizsgálatával az MDR kialakulásában betöltött szerepének megerősítése kutyák esetében is, valamint a prognosztikai értékének a vizsgálata. Ugyanezeknek a mintáknak a p53-expresszióját is vizsgáltuk. Ez egy olyan tumorszupresszor fehérje, amelynek mutációja mind az emberek, mind a kutyák rosszindulatú emlődaganatánál leírt, de kutyák emlődaganatai esetén eddig kevés információ állt rendelkezésre róla. Célul tűztük a p53 prognosztikai

értékének megerősítését, valamint összefüggéseket kerestünk a Pgp- és p53-expresszió között.

A humán emlődaganatok 40–50%-a magas ciklooxygenáz-2 (COX-2) expressziót mutat. Fő célunk a COX-2-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganataiban, prognosztikai értékének megerősítése, illetve a különböző COX-gátlók alkalmazásából származó klinikai előny igazolása és összehasonlítása volt.

Céljaink között szerepelt a tumorgenezisben szerepet játszó tirozin-kinázok vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén és ezáltal új, jövőbeli terápiás célpontok azonosítása. Humán emlődaganatok esetében régóta ismert tény bizonyos receptor tirozin-kinázok diszregulációja és fokozott expressziója. Ezek közül legismertebb a tumorgenezisben is szereplő HER-2 (ErbB2), amely az emlőrákok 20–30%-ában megtalálható és negatív prognosztikai faktorként rövidebb túléléssel jár. Ennek célzott gátlása emberek esetén a rutin terápia része. Mi a következő tirozin-kinázokat, valamint a VEGF-et detektáltuk realtime PCR eljárás segítségével: VEGFR1, VEGFR2, EGFR, ErbB2 (HER-2), PDGFR α , KIT, illetve MET. Az általunk vizsgált tirozin-kinázok többsége a masitinib és a toceranib targetje, ezek kutyák számára törzskönyvezett, Európában forgalomban lévő kismolekulájú tirozinkináz-gátlók.

2. Anyag és módszer

2.1. A Pgp-expresszió vizsgálata kutyák lymphomája esetén

2.1.1. A vizsgálatokban szereplő állatok

Vizsgálatunkban 33 kutya szerepelt, 18 kan, 15 nőstény, átlagéletkoruk 7,36 év volt. A nyirokcsomó mintavétel a praescapuláris nyirokcsomó eltávolításával történt. Fajta: keverék ($n = 6$), rottweiler ($n = 4$), német juhász ($n = 3$), magyar vizsla ($n = 3$), cocker spániel ($n = 2$), bullmasztiff ($n = 2$), dán dog ($n = 2$), angol szetter, csau-csau, bullterrier, szamojéd, bajor hegyi véreb, ír szetter, tacsó, sarplaninai juhászkutya, berni pásztor, bordói dog, shi-tzu.

A betegeket az első vizsgálatkor a következő stádiumokba soroltuk: II stádium ($n = 1$), III stádium ($n = 4$), IV stádium ($n = 22$) és V stádium ($n = 6$). A nyirokcsomóminták szövettani vizsgálata alapján 26 (78,78%) kutyának high-grade (3 B-lymphoblastos, 13 diffúz nagy B-sejtes magas mitotikus indexszel, 8 perifériás T-sejtes, 2 Burkitt-like) és 7 (21,21%) kutyának low-grade lymphomája volt (5 diffúz nagy B-sejtes lymphoma alacsony mitotikus indexszel, egy Mantle-sejtes és egy T-zone lymphoma).

2.1.2. Az alkalmazott kemoterápiás protokollok leírása

A betegek kezelése az ún. módosított COPA protokollon alapult (Cotter és Glodstein, 1987). A dózisok a következők voltak: Doxorubicin 30 mg/m^2 iv. az 1., 10. és 19. héten, vincristin $0,75 \text{ mg/m}^2$ iv. a 2–9. héten, illetve a 11–18. héten, ciklofoszfamid 250 mg/m^2 iv. a 4., 7., 13. és 16. héten, prednizonon az 1. héten 2 mg/ttkg po , a 2. héten $1,5 \text{ mg/ttkg po}$, a 3. héten 1 mg/ttkg po , a 4. héten $0,5 \text{ mg/ttkg po}$. Ezt a protokollt 19 héten keresztül használtuk. Amennyiben a beteg visszaesett, felajánlottuk a tulajdonosnak az ún. Madison-Wisconsin (MW)-protokollt (Rassnick és mtsai., 2007), ebben az esetben L-Asparaginase injekcióval indítottunk 400 NE/ttkg dózisban sc. 18 kutya részesült kizárólag COPA, 4 pedig kizárólag MW-protokollban. 10 kutya részesült mindkét protokollban (COPA elsőként, MW visszaesés után). Eredetileg az volt a tervünk, hogy a vizsgálatban szereplő valamennyi beteg MW protokollt kap első protokollként, de a tulajdonosok nagy része kedvezőbb ára miatt a COPA-t választotta.

2.1.3. A mellékhatások kiértékelése

A kezelés során fellépő mellékhatásokat a Veterinary Cooperative Oncology Group 2011-es ajánlása alapján soroltuk be súlyosság szerint (Grade) és a számszerűsítést is ez alapján végeztük. Ezenfelül egy ún. kumulatív pontszámot is megadtunk abból a célból, hogy a kezelések során megjelenő egyes mellékhatások összességének olyan számszerű értéket tudjunk adni, amiből azok súlyosságára is következtetni lehet. A kumulatív pontszámot az egyes epizódok számából és súlyosságából kalkuláltuk. Minden egyes számadatot egy matematikai „eseménynek” tekintettünk és ezek átlagát számoltuk ki a következő módon: kumulatív pontszám = az összes epizód száma + az első epizód Grade értéke + a második epizód Grade értéke stb., elosztva az „események” számával.

2.1.4. Szövetteni vizsgálatok, immunfenotípus-meghatározás, grading

A metszetek rutin hematoxilin-eozin festését követően minden esetben elvégeztük az immunfenotípus-meghatározást is. Az immunhisztokémiai festéshez B-sejt markerként CD79A-t (egér anti-CD79A monoklonális ellananyag, DAKO Ltd., High Wycombe, UK), T-sejt markerként pedig CD3-at (nyúl anti-CD3 monoklonális ellananyag, DAKO Ltd., High Wycombe, UK), használtunk. A gradinget a kutyák lymphomájára adaptált aktuális WHO-ajánlás alapján végeztük (Valli és mtsai., 2011). Valli és mtsai. (2013) leírásának megfelelően a betegeket a következő csoportokba soroltuk: low-grade B-sejtes, high-grade B-sejtes és T-sejtes, low-grade T-sejtes. Emellett az egyes altípusok meghatározását is elvégeztük. A csoportba sorolás alapja a szövettani Grade volt, ez a nagylátóterenkénti osztódások számán alapult: low-grade 0–5 mitózis/NNL, intermediate-grade 6–10 mitózis/NNL, high-grade > 10 mitózis/NNL (Valli és mtsai., 2013). A grading-rendszer Carter és mtsai 1986-os eredeti cikkén alapult Valli és mtsai. (2013) ajánlásainak figyelembevételével.

2.1.5. A Pgp kimutatása immunhisztokémiai vizsgálattal

Vizsgálatainkhoz 4%-os neutrális formalin oldatban fixált, majd paraffinba ágyazott metszeteket használtunk. A metszetek elkészítése során készen vásárolt xilanizált tárgylemezt alkalmaztunk. Az elkészült paraffinos metszeteket 12 órán át 56 °C-os termosztátban tároltuk. A minták feldolgozása eddig a fázisig az Országos Állategészségügyi Intézet Emlőskórbonctani Osztályának Szövettani Laboratóriumában (amely jelenleg Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság Emlős-, Vad- és Baromfibetegségek Laboratóriuma) és a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Kar,

Belgyógyászati Tanszék, Kóréletani laboratóriumában történt (jelenleg Állatorvostudományi Egyetem, Kóréletani és Onkológiai Tanszék laboratóriuma). A festések során egy alkalommal sem tudunk immunhisztokémiai festőautomatát használni. A manuális módszerhez Ramos-Vara 2005-ös Vet Pathol. cikkét vettük alapul. A deparaffinált metszeteket körberajzoltuk "Maszkoló" fedőfolyadék filctollal (4 mm, CSZ: 728002). Ez a kör segített megtartani az oldatokat a metszeten a reagensekkel végzett későbbi inkubációk során.

A Pgp immunhisztokémiai kimutatását P. E. Ginn 1996-os Veterinary Pathology című lapban megjelent cikke, valamint az Országos Onkológiai Intézet munkatársainak ajánlása alapján végeztük. A minták deparaffinálását, valamint rehidrációját xilolban, majd leszálló alkoholsorban történő áztatással végeztük. A 2×20 perces xilolban (Reanal Kft.) áztatást 2×5 perc abszolút-alkoholban, majd 2×5 perc 96%-os alkoholban (Reanal Kft.) történő áztatás követte. Ezután a metszeteket desztillált vízzel öblítettük. Az endogén peroxidázokat (pl. a vörösvérsejtekben található pszeudoperoxidázok) 3%-os hidrogén-peroxid oldattal blokkoltuk 10 percig úgy, hogy 30%-os hidrogén-peroxidot (Reanal Kft.) desztillált vízzel hígítottunk. Ezután a metszetek PBS-es (foszfát pufferes) öblítése következett. A PBS-t a SZIE-AOTK (jelenleg ÁTE) Belgyógyászati Tanszék és Klinika laboratóriumának munkatársai készítették a következők szerint: 10 liter desztillált vízben 80 g nátrium-kloridot (NaCl, Reanal 1000 g), 29 g dinátrium-hidrogénfoszfát-12-hidrátot (Na₂HPO₄, Reanal 1000 g), 2 g kálium-kloridot (KCl, Reanal 1000 g), valamint 2 g kálium-dihidrogénfoszfátot (KH₂PO₄, Reanal 1000 g) oldottak fel. Ezt követően az oldat kémhatását pH 8-ra állították be 1 mólos NaOH, illetve 1 mólos HCl oldat hozzáadásával. Az antigéneket 90°C-ra előmelegített, lúgos kémhatású, PBS-sel 1:3 arányban hígított Retrieve All 1. oldatban (Signet Laboratories) tártuk fel. A nem immuneredetű kötődéseket PBS-sel 1:10 arányban hígított 4%-os normál lószérumban való inkubációval blokkoltuk (Vector Laboratories). Az antigéneket 90°C-ra előmelegített, lúgos kémhatású, PBS-sel 1:3 arányban hígított Retrieve All 1. oldatban (Signet Laboratories) 10 percig tártuk fel. Erre a lépésre azért volt szükség, mert a formaldehid alapú szöveti rögzítés során a fehérjék természetes konformációját többnyire irreverzibilisen megváltoztató keresztkötések létesülnek. Ennek következtében az antigén determinánsok (epitópok) az antitestek számára hozzáférhetetlenné válhatnak. Az antigén (epitóp) feltárás célja, hogy az antigén determinánsokat felszabadítsuk, a számunkra fontos epitópokat hozzáférhetővé tegyük úgy, hogy közben a szöveti finomszerkezet ne sérüljön lényegesen.

A feltárás után desztillált vizes öblítés, majd 5 perc PBS-ben történő áztatás következett. A nem immuneredetű kötődéseket PBS-sel 1:10 arányban hígított 4%-os normál lószérumban való 20 perces inkubációval blokkoltuk. Erre a célra a kitben található lószérumot használtuk (Vector Laboratories). Nemspecifikus kapcsolatok forrása lehet a pozitív töltésű szöveti molekulák (pl. kollagén, magfehérjék, elasztin) és a reagens negatív csoportjai között kialakuló elektromos vonzóerő (a legtöbb IgG izoelektromos pontja enyhén savas közegben

van, így neutrális vagy lúgos pH-n enyhén negatívak). Hasonló problémát okozhat még a szöveti aldehidcsoportok és az immunglobulinok között, illetve a szövet és az immunglobulinok hidrofób csoportjai között kialakuló „nem kívánt” kapcsolat (a formaldehides rögzítés ugyanis hidrofóbbá teszi a szövetet). Ezen folyamatok miatt kell a metszet nemspecifikus kötőhelyeit nagy koncentrációjú indifferens fehérjeoldattal (esetünkben lószérummal) telíteni még az immunreagensek alkalmazása előtt.

A lószérummal való inkubáció után 2×5 perc PBS-ben való áztatás következett. Ezt követően 4%-os lószérumot tartalmazó PBS-ben hígított primer Pgp elleni ellenanyaggal (C494, Signet Laboratories) 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeteket.

A primer ellenanyag eltávolítását követően 2×10 perc PBS-es öblítés következett, majd 45 percig inkubáltuk a metszeteket ló anti-egér biotinilált ellenanyaggal, amelyet a Vectastain Elite ABC kit-ben lévő (Vector Laboratories) alapanyagokból, a gyártó utasítása alapján készítettünk el. Az elkészítés pontos menete a következő volt: 3 csepp, kitből származó normál lószérumot 10 ml PBS-ben oldottunk fel, majd ehhez 1 csepp kitben található biotinilált ellenanyagot cseppentettünk. A biotinilált ellenanyaggal való kezelés célja a primer antitest kötődésének kimutatása. Ez az eljárás egy indirekt immunreakció, mivel a primer ellenanyag kötődését biotinnel konjugált második antitestten keresztül mutatjuk ki.

A 45 perces inkubációt 2×5 perces PBS-es öblítés követte, majd 60 percig inkubáltuk a mintákat a gyártó utasítása alapján előkészített ABC-oldatban. Az ABC-reagenst 30 perccel a felhasználás előtt készítettük el a következő módon: a kitből származó 2 csepp „A” reagenst 5 ml PBS-ben oldottuk fel, majd az így készült keverékhez 2 csepp „B” jelzésű reagenst cseppentettünk. Az S-ABC (streptavidin-biotin-peroxidáz komplex) módszer alapja az avidin-biotin kötés nagy affinitása és stabilitása. A *Streptomyces avidinii* tenyészetből izolálható 60 kDa-os streptavidin 4 biotin molekulát is képes megkötni. Lényeges előnye a hasonló tulajdonságú avidinnel szemben, hogy izoelektromos pontja a neutrális tartományba esik, és nem tartalmaz oligoszacharid oldalláncokat, amelyek nemspecifikusan a szöveti lektinekhez kötődhetnek. Az ABC-kitben a reakció láthatóvá tételében kulcsfontosságú szerepet játszó peroxidáz a streptavidinhez kovalens kötéssel kapcsolódik.

A metszetek 2×5 perces PBS-es öblítése után a mintákat – közvetlenül a felhasználás előtt – a gyártó utasítása alapján elkészített DAB (diamino-benzidin, gyártócég: Vector Laboratories) oldatban inkubáltuk 2 percig. A DAB elkészítésének pontos menete a következő volt: 5 ml desztillált vízhez 2 csepp, a kitben található Buffer Stock Solution-t tettünk, alapos rázás után a keverékhez 4 csepp DAB Stock Solution-t adtunk, összeráztuk, hozzáadtunk 2 csepp H₂O₂ Solution-t, majd a kész keveréket összeráztuk. A reakció láthatóvá tételének rövid elméleti háttere az, hogy az elbontott szubsztrát (H₂O₂) oxidálja az elektrondonor kromogént (DAB), amelyből rosszul oldódó sötétbarna színű polimerizált csapadék válik ki.

Ezt kétszeri desztillált vizes öblítés, aztán 2 percgig festés haematoxin oldattal, végül 2 perces csapvízben kékítés követte. A metszetek száradása után folyékony halmazállapotúra melegített glicerinzselatint tartalmazó oldattal (DPX mountant BDH Laboratory Supplies) fedtük le a mintákat.

Pozitív kontrollnak kutyából származó ép máj- és veseszövetet, negatív kontrollnak pedig egészséges kutyából származó nyirokcsomósövetet használtunk. Ezenkívül alkalmaztunk egy ún. „belső negatív kontrollt” is, ebben az esetben a primer monoklonális ellenanyagot PBS-sel helyettesítettük.

A sejtek festődésének mértékét és annak sejten belüli helyeződését fénymikroszkópos elemzéssel vizsgáltuk, double blind módszerrel két gyakorlott vizsgáló segítségével. A Pgp-pozitív sejtek százalékos arányát (ún. festődési index) szemikvantitatív módon becsültük meg 10 véletlenszerűen kiválasztott nagy látóterű mezőn (400x nagyítás) található daganatsejt (mezőnként 60–180, összesen 500–1000 sejt) vizsgálatával. A festődés során keletkezett műtermékek zavaró hatásának kiküszöbölésére a véletlenszerűen kiválasztott területek között széli mezők nem szerepeltek. A Pgp-expresszió mértékét Lee és Ramos-Vara ajánlása szerint 4 pontos skálán jelöltük a pozitív sejtek számának becslése alapján: 10% alatti pozitivitás = 0 pont, 10%–30% pozitivitás = 1 pont, 30%–75% pozitivitás = 2 pont, 75% feletti pozitivitás = 3 pont (Lee és mtsai., 1996; Ramos-Vara és Miller, 2007).

A festődés intenzitását is vizsgáltuk az expressziós pontrendszerrel függetlenül: 0 értéket kaptunk, ha nem tapasztaltunk festődést, 1-est a gyenge, de a negatív kontrollhoz viszonyítva detektálható festődés, 2-est a normál, a pozitív kontrollhoz hasonló erősségű festődés, 3-ast pedig az erős festődés (3. ábra).

Céljaink között szerepelt egy Pgp-pozitivitási határérték (cut-off pont) megállapítása is, vagyis hogy mi az expressziós százalék, ami fölött Pgp-pozitívnek véve a betegeket a legerősebb korrelációt kapjuk a túlélési idővel. Ennek érdekében a kutyákat emelkedő Pgp-expressziós százalékos csoportokba osztottuk: az első esetben a mintákat 10%-os expresszió alatt vettük negatívnak, majd 20%, 30%, 40%, 50% és végül 60% alatt. Ezt követően statisztikai elemzéseket végeztünk a különböző csoportok adatainak felhasználásával, majd ROC-analízis segítségével kerestük meg a túléléssel legerősebben korreláló Pgp-pozitivitási határértéket.

2.1.6. Statisztikai módszerek

A medián recidívamentes periódust (RFP, relapse-free period) és a medián teljes túlélési időt (OST, overall survival time) Kaplan-Meyer analízis segítségével állapítottuk meg.

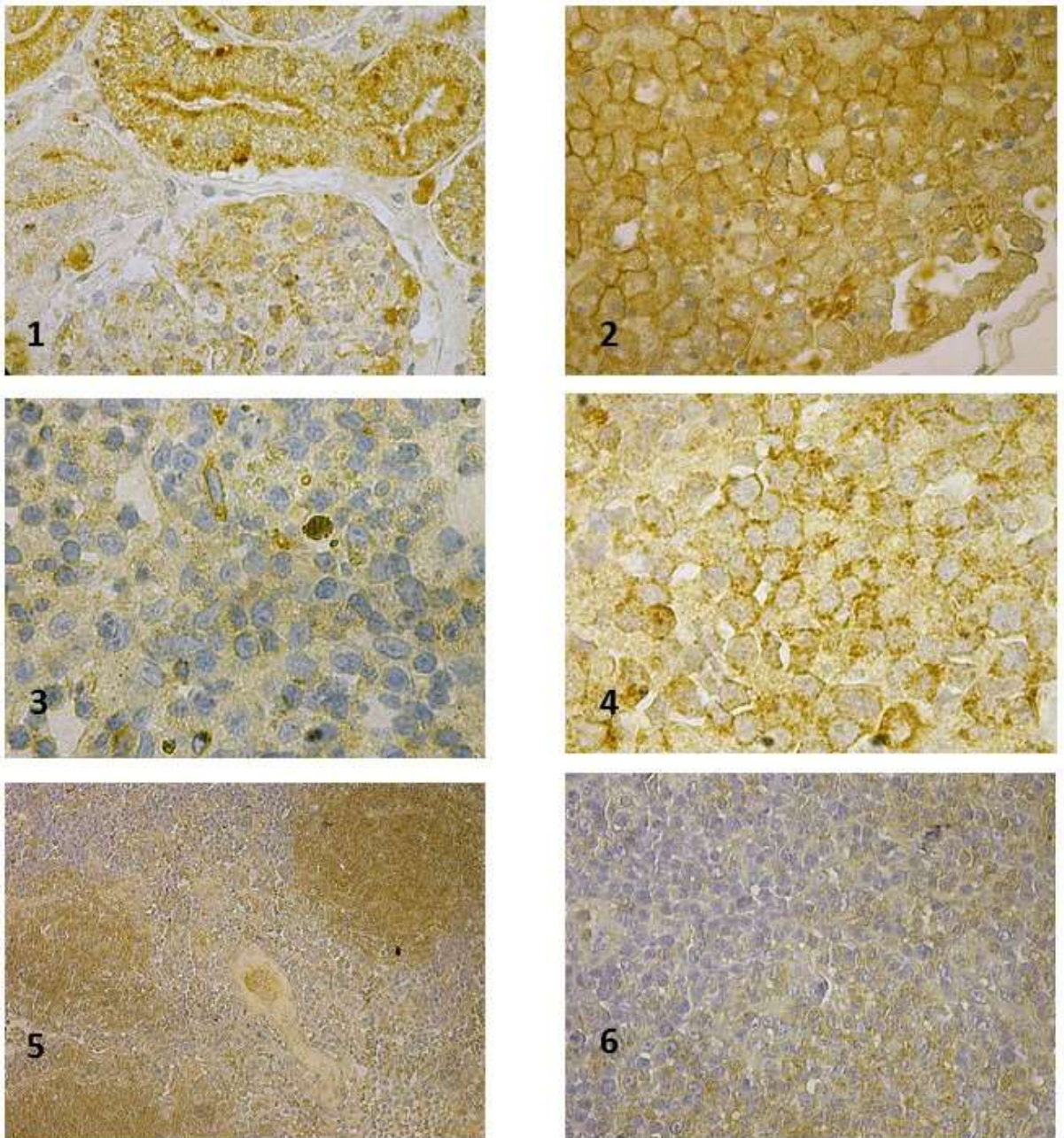
A különböző csoportok recidívamentes és teljes túlélési idejét Log-rank teszttel és Cox „proportional hazard” analízissel hasonlítottuk össze.

A különböző változók közötti összefüggések felderítésére Fisher-féle egzakt tesztet használtunk, az eredményt $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

A specificitási és szenzitivitási értékeket a Pgp-expressziós határérték (cut-off érték) megállapításakor ROC-analízis segítségével számoltuk ki.

A különböző csoportok klinikai és laboratóriumi paramétereinek összehasonlításakor kétmintás nem egyenlő varianciájú Student-féle t -próbát alkalmaztunk.

A vizsgálatokat a Statistica, Microsoft Excel, illetve R program használatával végeztük. A kapott eredményeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.



3. ábra: Pgp-immunhisztokémia. 1. Pozitív kontrollként kutya veseszövetet használtunk. Pgp-expressziót barna, rögös membrán-, illetve gyenge magfestődés jelzi (200x nagyítás). 2. Pozitív kontrollként kutya májszövetet használtunk. Pgp-expressziót barna, rögös membrán-, illetve gyenge magfestődés jelzi (200x nagyítás). 3. Negatív kontrollként kutya nyirokcsomóból származó mintát használtunk. Gyenge, nonspecifikus festődés látható (400x nagyítás). 4. Kód: 124833. T-lymphoblastos lymphoma, Pgp 70%. Erős membrán- és citoplazmafestődés látható (400x nagyítás). 5. Kód: 123613. Diffúz nagy B-sejtes lymphoma, centroblastos forma (alacsony mitotikus index), Pgp 50%. Erős membrán- és citoplazmapozitivitás látható a folliculáris zónában, gyenge a nem folliculáris zónában (100x nagyítás). 6. Kód: 123613. Folliculáris centrumsejtes lymphoma (alacsony mitotikus index), Pgp 50%. Gyenge membrán- és citoplazmapozitivitás látható (200x nagyítás).

2.2. A Pgp- és a p53-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

2.2.1. A vizsgálatokban szereplő állatok

Vizsgálatunkban 30 különböző fajtájú és korú emlődaganatos kutya szerepelt. A betegek között volt 5 éves ($n = 3$), 6 éves ($n = 4$), 8 éves ($n = 5$), 9 éves ($n = 3$), 10 éves ($n = 4$), 11 éves ($n = 3$), 12 éves ($n = 6$) és 13 éves ($n = 2$). A daganatok rutin szövettani vizsgálatának eredményei a következők voltak: 9 tubulopapilláris carcinoma, 12 komplex carcinoma, 2 komplex adenoma, 2 benignus kevert daganat, 1 fibroadenoma, 1 ductális papilloma, 2 carcinosarcoma, 1 lipid gazdag komplex carcinoma.

Ebben a vizsgálatban a kutyák mind műtéti daganatkimetszésen estek át, és utókezelésként fájdalomcsillapító nemszteroid gyulladáscsökkentőt (meloxicam 0,1 mg/ttkg), ill. cephalexin-t (20 mg/ttkg 2x naponta) kaptak 2 héten át szájon át. Egyéb onkoterápiás utókezelés nem történt.

Vizsgálatainkhoz 4%-os neutrális formalin oldatban fixált, majd paraffinba ágyazott metszeteket használtunk. A metszetek elkészítése során készen vásárolt xilanizált tárgylemezt alkalmaztunk. Az elkészült paraffinos metszeteket 12 órán át 56 °C-os termosztátban tároltuk. A minták feldolgozása eddig a fázisig az Országos Állategészségügyi Intézet Emlőskórbonctani Osztályának Szövettani Laboratóriumában (amely jelenleg Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság Emlős-, Vad- és Baromfibetegségek Laboratóriuma) és a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Kar, Belgyógyászati Tanszék, Kóréletlani laboratóriumában történt (jelenleg Állatorvostudományi Egyetem, Kóréletlani és Onkológiai Tanszék laboratóriuma). A festések során egy alkalommal sem tudtuk immunhisztokémiai festőautomatát használni. A manuális módszerhez Ramos-Vara 2005-ös Vet Pathol. cikkét vettük alapul. A deparaffinált metszeteket körberajzoltuk "Maszkoló" fedőfolyadék filctollal (4 mm, CSZ: 728002). Ez a kör segített megtartani az oldatokat a metszeten a reagensekkel végzett későbbi inkubációk során.

2.2.2. A p53 kimutatása immunhisztokémiai vizsgálattal

A p53 immunhisztokémiai kimutatását Wolf és munkatársainak 1997-ben megjelent cikke alapján végeztük. A minták deparaffinálását, valamint rehidratálását a Pgp-vel megegyező módszerrel végeztük. Ezután az antigéneket 90°C-ra előmelegített, PBS-sel 1:10

arányban hígított citrát oldatban tártuk fel. A nem immuneredetű kötődéseket PBS-sel 1:10 hígított 4%-os normál kecskeszérumban (Vector Laboratories) való inkubációval blokkoltuk. Ezután egész éjszakás inkubáció következett az 1:75 arányban hígított primer ellenanyaggal (CM-1, polyclonal rabbit anti-human p53 oncoprotein, Signet Laboratories). A festés további folyamata megegyezik a Pgp-nél leírtakkal, annyi különbséggel, hogy itt kecske anti-nyúl biotinilált ellenanyagot használtunk.

A pozitív kontroll humán invazív ductális carcinoma volt, negatív kontrollnak pedig egészséges kutyából származó nyirokcsomót használtunk.

A sejtek festődésének mértékét fénymikroszkópos elemzéssel vizsgáltuk. A p53-expresszió mértékét Lee és mtsai. által leírtaknak megfelelően 4 pontos skálán jelöltük a pozitív sejtek számának becslése alapján az alábbiak szerint: 0% expresszió = 0 pont, 1–10% pozitivitás = 1 pont, 10–50% pozitivitás = 2 pont, 50–80% pozitivitás = 3 pont, 80–100% pozitivitás = 4 pont (Lee, 2004). A citoplazma- és magfestődést nem értékeltük külön, mivel a minták mintegy kétharmadában nem tapasztaltunk magfestődést. A vizsgálat double blind módszerrel történt két gyakorlott vizsgáló által. A festődés intenzitását nem vizsgáltuk külön. Klasszikusan a p53-pozitivitás abban az esetben mondható ki, ha a sejtek >10%-ára jellemző a p53-expresszió (Angelé és mtsai., 2004).

2.2.3. A Pgp kimutatása immunhisztokémiai vizsgálattal

A Pgp kimutatása és a festődés kiértékelése megegyezett a 2.1.5. fejezetben leírtakkal. A Pgp-pontszámokat az alábbiak szerint számoltuk: 10% alatti pozitivitás = 0 pont, 10%–30% pozitivitás = 1 pont, 30%–75% pozitivitás = 2 pont, 75% feletti pozitivitás = 3 pont.

2.2.4. A különböző klinikai paraméterek vizsgálata

A betegek stádiumbasorolása az 1. fejezetben leírtaknak megfelelően történt. A műtét előtt minden esetben sor került mellkasi röntgenvizsgálatra, illetve hasi ultrahangvizsgálat elvégzését is felajánlottuk a tulajdonosoknak. A caudális emlőtelep eltávolításakor mindig eltávolítottuk az inguinalis nyirokcsomót is, amiből szövettani vizsgálat készült. Az axilláris nyirokcsomót normál esetben nem távolítottuk el, csak ha a műtét során alapos tapintással az élettaninál nagyobbak vagy tömöttebbnek találtuk

A varratszedést követően rendszeres kontrollvizsgálatokat végeztünk: fél évig 2 havonta, majd utána 3 havonta mindkét emlőléc, ill. a regionális nyirokcsomók tapintásos vizsgálata állatorvos által, illetve a tulajdonosokat minden esetben megtanítottuk az emlők tapintásos vizsgálatának otthoni elvégzésére, ez ideális esetben hetente megtörtént. Indokolt

esetben (high-grade formák, előrehaladott stádium) a kontrollvizsgálatok havonta történtek. Mellkas röntgen és hasi ultrahang vizsgálatot a szövettani eredménytől függően 2–6 havonta vagy panaszok jelentkezése esetén javasoltunk. Sajnos a tulajdonosi együttműködés hiánya miatt előfordult, hogy a kontrollvizsgálatokra a fent leírtnál ritkábban került sor, illetve néhány esetben telefonos utánkövetést végeztünk. Az elhullott betegek boncolására a tulajdonosok kérésének megfelelően nem került sor.

2.2.5. Statisztikai analízis

Betegeinket a daganat kórszövettani besorolása alapján 4 csoportra osztottuk: tubulopapillaris carcinoma ($n = 9$), komplex carcinoma ($n = 12$), egyéb malignus daganat ($n = 3$), jóindulatú daganat ($n = 6$).

Minden csoportnál vizsgáltuk, hogy történt-e ivartalanítás az emlődaganat kialakulását megelőzően, a betegek életkorát az emlődaganat műtéti eltávolításakor, azt, hogy az általunk vizsgált daganat primer tumor volt vagy már egy recidivált daganat, nyirokcsomó-áttét vagy lymphovasculáris invázió meglétét, recidíva megjelenését, az állat élete során jelentkezett-e egyéb daganatos megbetegedés a műtét előtt vagy után, és azt, hogy az állat elhullását daganatos betegség okozta-e.

A különböző paraméterek különbségét Wilcoxon rank-sum teszttel és kétmintás, nem egyenlő varianciájú Student-féle t -próbával vizsgáltuk a különböző diagnózisú csoportok között SAS-STAT programmal. A paraméterek között Pearson-féle korrelációs analízist is végeztünk az SPSS 8.0 számítógép program segítségével. A kapott eredményeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

2.3. A COX-2-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

2.3.1. A vizsgálatokban szereplő állatok

A vizsgálatainkban 42 kutya (41 nőstény, 1 hím) emlődaganat mintái szerepeltek. A betegek átlag életkora 9,17 év volt. 2 éves ($n = 1$), 4 éves ($n = 3$), 5 éves ($n = 2$), 6 éves ($n = 2$), 7 éves ($n = 3$), 8 éves ($n = 4$), 9 éves ($n = 2$), 10 éves ($n = 6$), 11 éves ($n = 2$), 12 éves ($n = 10$), 13 éves ($n = 2$), 14 éves ($n = 2$), 15 éves ($n = 3$).

A pácienseket fajtájuk alapján csoportosítva a vizsgált egyedek között az alábbiak fordultak elő: amerikai staffordshire terrier ($n = 1$), beagle ($n = 1$), bobtail ($n = 1$), bolognese ($n = 1$), boxer ($n = 1$), csivava ($n = 1$), cocker spaniel ($n = 2$), howawart ($n = 1$), kerryblue terrier ($n = 1$), keverék ($n = 13$), közép uszkár ($n = 1$), kuvasz ($n = 1$), labrador ($n = 1$), máltai selyemkutya ($n = 2$), német juhász ($n = 2$), német spicc ($n = 2$), óriás schnautzer ($n = 2$), rottweiler ($n = 1$), shi-tzu ($n = 1$), tacsókó ($n = 3$), törpe uszkár ($n = 1$), weimari vizsla ($n = 1$), westhighland white terrier ($n = 1$).

28 daganatminta primer, 15 pedig recidivált tumorból származott (1 betegnek mind primer, mind recidivált daganata is volt). A daganatok közül 13 benignus, 29 malignus volt. A malignus daganatok szövettani besorolás alapján solid carcinoma ($n = 8$), tubulopapilláris carcinoma ($n = 7$), anaplasztikus simplex carcinoma ($n = 1$), ductális carcinoma *in situ* ($n = 1$), komplex carcinoma ($n = 8$), carcinosarcoma ($n = 1$), fibrosarcoma ($n = 1$), osteosarcoma ($n = 1$), chondrosarcoma ($n = 1$) voltak.

Az emlődaganatok Grade-besorolása a Goldschmidt és mtsai. (2011) által leírt klasszifikációs rendszernek megfelelően történt.

A daganatok átlagos térfogata $191,8 \text{ cm}^3$ volt, ennek magyarázata, hogy néhány egyed extrém nagy méretű, 10–16 cm átmérőjű tumorral rendelkezett.

A műtétet követően 31 beteg részesült min. 4 hónapig tartó NSAID-kezelésben, közülük 16 beteg többféle hatóanyagot is kapott: piroxicam (0,3 mg/ttkg po. naponta) ($n = 23$), meloxicam (0,1 mg/kg po. naponta) ($n = 18$), firocoxib (5 mg/ttkg po. naponta) ($n = 12$), ennek magyarázata a vizsgálat hosszú lefutása és a korszerű hatóanyagok későbbi megjelenése.

Összesen 13 kutya részesült posztoperatív kemoterápiában, közülük 4-en többféle hatóanyaggal: doxorubicin ($n = 7$), ciklofoszfamid ($n = 1$), carboplatin ($n = 10$).

2.3.2. A COX-2 kimutatása immunhisztokémiai vizsgálattal

Az immunhisztokémiai vizsgálathoz paraffinba ágyazott metszeteket használtunk. A műtétielt eltávolított daganatok mintái 4%-os neutrális formalin oldatban kerültek fixálásra, majd ezután történt a paraffinba való beágyazás. A metszetek elkészítése során készen vásárolt xilanizált tárgylemezt használtunk. Az elkészült paraffinos metszeteket 12 órán át 56 °C-os termosztátban tároltuk. Ezen eljárásoknak köszönhető, hogy a későbbi a feltárás során alkalmazott hő hatására a metszetek nem váltak le a tárgylemezről, illetőleg így szobahőmérsékleten korlátlan ideig tárolhatók. A minták feldolgozása eddig a fázisig az Országos Állategészségügyi Intézet Emlőskórbonctani Osztályának Szövetani Laboratóriumában (amely jelenleg Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság Emlős-, Vad- és Baromfibetegségek Laboratóriuma) történt.

A COX-2-expresszió immunhisztokémiai kimutatását Queiroga és mtsai. 2007-ben megjelent cikke, valamint az Országos Onkológiai Intézet munkatársainak ajánlása alapján végeztük. A minták deparaffinálását, rehidratálását, valamint a nem immuneredetű kötések blokkolását a Pgp-vel megegyező módszerrel végeztük. Ezt követően a mintákat monoklonális primer IgG1 (Rat Cox-2 aa. 368-604) ellenanyaggal inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át.

A festés további folyamata megegyezett a Pgp-nél leírtakkal. A pozitív kontroll Queiroga és mtsai. által használtakkal megegyezően egészséges kutya máj- és veseszövet minták voltak.

Queiroga és mtsai. (2007) által leírtaknak megfelelően a festődés értékelése fénymikroszkópos vizsgálattal, double blind módszerrel történt két gyakorlott vizsgáló által. A pozitivitást a kifejezett barnás festődés megjelenése jelezte.

A pozitív kontrollal megegyező festődést mutató sejtek százalékos aránya alapján meghatároztuk a minták COX-2-pontszámát: 0: nincs festődés; 1 pont: 1–10%; 2 pont: 11–50%; 3 pont: 51–80%; 4 pont: 81–100%. A festődés intenzitását az alábbiak szerint jelöltük: negatív (0); gyenge (1); mérsékelt (2); erős (3).

Az első publikáció, amely kutyák emlőtumorában vizsgálta a COX-2 expressziót, más pontmeghatározást alkalmazott. A COX-2-pozitív tumorsejtek százalékos aránya alapján 0 pont: <5%, 1 pont: 15–25%, 2 pont: 26–50%, 3 pont: 51–75% és 4 pont: >75% (Doré és mtsai, 2003).

2.3.3. A különböző klinikai paraméterek vizsgálata

A betegek stádiumbasorolása az 1. fejezetben leírtaknak megfelelően történt. A műtét előtt minden esetben sor került mellkasi röntgenvizsgálatra, illetve hasi ultrahangvizsgálat elvégzését is javasoltuk. A caudális emlőtelep eltávolításakor mindig eltávolítottuk az inguinalis nyirokcsomót is, amiből szövettani vizsgálat készült. Az axilláris nyirokcsomót normál esetben nem távolítottuk el, csak ha a műtét során alapos tapintással az élettaninál nagyobbak vagy tömöttebbnek találtuk

A kemoterápiás kezeléseket az alábbiak alapján alkalmaztuk. Négy–hat ciklusban carboplatint (300 mg/m^2), esetleg ciklofoszfamidot (250 mg/m^2) (Sorenmo és mtsai, 2003; Lavallo és mtsai, 2012) vagy doxorubicint (30 mg/m^2) (Simon és mtsai, 2006) adtunk intravénásan min. 1 órán át tartó cseppinfúzióban, 21 naponként.

A varratszedést követően rendszeres kontrollvizsgálatokat végeztünk: fél évig 2 havonta, majd utána 3 havonta. Mindkét emlőléc, ill. a regionális nyirokcsomók tapintásos vizsgálata állatorvos által, illetve a tulajdonosokat minden esetben megtanítottuk az emlők tapintásos vizsgálatának otthoni elvégzésére, ez ideális esetben hetente megtörtént. Indokolt esetben (high-grade formák, előrehaladott stádium) a kontrollvizsgálatok minimum havonta történtek. A recidívát úgy definiáltuk, hogy a műtét helyén jelentkező duzzanatból vékonytű aspirációs citológiai vizsgálatot végeztünk, ill. ha ismét műtétre került a sor, akkor a kimetszett daganat szövettani vizsgálata is megtörtént, amikor a tulajdonosok hozzájárultak. Azokban az esetekben, amikor a citológiai vagy szövettani megerősítés nem volt lehetséges, a műtéti helyszínen történő bármilyen duzzanatot recidívának tekintettünk. Amennyiben a beteg intravénás kemoterápiában részesült, az emlőlécek és a regionális nyirokcsomók tapintásos vizsgálatát 21 naponta valamennyi kezelés alkalmával elvégeztük. Az utókövetés során az említett fizikális vizsgálat mellett teljes vérkép, rutin szérumbiokémiai vizsgálat történt és mellkasi röntgenfelvételeket is készítettünk. Az esetek mintegy 50%-ában hasi ultrahangvizsgálat is történt. Az első egy évet követően mellkas röntgen- és hasi ultrahangvizsgálatot a szövettani eredménytől függően 4–6 havonta, illetve panaszok jelentkezése esetén javasoltunk. Az elhullott betegek boncolására a tulajdonosok kérésének megfelelően nem került sor.

2.3.4. Statisztikai analízis

A betegeket a daganat kórszövettani besorolása alapján több csoportra osztottuk: benignus daganatok ($n = 13$), carcinosarcoma ($n = 1$), komplex carcinoma ($n = 8$), chondrosarcoma ($n = 1$), ductális carcinoma *in situ* ($n = 1$), fibrosarcoma ($n = 1$), osteosarcoma

($n = 1$), anaplasztikus simplex carcinoma ($n = 1$), solid carcinoma ($n = 8$), tubulopapilláris carcinoma ($n = 7$). A statisztikai vizsgálatok egy részénél néhány csoportot összevontunk. Valamennyi sarcomát egy csoportba soroltunk, ill. az *in situ* ductális carcinomát a tubulopapilláris carcinomákhoz, az anaplasticus simplex carcinomát pedig a solid carcinomákhoz soroltuk, így a következő 5 csoport jött létre: benignus daganatok ($n = 13$), solid carcinoma ($n = 9$), komplex carcinoma ($n = 8$), tubulopapilláris carcinoma ($n = 8$), valamint sarcomák ($n = 4$).

Összehasonlítottuk a COX-2-expressziós értékeket a különböző csoportok között, összefüggést kerestünk a COX-2-expresszió és tumorméret, illetve túléléssel összefüggő különböző paraméterek között.

Vizsgálataink során Kruskal-Wallis ANOVA-t, illetve Bonferroni-tesztet végeztünk. A különböző csoportok recidívamentes és teljes túlélési idejét Log-rank teszttel és Cox „proportional hazard” analízissel hasonlítottuk össze.

A specificitási és szenzitivitási értékeket a COX-2-expressziós határérték (cut-off érték) megállapításakor ROC-analízis segítségével számoltuk ki.

A statisztikai analízisek során SPSS 8.0, Free Statistics Software (WESSA, 2013), Microsoft Excel 7.0 és StatsDirect 3.2.8 programokat használtunk. A kapott eredményeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

2.4. Tirozin-kinázok vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

2.4.1. A vizsgálatokban szereplő állatok

Vizsgálatunkban 13 emlődaganatos nőstény kutya szerepelt, az állatok átlagéletkora 9,8 év volt. A daganatok szövettani besorolása simplex carcinoma ($n = 5$), komplex carcinoma ($n = 5$), orsósejtes carcinoma ($n = 1$), osteosarcoma ($n = 1$), illetve chondrosarcoma ($n = 1$) volt. Minden esetben az adott egyed egy, daganatos elváltozást nem mutató, egészséges emlője is eltávolításra került, ami a későbbiekben kontrollként szolgált.

Mindig olyan emlőt használtunk fel, melyben nem voltak látható elhalások. Az így nyert mintákból 0,5 és 1,0 g közötti mennyiséget távolítottunk el, majd homogenizáltuk Potter-Elvehjem-féle homogenizátor segítségével, 1 ml Trizolreagens (Total RNA Isolation reagent, Invitrogen) hozzáadásával. További feldolgozásig a mintákat -80 °C -on tároltuk.

2.4.2. Tirozin-kinázok kimutatása rt-PCR módszerrel

RNS-kivonás, DNázos emésztés: A Trizol oldatban homogenizált mintát 5 percig inkubáltuk 4 °C -on, ezt követően hozzáadtunk 0,2 ml -20 °C -os kloroformot, majd vortexeltük 15 másodpercig. Ezután újabb 5 perces inkubáció következett 4 °C -on, majd 15 perc centrifugálás 12000 g-vel 4 °C -on. Az RNS a centrifugálás után a felső vizes fázisba került. Óvatosan, hogy sem az alsó réteget, sem az interfázist ne szívjuk fel, leszívtuk és egy steril Eppendorf-csőbe pipettáztuk. Ennek a folyamatnak a megismétlésével végeztük az oldat további tisztítását. A következő lépés az RNS kicsapása volt. Az előbb kapott oldathoz 1:1 arányban hűtött izopropil alkoholt (Merck 100995.1000) kevertünk, majd vortexeltük és 4 °C -on 5 percig inkubáltuk. Ezután újra 4 °C -on centrifugáltuk 12000 g-n, ezúttal 10 percig. Végül leöntöttük a felülúszót és megtisztítottuk az RNS-t. Ennek során először hozzáadtunk 1 ml 75%-os -20 °C -os etanolt (Merck 100971.1000), ismét vortexeltük, majd centrifugáltuk 4 °C -on 7500 g-n 5 percig, végül az utóbbi két lépést megismételtük. Az RNS újrafeloldása során lepipettáztuk a folyadékfázist, majd további 5–10 percig levegőn szárítottuk a pelletet. A szárítást követően felodottuk 50 μl RNáz-mentes vízben (Merck). A mintát további vizsgálatokig -80 °C -on tároltuk.

cDNS írás (RevertAid™ H minusFirst Strand cDNASynthesis Kit, Fermentas) menete: 1 μg RNS mintához 1 μl random hexamer primert adtunk, majd DEPC-kezelt vizet mértünk hozzá úgy, hogy a végtérfogat 12 μl legyen. Ezeket alaposan összekevertük, centrifugáltuk,

és 70 °C-on 5 percig inkubáltuk, ezt követően 4 °C-ra hűtöttük. A cső falára ragadt cseppeket centrifugálással gyűjtöttük újra össze. Az elkészült keverékhez (folyamatosan jégen dolgozva) 4 µl ötszörös töménységű reakciópuffert, 20 U/µl ribonukleáz inhibitor és 2 µl 10 mM dNTP mixet adtunk. Összekevertük az oldatot, majd centrifugáltuk. 25 °C-on 5 perces inkubáció után hozzáadtuk a reverztranszkriptáz enzimet (200 U/µl) úgy, hogy a végtérfogat 20 µl legyen. Ezután 10 perc 25 °C-os és 60 perc 42 °C-os inkubáció következett, majd az enzim inaktiválására 10 percig 72 °C-on tartottuk az oldatot. Az elkészült cDNS-t további feldolgozásig –20 °C-on tároltuk.

Real-time PCR reakció: A PCR (polymerase chain reaction) reakcióhoz Mini Opticon™ (Biorad) típusú PCR műszert használtunk. A primereket a Primer-BLAST programmal terveztük és a Sigma-aldrich, illetve Bio-science cégektől rendeltük meg. Minden mintából két párhuzamost, bennük kilenc fehérje mRNS-ét vizsgáltuk (4. táblázat). A reakcióban 25 µl IQ™ SYBR GreenSupermixet (Biorad), 18 ml DEPC-vizet, 1–1 µl primer-párt használtunk 5 µl cDNS-hez.

A PCR reakciót 3 perc 95 °C-os enzimaktivációval kezdtük. Ezt követte 40 ciklus az alábbiak szerint: 95 °C 10 mp, 56 °C 10 mp, 72 °C 20 mp. A reakció végtermékeit az oladási görbével és agaróz gélen történt futtatással is ellenőriztük.

A PCR eredmények mennyiségi értékeléséhez a relatív módszert használtuk (2^{-DDCt}). Azonban a hatványozás azonosságait kihasználva a számítás egyéb lépéseit is érdemesnek találtuk a publikálásra, mert fontos különbséget mutattak (39. ábra).

Az elővizsgálatok során több háztartási gén is tesztelésre került: GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), HPRT (Hipoxantin-guanin-foszforibozil transzferáz), β-actin. A számítások alapján a legstabilabb HPRT-t választottuk, hasonlóan Etschmann és mtsai 2006-os Vet Pathol cikkében leírtakhoz.

2.4.3. Statisztikai analízis

Összehasonlítottuk ugyanazon állat daganatos, illetve egészséges emlőjéből származó expressziós értékeket, valamint a pácienseket csoportokra osztottuk a daganat szövettani malignitási foka alapján: Grade I ($n = 4$), Grade II ($n = 7$) és Grade III ($n = 4$). Vizsgálataink során Student-féle t -próbát, Kruskal-Wallis ANOVA-t, valamint Mann-Whitney próbát végeztünk a Statistica program használatával. A kapott eredményeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

4. táblázat: Az alkalmazott primerek szekvenciái

Primer	Szekvencia
EGFR Forward	CGCAGACTGCTGCAAGAAAG
EGFR Reverse	CAAGAGAGCCTGGTTGGGAG
ERBB2 Forward	GACCCACCTGGATATGCTCC
ERBB2 Reverse	TTGGCAGGCAGGTAAGTGAG
VEGFR1 Forward	ATTCGAGGAAAGGGGAAGGG
VEGFR1 Reverse	AGGGAACGCTCCAGGGTTTA
VEGFR2 Forward	GTTGGGAGAGGAGAGAGGGT
VEGFR2 Reverse	CAGTGCACCACAAAGACACG
PDGFR1 Forward	GAGGAACAGACACAGCTCACA
PDGFR1 Reverse	TCCTCGATGGTTTCGTCCTC
PDGFR2 Forward	CTGCTGTTGATGCTGAGCCC
PDGFR2 Reverse	CGAGCAGGTCAGAACGAAGG
c-KIT Forward	GGAAGCCTCTTCCCAAGGAC
c-KIT Reverse	TACTCGCGCTTCACGTTTCT
c-MET Forward	TCTCTCTTTGAACATGTTTTGGCA
c-MET Reverse	AGAAGCACAAGGATGCCAGG
HPRT Forward	5'-GACCAGTCAACAGGGACAT-3'
HPRT Reverse	5'-ACACTTCGAGGGGTCCTTTT-3'

3. Eredmények

3.1. A Pgp-expresszió vizsgálata kutyák lymphomája esetén

Klinikai paraméterek. 18 kutyát kizárólag COPA protokoll, 10 kutyát COPA, majd a visszaesés után Madison-Wisconsin (MW)-protokoll, 4 beteget pedig kizárólag MW-protokoll szerint kezeltünk. A leggyakrabban tapasztalt mellékhatás a hasmenés volt, 28 esetben fordult elő (súlyosság szerint csoportosítva Grade I 19 esetben, Grade II 5 esetben, Grade III 3 esetben, Grade IV pedig 1 esetben). 20 esetben tapasztaltunk anorexiát (Grade I 17 alkalommal, Grade II 2 alkalommal, Grade III 1 alkalommal). 12 esetben volt hányás, Grade I ($n = 9$), Grade II ($n = 1$), illetve Grade III ($n = 2$). Lázás állapot 6 alkalommal alakult ki (Grade I: $n = 5$, Grade II: $n = 1$). Alopecia 8 esetben jelentkezett (Grade I: $n = 7$, Grade II: $n = 1$). Tályog 12 esetben alakult ki (Grade I: $n = 11$, Grade II: $n = 1$). 7 kutya kapott pneumóniát, valamennyi Grade I volt. 6 esetben tapasztaltunk neutropeniát (Grade I: $n = 5$, Grade II: $n = 1$). 3 betegnél alakult ki cystitis. 15 kutyánál alakult ki thrombocytopenia (Grade I: $n = 9$, Grade II: $n = 3$, Grade III: $n = 3$). Egy kutya az első kemoterápiás kezelés (doxorubicin) után elpusztult, ezt az egyedét a túlélést vizsgáló log-rank tesztben nem szerepeltettük. 4 eb élete végéig nem recidivált, de ezek közül 3 még az első kemoterápiás ciklus lezárása előtt elpusztult, ezeket az adatokat a recidívamentes időszak (RFP) számításakor cenzoráltuk. Összesen egy olyan beteg volt, amelyik az első kemoterápiás ciklus befejezése után élete végéig nem mutatott tüneteket. A medián recidívamentes időszak (RFP) valamennyi beteget figyelembe véve 134 nap volt [95% CI: 95–232], a medián teljes túlélés (OST) 333 nap (95% CI: 240–540). A kezelés megkezdése után 1 évvel 5 kutya volt tünetmentes. A leghosszabb túlélés 790 nap volt. 11 kutya pusztult el a 19 hetes COPA protokoll befejezése előtt. 17 kutya (51,51%) esetében tapasztaltunk recidívát a 19 hetes COPA protokoll befejezése előtt. A recidívát követően 2 kutya tulajdonosa romló általános állapotuk miatt nem kért további kemoterápiát (a betegeket cenzoráltuk). A kiújulást követően 10 kutya részesült egy második kemoterápiás ciklusban (MW-protokoll). A kizárólag COPA protokollal kezelt kutyák ($n = 18$) esetében a medián recidívamentes periódus 95 nap volt, a medián túlélés pedig 150 nap. Kizárólag MW-protokoll esetén a medián RFP 100 nap, a medián OST 135 nap volt. Mindkét protokoll használata esetén a medián RFP 243 nap volt, míg a medián OST 404 nap. A kizárólag COPA vagy MW protokollban részesült betegek esetén nem volt szignifikáns különbség sem a teljes túlélésben, sem pedig a recidívamentes időben. Azok a kutyák, amik egymást követően COPA és MW-protokollt is kaptak, szignifikánsan magasabb

recidívamentes és teljes túlélést értek el, mint csak az egyik protokollt kapó kutyák ($p = 0,022$, Cox proportional hazards regression). A medián túlélés egy protokoll használata esetén 165,3 nap volt, 2 protokoll használatakor 414,3 nap. A kutyák többsége ($n = 22$) komplett remissziót (CR) mutatott, 8 beteg részlegesen, 3 pedig nem reagált megfelelően (60%, 50%, illetve 40% remisszió). 22 kutya esetében az elhullás oka a primer tumor vagy recidíva volt. A fennmaradó 11 kutyából 9 esetén a halál oka szeptikus, gyulladós folyamat és/vagy gyógyszer mellékhatás volt, 2 esetben pedig klinikailag nem lehetett különbséget tenni a daganat által kiváltott vagy egyéb okok (gyógyszer mellékhatás) között. A kemoterápia során fellépett mellékhatások (egyes epizódok száma, súlyosság foka (Grade), összesített pontszámok) az 5. sz. táblázatban láthatók.

Immunfenotípus szerint a lymphomák 72,72%-a B-sejtes ($n = 24$), 27,27%-a pedig T-sejtes volt ($n = 9$). B-sejtes lymphomák esetén nem szignifikánsan magasabb teljes túlélést (253 nap) és recidívamentes periódust (167 nap) tapasztaltunk, mint a T-sejtes formák esetén (150 és 81 nap).

Stádium és alstádium szerint a IV stádiumú betegek teljes medián túlélése ($n = 22$, medián: 415 nap) szignifikánsan különbözött az egyéb stádiumokétól, II stádium ($n = 1$, medián: 135 nap), III stádium ($n = 4$, medián: 124 nap) és V stádium ($n = 6$, medián: 150 nap) ($p = 0,0174$). Az egyes alstádiumok medián teljes túlélése nem különbözött szignifikánsan („a”: $n = 15$, medián: 404 nap, „b”: $n = 18$, medián: 124 nap).

Ivararány. Szukák és kanok esetében a teljes túlélésben nem találtunk szignifikáns különbséget (kanok: $n = 18$, medián: 342 nap, szukák: $n = 15$, medián: 244 nap).

Pgp-expresszió: A daganatsejtek festődésének átlagos mértéke 32,3% ($\pm 30,1$) volt.

Pgp-pontérték: Az anyag és módszer részben leírt pontrendszer alapján 15 beteg volt negatív (0 pont), 18 pozitív (1 vagy több pont). 1 pontot 2, 2 pontot 11, 3 pontot pedig 4 beteg kapott. Mind a recidívamentes, mind pedig a teljes túlélés szignifikánsan különbözött az eltérő pontértékű csoportok között (6. táblázat, 4. ábra). ROC-analízis segítségével a pozitívan festődött sejtek %-os aránya alapján cut-off pontot határoztunk meg az OST és RFP tekintetében. A ROC-analízist $< 35\%$ festődési értékekkel végeztük el a cenzorált adatok felhasználásával (5. ábra). Szenzitivitás és specificitás a túlélésre 0,7 és 0,75 volt, a recidívára pedig 0,533 és 1. Az OST és RFP a következőképpen alakult: $\geq 35\%$ pozitívan festődött sejt esetén 240, illetve 95 nap, $< 35\%$ Pgp-pozitivitás esetén pedig 428, illetve 232 nap (OST: $p = 0,0027$; RFP: $p = 0,004$) (7. táblázat, 5., 6. ábra).

5. táblázat: Mellékhatások COPA, illetve Madison-Wisconsin kemoterápiás protokoll alkalmazása alatt (33 lymphomás kutya adataival, a Veterinary Cooperative Oncology Group 2011-es ajánlása alapján)

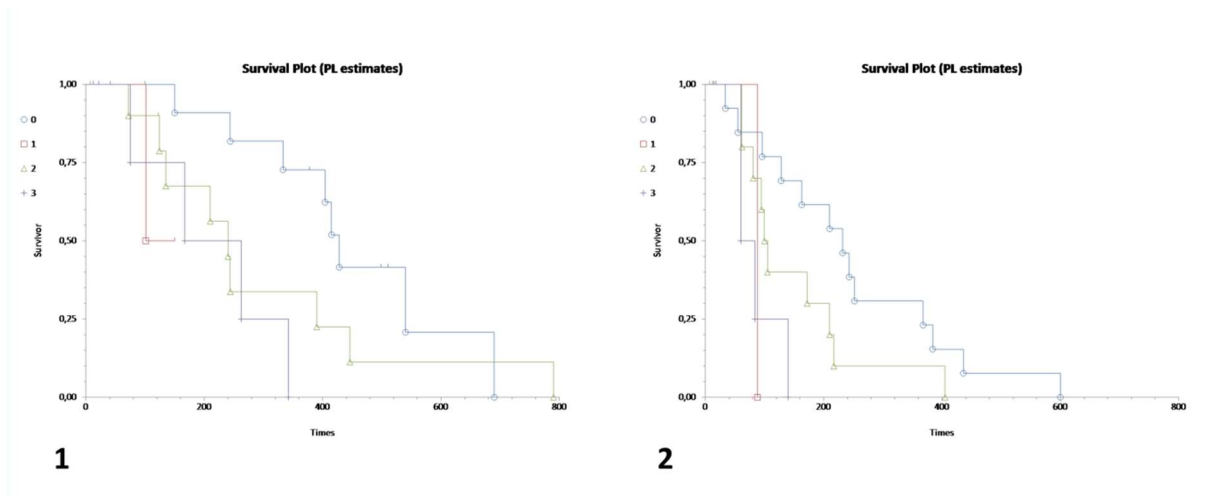
Mellékhatások	Grade					Átlag/ összes	Átlag/ Tünetek
	1	2	3	4	5		
Hányás (<i>n</i> = 12)	9	1	2				
Epizód						0,72	2,08
Kumulatív						0,50	1,48
Anorexia (<i>n</i> = 20)	17	2	1				
Epizód						1,24	2,05
Kumulatív						0,87	1,43
Hasmenés (<i>n</i> = 8)	19	5	3	1			
Grade							1,46
Epizód						1,30	1,65
Kumulatív						1,14	1,44
Láz (<i>n</i> = 6)	5	1					
Epizód						0,30	1,67
Kumulatív						0,23	1,28
Abscessus (<i>n</i> = 12)	11	1					
Epizód						0,45	1,25
Kumulatív						0,42	1,13
Alopecia (<i>n</i> = 8)	7	1					
Epizód						0,30	1,25
Kumulatív						0,29	1,19
Pneumonia (<i>n</i> = 7)	7						
Epizód						0,30	1,43
Kumulatív						0,24	1,11
Cystitis (<i>n</i> = 3)	3						
Epizód						0,15	1,67
Összesen						0,11	1,17
Neutropenia (<i>n</i> = 6)	5	1					
Epizód						0,24	1,14
Összesen						0,21	1,14
Thrombocytopenia (<i>n</i> = 15)	9	3	3				
Epizód						0,73	1,6
Kumulatív						0,69	1,5
Akut elhullás (<i>n</i> = 1)					1	5,00	5,00
Grade						5,00	5,00
Epizód						1,0	1,0

6. táblázat: Átlag és medián teljes túlélés (OST) és recidívamentes periódus (RFP) a különböző Pgp-pontszámú csoportoknál

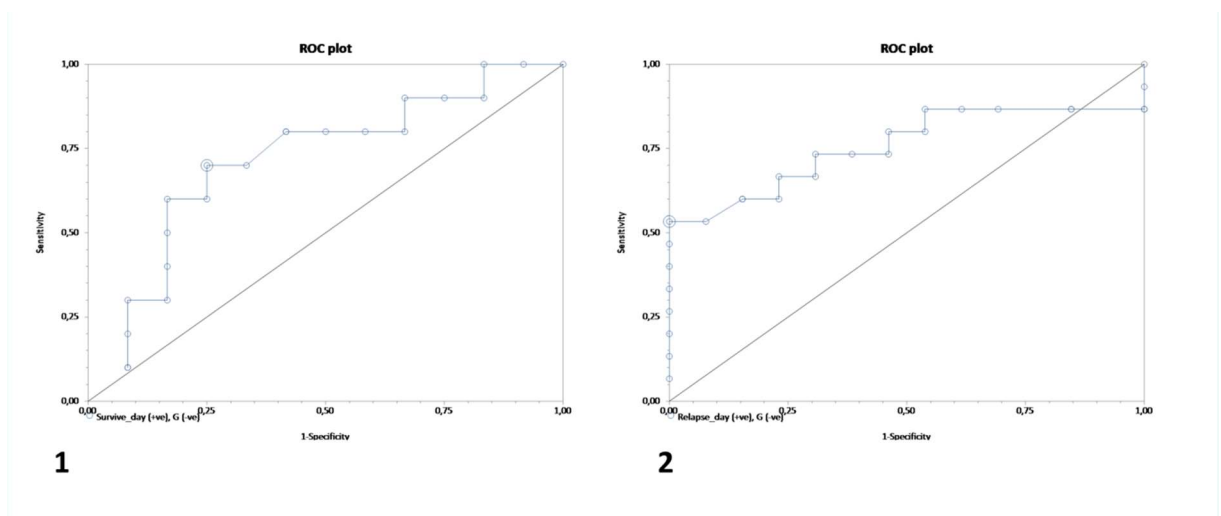
Pontérték/ Pozitívan festődött sejtek		n	RFP	OST
0	Medián	15	232	428
0–9%	Átlag (95% CI)	15	246,2	451,2
1	Medián	2	88	101
10–29%	Átlag (95% CI)	2	88	125,5
2	Medián	11	100	240
30–74%	Átlag (95% CI)	11	84,5	297,3
3	Medián	4	60	167
75–100%	Átlag (95% CI)	4	86	211,6
Log-rank teszt (Peto)	Khi-négyzet próba a halálozási ráták ekvivalenciájára		9,54 $p = 0,02$	6,58 $p = 0,09$

7. táblázat: Átlag és medián teljes túlélés (OST) és recidívamentes periódus (RFP) $\geq 35\%$ Pgp cut-off értéknél

Pozitívan festődött sejtek		n	RFP	OST
< 35%	Medián	18	232	428
	Átlag (95% CI)	18	246,3	467,3
$\geq 35\%$	Medián	14	95	240
	Átlag (95% CI)	14	111,4	227,9
Log-rank teszt (Peto)	Khi-négyzet próba a halálozási ráták ekvivalenciájára		8,95 $p = 0,003$	9,94 $p = 0,002$



4. ábra: A teljes túlélés (1) és recidívamentes periódus (2) összehasonlítása a különböző Pgp-pontszámú csoportok között. Cox proporcionális analízis. Értékek (1): $b_1 = 1,723124$, $z = 1,546224$, $p = 0,1221$. Értékek (2): $b_2 = 0,730133$, $z = 1,622024$, $p = 0,1048$. Értékek (3): $b_3 = 1,765823$, $z = 2,688298$, $p = 0,0072$

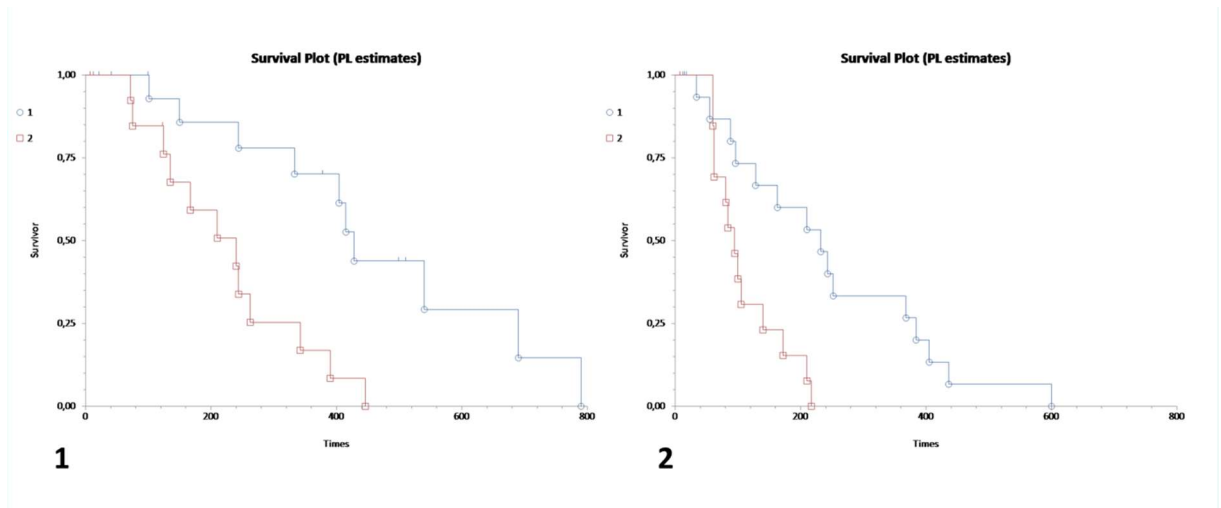


5. ábra: ROC-görbék a teljes túlélésre (1) és a recidívamentes periódusra (2) $\geq 35\%$ és $< 35\%$ Pgp cut-off érték használata esetén cenzorált adatokkal. Becsült cut-off érték 333 nap a teljes túlélés és 232 nap a recidívamentes periódus esetén. Tökéletes megkülönböztető képesség esetén (nincs átfedés a két eloszlásban) olyan ROC-görbét látunk, amely a (0;1) ponton (bal felső sarok) halad át (ebben az esetben 100%-os a szenzitivitás és 100%-os a specificitás). A teljesen véletlenszerű megkülönböztető képesség megegyezik az $y=x$ egyenessel, az ilyen modell szétválasztóképessége gyakorlatilag nulla. Minél közelebb van a ROC-görbe a (0;1) ponthoz, annál nagyobb a vizsgálat általános pontossága.

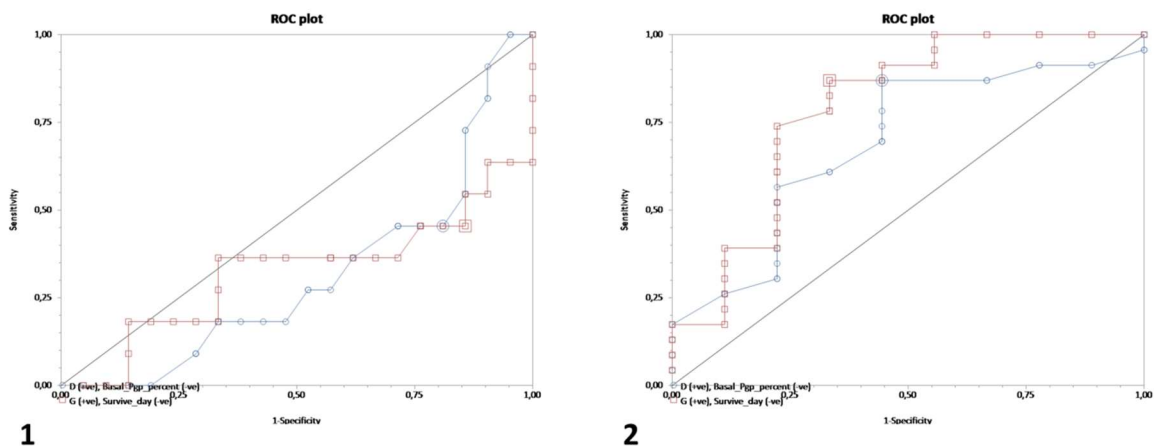
Pgp festődési intenzitás: 14 esetben gyenge, 6 esetben normál és 13 esetben erős festődést tapasztaltunk. Normál és erős festődést szignifikánsan gyakrabban ($p = 0,0028$) tapasztaltunk T-sejtes lymphomáknál (9 betegből 8), mint a B-sejtes formáknál (24 betegből 11). A gyenge festődésű csoportban a teljes túlélés ($p = 0,016$) és a recidívamentes periódus ($p = 0,0466$) is szignifikánsan magasabb volt, mint a normál+erős festődésű betegeknél (OST: 428 nap vs. 240 nap, RFP: 221 nap vs. 103 nap).

Gyógyszermellékhatások és Pgp-expressziós értékek összehasonlítása: ROC-analízis készült annak eldöntésére, hogy a Pgp-expresszió immunhisztokémiai vizsgálata alkalmas lehet-e a halál okának előrejelzésére (gyógyszermellékhatás vagy recidíva). A gyógyszermellékhatás miatt bekövetkezett halál előrejelzésére (medián 123 nap, $n = 11$) a legalkalmasabb a $\leq 6,5\%$ Pgp cut-off érték (szenzitivitás 0,55, specificitás 0,81, pozitív prediktív érték 0,66, negatív prediktív érték 0,77) és a 123 nap volt (szenzitivitás 0,55, specificitás 0,86, pozitív prediktív érték 0,78, negatív prediktív érték 0,23). A visszaesés miatt bekövetkezett halál előrejelzésére (medián 140 nap, $n = 23$) a legalkalmasabb a $> 6,5\%$ Pgp cut-off érték (szenzitivitás 0,87, specificitás 0,55, pozitív prediktív érték 0,83, negatív prediktív érték 0,63) és a 124 nap volt (szenzitivitás 0,87, specificitás 0,66, pozitív prediktív érték 0,87, negatív prediktív érték 0,66) (7. ábra).

A gyógyszermellékhatások okozta klinikai tünetek gyakoriságában nem volt lényeges eltérés a két csoport között. Szignifikáns különbség volt a hasmenés gyakoriságában, számszerűen a Pgp-negatív ($\leq 6,5\%$) csoportban $2,20 \pm 1,25$, a Pgp-pozitívban $0,91 \pm 0,77$ ($p = 0,014$). A hasmenés kumulatív pontértékében szintén szignifikáns különbség volt a két csoport között, mégpedig $1,67 \pm 0,48$ Pgp-negatívak és $0,91 \pm 0,77$ Pgp-pozitívok ($p = 0,001$).



6. ábra: Különbségek a teljes túlélésben (1) és a recidívamentes periódusban (2) $\geq 35\%$ és $< 35\%$ Pgp cut-off érték használata esetén. Cox proporcionális analízis. Teljes túlélés: deviancia/valószínűség/khi-négyzet = 9,017812, $df = 1$, $p = 0,0027$. Recidívamentes periódus: deviancia/valószínűség/khi-négyze $t = 8,284659$, $df = 1$, $p = 0,004$. Recidíva: deviancia/valószínűség/khi-négyzet = 8,284659, $df = 1$, $p = 0,004$



7. ábra: ROC-görbe a gyógyszer mellékhatás okozta halálzásra (1) $\leq 6,5\%$ Pgp-expressziós és 123 napos cut-off értékek használatával ($n = 11$). ROC-görbe a recidíva okozta halálzásra (2) $\leq 6,5\%$ Pgp-expressziós és 124 napos cut-off értékek használatával ($n = 23$).

3.2. A Pgp- és a p53-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

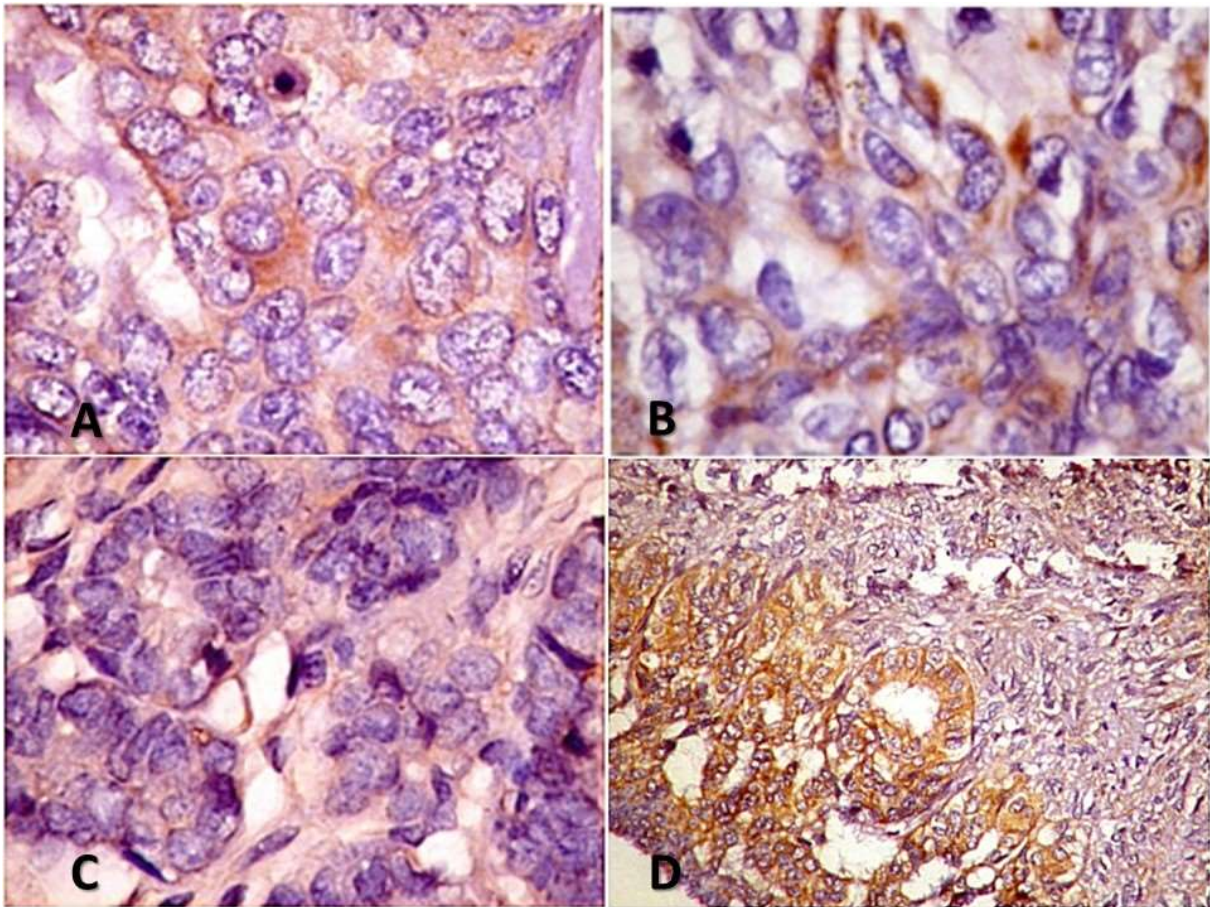
3.2.1. Pgp- és p53-expresszió az egészséges, illetve a daganatos emlőszövetben

A p53-expresszió 2 esetben nem volt megítélhető. Olyan eset, amelyben 0–10%-os pozitivitást találtunk, 4 volt. Összesen 6 esetben tapasztaltunk 10–50% közötti pozitivitást. Összesen 10 esetben volt 50–80%-os pozitívítás és 8 esetben 80–100%-os pozitívítás jelentkezett (8. táblázat). Magfestődés és citoplazmafestődés 10 esetben volt (tubulopapilláris carcinoma: $n = 4$, komplex carcinoma: $n = 4$, lipidgazdag carcinoma és carcinosarcoma), valamint csak citoplazmafestődés 15 esetben. A festődés az ép myoepithelialis sejtekben nem volt a pozitív kontrollnak megfelelő vagy annál fokozottabb (8., 9., 10. ábra). A p53-pontszámoknak megfelelően kialakított táblázatban a betegekre jellemző különböző klinikai paramétereket tüntettük fel (10. táblázat). Ebben a táblázatban a Pgp-expressziós % és az életkor esetében a konkrét számadatokról egyértelmű az átlag és a szórásérték közlése. A többi adat esetében (nyirokcsomó-metasztázis, már recidivált daganat, recidíva a későbbiekben, egyéb daganat kifejlődése később, elhullás daganat miatt, ivartalanított, pyometra korábban) az átlagot és a szórásértékeket úgy számoltuk, hogy a tulajdonság megléte kapott számértéket és a hiánya „0”-t. Ezeknek a paramétereknek az átlag és szórásértékét nem írtuk be a táblázatba.

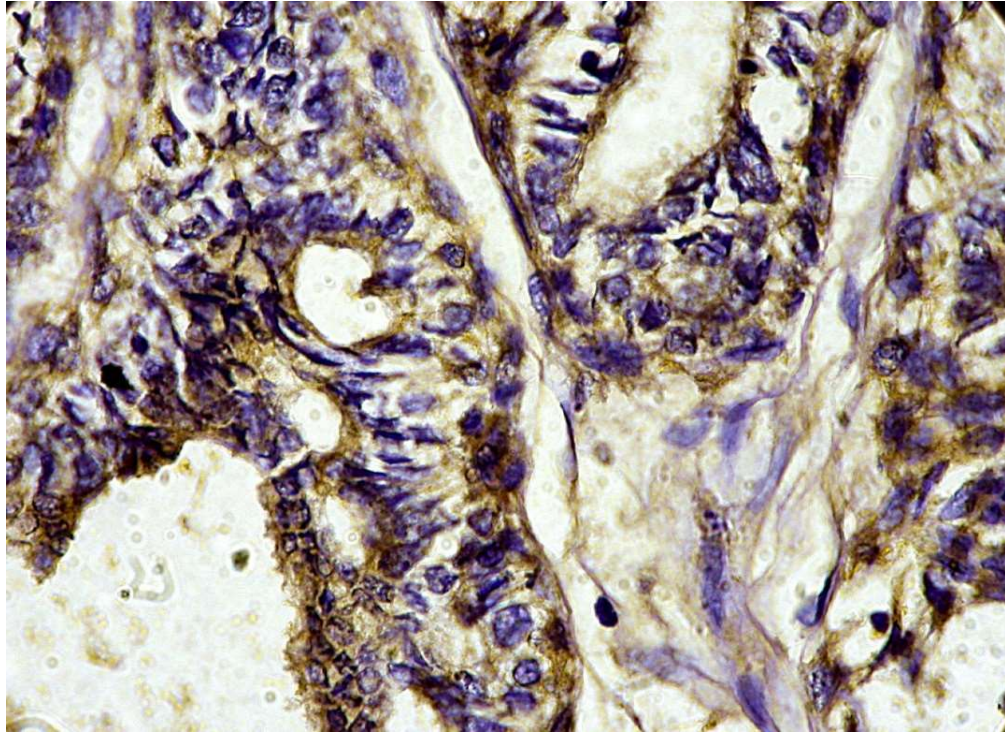
A Pgp-expresszió esetén 10% alatti pozitivitást, vagyis 0 pontot detektáltunk 2 esetben, 10%–30% pozitivitást, vagyis 1 pontot 13 esetben, 30%–75% pozitivitást, vagyis 2 pontot 10 esetben, 75% feletti pozitívítás, vagyis 3 pontot 5 esetben (9. táblázat). Minden esetben tapasztaltunk membrán és citoplazma expressziót is. A Pgp-pontszámoknak megfelelően kialakított 11. sz. táblázatban a betegekre jellemző különböző klinikai paramétereket tüntettük fel. Ebben a táblázatban a p53-expressziós % és az életkor esetében a konkrét számadatokról egyértelmű az átlag és a szórásérték közlése. A többi adat esetében (nyirokcsomó-metasztázis, már recidivált daganat, recidíva később, egyéb daganat kifejlődése később, elhullás daganat miatt, ivartalanított, pyometra korábban) az átlagot és a szórásértékeket úgy számoltuk, hogy a tulajdonság megléte számértéket és a hiánya „0”-t. Ezeknek a paramétereknek az átlag és szórásértékét nem írtuk be a táblázatba.

A myoepithel sejtekre is jellemző volt a Pgp-expresszió, bár gyengébb festődést tapasztaltunk, mint az epithelialis sejtekben, ami nem zavarta az epithelialis sejtekben jelentkező expressziók megállapítását. Az epithelialis sejtekben Pgp a citoplazmában és a

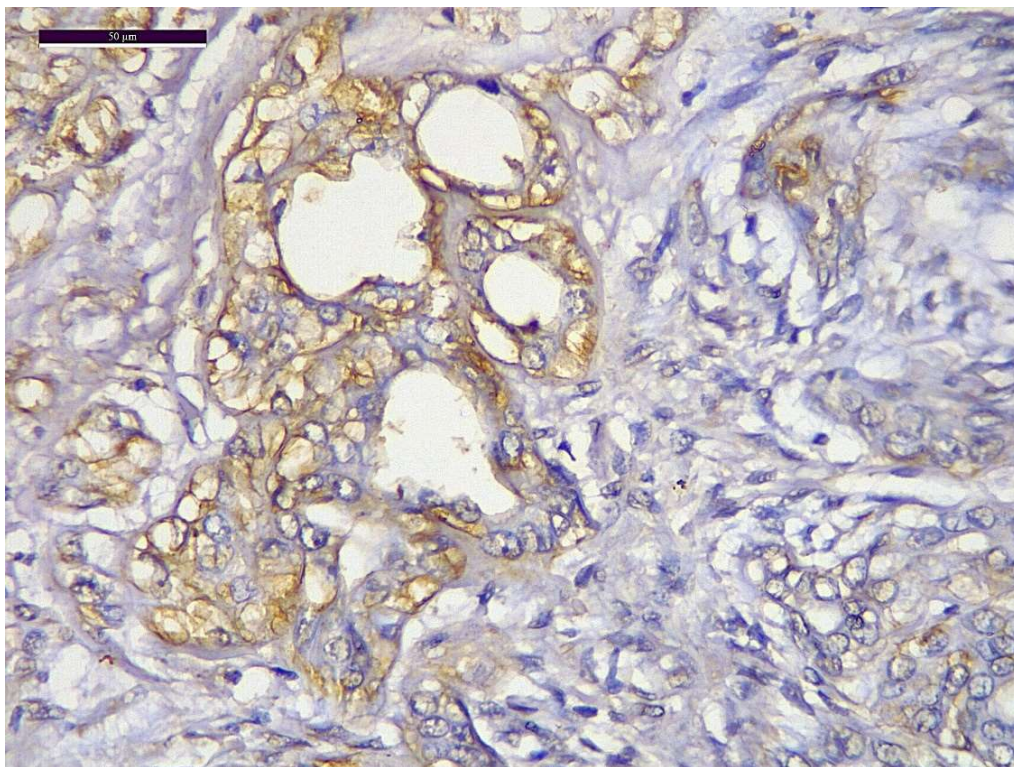
membránban, a myoepithelialis sejtekben bár halványan, de szinte csak a membránban mutatkozott (8., 11., 12., 13. ábra).



8. ábra: Pgp-és p53-expresszió kutyák emlődaganataiban. A daganatsejtek közepes-erős immunreaktivitást mutatnak. A tumorsejtek többségében citoplazmafestődés látható, de néhány esetben perinukleáris lokalizáció is megfigyelhető. A: Kód: 147857. p53-expresszió komplex carcinomában CM-1 poliklonális ellenanyag használatával (eredeti nagyítás 1000x). B: Kód: 115375. Pgp-expresszió tubulopapilláris simplex carcinomában C-494 monoklonális ellenanyag használatával (eredeti nagyítás: 1000x). C:Kód: 95423. p53-expresszió komplex adenomában CM-1 poliklonális ellenanyag használatával (eredeti nagyítás 1000x). D: Kód: 85130. Pgp-expresszió ép ductális hámsejtekben C-494 monoklonális ellenanyag használatával (eredeti nagyítás 200x).



9. ábra: Kód 79424, komplex carcinoma, p53-immunhisztokémia. Változatos festődés, amely a citoplazmát és a magokat is érinti. 400x-es nagyítás



10. ábra: Kód 139905, komplex adenoma, p53-immunhisztokémia. Helyenként citoplazmafestődés. 400x-os nagyítás

8. táblázat: Különböző p53-pontértékek az egyes daganattípusok esetén

p53-pontérték	Tumortípusok
pont (<i>n</i> = 2)	benignus vegyes daganat (<i>n</i> = 2)
1 pont (<i>n</i> = 4)	komplex adenoma komplex cc. (<i>n</i> = 2) tubulopapilláris cc.
2 pont (<i>n</i> = 6)	carcinosarcoma (<i>n</i> = 2) komplex adenoma intracanalikuláris fibroadenoma komplex cc. (<i>n</i> = 2)
3 pont (<i>n</i> = 10)	komplex cc. (<i>n</i> = 6), lipid-gazdag cc. ductus-papilloma, ductectasia tubulopapilláris cc. (<i>n</i> = 2)
4 pont (<i>n</i> = 8)	tubulopapilláris cc. (<i>n</i> = 6) komplex cc. (<i>n</i> = 2)

9. táblázat: Különböző Pgp-pontszámok az egyes daganattípusok esetén

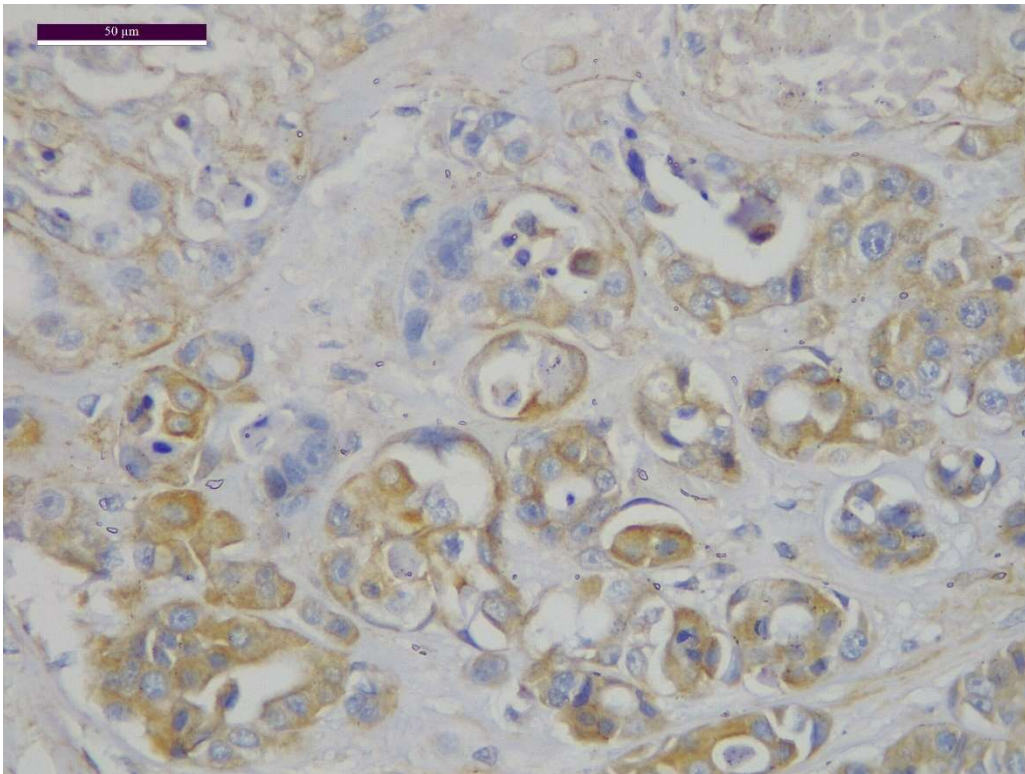
Pgp-pontérték	Tumortípusok
0 pont (<i>n</i> = 2)	carcinosarcoma komplex cc.
1 pont (<i>n</i> = 13)	benignus vegyes daganat (<i>n</i> = 2), carcinosarcoma, tubulopapilláris cc., komplex adenoma (<i>n</i> = 2), komplex cc. (<i>n</i> = 6) ductus-papilloma, ductectasia
2 pont (<i>n</i> = 10)	lipid-gazdag cc. komplex cc. (<i>n</i> = 4), tubulopapilláris cc. (<i>n</i> = 4), intracanalikuláris fibroadenoma
3 pont (<i>n</i> = 5)	komplex cc., tubulopapilláris cc. (<i>n</i> = 4)

10. táblázat: Különböző klinikai paraméterek összehasonlítása az eltérő p53-pontszámú emlődaganatok esetén

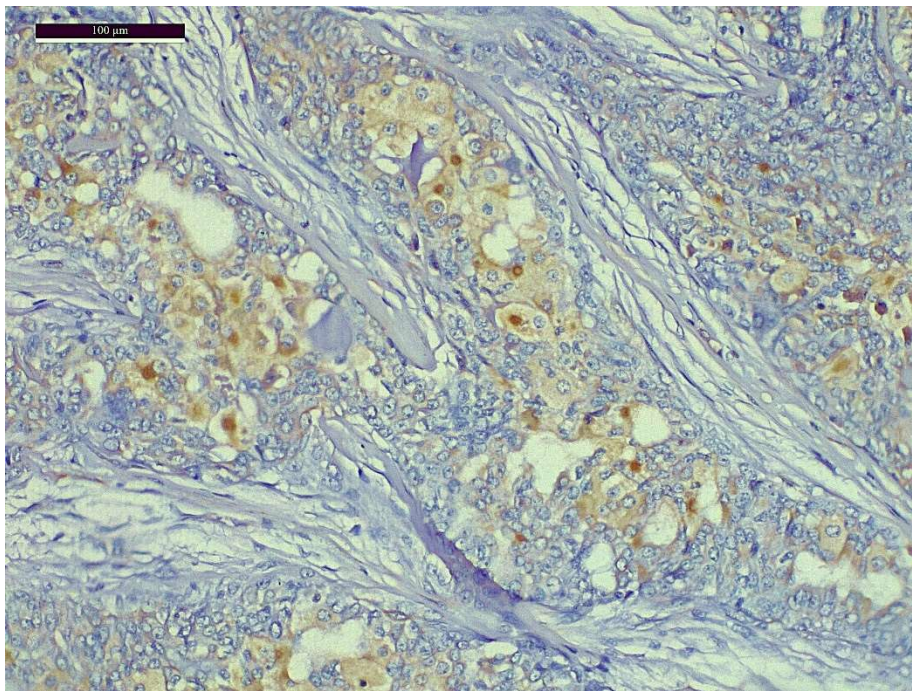
p53- pontszám	Pgp%	Kor (év)	Nyirok- csomó- met.	Már recidivált daganat	Recidíva később	Egyéb daganat később	Elhullás daganat miatt	Ivar- talanított	Pyometra korábban
0 pont									
(n = 2)			0	1	0	1	1	1	1
Átlag	41,67	9,50							
± SD	23,92	3,50							
1 pont									
(n = 4)			0	2	0	2	2	0	0
Átlag	40,63	9,25							
± SD	21,09	2,68							
2 pont									
(n = 6)			1	0	0	1	3	0	2
Átlag	18,54	10,33							
± SD	8,79	2,87							
3 pont									
(n = 10)			2	2	1	1	1	2	2
Átlag	48,75	8,56							
± SD	27,91	1,83							
4 pont									
(n = 8)			0	3	1	1	1	0	0
Átlag	58,75	8,57							
± SD	22,33	2,19							

A mikroszkópos vizsgálat alapján megállapítottuk, hogy az ép ductális epitheliumban a Pgp-expresszió kifejezett volt, csakúgy, mint a kötőszöveti elemekben. Ugyanez a sejttípus jelenik meg daganatos transzformálódás után a tubulopapilláris daganatokban, így ezekben is fokozott a Pgp-expresszió mértéke. Wilcoxon rank-sum teszttel a különböző tumortípusok Pgp- illetve p53-expressziós értékeit hasonlítottuk össze. Szignifikánsnak bizonyult a különbség a tubulopapilláris és a komplex carcinoma Pgp- és p53-expressziós értékeinél.

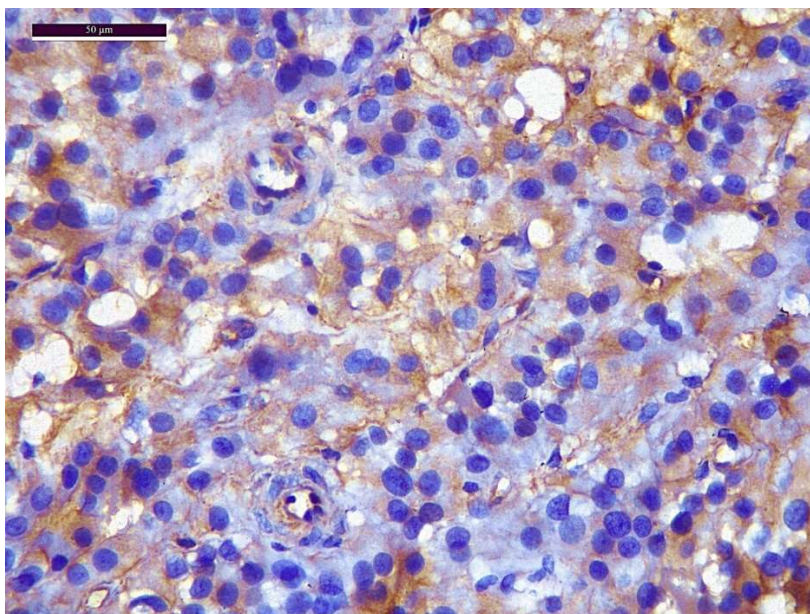
Pgp-expressziót tekintve szignifikáns, p53-expressziót tekintve szignifikancia közeli különbséget találtunk a tubulopapilláris carcinoma és a benignus daganatok között. Kizárólag a Pgp-expressziót vizsgálva szignifikáns különbséget találtunk valamennyi malignus csoport, illetve a benignus daganatok között (12. táblázat).



11. ábra: Kód: 106350, carcinosarcoma, Pgp-immunhisztokémia. Kiterjedt citoplazmatikus festődés és a mesenchymális eredetű sejtekben halvány membránfestődés. 400x-os nagyítás



12. ábra: Kód: 112325, komplex carcinoma. Fokális Pgp-festődés. 200x-os nagyítás



13. ábra: Kód: 014-0-04, tubulopapilláris carcinoma. Szigetekben kiterjedt Pgp-festődés. 400x-es nagyítás

11. táblázat: Különböző klinikai paraméterek összehasonlítása az eltérő Pgp-pontszámú emlődaganatok esetén

Pgp-pontszám	p53%	Kor (év)	Nyirok-csomó met.	Már recidivált daganat	Recidíva később	Egyéb daganat később	Elhullás daganat miatt	Ivar-talanított	Pyometra korábban
0 pont (n = 2)			0	0	0	0	0	0	0
Átlag	45,00	11,00							
± SD	30,00	1,00							
1 pont (n = 13)			3	4	0	3	4	1	2
Átlag	42,69	10,08							
± SD	33,30	2,66							
2 pont (n = 10)			0	2	0	3	3	1	2
Átlag	49,20	8,11							
± SD	35,28	1,73							
3 pont (n = 5)			0	2	2	0	1	1	1
Átlag	83,00	8,25							
± SD	11,66	2,59							

12. táblázat: A Pgp- és a p53-expressziós értékek összehasonlítása a különböző daganattípusok között

	Pgp (%)	p53 (%)
I.Tubulopapilláris carcinoma (simplex)	66,9 ±20,1	85,6±7,2
II.Komplex carcinoma	35,7±22,5	66,5±18,4
III.Benignus daganat	25,0±29,5	43,3±19,2
IV.Egyéb malignus daganat	33, 3±29,5	30,0±15,0
<i>p</i> -érték: I-II	0,0052	0,0146
<i>p</i> -érték: I-III	0,0002	0,0847
<i>p</i> -érték: I-IV	0,2431	0,1577
<i>p</i> -érték II-III	0,1683	0,2234
<i>p</i> -érték: II-IV	0,9215	0,2098
<i>p</i> -érték: III-IV	0,7296	0,5665
<i>p</i> -érték: I, II, IV-III	0,001773	0,173513

3.2.2. A Pgp- és a p53-expresszió összefüggése különböző klinikai paraméterekkel

Összehasonlítottuk a betegek kórelőzményét, hogy történt-e ivartalanítás a daganat megjelenése előtt. Az ivartalanított és intakt csoport között nem volt szignifikáns különbség. Összehasonlítottuk azt is, hogy milyen életkorban jelentkeztek az egyes emlődaganatok. Ezekben az összehasonlításokban nem volt szignifikáns különbség a daganattípusok között.

Összesen 8 olyan eset volt, amelyben nem primer, hanem már recidivált daganatot vizsgáltunk. A tubulopapilláris daganatok esetében szignifikánsan több volt olyan, amelyek már eleve recidiváltak voltak, mint a komplex carcinomák, a benignus daganatok és az egyéb tumorok között. Nyirokcsomó-áttétet csak a komplex carcinomák és a carcinosarcomák esetében találtunk (13. táblázat). Ebben a táblázatban a kor esetében a konkrét számadatokból egyértelmű az átlag és a szórásérték közlése. A többi adat esetében (nyirokcsomó-metasztázis, már recidivált daganat, recidiva később, egyéb daganat kifejlődése később, elhullás daganat miatt, ivartalanított, pyometra korábban) az átlagot és a szórásértékeket úgy számoltuk, hogy a tulajdonság megléte kapott számértéket és a hiánya „0”-t. Ezeknek a paramétereknek az átlag és szórásértékét nem írtuk be a táblázatba.

A különböző szövettani típusú daganatcsoportok túlélési idejét a 15. sz. táblázatban tüntettük fel.

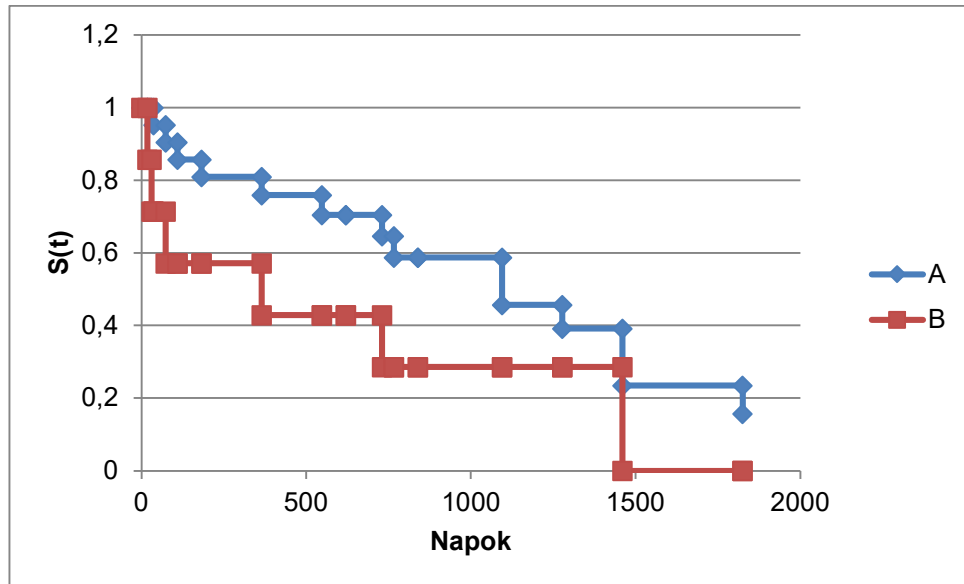
Pearson-féle korrelációs vizsgálattal a Pgp- és a p53-expresszió mértéke korrelált egymással. A Pgp-expresszió mértéke ezenkívül pozitívan korrelált a recidívára való hajlammal és negatívan a túlélési idővel. Szintén negatív, de nem szignifikáns korreláció volt a p53-expresszió mértéke és a túlélési idő között (14. táblázat). Az összehasonlító vizsgálat alapján igazolást nyert, hogy minél nagyobb arányban alakult ki más típusú daganat az általunk korábban műtött kutyában, annál nagyobb valószínűséggel hullott el a beteg daganat miatt (13. táblázat).

A p53-expresszió tekintetében nem találtunk korrelációt a mag-, illetve citoplazma-expresszió között ($r = -0,044$), valamint a nukleáris expresszió és a túlélési idő között ($r = -0,145$, $p = 0,479$).

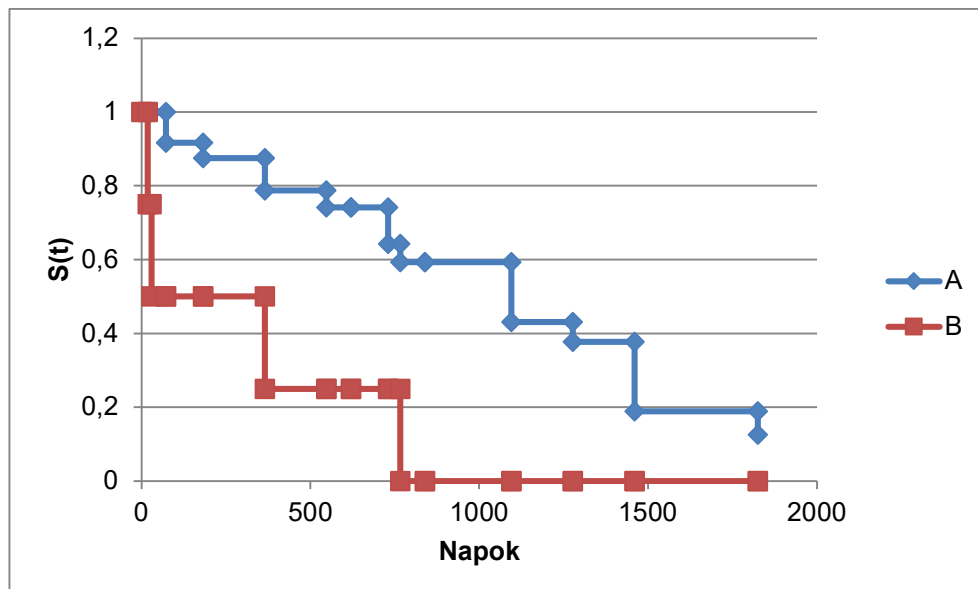
A p53-expresszió kapcsolata a túléléssel. Wilcoxon Log-rank analízissel összehasonlítottuk a medián túlélési időt a különböző p53-pontszámú betegcsoportok között. Az alacsony (0, 1, 2) pontszámmal rendelkező csoportnál ($n = 22$) az OST 803 nap volt, míg a magas pontszámú (3 pont, $n = 8$) csoport esetén 365 nap, a különbség szignifikancia közeli volt ($p = 0,05263$) (14. ábra). A különböző p53-pontszámú csoportok medián túlélési idejét a 16. táblázatban tüntettük fel.

A Pgp-expresszió kapcsolata a túléléssel. Wilcoxon Log-rank analízissel összehasonlítottuk medián túlélési időt a különböző Pgp-pontszámú betegcsoportok között. Az alacsony (0, 1, 2) pontszámmal rendelkező csoportnál ($n = 25$) az OST 766 nap volt, míg

a magas pontszámú (3 pont, $n = 5$) csoport esetén 36,5 nap, a különbség szignifikáns volt ($p = 0,0302$) (15. ábra). A különböző Pgp-pontszámú csoportok medián túlélési idejét a 17. sz. táblázatban tüntettük fel.



14. ábra: A napokban kifejezett medián túlélés (OST) összehasonlítása az alacsony (0, 1, 2 pontérték, „A”) és a magas p53-pontszámú (3 pont, „B”) csoport között. OST 803 nap vs. 365 nap. (Wilcoxon Log-rank analízis, $p = 0,05263$)



15. ábra: A napokban kifejezett medián túlélés (OST) összehasonlítása az alacsony (0, 1, 2 pontérték, „A”) és a magas Pgp-pontszámú (3 pont, „B”) csoport között. OST 766 nap vs. 36,5 nap (Wilcoxon Log-rank analízis, $p = 0,0302$).

13. táblázat: Különböző klinikai paraméterek összehasonlítása az eltérő szövettani típusú malignus emlődaganatok esetén

	Kor (év)	Nyirok- csomó- metasz- tázis	Már recidivált daganat	Recidíva később	Egyéb daganat kifejlő- dése később	Elhullás daganat miatt a későbbiek- ben	Ivar- talanított	Pyometra korábban
I. Tubulo- papilláris carcinoma (simplex) (n = 9)		0	5	2	1	1	2	2
Átlag	8,88							
± SD	2,09							
II. Komplex carcinoma (n = 12)		2	1	0	3	3	0	0
Átlag	9,91							
± SD	2,15							
III. Egyéb malignus daganat (n = 3)		1	0	0	0	1	0	1
Átlag	8,67							
± SD	2,49							
Szignifikancia (p-érték)			I–II: 0,036 I–III: 0,0133					

14. táblázat: A túlélés, a recidívára való hajlam, a p53- és Pgp-expresszió összehasonlítása Pearson-féle korrelációs vizsgálattal

Összehasonlított paraméterek	Korrelációs együttható	Szignifikancia
Pgp : p53	0,55	$p < 0,01$
Pgp : recidíva	0,484	$p < 0,01$
Pgp: túlélési idő	-0,287	$p < 0,05$
p53: túlélési idő	-0,122	nem szignifikáns

15. táblázat: A túlélési idő napokban a különböző szövettani típusú emlődaganatok esetén

Daganattípus	Átlag	Medián
I. Tubulopapilláris carcinoma	460	365
SD	±382	
II. Komplex carcinoma	754	456
SD	±670	
III. Benignus daganat	1186	1186
SD	±763	
IV. Egyéb malignus daganat	803	803
SD	±52	
Szignifikancia (p -érték)	I–III: 0,006 II–III: 0,0469 III–IV: 0,0439	

16. táblázat: A napokban kifejezett medián túlélési idő (OST) összehasonlítása a különböző p53-pontszámú csoportok között

p53-pontérték	Medián túlélési idő (nap)
0 pont (<i>n</i> = 2)	
Medián	930,75
Átlag	827,33
± SD	198,43
1 pont (<i>n</i> = 4)	
Medián	1003,75
Átlag	1095,00
± SD	741,32
2 pont (<i>n</i> = 6)	
Medián	602,25
Átlag	687,42
± SD	545,23
3 pont (<i>n</i> = 10)	
Medián	930,75
Átlag	938,05
± SD	643,90
4 pont (<i>n</i> = 8)	
Medián	365,00
Átlag	471,44
± SD	459,94

17. táblázat: A túlélési idők összehasonlítása a különböző Pgp-pontszámú csoportok között

Pgp-pontszám	túlélési idő (nap)
0 pont (<i>n</i> = 2)	
Medián	328,50
Átlag	328,50
± SD	219,00
1 pont (<i>n</i> = 13)	
Medián	1003,75
Átlag	932,15
± SD	647,67
2 pont (<i>n</i> = 10)	
Medián	602,25
Átlag	941,70
± SD	549,15
3 pont (<i>n</i> = 5)	
Medián	36,50
Átlag	236,01
± SD	279,36

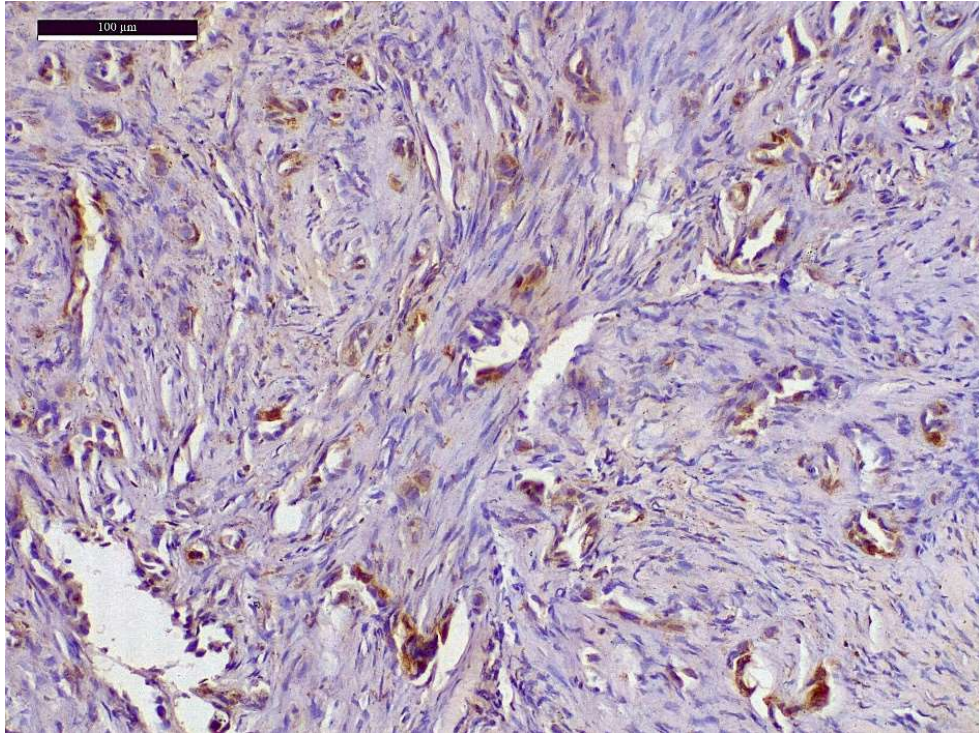
3.3. A COX-2-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

3.3.1. A COX-2-expressziók megjelenése

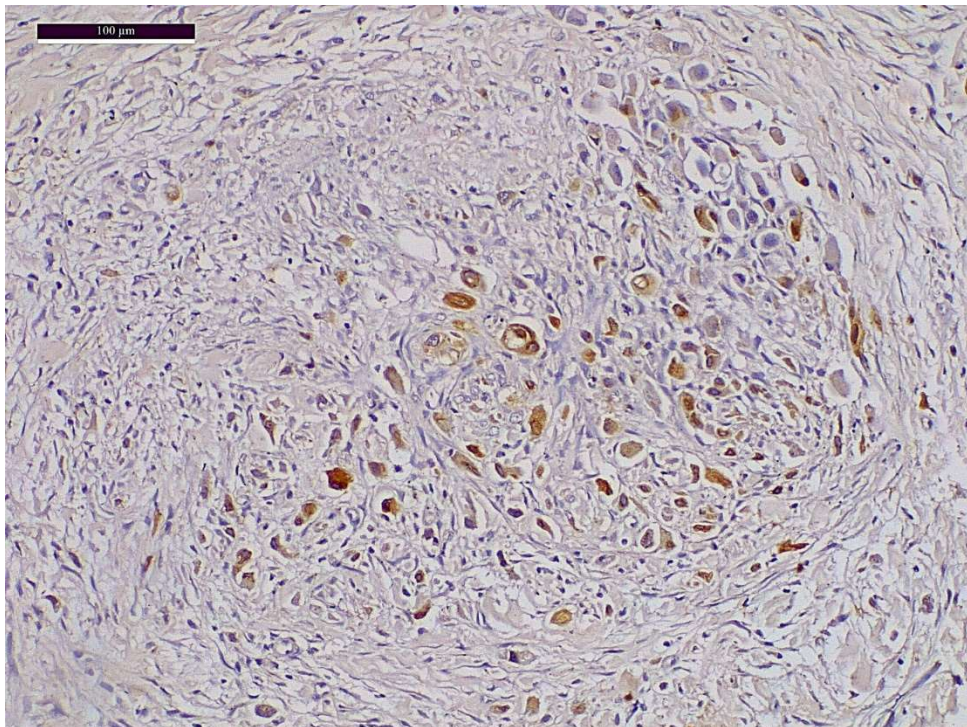
Normál emlőszövet. Néhány (< 8%) hámsejt citoplazmájában tapasztaltunk gyenge intenzitású COX-2-expressziót. Nekrotikus régióknál, a nekrotikus területet határoló fusiform fibroblasztszerű sejtek gyakran erősen pozitívak voltak a COX-2-jelöléssel. Mi ezt adenomában is tapasztaltuk. A gyulladássos sejtek, pl. macrophagok szintén expresszálták a COX-2-t, amely így belső kontrollként is alkalmazható volt.

Hyperplasticus emlőszövet és adenomák. Minden esetben tapasztalható volt gyenge, heterogén citoplazmatikus festődés. A kötőszöveti elemek festődése jelentős volt. A 13 jóindulatú elváltozásból 5 esetben nem tapasztaltunk festődést. A rosszindulatú daganatok esetében pedig 3 esetben volt gyenge a festődés, amely a 11%-ot nem érte el (tubulopapilláris carcinoma ($n = 2$) és komplex carcinoma ($n = 1$)). A COX-2-expresszió az eltérő szövettani típusú jóindulatú daganatok között eltérő volt. Így simplex adenomák esetén esetenként kis góccokban a sejtek 8–80%-a mutatott erős intenzitást ($n = 3$). A komplex típusú jóindulatú daganatokban és ductális hyperplasiában ($n = 7$) a COX-2-expresszió fokálisan a 0–79%-ig változott. A jóindulatú egyéb elváltozásokban ($n = 3$) nem mutatkozott COX-2-expresszió. Az ép emlőszövetekben a daganatos területek mellett a COX-2-expresszió fokálisan jelentkezett < 10%-ban és kevésbé volt intenzív, mint az epitheliális daganatokban.

Daganatos szövetek. A COX-2-expresszió túlnyomórészt citoplazmatikus és szemcsés volt. Ezenkívül esetenként erős perinukleáris jelölést tapasztaltunk és egy-két esetben (solid carcinoma) nukleáris jelölés is megfigyelhető volt. A fusiform stromakomponensek időnként diffúz vagy fokális reakcióképességet mutattak. A carcinosarcomákban mind a carcinomás, mind a sarcomás területeken erős és homogén COX-2-expresszió mutatkozott. A COX-2-t a rosszindulatú daganatszövet mellett nem neoplasztikus emlőrégiók is expresszálták. A látszólag ép epitheliális sejtekben a jelölés gyakran multifokális volt (az epitheliális sejtek 10–50%-a) és ritkán hasonló intenzitással jelentkezett, mint a daganatos sejtekben, de gyakrabban annál kevésbé. Ezenkívül a komplex típusú carcinomákban a myoepithelialis sejtek citoplazmája gyakran COX-2-pozitív volt (16., 17. ábra).



16. ábra: Kód: 671-711. Komplex carcinoma. 200x-os nagyítás



17. ábra: Kód: 5-5. Solid carcinoma. 200x-os nagyítás

ANOVA-teszt segítségével összehasonlítottuk a COX-2-expresszió százalékos mértékét a különböző szövettani diagnózisú csoportok között. Szignifikáns különbséget

találtunk a benignus daganatok és a solid carcinomák, a benignus daganatok és a sarcomák, valamint a benignus daganatok és a tubulopapilláris carcinomák között (18. ábra).

Festődési intenzitás. ANOVA-teszt segítségével összehasonlítottuk a COX-2-festődés intenzitását a különböző szövettani diagnózisú csoportok között. Szignifikáns különbséget találtunk a benignus daganatok és a solid carcinomák, a benignus daganatok és a tubulopapilláris carcinomák, a solid carcinomák és a komplex carcinomák, a komplex carcinomák és a sarcomák, valamint a benignus daganatok és sarcomák között (19. ábra).

3.3.2. Különböző klinikai paraméterek és a COX-2-expresszióval való kapcsolatuk vizsgálata

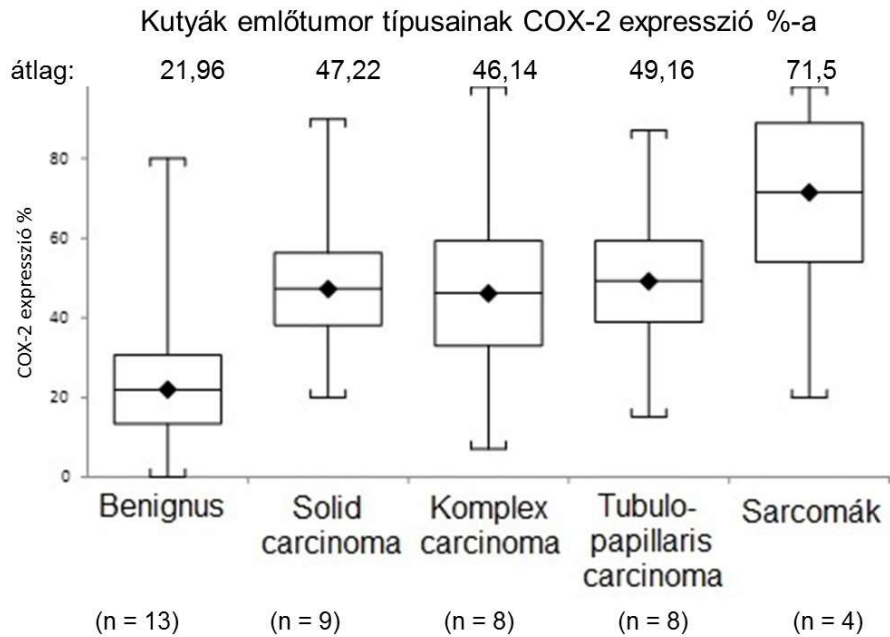
A szövettani Grade alapján a malignus daganatok megoszlása a következő volt: Grade I ($n = 14$), Grade II ($n = 7$), Grade III ($n = 8$).

A stádiumbesorolás eredménye a következő volt a benignus daganatokban: Stage I ($n = 10$), Stage II ($n = 3$), Stage III ($n = 0$), Stage IV ($n = 0$). A malignus emlődaganatokban Stage I ($n = 8$), Stage II ($n = 9$), Stage III ($n = 7$), Stage IV ($n = 5$).

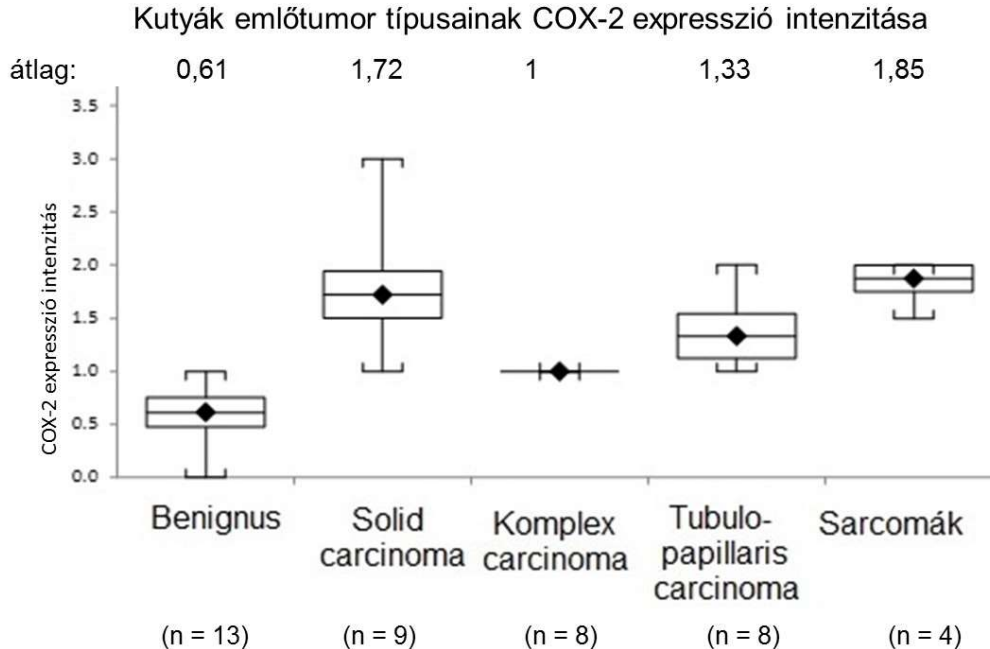
A primer és a recidivált tumorokat külön is elemeztük, de jelentős szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk köztük. Ugyanakkor χ^2 -próbával szignifikáns különbség adódott ($p = 0,009427$) abban a vonatkozásban, hogy a recidivált tumorokkal rendelkező kutyák szignifikánsan több ízben kaptak kemoterápiás kezelést (8/14), mint azok, amelyek primerek voltak (5/28). Továbbá a recidivált tumorok között szignifikánsan ($p = 0,018353$) több volt az 5 cm-esnél nagyobb méretű tumorral műtött beteg (4/14), mint a primer tumorok között (1/28).

Túlélési idők. Log-rank teszt segítségével összehasonlítottuk a túlélési időt, valamint a recidívamentes periódust a különböző szövettani típusú emlődaganat-csoportok között. Tájékoztató jelleggel vizsgáltuk a jóindulatú és a rosszindulatú emlődaganatos betegek teljes túlélési és recidívamentes idejét a 4 éves követési periódus alatt. Minden túlélési időt cenzorált adatként kezeltünk, amely nem a daganatos folyamat miatt alakulhatott ki, így a teljes és a recidívamentes túlélési adatokat egyaránt. A benignus daganatok túlélési ideje szignifikánsan hosszabb volt ($p = 0,0296547$), mint a malignus daganatoké (22. táblázat, 22. ábra). A recidívamentes periódus szignifikánsan hosszabb volt a benignus tumorok esetén, mint a malignusok esetén ($p = 0,00122359$) (22.b táblázat, 22.b ábra).

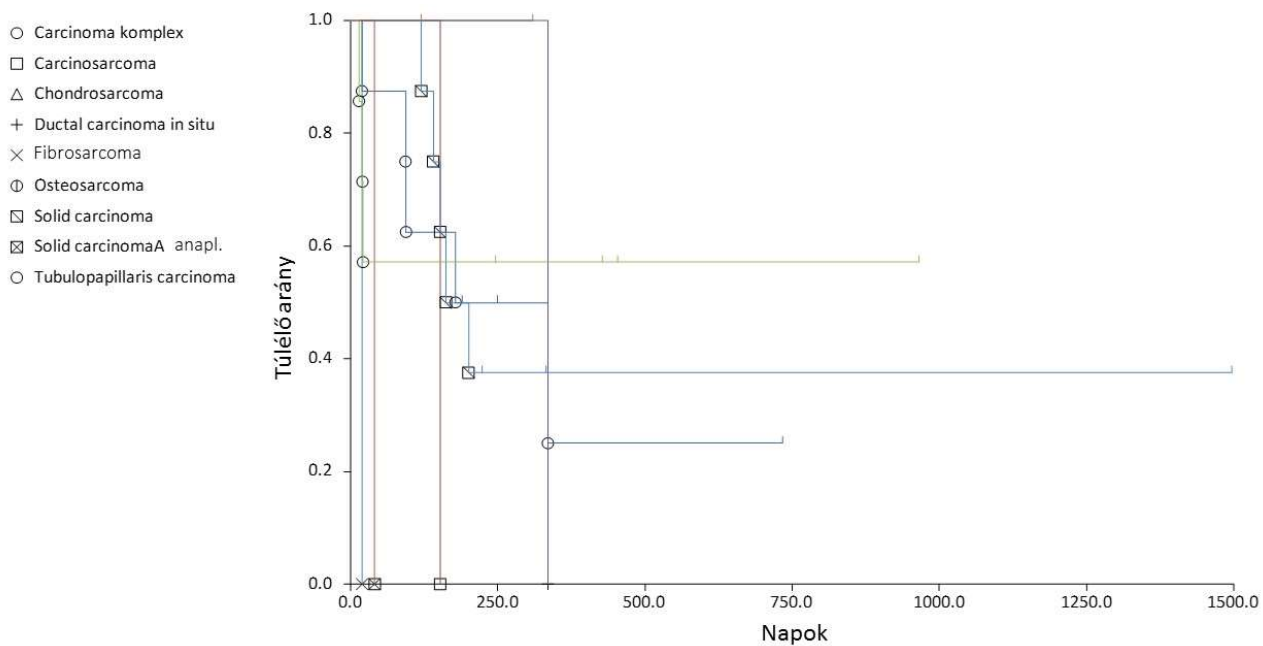
Meghatároztuk a különböző malignus daganatos betegek teljes és recidívamentes túlélését. A medián túlélések az alábbiak szerint alakultak (21. táblázat, 20., 21. ábra). A különbségek a túlélési idők tekintetében nem voltak szignifikánsak ($p = 0,3959$). Azonban a recidívamentes túlélésben a tubulopapilláris carcinoma recidíva ideje csaknem szignifikánsan hosszabb volt, mint a többi daganat esetében ($p = 0,084$).



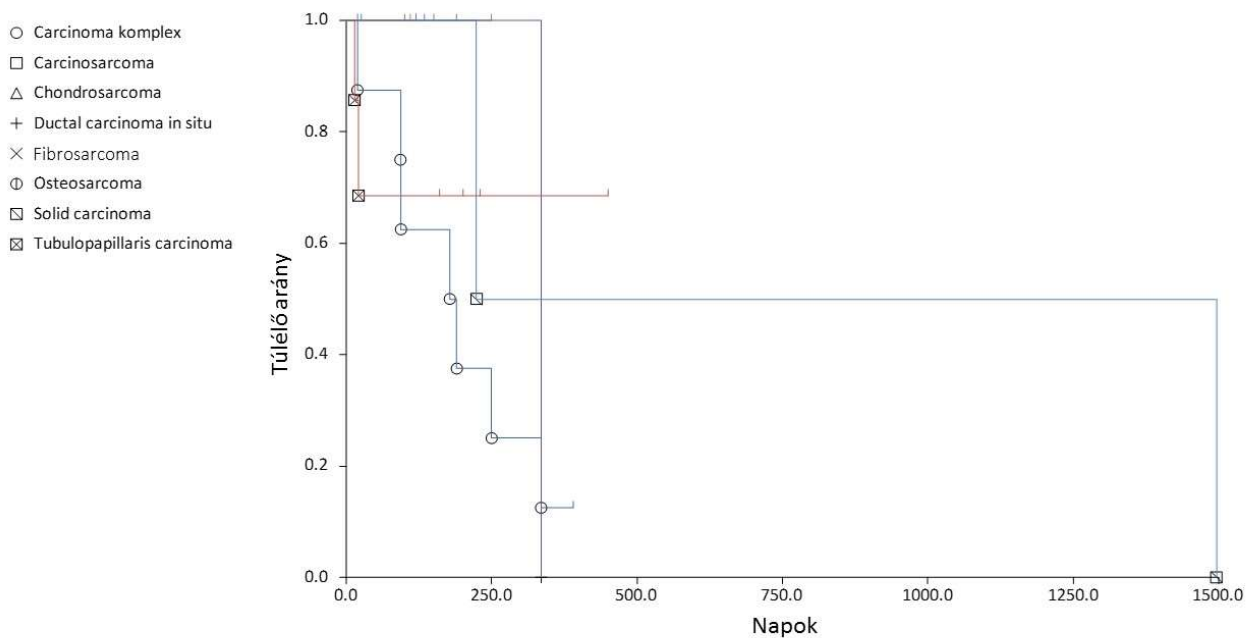
18. ábra: A COX-2-expresszió százalékos mértékének összehasonlítása a különböző típusú emlődaganatok között. Szignifikáns különbségeket találtunk a következő tumortípusok között (Kruskal-Wallis teszt): benignus vs. solid carcinoma: $p = 0,0232$, benignus vs. tubulopapilláris carcinoma: $p = 0,0006$, benignus vs. sarcomák: $p = 0,0032$



19. ábra: A COX-2-expresszió festődési intenzitásának összehasonlítása a különböző típusú emlődaganatok között. Szignifikáns különbségeket találtunk a következő tumortípusok között (Kruskal-Wallis teszt): benignus vs. solid carcinoma: $p = 0,0019$, benignus vs. tubulopapilláris carcinoma: $p = 0,0437$, benignus vs. sarcomák: $p = 0,0032$, solid carcinoma vs. komplex carcinoma: $p = 0,0262$, komplex carcinoma vs. sarcomák: $p = 0,0082$



20. ábra: Napokban kifejezett teljes túlélési idő (OST) különböző szövettani típusú malignus emlődaganatok esetén (Log-rank teszt)



21. ábra: Napokban kifejezett recidívamentes túlélési idő (RFP) különböző szövettani típusú malignus emlődaganatok esetén (Log-rank teszt)

20. táblázat: Összefoglaló klinikai táblázat a COX-2-expressziós %-ok alapján tapasztalt pontértékek szerint

COX-2-pontszám	Tumortípusok	Malignitás	NSAID	Kemoterápia	Kor (év)	Ivar	Primer
0 (n = 5)	Komplex adenoma (n = 2), Granulomás steatitis, Fibroadnaxialis hamartoma, Lipoma	Benignus (n = 5)	Piroxicam (n = 4), Firocoxib (n = 2)	-	2, 6 (n = 2), 10, 12,	szuka (n = 4), kan (n = 1)	2
1 (n = 7)	Tubulopapillaris carcinoma simplex (n = 2), Komplex carcinoma (n = 2), Komplex adenoma (n = 2) Ductalis carcinoma <i>in situ</i>	Benignus (n = 2), Malignus (n = 5)	Piroxicam (n = 6), Firocoxib (n = 3), Meloxicam (n = 5)	Doxorubicin (n = 1), Carboplatin (n = 2) az egyik mindkettőt kapta	4, 7, 10 (n = 2), 12, 15	mind szuka	6
2 (n = 16)	Simplex adenoma, Komplex adenoma (n = 2), Carcinosarcoma, Fibrosarcoma, Komplex carcinoma (n = 3), Solid carcinoma (n = 5), Tubulopapillaris carcinoma simplex (n = 3)	Benignus (n = 13), Malignus (n = 3)	Piroxicam (n = 8), Firocoxib (n = 5), Meloxicam (n = 6)	Doxorubicin (n = 6), Carboplatin (n = 6) két kutya mindkettőt kapta	8 (n = 2), 9 (n = 2), 10, 11, 12 (n = 7), 14 (n = 2), 15,	mind szuka	11
3 (n = 8)	Solid carcinoma (n = 2), Adenoma komplex, Tubulopapillaris carcinoma simplex, Komplex carcinoma (n = 2), Ductalis hyperplasia, Simplex adenoma	Benignus (n = 3), Malignus (n = 5)	Piroxicam (n = 3), Firocoxib (n = 1), Meloxicam (n = 4)	Doxorubicin (n = 3), Carboplatin (n = 1), Ciklofoszfamid (n = 1) egy kutya mindhármát kapta	4 (n = 2), 5, 7, 8, 10, 13 (n = 2)	mind szuka	6
4 (n = 6)	Osteosarcoma, Tubulopapillaris carcinoma simplex, Solid carcinoma (n = 2), Komplex carcinoma, Chondrosarcoma	Malignus (n = 6)	Piroxicam (n = 2), Firocoxib (n = 1), Meloxicam (n = 3)	Doxorubicin (n = 1), Carboplatin (n = 1)	7, 8, 10, 11, 12, 15	mind szuka	4

21. táblázat: Napokban kifejezett teljes és recidívamentes túlélés különböző szövettani típusú malignus emlődaganatok esetén

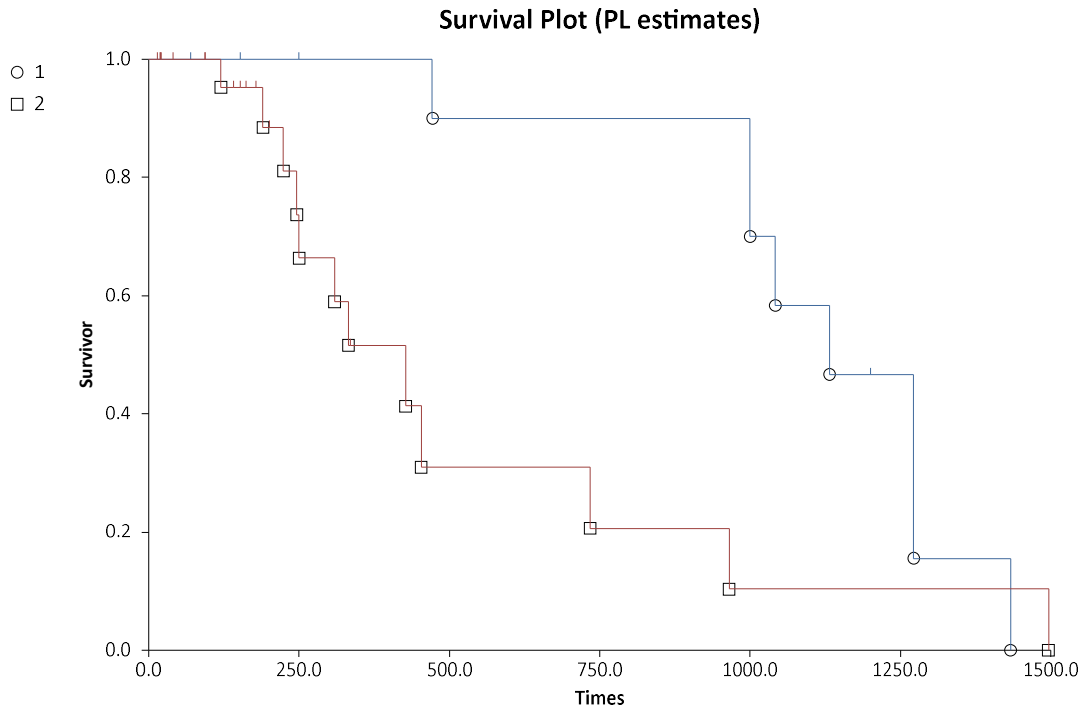
Daganattípus	Teljes túlélés (nap)	Recidívamentes túlélés (nap)
Carcinosarcoma (<i>n</i> = 1)	152	120
Komplex carcinoma (<i>n</i> = 8)	178	178
Chondrosarcoma (<i>n</i> = 1)	309	250
Ductal carcinoma <i>in situ</i> (<i>n</i> = 1)	335	335
Fibrosarcoma (<i>n</i> = 1)	20	20
Osteosarcoma (<i>n</i> = 1)	120	110
Solid carcinoma (<i>n</i> = 9)	162	224
Tubulopapilláris carcinoma (<i>n</i> = 7)	átlag: 559	átlag: 314

22. táblázat: Napokban kifejezett teljes túlélési idő (OST) benignus, illetve malignus emlődaganatok esetén

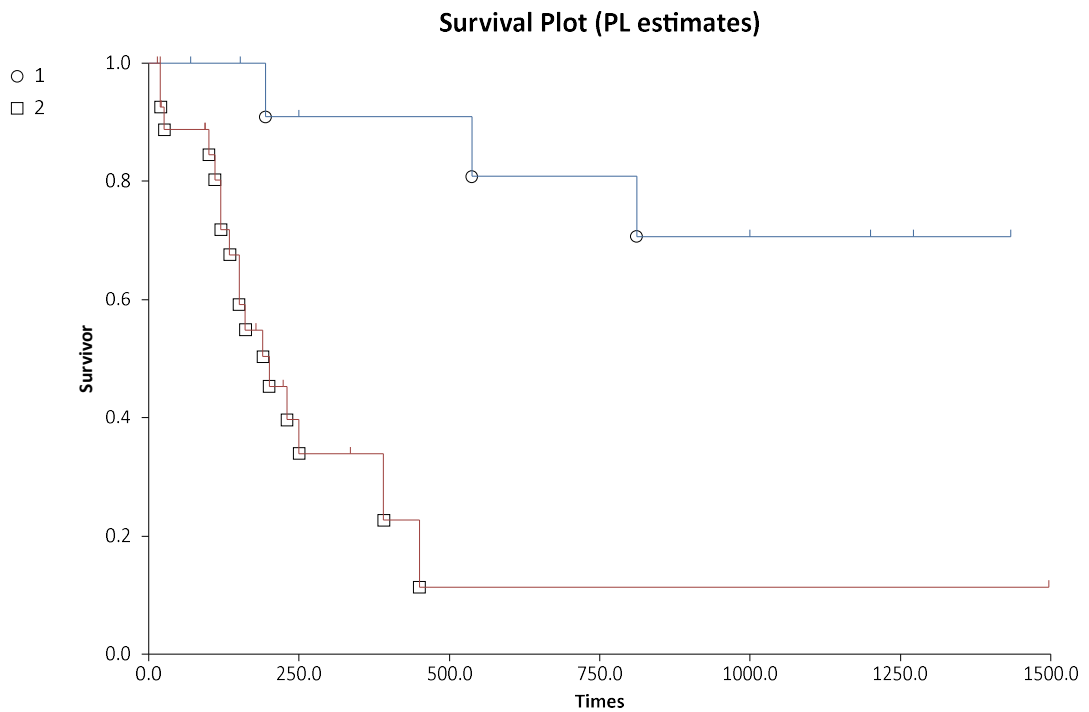
Túlélési idő (nap)	Benignus	Malignus
95% CI, maximum	1200	453
95% CI, minimum	1000	250
Medián	1 132	427

22.b táblázat: Napokban kifejezett recidívamentes túlélési idő (RFP) benignus, illetve malignus emlődaganatok esetén

Túlélési idő (nap)	Benignus	Malignus
95% CI, maximum	1433	235
95% CI, minimum	811	335
Medián	1 167 (átlag)	200



22. ábra: Napokban kifejezett teljes túlélési idő (OST) benignus (kék), illetve malignus (piros) emlődaganatok esetén



22.b ábra: Napokban kifejezett recidívamentes túlélési idő (RFP) benignus (kék), illetve malignus (piros) emlődaganatok esetén

COX-2-pontszám szerinti teljes túlélési vizsgálat. Log-rank teszt segítségével összehasonlítottuk a medián túlélési időt (OST) a különböző COX-2-pontértékű csoportok között. Az összehasonlítás során szignifikáns különbség adódott ($p = 0,002$): A magasabb (3-as és a 4-es) pontszámmal rendelkezők szignifikánsan rövidebb ideig éltek, mint az alacsonyabb (0-s, az 1-es, és a 2-es) pontszámú csoportba tartozó betegek (24. ábra, 23. táblázat).

23. táblázat: A napokban kifejezett teljes túlélési idő (OST) és a napokban kifejezett recidívamentes periódus (RFP) összehasonlítása a különböző COX-2-pontszámú, eltérő Grade-besorolású és stádiumú csoportok között

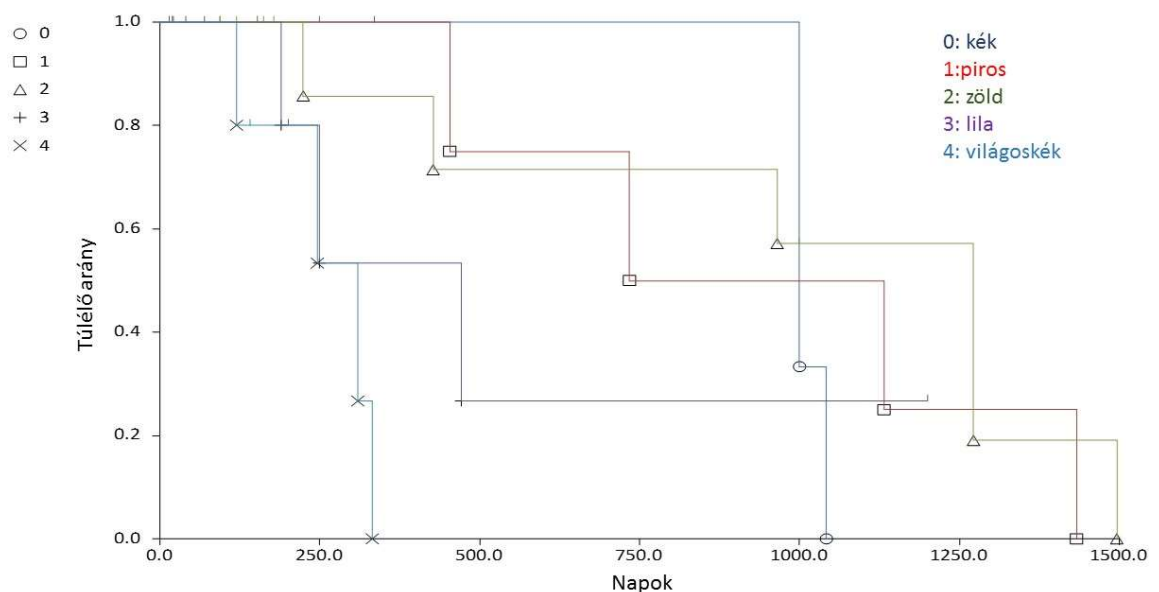
COX-2-pontérték	Stage	Grade	Teljes túlélés (nap)	Recidívamentes túlélés (nap)
0 pont ($n = 5$)	I ($n = 2$)		1000	811
	II ($n = 3$)			
1 pont ($n = 7$)	I ($n = 5$)	I ($n = 3$)	734	391
	II ($n = 1$)	II ($n = 1$)		
	IV ($n = 1$)	III ($n = 1$)		
2 pont ($n = 16$)	I ($n = 6$)	I ($n = 8$)	1 272	155,5
	II ($n = 6$)	II ($n = 3$)		
	III ($n = 2$)	III ($n = 2$)		
	IV ($n = 2$)			
3 pont ($n = 8$)	I ($n = 4$)	I ($n = 2$)	472	190
	III ($n = 3$)	II ($n = 1$)		
	IV ($n = 1$)	III ($n = 2$)		
4 pont ($n = 6$)	I ($n = 2$)	I ($n = 1$)	309	142,5
	II ($n = 1$)	II ($n = 3$)		
	III ($n = 2$)	III ($n = 2$)		
	IV ($n = 1$)			

COX-2-pontszám szerinti recidívamentes túlélési vizsgálat. Log-rank teszt segítségével összehasonlítottuk a recidívamentes periódust (RFP) a különböző COX-2-

pontszámú csoportok között. Az összehasonlítás során szignifikáns különbség nem adódott az elhullási arányban ($p = 0,0641$), de a trendben igen ($p = 0,0085$). A legmagasabb, 4-es pontszámmal rendelkezők recidívamentes periódusa szignifikánsan rövidebb volt, mint az alacsonyabb pontszámú csoportok esetében (23. táblázat, 23. ábra).

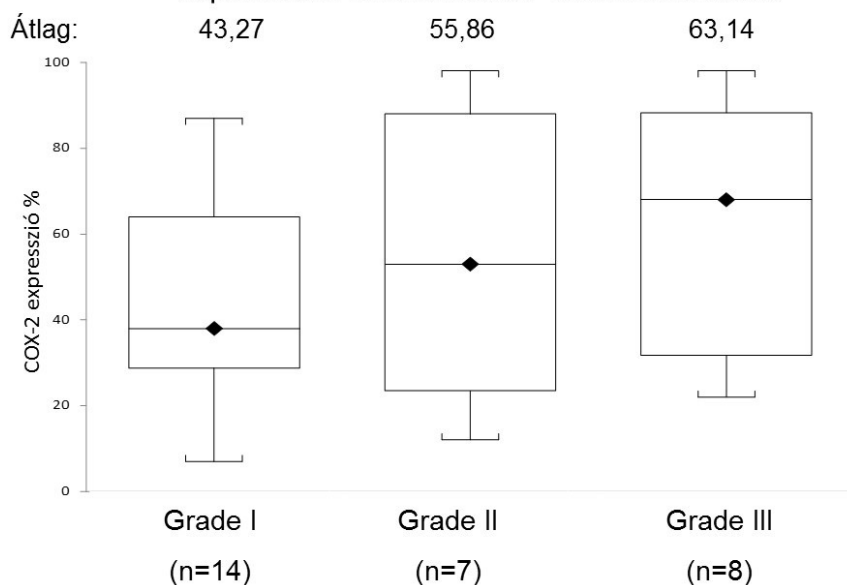
COX-2-expresszió és a Grade kapcsolata. ANOVA-teszt segítségével összehasonlítottuk a COX-2-expresszió mértékét a különböző Grade-besorolású daganatcsoportok között. Sem a COX-2-expressziós %-ban, sem a COX-2-expresszió intenzitásában nem találtunk szignifikáns különbséget, bár a COX-2-expresszió növekvő tendenciát mutatott a malignitás fokának növekedésével (24. és 24.b ábra).

COX-2-expresszió és a stádium kapcsolata. ANOVA-teszt segítségével összehasonlítottuk a COX-2-expresszió mértékét a különböző stádiumbesorolású (Stage) malignus daganatcsoportok között. Sem a COX-2-expressziós %-ban, sem a COX-2-expresszió intenzitásában nem találtunk szignifikáns különbséget (25. és 25.b ábra).



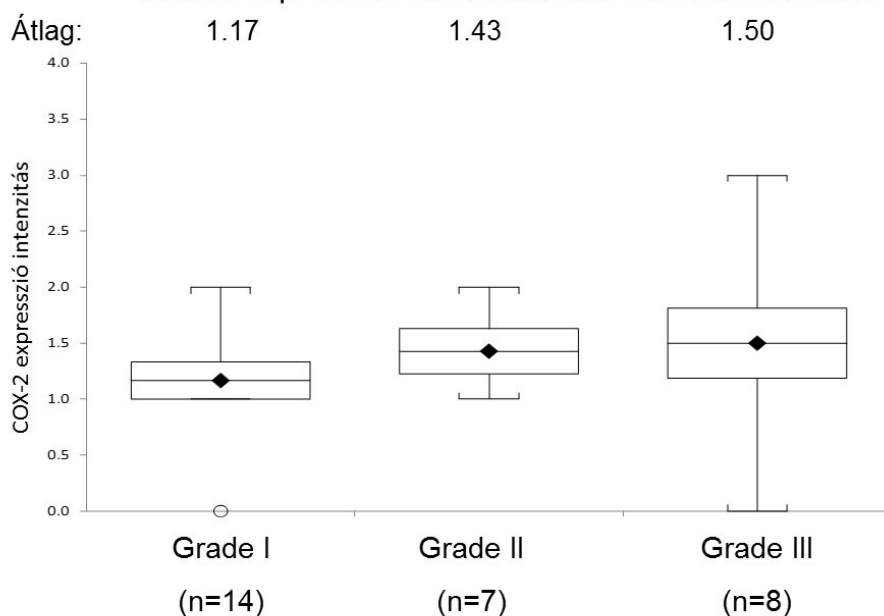
23. ábra: A napokban kifejezett teljes túlélési idő (OST) összehasonlítása a különböző COX-2-pontszámú csoportok között (Log-rank teszt). 0: kék, 1: piros, 2: zöld, 3: lila, 4: világoskék

Különböző Grade-besorolású daganatcsoportok COX-2-expressziós százalékának összehasonlítása



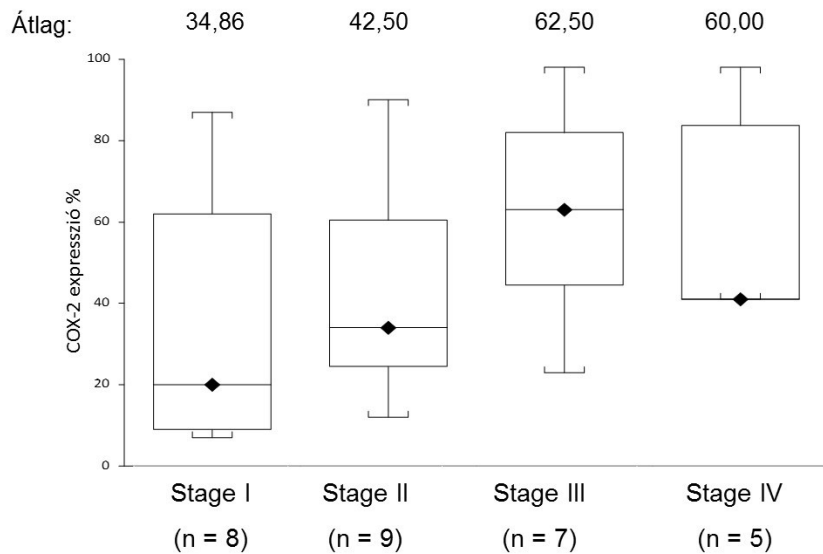
24. ábra: Különböző Grade-besorolású daganatcsoportok COX-2-expressziós százalékának összehasonlítása (kétmintás randomizált, ún. block ANOVA, Tukey-féle többszörös összehasonlítás)

Különböző Grade-besorolású malignus emlőtumorok COX-2-expresszió intenzitásának összehasonlítása



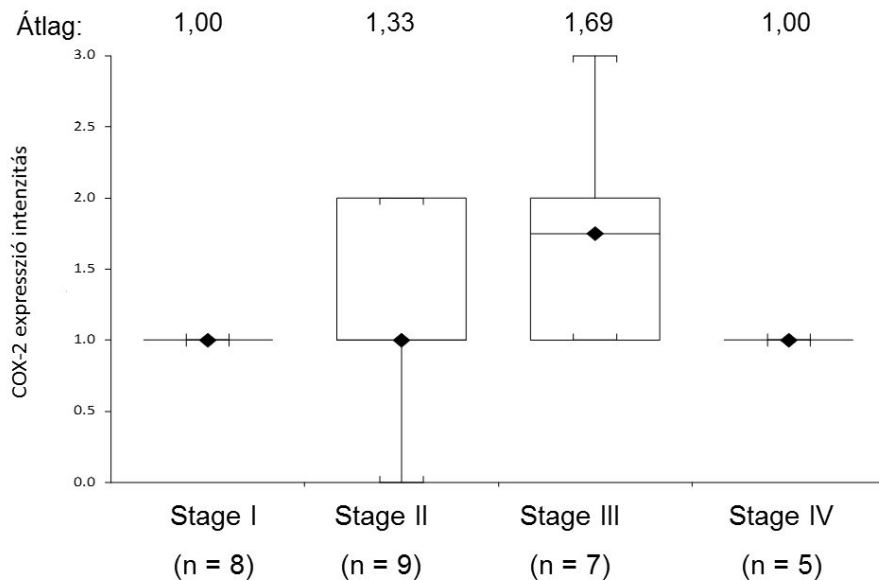
24.b ábra: Különböző Grade-besorolású daganatcsoportok COX-2-festődési intenzitásának összehasonlítása (kétmintás randomizált, ún. block ANOVA, Tukey-féle többszörös összehasonlítás)

COX-2 expresszió % a különböző stádiumú malignus emlődaganatos beteg esetén



25. ábra: Különböző stádiumbesorolású malignus daganatcsoportok COX-2-expressziós százalékának összehasonlítása (kétmintás randomizált, ún. block ANOVA, Tukey-féle többszörös összehasonlítás)

COX-2 expresszió intenzitás a különböző stádiumú malignus emlődaganatos beteg esetén

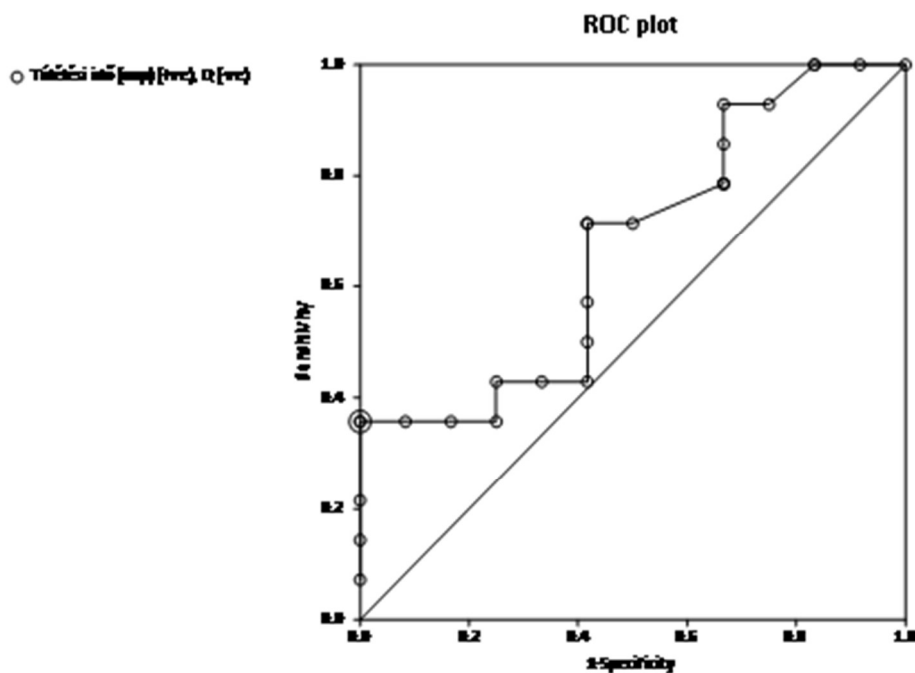


25.b ábra: Különböző stádiumbesorolású malignus daganatcsoportok COX-2-expressziós intenzitásának összehasonlítása (kétmintás randomizált, ún. block ANOVA, Tukey-féle többszörös összehasonlítás)

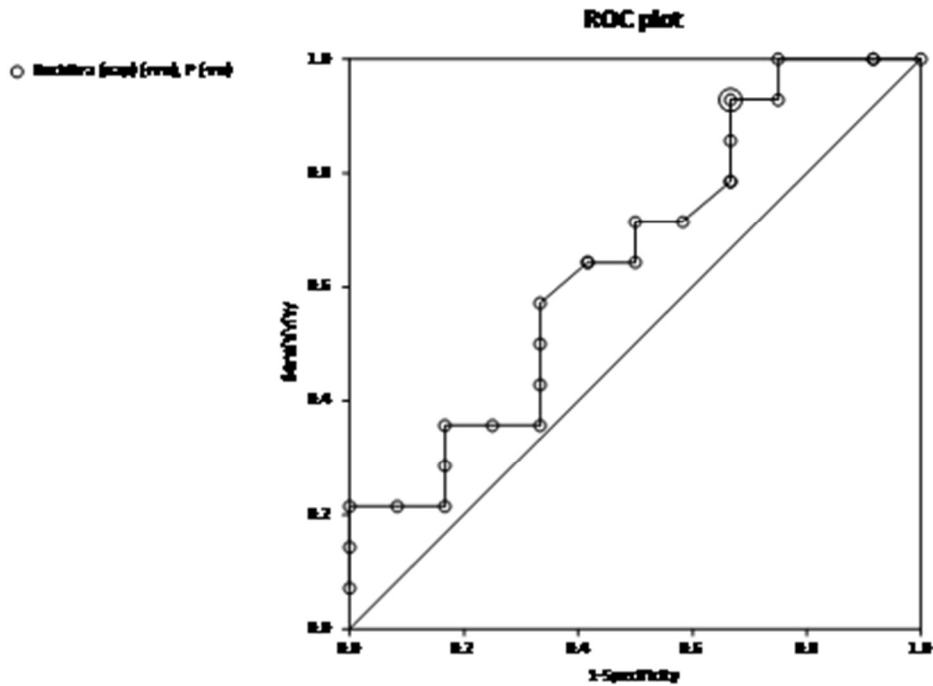
Cut-off érték meghatározása. ROC-analízis segítségével a pozitívan festődött sejtek %-os aránya alapján cut-off pontot határoztunk meg az OST és RFP tekintetében. A ROC-analízist < 50% festődési értékekkel végeztük el (26. és 27. ábra). A túlélési idő 50%-os határértéknél 335 napnak adódott, szenzitivitás (95% CI) = 0,35714, specificitás (95% CI) = 1. A recidívamentes periódus 50%-os határértéknél 93 nap volt, szenzitivitás (95% CI) = 0,928571, specificitás (95% CI) = 0,333333.

Log-rank analízissel összehasonlítottuk az 50% feletti, illetve alatti COX-2-expressziót mutató betegek túlélési idejét és recidívamentes idejét. Az 50% feletti COX-2-expressziót mutató betegek túlélési ideje szignifikánsan rövidebb volt, mint az 50% alatti COX-2-expressziót mutatóké (medián OST: 190 nap vs. 330 nap, $p = 0,009$) (28. ábra).

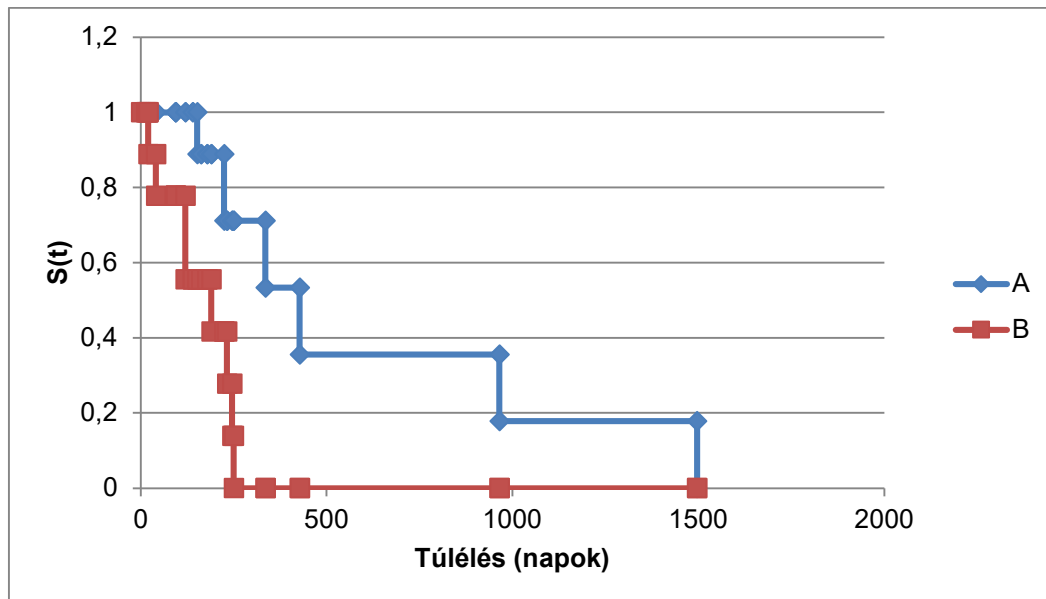
Az 50% feletti COX-2-expressziót mutató betegek recidívamentes periódusa szignifikánsan rövidebb volt, mint az 50% alatti COX-2-expressziót mutatóké (medián RFP: 110 nap vs. 300 nap, $p = 0,039$) (29. ábra).



26. ábra: A túlélési idő a COX-2-expresszió 50%-ánál mint határértéknél. Az OST 50%-os határértéknél: 335 nap, szenzitivitás (95% CI) = 0,35714, specificitás (95% CI) = 1.



27. ábra: A recidívamentes periódus a COX-2-expresszió 50%-ánál mint határértéknél. Az RFP 50%-os határértéknél: 93 nap, szenzitivitás (95% CI) = 0,928571, specificitás (95% CI) = 0,333333.



28. ábra: Az 50%-nál nagyobb (A, kék), illetve alacsonyabb (B, piros) COX-2-expressziót mutató betegek túlélési idejének (OST) összehasonlítása, $p = 0,009$ (Log-rank teszt)

24. táblázat: A COX-2-expresszió korrelációja a különböző klinikai paraméterekkel

Változók	Korrelációs (<i>r</i> -érték)	koefficiens <i>p</i> -érték
COX-2-expresszió % : Teljes túlélési idő	-0,50835998	< 0,05
COX-2-expresszió % : Recidívamentes periódus	-0,7817827	< 0,01
COX-2-expresszió % : Tumorméret	0,455349141	< 0,05
Grade: Teljes túlélési idő (OST)	-0,629	< 0,0001
Grade : Recidívamentes periódus (RFP)	-0,638	< 0,0001

COX-2-expresszió korrelációja különböző klinikai paraméterekkel. Pearson-féle korrelációs analízissel vizsgálva negatív korrelációt találtunk a COX-2-expresszió és a teljes túlélési idő, valamint a COX-2-expresszió és a recidívamentes periódus között. A COX-2-expresszió és a tumorméret között pozitív korreláció volt. A Grade-besorolás negatívan korrelált a teljes túlélési idővel és a recidívamentes periódussal (24. táblázat).

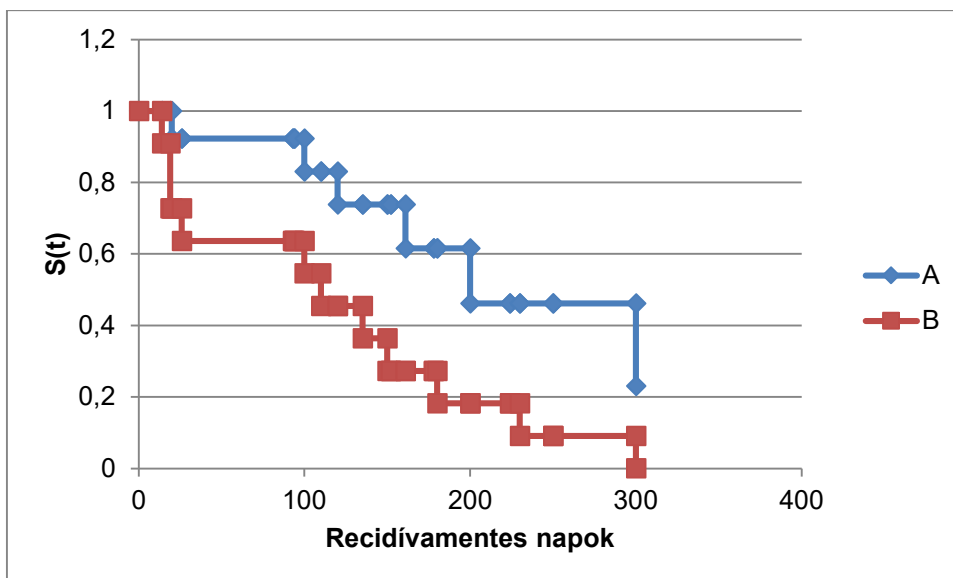
3.3.3. Az adjuváns kezelés hatásának vizsgálata

A kezelések során az alábbiakat vettük alapul. Olyan beteg, amely nem kapott nemszteroid gyulladáscsökkentőt (NSAID) 9 volt, a csak NSAID-ot kaptak 19-en voltak. Kizárólag kemoterápiás kezelésben részesültek száma 1 volt, a NSAID-ot, valamint kemoterápiás kezeléseket is kaptak száma pedig 13.

NSAID-kezelés kapcsolata a túléléssel. Pearson-féle korrelációs analízissel vizsgáltuk a különböző típusú nemszteroid gyulladáscsökkentők kapcsolatát a túléléssel. Kizárólag a firocoxib korrelált pozitívan a túlélési idővel (25. táblázat).

Log-rank analízissel összehasoltuk a recidívamentes és teljes túlélési időt az NSAID-t használó, illetve nem használó csoportok között. Az NSAID-kezelés sem a teljes, sem a recidívamentes túlélést nem javította, a különbség nem volt szignifikáns (26. táblázat).

Log-rank analízissel összehasoltuk a recidívamentes és teljes túlélési időt a firocoxibot használó, illetve nem használó csoportok között (27. táblázat, 30. ábra). A firocoxib-kezelés a túlélést javította (nem szignifikánsan), de a recidívamentes periódust nem.



29. ábra: Az 50%-nál nagyobb (A, kék), illetve alacsonyabb (B, piros) COX-2-expressziót mutató betegek recidivamentes periódusának (RFP) összehasonlítása, $p = 0,039$ (Log-rank teszt)

25. táblázat: Korrelációs koefficiens a különböző típusú NSAID-ok és a túlélési idő összehasonlításakor

NSAID	piroxicam	meloxicam	firocoxib	összes NSAID
<i>r</i> -érték	0,0194	-0,0404	0,1968	-0,1233

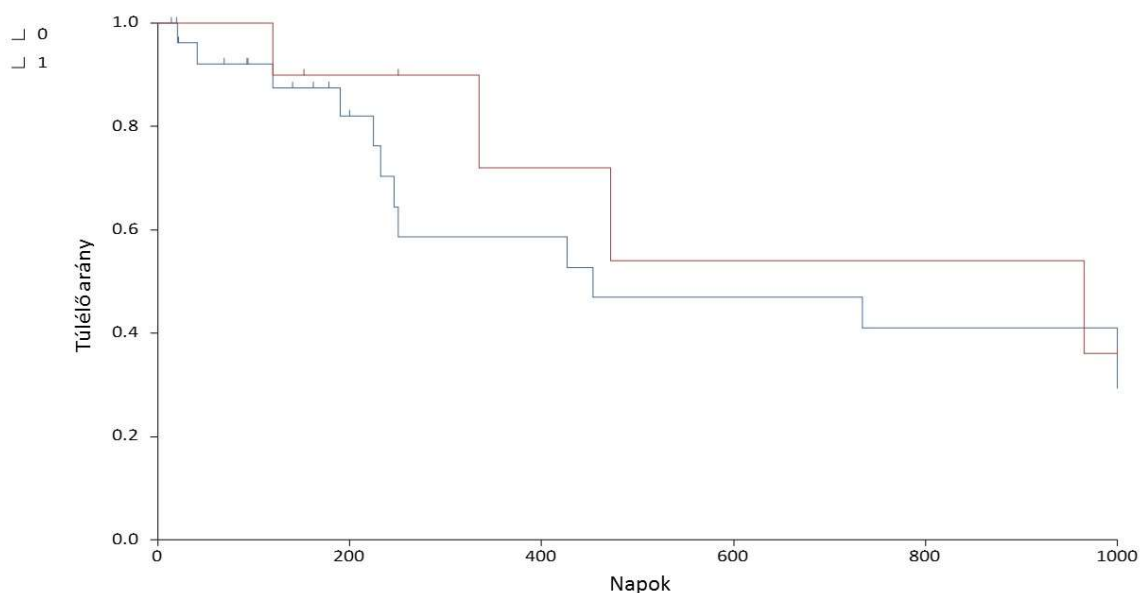
26. táblázat: NSAID-kezelések hatása a teljes túlélésre (OST) és a recidivamentes periódusra (RFP)

Kezelés	OST (napok)	RFP (napok)
NSAID-ot nem kaptak	246	230
NSAID-ot kaptak	178	150
Szignifikancia	$p = 0,309$	$p = 0,087$

27. táblázat: A firocoxib-kezelés hatása a teljes túlélésre (OST) és a recidívamentes periódusra (RFP)

Kezelés	OST (napok)	RFP (napok)
Firocoxibot nem kaptak	453	391
Firocoxibot kaptak	965	200
Szignifikancia	$p = 0,4094$	$p = 0,9208$

Kemoterápiás kezelés kapcsolata a túléléssel. Log-rank analízissel összehasonlítottuk a kemoterápiás kezelésben részesült, illetve nem részesült betegek teljes, valamint recidívamentes túlélési idejét (28. táblázat, 31. és 32. ábra). A teljes túlélésben (OST) nem találtunk különbséget. A recidívamentes periódus (RFP) a kemoterápiában részesült csoportban a kemoterápiát nem kapottakhoz képest az OST-hez hasonlóan nem szignifikánsan csökkent. Azon betegek esetében, amelyeknek daganatai súlyosabbak voltak (Grade II és Grade III csoport), a kemoterápiás kezelés a túlélést javította (nem szignifikánsan), de a recidívamentes időt nem (29. táblázat, 33. és 34. ábra).



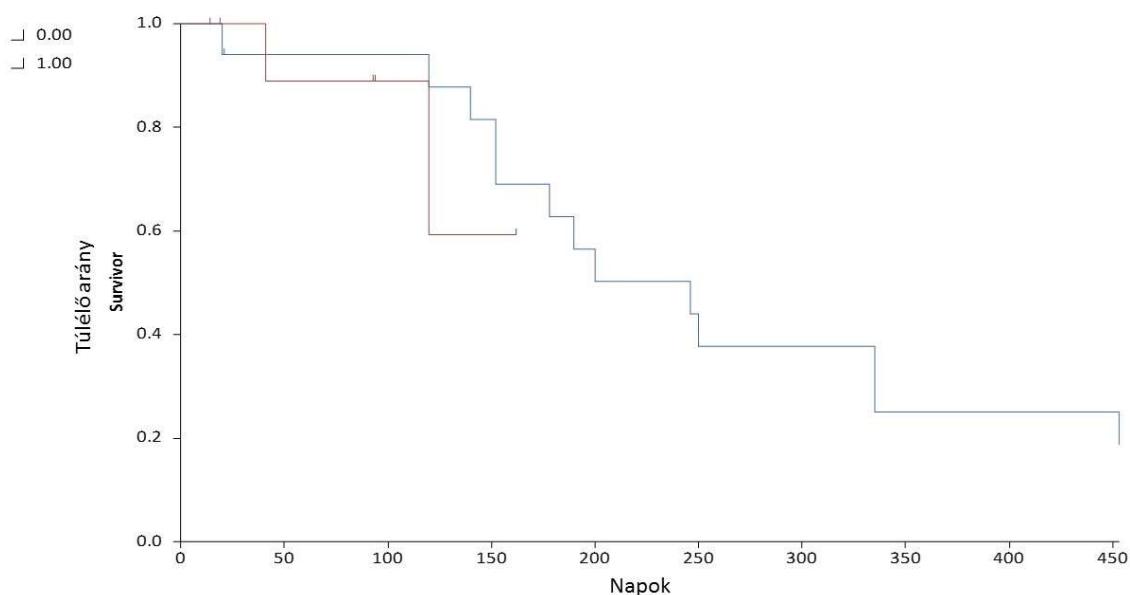
30. ábra: Emlődaganatos kutyák napokban kifejezett túlélési ideje (OST) a firocoxib kezelésben részesült (piros), illetve nem részesült csoport esetén (kék), Log-rank analízis

28. táblázat: Emlődaganatos kutyák napokban kifejezett teljes túlélési ideje (OST) és recidívamentes periódusa (RFP) a kemoterápiás kezelésben részesült, illetve nem részesült csoport esetén

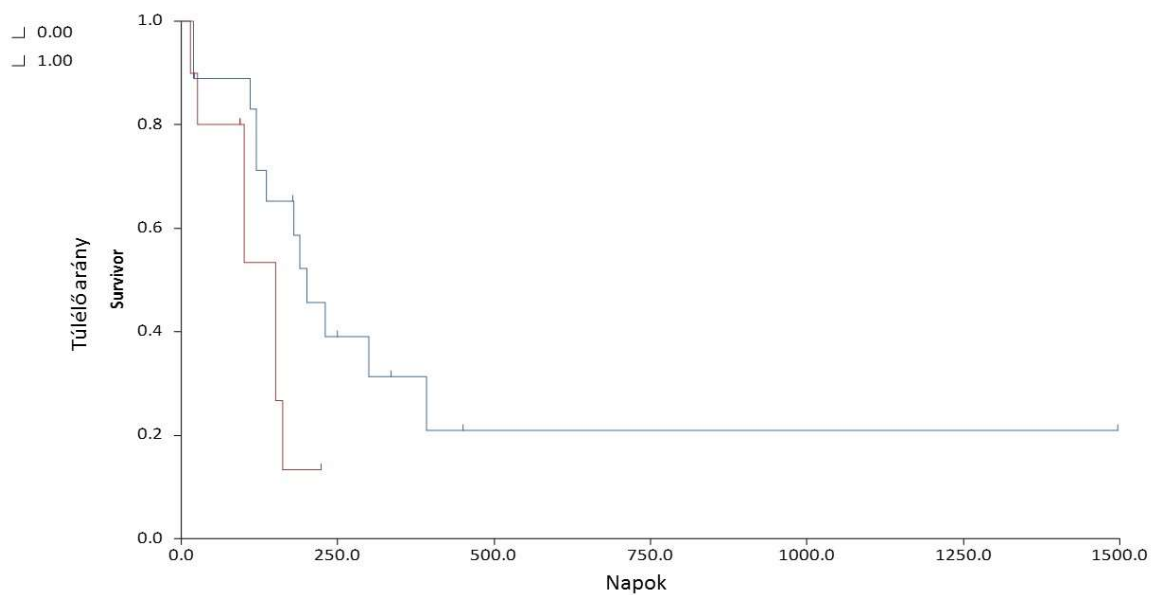
Kezelés (összes malignus emlőtumoros eset)	OST (napok)	RFP (napok)
Kemoterápiát nem kaptak	246	200
Kemoterápiát kaptak	224	150
Szignifikancia	$p = 0,848$	$p = 0,0574$

29. táblázat: Grade II és Grade III besorolású emlődaganatos kutyák napokban kifejezett teljes túlélési ideje (OST) és recidívamentes periódusa (RFP) a kemoterápiás kezelésben részesült, illetve nem részesült csoport esetén

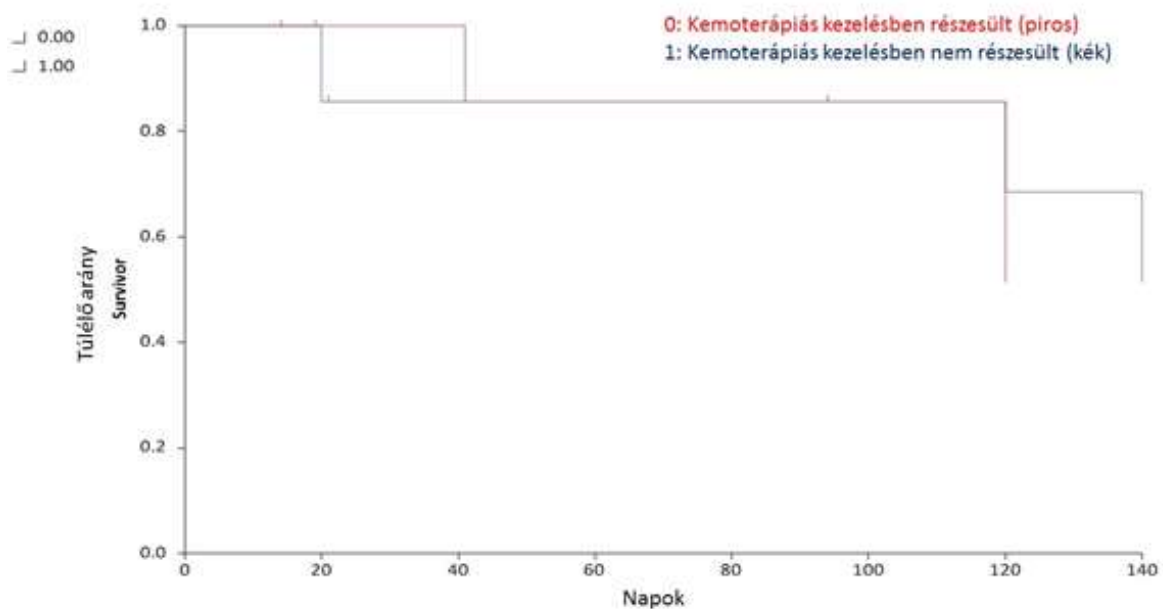
Kezelés (Grade II és III esetek)	OST (napok)	RFP (napok)
Kemoterápiát nem kaptak	152	120
Kemoterápiát kaptak	224	100
Szignifikancia	$p = 0,8484$	$p = 0,8234$



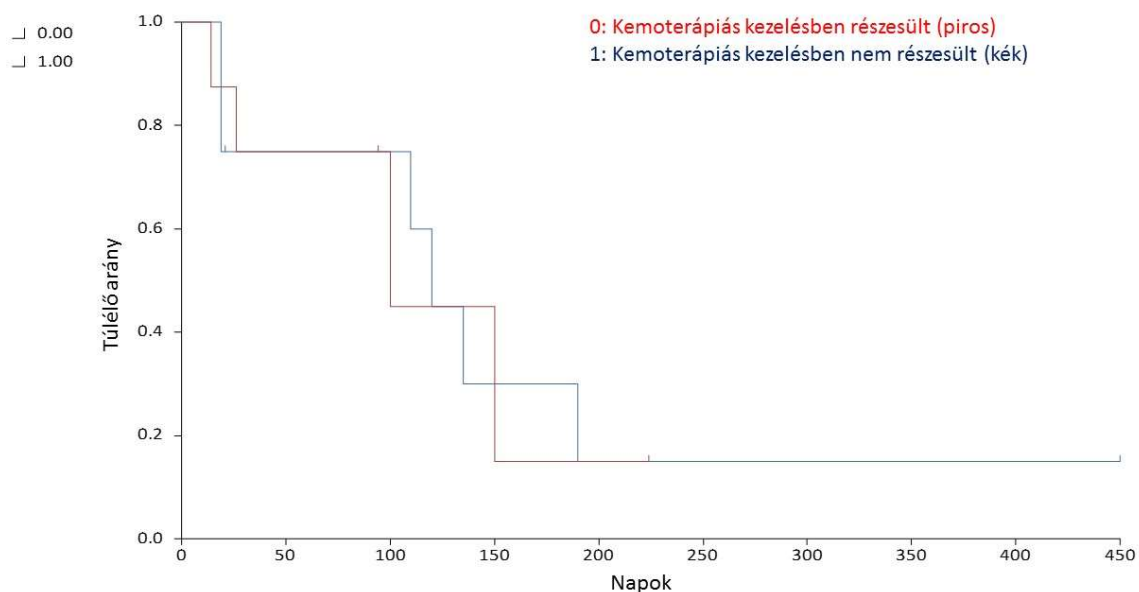
31. ábra: Emlődaganatos kutyák napokban kifejezett túlélési ideje (OST) a kemoterápiás kezelésben részesült (piros), illetve nem részesült csoport esetén (kék), Log-rank analízis



32. ábra: Emlődaganatos kutyák napokban kifejezett recidívamentes periódusa (RFP) a kemoterápiás kezelésben részesült (piros), illetve nem részesült csoport esetén (kék), Log-rank analízis



33. ábra: Grade II és Grade III besorolású emlődaganatos kutyák napokban kifejezett túlélési ideje (OST) a kemoterápiás kezelésben részesült (piros), illetve nem részesült csoport esetén (kék), Log-rank analízis

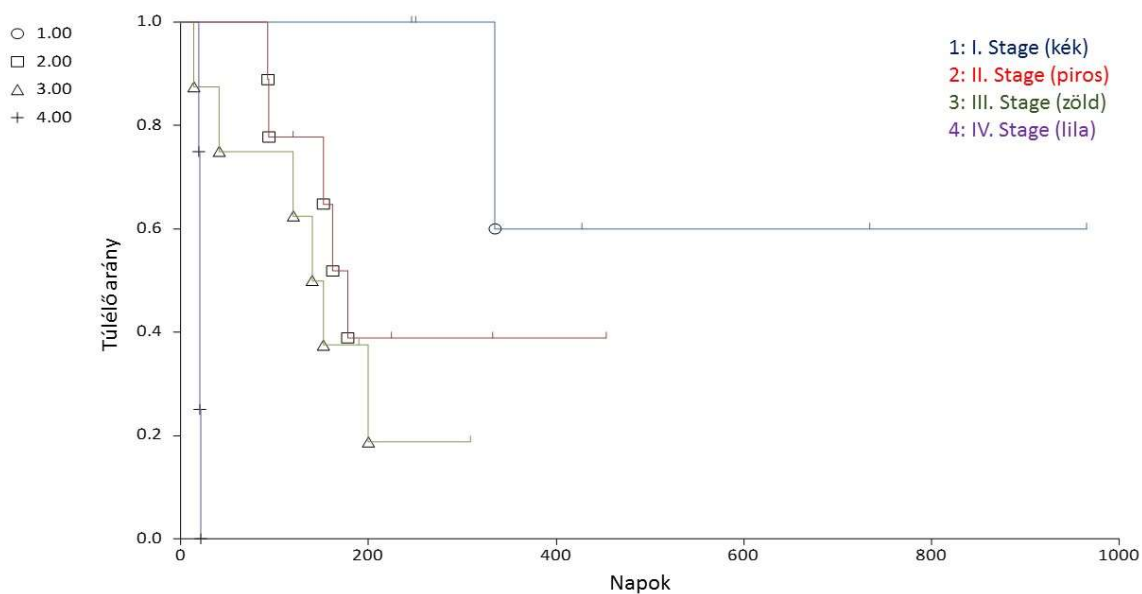


34. ábra: Grade II és Grade III besorolású emlődaganatos kutyák napokban kifejezett recidívamentes periódusa (RFP) a kemoterápiás kezelésben részesült (piros), illetve nem részesült csoport esetén (kék), Log-rank analízis

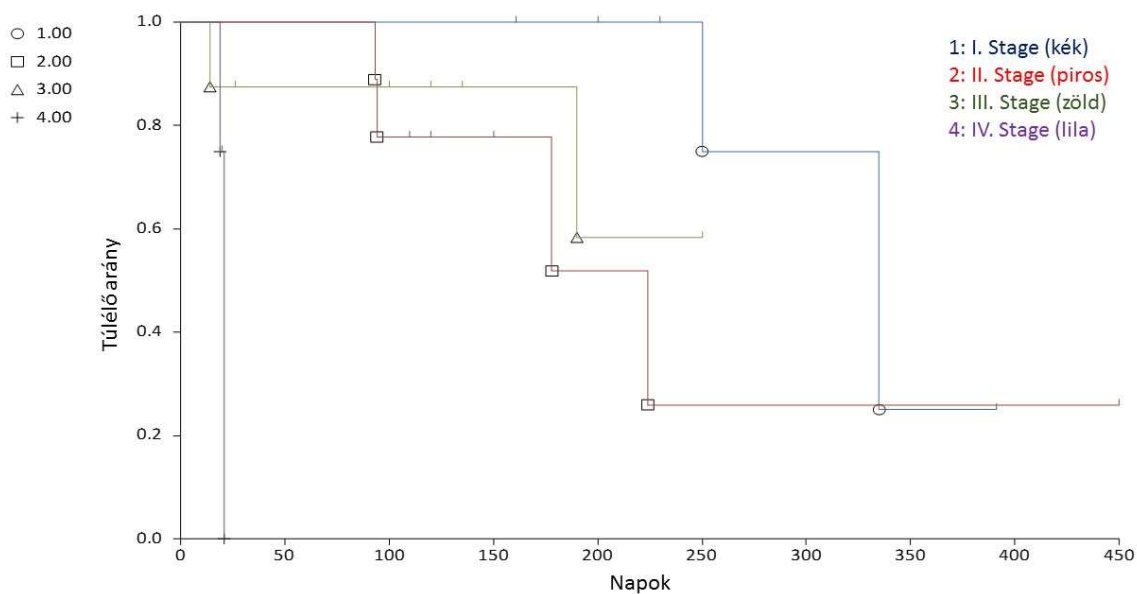
3.3.4. A stádiumbasorolás és a túlélés kapcsolata

Log-rank analízissel értékeltük a különböző stádiumú malignus daganatos betegek teljes túlélését (OST). A túlélések az I., a II., és a III. stádiumban nem tértek el egymástól, de a IV. stádiumú betegek túlélése szignifikánsan elmaradt a többtől ($p < 0,0001$). Az OST az alábbiak szerint alakult: Stage I: medián nem volt meghatározható, az átlag 713 nap, Stage II: 178 nap, Stage III: 140 nap, Stage IV: 20 nap (35. ábra).

Log-rank analízissel összehasonlítottuk a különbözős stádiumú malignus daganatos betegek recidívamentes túlélését (RFP). Az RFP az I., a II. és a III. stádiumban nem tért el egymástól, de a IV. stádiumú betegek recidívamentes periódusa szignifikánsan elmaradt a többtől ($p = 0,0186$). A medián recidívamentes túlélési idők az alábbiak szerint alakultak: Stage I: 335 nap, Stage II: 224 nap, Stage III: a medián nem volt meghatározható, az átlag 220,5 nap, Stage IV: 21 nap (36. ábra).



35. ábra: A különböző stádiumbesorolású malignus emlődaganatos kutyák napokban kifejezett medián túlélési ideje (OST), Log-rank analízis, $p < 0,0001$. I. Stage: kék, II. Stage: piros, III. Stage: zöld, IV. Stage: lila



36. ábra: A különböző stádiumbesorolású malignus emlődaganatos kutyák napokban kifejezett recidívamentes periódusa (RFP), Log-rank analízis, $p = 0,0186$. I. Stage: kék, II. Stage: piros, III. Stage: zöld, IV. Stage: lila

3.4. A tirozin-kinázok vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

Ugyanazon állat daganatos ($n = 13$) és egészséges ($n = 13$) emlőtelepeiből származó mintákban határoztuk meg a tirozin-kinázok mRNS-expresszióját a HPRT háztartási génhez viszonyítva.

A kapott értékeket Student-féle páros t-próbával hasonlítottuk össze, $p < 0,05$ érték esetében tekintettük a különbséget szignifikánsnak. A daganatos emlőtelepek VEGFR1-, VEGFR2-, VEGF- és EGFR-expressziója szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges emlőtelepeké (37. ábra).

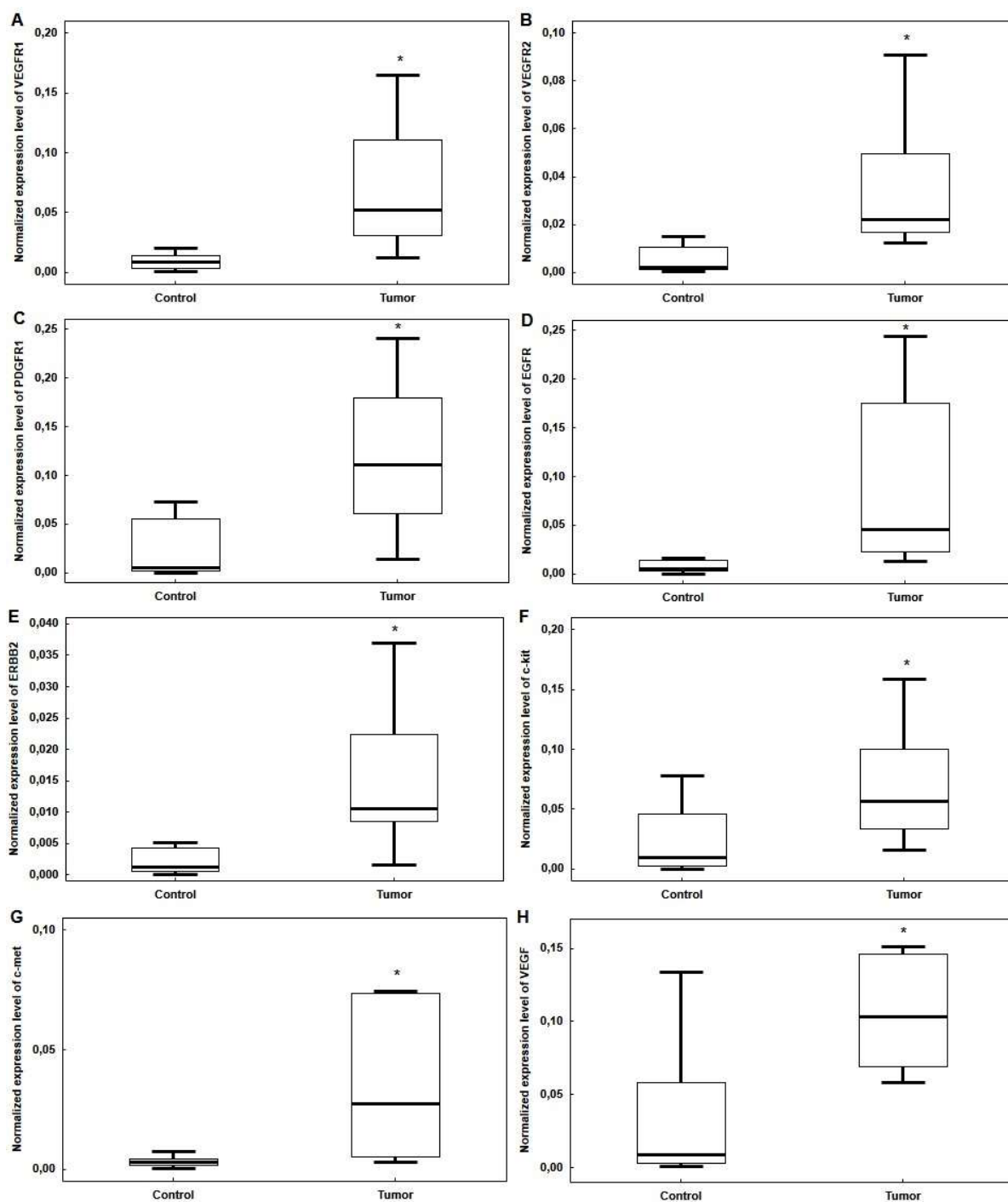
Kruskal-Wallis ANOVA-val összehasonlítottuk VEGFR1-, PDGFR α -, VEGF-, EGFR-, KIT-, valamint MET-expressziós értékeket a Grade I ($n = 5$), Grade II ($n = 5$) és Grade III ($n = 3$) besorolású emlődaganatok esetében. A kontroll ugyanazon állat egészséges emlőszövetéből származó minta volt (38. ábra). A különbséget $p < 0,05$ érték alatt tekintettük szignifikánsnak.

A magasabb Grade besorolás magasabb VEGFR1-expresszióval járt együtt. Szignifikáns különbség adódott a Grade I és II ($p = 0,014$), Grade II és III ($p = 0,016$), valamint a Grade I és III ($p = 0,023$) besorolású mintákból származó VEGFR1-expresszió között. A Grade I és a kontroll között viszont nem volt szignifikáns különbség (38. ábra).

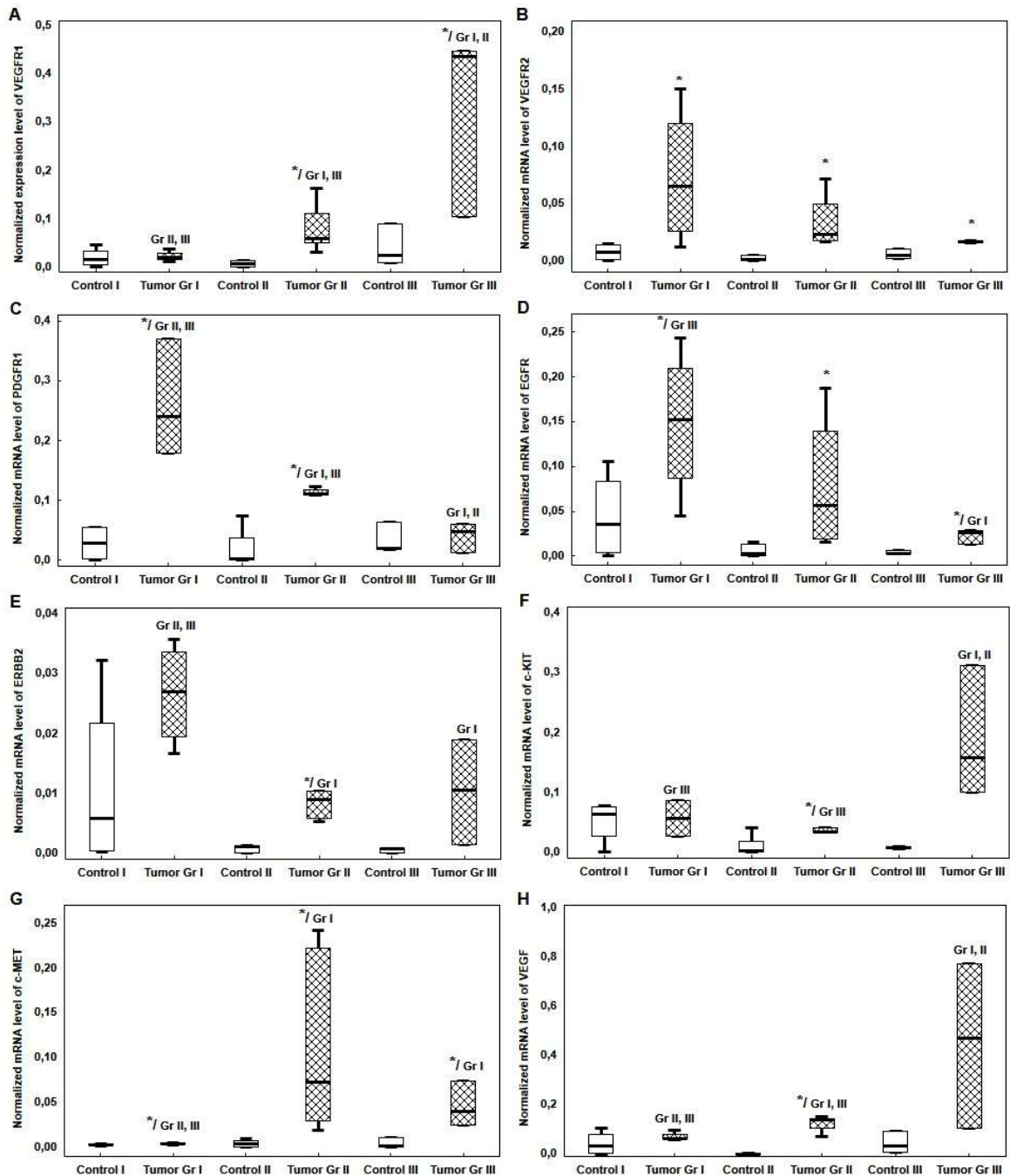
A VEGFR2-expresszió tekintetében a Grade I tumoroknál volt a legmagasabb az mRNS-szint, ezt követte egyre csökkenő értékekkel a Grade II, végül a Grade III csoport. Mindhárom esetben a daganatos szövetben szignifikánsan magasabb koncentrációt mértünk, mint a kontroll emlőszövetben: Grade I ($p = 0,046$), Grade II ($p = 0,008$), Grade III ($p = 0,015$) (38. ábra).

A PDGFR1-expresszió esetén a Grade I tumoroknál volt a legmagasabb az mRNS-szint, ezt követte egyre csökkenő értékekkel a Grade II, végül a Grade III csoport. A Grade I és Grade II csoportban szignifikánsan magasabb volt a koncentráció, mint a kontroll emlőszövetben, valamint szignifikáns különbség volt a Grade I és Grade II, III, illetve a Grade II és Grade III csoportok között (38. ábra).

EGFR-expresszió esetében szintén a Grade I tumoroknál volt a legmagasabb az mRNS-szint, ezt követte egyre csökkenő értékekkel a Grade II, végül a Grade III csoport. Valamennyi daganatos csoportban szignifikánsan magasabb koncentrációt mértünk, mint az egészséges emlőszövetben. Ezenkívül szignifikáns különbség volt a Grade I és Grade III csoport között (38. ábra).



37. ábra: Különböző tirozin-kinázok és a VEGF HPRT-re normalizált értékeinek összehasonlítása azonos állatokból származó daganatos ($n = 13$) és egészséges ($n = 13$) emlőszövet esetén Student-féle t -próbával. $p < 0,05$ érték esetében tekintettük a különbséget szignifikánsnak (*). A. VEGFR1-expresszió, B. VEGFR2-expresszió, C. PDGFR1-expresszió, D. EGFR-expresszió, E. ErbB2-expresszió, F. c-KIT-expresszió, G. c-MET-expresszió, H. VEGF-expresszió



38. ábra: Különböző tirozin-kinázok és a VEGF HPRT-re normalizált értékeinek összehasonlítása különböző Grade-besorolású daganatok esetén. Grade I ($n = 5$), Grade II ($n = 5$) és Grade III ($n = 3$). A kontrollt minden esetben az adott állat egészséges emlőjéből származó minta képezte. Kruskal-Wallis ANOVA, a különbséget $p < 0,05$ érték alatt tekintettük szignifikánsnak (*). A. VEGFR1-expresszió, B. VEGFR2-expresszió, C. PDGFR1-expresszió, D. EGFR-expresszió, E. ErbB2-expresszió, F. c-KIT-expresszió, G. c-MET-expresszió, H. VEGF-expresszió

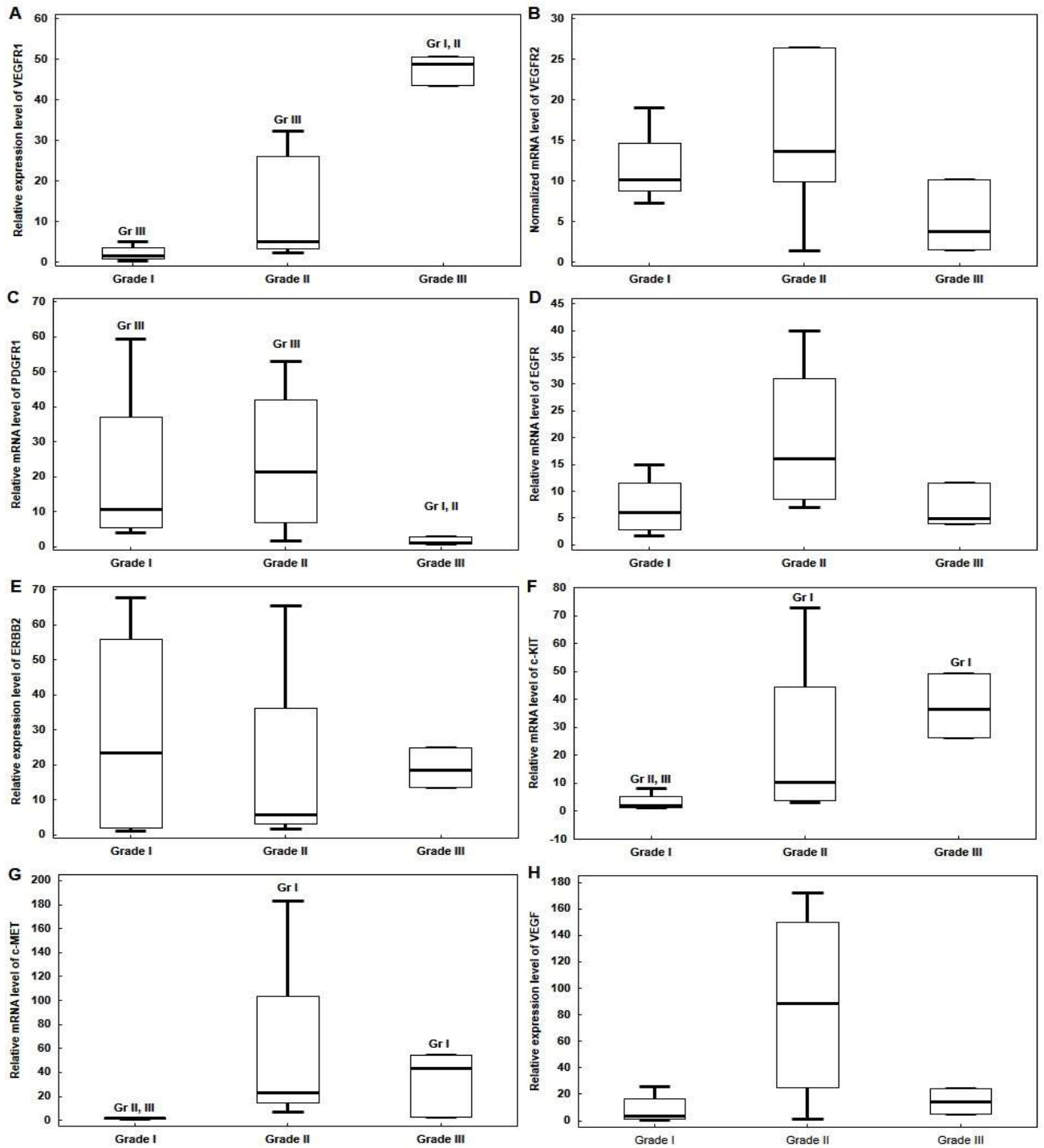
Az ErbB2-expresszió mérésekor a Grade I mintákban szignifikánsan magasabb volt a koncentráció, mint a Grade II vagy Grade III csoportban. Ezenkívül a Grade II daganatszövetben a kontroll szöveténél is szignifikánsan magasabb értéket mértünk (38. ábra).

A c-KIT-expresszió vizsgálatokor a VEGFR1-nél tapasztalható hasonló folyamatokat találtunk, azaz a Grade III csoportban mértük a legmagasabb koncentrációt, ami szignifikánsan magasabb volt a Grade I és Grade II mintákénál. A Grade I csoport kivételével a daganatszövetekben a kontrollnál szignifikánsan magasabb mRNS szintet detektáltunk (38. ábra).

A c-MET esetében a Grade II csoportban találtuk a legmagasabb mRNS-koncentrációt, ezt követte a Grade III, majd a Grade I csoport. Mindhárom daganatos csoport a kontrollszövetnél szignifikánsan magasabb értéket mutatott, ezenkívül szignifikáns különbséget találtunk a Grade I és Grade II, illetve a Grade I és Grade III csoportok között (38. ábra).

A VEGF-expresszió vizsgálatokor szintén hasonló folyamatokat találtunk: magasabb Grade magasabb expressziós értékekkel járt együtt. Szignifikáns különbség volt a Grade I és Grade II, a Grade I és Grade III, valamint a Grade II és Grade III csoportok között (38. ábra).

Mann-Whitney teszt segítségével összehasonlítottuk a különböző Grade-besorolású csoportok saját egészséges kontroll emlőpárjukhoz viszonyított relatív expressziós értékeit. A következő faktoroknál találtunk szignifikáns különbséget: VEGFR1, PDGFR1, c-KIT és c-MET. VEGFR1 esetén a Grade III tumoroknál szignifikánsan magasabb relatív expressziós értéket mértünk, mint a Grade I ($p = 0,005$) és a Grade II ($p = 0,037$) minták esetében. A PDGFR1 relatív mRNS-szintje Grade III tumorok esetén szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a Grade I ($p = 0,048$) és Grade II ($p = 0,045$) csoportokban. A c-KIT és c-MET vizsgálatokor a relatív expressziós értékek a Grade III csoportban szignifikánsan magasabbak voltak, mint a Grade I ($p = 0,049$ és $p = 0,049$), illetve Grade II daganatok ($p = 0,048$ és $p = 0,049$) esetében (39. ábra).



39. ábra: Az eltérő Grade-besorolású csoportok saját egészséges kontroll emlőpárjukhoz viszonyított relatív expressziós értékei (különböző tirozin-kinázok és a VEGF). Grade I ($n = 5$), Grade II ($n = 5$) and Grade III ($n = 3$). Mann-Whitney teszt, a különbséget $p < 0,05$ érték alatt tekintettük szignifikánsnak. A. VEGFR1-expresszió, B. VEGFR2-expresszió, C. PDGFR1-expresszió, D. EGFR-expresszió, E. ErbB2-expresszió, F. c-KIT-expresszió, G. c-MET-expresszió, H. VEGF-expresszió

4. Megbeszélés

4.1. A Pgp-expresszió vizsgálata kutyák lymphomája esetén

Lymphomás kutyák esetén a terápia rezisztencia különösen nagy jelentőségű klinikai faktor, mivel döntően ez felelős a kemoterápiás kezelés kudarcáért (Bergman, 2000; Vail, 2019). A multidrog-rezisztencia (MDR) egyik fő kiváltó faktora a P-glycoprotein (Pgp), ami egy ATP-függő pumpafehérje. Ez a fehérje képes számos, a lymphoma terápiájában kulcsfontosságú citosztatikumot mint a doxorubicint vagy a vincristint kipumpálni a daganatsejtből. A Pgp immunhisztokémiai módszerrel történő kimutatása kutyák esetében 1996 óta ismert (Lee, 1996; Ginn, 1996). Lee és Ginn (1996) a megnövekedett Pgp-expressziót negatív prognosztikai faktorként azonosították. Vizsgálatunk egyik fő célja volt, hogy egyrészt megerősítsük a Pgp-immunhisztokémia prognosztikai értékét kutyák lymphomája esetén, beleértve a festődés intenzitásának és a festődési százaléknak a figyelembe vételét. Másrészt az, hogy validáljuk az általunk használt festési módszert egy Pgp cut-off érték meghatározásával. Utóbbira azért volt szükség, mert a szakirodalmi adatokban eltérő Pgp-expressziós százalékok szerepelnek. Ezeknek az eltéréseknek részben metodikai, részben a festődés eltérő kiértékelése, vagyis a vizsgálok szubjektivitása a lehetséges oka. Ezért a prognosztikai érték erősítése céljából javasolt a különböző módszerek validálása. Így lehetőség nyílna arra, hogy a kezelés megkezdése előtt információkat szerezzünk a várható terápia rezisztenciáról és ezekben az esetekben a nem Pgp-szubsztrát kemoterapeutikumokat preferáljuk az olcsóbb, hagyományos szerekkel szemben.

Vizsgálatunk másik célja a különböző klinikai jellemzők kiértékelése volt, különös tekintettel a recidíva, illetve gyógyszer mellékhatások okozta halálra. Az ezekkel kapcsolatos prognosztikai faktorok azonosítása, valamint az MDR-rel való kapcsolatuk vizsgálata. Ez utóbbival kapcsolatban az volt a hipotézisünk, hogy az alacsonyabb Pgp-expressziós értéket mutató betegek érzékenyebbek a gyógyszer mellékhatásokra, mint a magasabb Pgp-expressziót mutató páciensek.

Klinikai paraméterek. A kezelésben részesült lymphomás betegeink teljes medián túlélése (OST) 333 nap volt, míg a medián recidívamentes periódus (RFP) 134 nap. Ez lényegében megegyezik Dhaliwal és mtsai. 2013-ban publikált túlélési adataival (medián OST 246 nap, medián RFP 137 nap). Valli és mtsai (2011) 418 lymphomás kutyát vizsgálva az USA-ban ennél rövidebb, 218 napos median túlélést írtak le, Aresu és mtsai. (2015) Olaszországban pedig még rövidebb, 195 napot. Azt meg kell jegyeznünk, hogy az amerikai

ebekhez viszonyítva a hazai kutyák (főként a vidéken élők) ritkábban részesülnek adekvát kezelésben. Viszont azokban az esetekben, amikor lehetőség van a megfelelő kemoterápiás protokollok használatára, az általunk produkált túlélési adatok megegyeznek a nemzetközi közleményekben leírtakkal vagy annál kicsit jobbak.

Immunfenotípus. A betegeink 72,72%-ának volt B-sejtes, 27,27%-ának pedig T-sejtes lymphomája, ezek az arányok az irodalmi adatokhoz hasonlóak. A T-sejtes lymphomák B-sejtes formákhoz viszonyított rosszabb kórjósolata ismert jelenség. Tanulmányunkban az OST high-grade B-sejtes formák esetén 404 nap volt, az összes B-sejtes forma esetén 253 nap, míg a high-grade T-sejtes formák esetén 240 nap, valamennyi T-sejtes beteg esetén pedig 150 nap.

Stádium és alstádium. A IV stádiumú betegek teljes medián túlélése ($n = 22$) 415 nap volt, ami szignifikánsan különbözött az egyéb stádiumokétól, II stádium: 135 nap ($n = 1$), III stádium: 124 nap ($n = 4$) és V stádium ($n = 6$, medián: 150 nap). A kedvezőbb stádiumok rosszabb túlélési adatainak magyarázata az alacsony esetszám és ebből fakadóan a különböző szövettani típusú betegek egyenlőtlen eloszlása. Az egyetlen II stádiumú beteg kifejezetten rossz kórjóslatú Burkitt-like lymphomás volt, míg a 4 db III stádiumú betegből 3 db high-grade T-sejtes lymphoma volt, ezeknek a medián túlélése szintén alacsony.

Ivararány. Szukák és kanok esetében a teljes túlélésben nem találtunk szignifikáns különbséget (kanok: $n = 18$, medián: 342 nap, szukák: $n = 15$, medián: 244 nap), ez az eredményünk megfelel az irodalmi adatoknak.

Pgp-expresszió. Az általunk tapasztalt 54,5%-os Pgp-pozitivitás magasabb, mint a Ginn által 1996-ban publikált 27,3%-os vagy Lee 33%-os átlagos értéke. Az immunhisztokémiai módszerrel detektált Pgp-festődési értékek kutyában nagy szórást mutatnak. Sokolowska és mtsai. (2015) 10%-os cut-off érték mellett különböző szövettani altípusú lymphomákat vizsgálva 48%-os (12/25) Pgp-pozitivitást talált, míg Dhaliwal és mtsai (2013) 50%-os cut-off érték mellett 80%-os pozitivitást detektáltak. A különböző eredményeket számtalan faktor okozhatja, kezdve a metodikai eltérésektől (pl. antigénfeltárás erőssége), de esetünkben a magasabb érték magyarázata lehet a T-sejtes betegek relative nagyobb száma (27,7%) is. Éppen ezért szükséges a saját cut-off értékek meghatározása és a módszer validálása.

Pgp-pontérték. Pontrendszer használatakor Drénou és mtsai.-hoz (1998) hasonlóan szignifikáns különbséget találtunk mind a túlélésben, mind pedig a recidívamentes periódusban a különböző pontszámú csoportok között. 15 beteget tekintettünk Pgp-negatívnak (0 pont) és 18-at Pgp-pozitívnak (1, 2, 3 pont), ezek az arányok gyakorlatilag megegyeznek Sokolowska és mtsai. (2015) adataival, ahol 25 betegből 12-t találtak Pgp-pozitívnak. A Pgp-pozitív és -negatív csoport között mind a teljes túlélésben (240 nap vs. 428 nap, $p = 0,0027$), mind pedig a recidívamentes periódusban (95 nap vs. 232 nap, $p = 0,004$)

szignifikáns különbséget találtunk. ROC-analízis segítségével 35%-os Pgp-expressziós cut-off értéket határoztunk meg, melynek a specificitása és szenzitivitása a túlélésre 0,75, illetve 0,7, a recidíva előjelzésére pedig 1 és 0,533 volt. Eszerint a Pgp-immunhisztokémia 35% cut-off érték használatával megfelelő diagnosztikai értékkel rendelkezik.

Pgp festődési intenzitás. Céljaink között szerepelt a festődés intenzitásának vizsgálata és ennek számszerűsítése. Markáns különbséget (240 nap vs. 428 nap, $p = 0,016$) találtunk a teljes túlélésben az erősen, illetve gyengén festődő minták között, akárcsak Lee és mtsai. (1996). Hasonló a tendencia a recidívamentes periódus összehasonlításakor is, számszerint 103 nap vs. 221 nap ($p = 0,046$). Vizsgálatunkkal megerősítettük a Pgp festődési intenzitás prognosztikus értékét. Ezenkívül megfigyeltük, hogy a T-sejtes lymphomák erősebben festődnek (8/9). Lee és mtsai.-val (1996) ellentétben mi szignifikáns különbséget találtunk a B- és T-sejtes formák festődési intenzitása között: normál és erős festődést szignifikánsan gyakrabban ($p = 0,0028$) tapasztaltunk T-sejtes lymphomáknál, mint a B-sejtes formáknál. Ez magyarázhatja többek között a T-sejtes forma terápia rezisztenciáját és a rosszabb túlélési adatokat.

A Pgp-immunhisztokémia prognosztikai értékét összegezve elmondhatjuk, hogy az ABC transzporterek expressziója és a betegség klinikai lefolyása közötti kapcsolat ellentmondásos. A Pgp-meghatározás fontosságát mint prognosztikai faktort, Bergmann (1996) és Lee (1996) korai vizsgálatai egyértelműen bizonyították. Bergmann 1996-os vizsgálatával ellentétben, melyben leírta a C219 ellenanyaggal történő Pgp-immunhisztokémia prognosztikai jelentőségét fontos prognosztikai faktorként azonosítva azt, Zandvliet és mtsai. 2015-ben azt tapasztalták, hogy a kezelés előtti mintákban vizsgált ABC transzportergén expressziójának szintje nem volt prediktív sem a teljes, sem a recidívamentes túlélésre. Dhaliwal és mtsai. (2013) immunhisztokémiai módszerrel találtak ugyan különbséget a Pgp-pozitív és Pgp-negatív csoport medián túlélésében (OST 246 nap vs. 418 nap), de ez a különbség nem volt szignifikáns ($p = 0,762$). Mindezen feltételezések ellenére mi a kezelés megkezdése előtt vizsgált Pgp-expressziót megfelelő cut-off érték használatával megbízható prognosztikai faktornak találtuk. Hipotézisünkben a vizsgálatot megelőzően azt valószínűsítettük, hogy a 10%-os cut-off érték megfelelő prognosztikai értékű. A vizsgálatok során azonban arra a következtetésre jutottunk, hogy magasabb cut-off érték használata esetén a túlélésbeli különbség még inkább szignifikáns. Különösen fontosnak tűnik az adatok megfelelő cenzorálása a halál oka szerint, mivel a daganatos okból és a gyógyszer mellékhatás miatt bekövetkezett halálozás elkülönítésével sokkal pontosabb következtetéseket lehet levonni. Például a mi vizsgálatunkban a cenzorált adatok használatával (a gyógyszer mellékhatás okozta halálozás kizárása után) a Pgp < 35% (vagy 0, illetve 1 pontszámú) csoport túlélése megközelítőleg 400 nap volt, szemben a Pgp ≥ 35 (2 és 3 pontszámú) csoport kb. 200 napos túlélésével. Cenzorálás nélkül ezt a különbséget

alulbecsültük volna, a medián túlélés 333 nap lett volna Pgp < 35% esetén és 189 nap \geq 35% expresszió esetén ($p = 0,0369$).

Feltételezésünk szerint számos tényező befolyásolja a Pgp-immunhisztokémia prognosztikai értékét (30. táblázat). Az egyik ilyen az eltérés a festési metodikában (antigénfeltárás, inkubációs idők, a metodika standardizálása, az adott ellanyag klónaffinitása az antigénhez) (Ginn, 1996; Lee és mtsai., 1996; Dhaliwal és mtsai., 2013).

30. táblázat: A Pgp-immunhisztokémia prognosztikai értékét befolyásoló főbb tényezők

Eltérések a festési metodikában	Eltérő inkubációs idő, reagensek stb.
Festődés kiértékelése	Manuális számolás vs. automata képelemzés, eltérések az egyes vizsgálók között, leszámolt sejtek száma
MDR kialakulása a kezelés előtt	Pl. szteroid-előkezelés
Eltérő beteganyag	Immunfenotípus, szövettani besorolás
Alkalmazott kemoterápiás protokoll	Pgp-szubsztrátok vs. egyéb szerek
Beteg egyedi érzékenysége	Mellékhatások miatti dóziskorrekción
Visszaesés és elhullás idejének pontos megállapítása	Adatok megfelelő cenzorálása
Egyéb rezisztenciát okozó faktorok	Pl. citokróm P450

Következő a festődés kiértékelése, az alkalmazott számolási módszer, az eltérés az egyes vizsgálók között, manuális számolás vagy automata képelemzés, a leszámolt sejtek száma (Bergmann és mtsai., 1996; Ginn, 1996; Lee és mtsai., 1996; Dhaliwal és mtsai., 2013). Ilyen tényező a vizsgálatot megelőző MDR kialakulása a betegben, pl. szteroid-előkezelés a kemoterápiás protokoll megkezdése előtt (Tsujiura és mtsai., 2005). Különbséget okozó faktor az eltérő beteganyag (immunfenotípus, szövettani típus) (Sokolowska és mtsai., 2015). További tényező az alkalmazott kemoterápiás protokoll, különös tekintettel arra, hogy a felhasznált gyógyszerek Pgp-szubsztrátok (pl. doxorubicin, vincristin) vagy nem (pl. L-Asparaginase, lomustine) (Tse és Kwong, 2013). Dhaliwal és mtsai (2013) vizsgálatukban pl. a betegeket L-Asparaginase alapú terápiával kezelték, ami markánsan csökkenti a Pgp-pozitív sejtek számát. Valószínűleg ez a magyarázata annak, hogy nem tapasztaltak szignifikáns különbséget a túlélésben a Pgp-pozitív és -negatív csoportok között ellentétben pl. Lee és munkatársaival vagy velünk. További különbséget okozhat a betegegek mellékhatásokra való egyedi érzékenysége, ami miatt szükség lehet a kemoterápiás szerek dóziskorrekciónjára vagy bizonyos szerek elhagyására, ami szintén elősegíti az MDR kialakulását (Bergman, 2000). Kifejezetten fontos tényező a visszaesés és elhullás idejének pontos megállapítása, az adatok

cenzorálása az alapján, hogy a halál daganatos okból vagy gyógyszer mellékhatás miatt következett be. És vannak egyéb, nem ABC-transzporter alapú faktorok, amik szintén terápia rezisztenciát okoznak, pl. citokróm P450 rendszer (Grandjean és mtsai., 2002) vagy különböző antioxidánsok (Cort és mtsai., 2016). Az itt felsorolt faktorok mind befolyásolhatják a klinikai adatokat és hozzáadódhatnak a Pgp pumpafunkciójához, befolyásolva ezzel a terápiás választ és az eredményt.

Gyógyszer mellékhatások és Pgp-expressziós értékek összehasonlítása. Az általunk leggyakrabban megfigyelt mellékhatás a hasmenés volt. A kumulatív grading megmutatta, hogy Dhaliwal és mtsai. (2013) megállapításaihoz hasonlóan a hasmenés, az anorexia és a thrombocytopenia voltak a kezelés legsúlyosabb mellékhatásai. Azt tapasztaltuk, hogy a daganatos halálozás Pgp $\geq 6.5\%$ cut-off érték használatával gyengén előrejelezhető, ahogy a gyógyszer mellékhatások okozta halálozás is. Wang és mtsai. 2015-ben azt találták, hogy a kemoterápiás kezelés alatt neutropeniát mutató betegek szignifikánsan magasabb túléléssel rendelkeztek. Bár Wang és mtsai. az egyes daganatminták Pgp-expresszióját nem vizsgálták, valószínűsíthető, hogy a neutropenia a normal és daganatos szövetekben lévő alacsonyabb Pgp-koncentráció következménye volt. Ezt támasztja alá Gramer és mtsai. (2015) vizsgálata is, ami szerint a kiindulási és terápiát követő MDR-1 génextpressziós értékek alkalmasak lehetnek különböző gyógyszer mellékhatások, valamint a terápia rezisztencia kialakulásának előrejelzésére is. Ebben a 27 kutyás vizsgálatban a gyógyszer mellékhatásokat mutató kutyák szignifikánsan alacsonyabb MDR1 mRNS-szinttel rendelkeztek real-time PCR módszerrel vizsgálva.

A kutatásunk során azt is vizsgáltuk, hogy a terápia előtti, előkezeletlen daganatmintából lehet-e következtetni a későbbi, *in vivo* „normál” gyógyszer rezisztencia funkcióra. Az eredményeink szerint alacsony szenzitivitással (0,55), de magas specificitással (0,81) elő tudtuk jelezni a gyógyszer mellékhatás miatt bekövetkezett halálozást. A daganatos betegség miatt bekövetkezett halálozást ezzel szemben magas szenzitivitással (0,87) és alacsony specificitással (0,66) tudtuk jelezni. Tapasztalataink szerint a gyógyszer mellékhatások gyakoribbak a Pgp-negatív, mint a Pgp-pozitív betegeknél, illetve Pgp $\leq 6,5\%$ cut-off értéknél a hasmenés kialakulásánál erős szignifikanciát is találtunk ($p = 0,001$). Lehetséges, hogy ennek az az oka, hogy a Pgp-negatív betegek tovább élnek, emiatt több kemoterápiás kezelést kapnak, így nagyobb eséllyel alakul ki hasmenés náluk.

A kemoterápiás szerek mind a daganatsejtek, mind a gyorsan osztódó testi sejtek pusztulását előidézik, ami részben a daganat remisszióját okozza, részben pedig mellékhatásként azt eredményezi, hogy a betegek fogékonyabbak lesznek a különböző fertőzésekre. A beteg sejteinek veleszületett/örökölt (*ab ovo*) képessége pedig a kemoterápiás szerek kipumpálására vagy metabolizálására okozza később a tumorsejteknek azt a képességét, hogy multidrog rezisztenciát (MDR) fejlesszenek ki (Bergman és mtsai.,

1996). Ez a folyamat okozhat csökkent terápiás választ (korábbi visszaesés) és ugyanakkor kevesebb gyógyszerellékhatást is. Emelett nem szabad megfeledkezni arról sem, hogy a sejtek nem csak *ab ovo*, hanem szerzett gyógyszerrezisztenciával is rendelkezhetnek (Mealey és mtsai., 1998).

Vizsgálatunk legnagyobb limitáló tényezője a kis esetszám volt. Az eredményeink, miszerint a kemoterápia megkezdése előtt vizsgált Pgp-negatív nyirokcsomók magabb OST és RFP értékekkel járnak, megerősítik azokat a korábbi irodalmi adatokat, miszerint kutyák lymphomája esetén a magas Pgp-expresszió terápiaerezisztencia kialakulásával jár, ezáltal negatív prognosztikai faktor (Lee és mtsai., 1996; Ramos-Vara és Miller, 2007).

Eredményeink alapján azt javasoljuk, hogy a festődés intenzitását is értékelni kell az immunhisztokémiai vizsgálat használatakor. Feltételezzük azt is, hogy nemcsak a különböző immunhisztokémiai módszerek, metodikai különbségek miatt kaptak az egyes kutatók eltérő eredményeket, hanem azért, mert a Pgp-expresszió prognosztikai értéke magasabb a főként Pgp-szubsztrátokkal kezelt betegekben.

Amennyiben az adott metodikát megfelelően értékelik ki, az a klinikai gyakorlatban jól használható lesz, de ehhez megfelelő, a konkrét módszerre validált cut-off értékeket kell meghatározni. Úgy látjuk, hogy a gyógyszerellékhatások kialakulása gyenge összefüggést mutat az előkezeletlen tumorok Pgp-expressziójával. A Pgp-expresszió kiértékelése csak a daganatsejtek terápiaerezisztenciájáról ad releváns információt, nem pedig az egész állat terápiás válaszáról (különös tekintettel a mellékhatásokra). Ahogy ezt már más szerzők is megállapították (Zandvliet és mtsai., 2015), további nagy beteglétszámú, hosszú utánkövetési időszakú vizsgálatokból nyerhető információk tovább növelhetik a Pgp-immunhisztokémiai létjogosultságát a lymphomás kutyák napi terápiájában.

Vizsgálatunk során megállapítottuk, hogy a Pgp-immunhisztokémia megfelelő diagnosztikai értékkel rendelkezik és az egyedre szabott gyógyászat alapja lehet lymphomás kutyák esetében. Intenzív és magas (> 35%) Pgp-expresszió esetén a kezelő állatorvosnak ugyanis a jobb terápiás válasz eléréséhez javasolt olyan szereket kell választania, amelyek nem Pgp-szubsztrátok (pl. lomustine, L-asparaginase).

4.2. Pgp- és p53-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

4.2.1. Pgp- és p53-expresszió az egészséges, illetve a daganatos emlőszövetben

A p53-expresszió tekintetében érdekes, hogy pozitív festődést tapasztaltunk a jóindulatú daganatok esetében is, bár kisebb expressziós százalékban, mint a tubulopapilláris és komplex carcinomáknál. A p53-pozitivitás nem meglepő adenomáknál sem (Wolf és mtsai., 1997). Ugyanakkor a carcinomák nagy része pozitívan festődött, és az expressziós százalékok a mi esetünkben nagyobbak mutatkoztak, mint pl. Rodo és Malicka (2008) esetében, akik 32%-os expressziót tapasztaltak carcinomáknál. Ez a különbség abból is adódhat, hogy ők kizárólag a magfestődést vizsgálták, mi pedig mindkét sejtrégió (mag és citoplazma) festődését.

A p53 magfestődése csak 30%-ban volt tapasztalható és az sem volt klasszikusan erős. Ez nem meglepő. Bár sokkal kifejezettebb magfestődést vártunk, mégis a klasszikus magfestődés kutyákban nem olyan kifejezett, mint emberekben. A p53-festődés kutyákban gyakran a citoplazmára jellemző. Ennek magyarázata nem tisztázott (Haga és mtsai., 2001). A magfestéssel rendelkező daganatokban változatos volt a festődés. A sejtmagok a halványsárgától a sötétebb barnáig festődtek. Néhány esetben szemcsézett, rögösebb volt a mintázat (9. ábra: Kód 79424). Egyes daganatokban majdnem az egész sejtpopuláció pozitív reakciót mutatott, pl. anaplasztikus karcinómák. Ezt támasztja alá más szerzők megfigyelése is (Lopuszynski és mtsai, 2010).

Az ép myoepithelialis sejtekben nem tapasztaltunk a pozitív kontrollnak megfelelő, vagy annál fokozottabb festődést. Ez a megfigyelésünk megfelel az irodalmi adatoknak. Bár enyhe p53-festődés tapasztalható myoepithel sejtekben is, azonban ezek markere p53-mal rokon p63 fehérje (Barbareschi és mtsai, 2001). Humán tapasztalatok alapján az emlőtumorokat felosztották úgy is, hogy a myoepithel fenotípus dominál. Ezeknek a daganatoknak a 42%-ában tapasztaltak p53-pozitivitást (Rakha és mtsai, 2006). Ez azonban a myoepithelekből formálódó daganatokra (malignus myoepithelioma, sarcomatoid breast carcinoma) jellemző, nem pedig a daganatos sejtek melletti ép myoepithelsejtekre. Normál emlőben a myoepithelek negatívak voltak humán tapasztalatok alapján is (Angéle és mtsai., 2004).

Pgp-expresszió. Petterino és munkatársai 2006-ban a tubulopapilláris simplex carcinoma estében 49,75%, a komplex carcinoma esetében 40,31%, benignus daganatoknál 31,36%, míg carcinosarcomáknál 47,28%-ban állapították meg a Pgp-pozitív sejtek arányát.

A mi eredményeink nagyságrendileg hasonlóak: a tubulopapilláris simplex carcinomáknál 66,94%, a komplex carcinomáknál 35,72%, a benignus daganatoknál 25%, míg a carcinosarcomáknál 33,33% a Pgp-t expresszáló sejtek aránya. Ezek az expresszió értékek nem térnek el jelentősen egymástól.

Az összehasonlítás során megállapítottuk, hogy szignifikáns különbség van a tubulopapilláris carcinoma és a komplex carcinoma, valamint a malignus és a benignus daganatok között a Pgp-expresszió tekintetében. Ez felveti annak a jelentőségét, hogy valamennyi általunk vizsgált malignus emlődaganat típus, de különösképpen a tubulopapilláris carcinoma kifejezetten terápiarezisztensnek tekinthető. Az ilyen daganatok esetében sokkal kevesebb értelme van annak, hogy a daganatot olyan kemoterápiás szerrel kezeljük, amely szubsztrátja a Pgp-nek (doxorubicin, vincristin, ciklofoszfamid, mitoxantron, stb.). Ezek a megállapításaink megfelelnek annak a klinikai tapasztalatnak, miszerint a kutyák emlődaganatai a vénás citosztatikumok többségére (beleértve a Pgp-szubsztrátokat is) rezisztensek (Arenas és mtsai., 2016; Sorenmo és mtsai., 2019). A Pgp terápiarezisztenciát okozó szerepét kutyák emlődaganatainál több későbbi tanulmány is megerősítette (Levi és mtsai, 2016, 2019).

Fontos megjegyezni, hogy az emlődaganatos minták csaknem mindegyikében mutatkozott bizonyos mértékű Pgp-expresszió. Ez azt jelenti, hogy abban az esetben, amikor egy kisebb mértékű Pgp-expressziót mutató emlődaganatot kezelnénk kemoterápiával, egy idő után valószínűleg a kezdeti tumorregressziót követően biztosan szelektálna egy terápiarezisztens klón, amely túlszaporodva már nem mutatna jelentősebb regressziót a gyógykezelés hatására. Ezek az eredményeink megfelelnek annak a klinikai megfigyelésnek miszerint a kutyák emlődaganatai a Pgp-szubsztrátokra rezisztensek.

Kutyák malignus emlődaganatainak emelkedett Pgp-expressziójával kapcsolatos eredményeinket a későbbiekben több más tanulmány is megerősítette. Levi és mtsai (2016) szignifikáns különbséget találtak a malignus daganatok, valamint a hyperplasticus epithelium és a benignus emlőtumorok C494-es klón alkalmazásával tapasztalt Pgp-expressziója között. Hasonlóképpen hozzánk azt is megállapítottak, hogy a simplex carcinomákban fokozottabb az expresszió mértéke, mint a komplex formák esetén (simplex carcinomák: 78,26%, komplex, illetve kevert tumorok esetén 73,91% (Levi és mtsai., 2016). Ugyanebben a vizsgálatban a Grade II és III daganatokban szignifikánsan magasabb Pgp-expressziót tapasztaltak, mint a Grade I tumorokban. Az egyes stádiumok között nem találtak szignifikáns különbséget. Mi sajnos nem tudtuk összehasonlítani a különböző Grade-besorolású csoportok expressziós értékeit, mivel a vizsgálatunk időpontjában még nem állt rendelkezésre kutyák emlődaganatainál használt egységes grading rendszer.

A myoepithel sejtek Pgp-expressziója a mi esetünkben nem volt kifejezett, annak ellenére, hogy Kim és mtsai. (2012) tapasztaltak Pgp-expressziót a Pgp C219-es klónjának

alkalmazásával. Ennek magyarázata lehet, hogy mi a C494-es klónt használtuk. Kim és mtsai (2012) vizsgálatában a C219 antitesttel pozitívnak bizonyult a malignus emlőtumorok 61,1%-a (33/54-tumorminta) és a jóindulatú emlőtumorok 35,5%-a (5/14-tumorminta). Ez utóbbiakban a Pgp-expresszió enyhe volt a myoepithelialis sejteiben. A Pgp-pozitív malignus tumorok közül ($n = 33$) a myoepithelialis expressziót is mutató daganatok ($n = 21$, 63,6%) körülbelül kétszer annyiszor voltak, mint az epithelialis expressziót mutatók ($n = 12$, 36,5%). Mi ilyen jelentős myoepithelialis expressziót nem tapasztaltunk. Az említett szerzők az epithelialis sejtekben a Pgp-expressziót a citoplazmában, míg a myoepithelialis a membránban tapasztalták. Mi azonban az epithelialis sejtekben is tapasztaltunk sejtmembránhoz lokalizált Pgp-t. A Pgp-pozitív szöveteket szintén három csoportba soroltuk az immunreaktív sejtek aránya alapján, és egyikük sem haladta meg az immunreaktivitás 80%-át. Ugyanők nem tapasztaltak 80%-osnál nagyobb Pgp-expressziót, míg mi egy esetben tapasztaltunk, egy tubulopapilláris carcinoma esetében. Ez a kutatócsoport, ellentétben másokkal és velünk azt tapasztalta, hogy a Pgp-expresszió szignifikánsan magasabb volt a komplex carcinomákban, a komplex adenomákban, vegyes daganatokban és simplex carcinomákban, és alacsonyabb az anaplasztikus és a laphámsejt carcinomában. Ugyanők azt tapasztalták, hogy a Grade II típusokban nagyobb a Pgp-expresszió, mint a Grade III típusokban. Mindezek a különbségek adódhattak abból, hogy más klónt használtak.

4.2.2. A Pgp- és a p53-expresszió összefüggése különböző klinikai paraméterekkel

Az általunk vizsgált daganatok közül a tubulopapilláris daganatok voltak többnyire a már recidivált tumorok, ami nem meglepő, hiszen ez a daganattípus gyakran mutat kiújulást. A daganat kialakulásának időpontja szempontjából nem találtunk szignifikáns különbséget a tumortípusok között. Összehasonlítottuk a betegek kórelőzményét is, ahol azt vizsgáltuk, hogy történt-e ivartalanítás a daganat jelentkezését megelőzően, hiszen ismert az a tény, hogy a korai ivartalanítás csökkenti az emlőtumor kialakulásának esélyét kutyában. Esetünkben az ivartalanítás megléte azonban nem befolyásolta lényegesen a daganatok kialakulását. Ennek valószínűleg az az oka, hogy az ovarioectomia ezeknél a kutyáknál már felnőttkorban történt, míg jelentős különbség csak a korai, 2. tüzelés előtt végzett ivartalanításkor tapasztalható, amely kifejezetten csökkenti az emlődaganatok kialakulásának esélyét. A későbbiekben ez a védőhatás sajnos megszűnik (Schneider és mtsai., 1969). Tanulmányunkban a legtöbb ivartalanítás a tubulopapilláris csoportban történt, ahogy a legtöbb recidíva is, ami megfelel annak az irodalmi adatnak, miszerint a később végzett ivartalanítás pusztán a benignus daganatok kialakulásának valószínűségét csökkenti (Sorenmo és mtsai., 2019). Ugyanakkor, amikor a kutyákat a műtét idején az ösztrogén-2 (E2) szérum értékek (magas és alacsony)

alapján csoportosították, az ovariohysterectomia (OHE) protektívnek bizonyult a magas E2-es csoportba tartozó kutyákban. Az alacsony E2-vel rendelkezőknél nem volt hatással a recidívára és a túlélésre. Ugyanebben a tanulmányban az OHE hatását a tumortípusok alapján is vizsgálták és a Grade II daganatokban szenvedő kutyák szignifikánsan hosszabb recidívamentes túlélést mutattak. Az OHE nem volt hatással a Grade I és a Grade III malignitási fokozatú csoportok tagjaira (Kristiansen és mtsai. 2016).

A korrelációs vizsgálattal megállapítást nyert, hogy a Pgp- és a p53-expresszió mértéke egymással összefügg, ami azt jelenti, hogy a terápiarezisztenciát okozó fehérjék és a mutációt mutató p53 fokozott expressziója hasonló mértékben jelzi a rosszabb prognózist. Megállapítható, hogy minél nagyobb a Pgp-expresszió mértéke, annál nagyobb az esély a recidívára, amely azt igazolja, hogy prognosztikailag jó paraméter lehet a Pgp-expresszió meghatározása emlőtumorok esetén. Annak ellenére fontos ez a megfigyelés, hogy ezeket a daganatokat nem kezeljük kemoterápiával, hanem általában csak műtéten esnek át. A p53-expresszió mértéke és a túlélés között ugyanakkor nem találtunk szignifikáns kapcsolatot.

A p53-expresszió kapcsolata a túléléssel. A túlélési adatok alapján csaknem szignifikáns különbséget tapasztaltunk a 3-as p53 pontszámú csoport (a sejtek 80–100%-os pozitivitása) esetén a többi expressziós %-hoz képest, csakúgy, mint a Pgp esetén, ahol a 3-as pontértéket a sejtek 75%-os pozitivitásánál soroltuk be. Ugyanakkor megállapítottuk, hogy a fentiekől függetlenül a p53-expresszió vizsgálata önmagában nem rendelkezik megfelelő prognosztikai értékkel. A p53-immunhisztokémia prediktív értékének hiányát a későbbiekben más vizsgálatok is megerősítették. Munday és mtsai (2019) 35, Dolka és mtsai (2016) pedig 40 emlődaganatos minta vizsgálata után jutott ugyanerre az eredményre. Ennek magyarázata lehet, hogy viszonylag vegyes festődés tapasztalható és nem jellemző a humán tapasztalatok alapján megszokott „klasszikus” magfestődés, ami p53-mutációra és fokozott expresszióra enged következtetni.

A Pgp-expresszió kapcsolata a túléléssel. Megállapítottuk, hogy a Pgp-expresszió mértéke a daganat szövettani típusától függetlenül negatívan korrerál a túlélési idővel. A legalacsonyabb túlélési időt a tubulopapilláris carcinomáknál tapasztaltunk, de Pgp-expresszió tekintetében a malignus csoportokon belül csak a tubulopapilláris és a komplex carcinomák között találtunk szignifikáns különbséget.

A Pgp-expresszió vizsgálata egy olyan összehasonlító elemzésben lenne érdekes, amikor az emlődaganatokat kemoterápiával kezeljük. Ugyanakkor érdekes, hogy a kemoterápiás kezeléstől függetlenül is tapasztalható, hogy a magas Pgp-expresszió rövidebb túléléssel jár. A Pgp-expresszió fokozódása a gyógyszeres kezeléstől függetlenül is az egyre malignusabb daganatok jellemzője lehet.

4.3. COX-2-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

Fő célunk a COX-2-expresszió vizsgálata kutyák emlődaganataiban, illetve a különböző COX-gátlók alkalmazásából származó klinikai előny igazolása, illetve összehasonlítása volt. A humán medicinában tapasztaltaknak megfelelően kutyák egészséges emlőszövege nem vagy csak minimális mértékben mutat COX-2-expressziót. Ezzel szemben az emlődaganatok többségénél emelkedett COX-2-expresszió detektálható, amely negatív prognosztikai faktorként összefüggést mutat a malignitás fokával, a recidívára való hajlammal, valamint a metasztatikus potenciállal is (Lavalle és mtsai., 2009; Doré, 2011). A hipotézisünk az volt, hogy az emelkedett COX-2-expresszió kutyák esetében is negatív prognosztikai faktor, aminek a gátlása túlélésbeli előnyhöz vezet.

Esetünkben prospektív vizsgálatot végeztünk az emlődaganattal műtött betegek sorrendjében, a betegeink 4,7%-a volt kan, ami szignifikánsan magasabb, mint a más tanulmányok által leírt előfordulási arány. Benjamin és mtsai. (1999) 1343 emlődaganatos beaglet vizsgáltak és ebből csak 2 (kevesebb, mint 0,5%) volt kan. Összességében elmondható, hogy a kanok esetén az emlődaganatok incidenciája a nőstényekben tapasztalhatóknak kb. 1%-a (Merlo és mtsai., 2008).

A mi adataink szerint a malignus tumorok az összes daganat 69,05%-át tették ki, ez magasabb, mint az irodalomban általában szereplő kb. 50%-os arány (Misdorp és Hart, 1976; Doré és mtsai., 2003; Lavalle és mtsai., 2009). Ettől függetlenül ismertek a miénkhez hasonló eredmények is, például Hellmén 1993-ban 68%-os, Bauman és mtsai. 2004-ben 71%-os, Rasotto és mtsai 2017-ben pedig 74%-os arányt mértek. A malignus daganatok relatíve nagyobb számának oka lehet a korai ivartalanítás elmaradása, illetve az, hogy a betegek előrehaladottabb stádiumban, később kerülnek onkológiai vizsgálatra, így nagyobb eséllyel történik meg a kezdetben benignus elváltozások malignus transzformációja.

4.3.1. A COX-2-expressziók megjelenése

COX-2-expresszió. Vizsgálataink megerősítették azt az irodalmi adatot, miszerint a malignus emlődaganatok COX-2-expressziója a benignusakénál magasabb (Doré és mtsai., 2003; Queiroga és mtsai., 2007). Ugyanakkor a benignus tumorokon belül nem tapasztaltuk, hogy a komplex és a simplex adenomák COX-2-expressziója között jelentősebb különbség lenne (Queiroga és mtsai., 2007). A százalékos expressziós érték vizsgálatakor szignifikáns különbséget találtunk a benignus daganatok (21,96%) és a tubulopapilláris carcinomák (49,16%), a benignus daganatok és a solid carcinomák (47,22), valamint a benignus

daganatok és a sarcomák (71,5%) között. A benignus daganatok expressziós százaléka szintén megfelel az irodalmi adatoknak, Doré és mtsai. (2003) adenomák esetén 24%-os expressziós értéket mértek. Brunelle és mtsai. (2006) 84 malignus emlődaganatos minta vizsgálatakor pedig azt tapasztalták, hogy a daganatok kb. fele volt COX-2-pozitív. Ennek megfelel Heller és mtsai. (2005) tanulmánya is, ahol 37 adenocarcinoma 46%-a bizonyult COX-2-pozitívnak. A kötőszöveti elemek festődése nálunk is megegyezett Doré és mtsai. (2003) tapasztalataival. Mi is leírtuk az említett szerzőkhöz hasonlóan, hogy a gyulladásosejtek expresszálták a COX-2-t, amely így a festődés belső kontrolljaként is alkalmazható volt, valamint azt a tényt, hogy a nekrotikus régióknál, a nekrotikus területet határoló fusiform fibroblasztszerű sejtek gyakran erősen pozitívak voltak a COX-2-jelöléssel. Ugyanakkor mi ezt adenomában is tapasztaltuk.

Festődési intenzitás. A festődés intenzitásának vizsgálatakor 4 fokozatú (0–3) pontrendszer használatával szignifikáns különbséget találtunk a benignus daganatok (0,61) és a solid (anaplasztikus) carcinomák (1,72), a benignus daganatok és a tubulopapilláris carcinomák (1,33), a benignus daganatok és a sarcomák (1,87), a solid carcinomák és a komplex carcinomák (1,00), valamint a komplex carcinomák és a sarcomák festődési erőssége között. Ezek az eredmények szintén megfelelnek az irodalmi adatoknak. Doré (2003) adenomák esetén gyenge diffúz citoplazmafestődést, míg malignus tumorok esetén pedig több és szignifikánsan intenzívebb festődést tapasztalt. Queiroga és mtsai. (2007) szintén ezzel megegyező eredményt kaptak, a malignus tumorok expressziós százaléka magasabb volt, és szövettani típustól függően a festődés is intenzívebb volt.

4.3.2. Különböző klinikai paraméterek és a COX-2-expresszióval való kapcsolatuk vizsgálata

Grade. A szövettani Grade alapján a malignus daganatok megoszlása a következő volt: Grade I 48,27% ($n = 14$), Grade II 24,13% ($n = 7$), Grade III 27,58% ($n = 8$). Ezek az arányok megfelelnek a más tanulmányokban olvasható értékeknek, például Rasotto és mtsai (2017) 169 malignus tumor vizsgálatakor hasonló adatokat írt le (Grade I 51%, Grade II 14%, Grade III 35%).

Stádium. A stádiumbesorolás eredménye a következő volt a benignus daganatokban: Stage I: 77% ($n = 10$), Stage II: 27% ($n = 3$), Stage III: 0% ($n = 0$), Stage IV: 0% ($n = 0$). A malignus emlődaganatokban Stage I: 27,58% ($n = 8$), Stage II: 31,03% ($n = 9$), Stage III: 24,13% ($n = 7$), Stage IV: 17,24% ($n = 5$). Gundim és mtsai (2016) 63 malignus daganat vizsgálatakor a következő eredményt kapták: Stage I: 31,75%, Stage II: 19,05%, Stage III: 19,05%, Stage IV: 22,22%, Stage V: 7,93%. A mi vizsgálatunkban nem szerepeltek Stage V

(távoli metasztázissal rendelkező) betegek, mivel a mi mintáink rutin daganatműtétekből származtak és ezeknek a betegeknek nem javasoltunk műtéti terápiát.

Túlélési idők. A vizsgálatunkban szerepelt betegek medián túlélési ideje (OST) a következőképpen alakult: benignus daganatok esetén 1000 nap, solid carcinomák esetén 162 nap, komplex carcinomák esetén 178 nap, ductális carcinomák esetén 335 nap, tubulopapilláris carcinomák esetén 559 nap, sarcomák esetén pedig 152 nap. Ezek az értékek a benignus daganatok, a solid carcinomák, tubulopapilláris carcinomák, ductális carcinomák és a sarcomák esetén nem térnek el számottevően a Rasotto és mtsai (2017) által leírt adatoktól, de a komplex carcinomák esetén mi jelentősen alacsonyabb túlélést tapasztaltunk. Ennek magyarázata részben az alacsonyabb esetszámunk lehet, valamint az a tény, hogy a magyarországi kutyák előrehaladottabb stádiumban, később kerülnek onkológiai vizsgálatra. Komplex carcinomák esetén Rasotto és mtsai. (2017) kedvezőbb adatait az is magyarázhatja, hogy az ő vizsgálatukban különösen nagy arányban (87%) szerepeltek Grade I besorolású daganatok.

A jóindulatú emlődaganatok esetén elvben nincs értelme recidívamentes túlélési időt vagy teljes túlélési időt számolni. Mi sem szerettünk volna messzemenő következtetéseket levonni, és kizárólag azért vizsgáltuk, mert igazolni szeretnénk volna, hogy a követéses vizsgálattal a várható számadatok tapasztalhatók-e. Mi négyéves követéses időszakban vizsgáltuk a betegeinket. Egy ilyen intervallumban a túlélési mutatókat nagyon sok faktor és számos közben kialakuló betegség is módosítja. Ugyanakkor ismert, hogy ugyanabban az emlőtelepben a benignus daganat mellett malignus is kifejlődhet, sőt a benignus folyamat átmehet malignusba (Sorenmo és mtsai, 2009). A kérdést mi nem kívántuk elemezni, de néhány munkacsoport foglalkozik ezzel a témával. Egy mexikói munkacsoport például az tapasztalta, hogy tizennyolc hónappal a műtét után 15/80 (18,8%) betegnél recidíva alakult ki. Ezen betegek közül 7/15-nek (46,7%) volt eredetileg jóindulatú daganata, 8/15-nek (53,3%) legalább egy rosszindulatú daganata ($p > 0,05$). A jóindulatú és rosszindulatú daganatok recidívaaránya tehát hasonló volt. A rosszindulatú emlődaganatokban szenvedő kutyák szignifikánsan rövidebb túlélési időt mutattak, mint a jóindulatú daganattal műtöttek. A rosszindulatú emlődaganatokban szenvedő betegek közül 19/74 (25,7%) pusztult el a műtét utáni követés során; ezek közül 89,5% (17/19) korán vagy egy éven belül elhullott (Salas-Araujo és mtsai, 2016).

Azokat a recidívamentes túlélési adatokat, amelyek olyan betegeknél keletkeztek, amelyeknél az eredetileg benignus tumorról műtött betegben később, más emlőtelepben kifejlődött malignus emlődaganat, cenzorált adatként kezeltük. A 22. és a 22.b táblázatban a cenzorált adatok miatt alakult ki az az ellentmondás, hogy a benignus tumorok teljes túlélési idejének mediánját lehetett számolni és ez 1132 nap volt, míg a recidívamentes túlélési adat esetében a sok cenzorált adat miatt mediánt nem lehetett számolni, csak átlagot, ami 1167 nap volt, és

ez hosszabb, mint a teljes túlélési idő. Ennek oka, hogy a recidívamentes túlélések cenzorált adata sok esetben a teljes túlélés volt. Néhány esetben azonban, a valódi adatként ismert recidívamentes túlélési idő hosszabb volt, mint a cenzorált adatok a többi állat esetében, pedig azok nem recidiváltak, csak hamarabb elhullottak, mint azok, amelyeknél a recidíva ideje valódi adatként szerepelt.

COX-2-expresszió és a Grade kapcsolata. Anadol és mtsai. (2017) tanulmányával ellentétben mi nem találtunk szignifikáns különbséget a különböző Grade-besorolású daganatok COX-2-expressziójának mértéke és intenzitása között, csupán növekvő tendenciát sikerült igazolnunk a malignitás fokának növekedésével. Ezek az eredmények megfelelnek azoknak az irodalmi adatoknak, miszerint az agresszívebb besorolású, anaplasztikus formák esetén kifejezetten magas expressziós értékeket tapasztaltak (Dias Pereira és mtsai., 2009; Anadol és mtsai., 2017).

COX-2-expresszió és a stádium kapcsolata. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a COX-2-expresszió és -intenzitás mértékében a különböző stádiumokban, Stage I (3 cm átmérő alatti méretű), a Stage II (3–5 cm-es tumorok) és a Stage III (5 cm átmérő feletti méretű) tumorok, valamint azon tumoros betegek között, amelyek Stage IV fokozatúak (bármely méretű daganat nyirokcsomó áttéttel) voltak. A kutyák emlődaganatainak stádiumbesorolása alapján egyébként a 3 cm daganatátmérő alatti betegek prognózisa szignifikánsan jobb, mint a nagyobb daganattal kezelt kutyáké. Chang és mtsai. (2005) vizsgálata szerint az 5 cm átmérő feletti daganatok a kisméretű tumoroknál nagyobb valószínűséggel képeznek metasztázist és a betegek 7x nagyobb eséllyel pusztulnak el a műtétet követő 2 éven belül. Az itt felsorolt biológiai tulajdonságok egyik magyarázata lehet a nagyobb daganatmérettel összefüggő magasabb COX-2-expresszió. Ugyanakkor a Stage IV-es esetekben a daganatok mérete különböző volt, és néhány a daganat méretét tekintve I. és II. stádiumba lett volna sorolható.

COX-2-expresszió korrelációja különböző klinikai paraméterekkel. Pozitív korrelációt találtunk a COX-2-expresszió mértéke és a daganatméret között, hasonló összefüggést megfigyeltek nők emlőrákja esetén is (Arun és Goss, 2004). Negatív korrelációt találtunk a COX-2-expresszió és a teljes túlélési idő, a COX-2-expresszió és a recidívamentes periódus között. Ezek a megfigyeléseink megfelelnek azoknak az irodalmi adatoknak miszerint az emelkedett COX-2-expresszió kutyák emlődaganatai esetén negatív prognosztikai faktor (Queiroga és mtsai., 2005).

Kifejezetten erős negatív korrelációt találtunk a Grade-besorolás és túlélési idő ($p < 0,0001$), valamint a recidívamentes periódus között ($p < 0,0001$). Ezek a megfigyeléseink megfelelnek azoknak az irodalmi adatoknak, melyek szerint a grading kifejezetten erős prognosztikai értékkel bír (Rasotto és mtsai., 2017; Sorenmo és mtsai., 2019).

COX-2-pontszám szerinti teljes túlélési vizsgálat. Negatív korrelációt találtunk a rosszindulatú daganatok esetében a COX-2-expresszió mértéke és a túlélési idő, valamint a recidívamentes periódus között. Ezek az adatok megfelelnek azoknak az irodalmi adatoknak, miszerint az emelkedett COX-2-expresszió negatív prognosztikai faktor. Ebből következően fontos szerepet tölt be a daganatok angiogenezisében, antiapoptotikus tulajdonságú, valamint növeli az invázióra és a metasztázisra való hajlamot (Tsuji és mtsai., 1998). Queiroga és mtsai. (2005) kutyák rosszindulatú emlődaganatainak ($n = 27$) vizsgálatkor megállapították, hogy az emelkedett COX-2-expressziót mutató csoportban szignifikánsan nagyobb volt az utánkövetés során a távoli metasztázisra való hajlam, illetve a műtét időpontjában a nyirokcsomó-metasztázis valószínűsége. Ennek megfelelően az emelkedett expressziós csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt a túlélési idő és a recidívamentes periódus. Velünk ellentétben ebben a vizsgálatban nem találtak összefüggést a COX-2-expresszió mértéke és a tumorméret között. A COX-2 érzékdzésben betöltött szerepét támasztották alá Lavelle és mtsai. (2009) is, amikor kutyák rosszindulatú emlődaganatai esetében vizsgálták a COX-2-expresszió és a mikroérdenzítés összefüggését. Megállapították, hogy a megnövekedett COX-2-expresszió lineárisan nagyobb mikroérsűrűséggel járt együtt, ami rosszabb prognózist és rövidebb túlélést okozott. Az emelkedett COX-2-expresszió metasztázisképzésben betöltött szerepét támasztja alá Dias Pereira és mtsai. (2009) tanulmánya is, ahol tüdő- és nyirokcsomóáttétek COX-2-expressziójának mértékét hasonlították össze a primer emlőtumoréval. Az esetek 83,3%-ában a metasztázisok a primer daganattal megegyező vagy azt meghaladó intenzitású COX-2-expressziót mutattak.

Cut-off érték. A COX-2-expresszió prognosztikai értékének növelése céljából meghatároztunk egy 50%-os cut-off értéket, aminek használatával szignifikáns és markáns különbséget találtunk a rosszindulatú daganatok esetében a túlélésben, valamint a recidívamentes periódusban. Az 50%-os határérték kb. 1 éves túlélésre vonatkozóan alacsony szenzitivitással (0,357), de magas specificitással (1) és a mintegy 3 hónapos recidívamentes túlélésre pedig magas szenzitivitással (0,928), de alacsony specificitással (0,333) rendelkezett. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy az 50% feletti COX-2-expressziós értékkel rendelkező betegek nagy valószínűség szerint elpusztulnak egy éven belül. Ettől függetlenül sok más olyan beteg is lesz, amelyek egy éven belül elpusztulnak, pedig a COX-2-expressziós százalékuk az 50%-os határérték alatt van. A recidíva kialakulására vonatkozólag sok lesz az olyan beteg, amelyik nem recidivál 3 hónapon belül, hiába magasabb a COX-2-expressziója, mint 50%, azonban alig lesz olyan beteg, amelyik hamarabb recidiválna 3 hónapnál, úgy, hogy a COX-2-expressziója kisebb lenne, mint 50%. Az 50% feletti expressziós értékű csoport teljes túlélése 190 nap, míg az 50% alattié 330 nap volt ($p = 0,009$). A recidívamentes periódus az 50% feletti expressziós értékű csoport esetében 110 nap, az 50% alattinál pedig 300 nap volt ($p = 0,039$).

4.3.3. Az adjuváns kezelés hatásának vizsgálata

NSAID-kezelés kapcsolata a túléléssel. A nemszteroid gyulladáscsökkentők kemopreventív és daganatnövekedést csökkentő hatása régóta ismert, ahogy a fordított összefüggés is a nők emlőrák kialakulási kockázata, valamint NSAID-használatuk között (Khuder és Mutgi, 2001). A nemszteroid gyulladásgátlók számos daganattípusnál a terápia részét képezik, függetlenül attól, hogy a tumorelles hatás pontos sejtszintű és biokémiai mechanizmusa még csak részben ismert (Moore és mtsai., 2000). Az ún. metronomicus protokollok elterjedésével a NSAID-k használata folyamatosan teret nyer a klinikai onkológiában főként az olyan daganatok esetén, amik a klasszikus vénás kemoterápiára rezisztensek. A metronomicus terápia célja a COX-2-gátlók és protokolltól függően egyéb kemoterápiás szerek kisdózisú, folyamatos adagolásával a daganat érzécszésének a gátlása.

A mi vizsgálatunkban a NSAID-kezelésben részesült betegek nem reagáltak pozitívan. Ehelyett az NSAID-terápiában részesült csoport rövidebb túlélési időt mutatott. Ennek lehetséges oka a nem megfelelő kísérleti elrendezés, ugyanis az előrehaladottabb stádiumú, valamint agresszívebb daganattal kezelt kutyák közül arányaiban többen részesültek kezelésben, mert a benignusabb formák tulajdonosait nehezebben sikerült meggyőzni az adjuváns terápia szükségességéről, így a kontrollcsoportot döntően a Grade I, adjuváns kezelést nem igénylő betegek alkották. Arenas és mtsai. (2016) firocoxib monoterápia hatékonyságát hasonlították össze mitoxantron kemoterápiával kutyák kifejezetten malignus (Grade III és/vagy Stage IV) emlődaganatai esetén ($n = 28$) a tumor sebészi eltávolítását követően. A daganatok mindegyike COX-2-expressziót mutatott. A firocoxib terápiaiban részesült betegek túlélése és recidívamentes periódusa szignifikánsan magasabb volt a kontrollcsoportnál. Az egyes NSAID-k hatékonyságát vizsgálva mi is hasonló eredményt kaptunk. A felhasznált szerek közül egyedül a firocoxib korrelált pozitívan a túlélési idővel. Ennek oka lehet, hogy a firocoxib az egyedüli szelektív COX-2-gátló az általunk vizsgált szerek közül.

Bár Arenas és mtsai. (2016) tanulmányához hasonlóan részben nekünk is sikerült igazolni a firocoxib hatékonyságát kutyák high-grade emlődaganatainak adjuváns kezelésben, az NSAID-használattal kapcsolatos eredményeinket limitálja az alacsony betegszám, a nem megfelelő betegszelekció és kísérleti elrendezés, valamint az utánkövetés nehézsége. Még inkább releváns eredmény eléréséhez más módon megtervezett kísérletre lett volna szükség (pl. azonos stádiumú és Grade-besorolású betegek), a mi kutatásunk fókuszában azonban a COX-2-expresszió vizsgálata állt.

Kemoterápiás kezelés kapcsolata a túléléssel. A mi vizsgálatunkban a kemoterápiát kapott betegek nem reagáltak pozitívan (az OST a kemoterápiás csoportban 224 nap volt, szemben a kontrollcsoport 246 napjával), a citosztatikus kezelésben részesült csoport

recidívamentes periódusa pedig szintén rövidebb volt, mint a kemoterápiát nem kapott betegeké. Ezek az eredmények megfelelnek az emlődaganatok kemoterápiarezisztanciájáról ismert eddigi irodalmi adatoknak (Arenas és mtsai., 2016; Sorenmo és mtsai., 2019). A citosztatikus csoport rövidebb recidívamentes és teljes túlélésének pedig az a magyarázata, hogy eleve a magasabb stádiumú és Grade-besorolású betegek részesültek kemoterápiás kezelésben, a kontrollcsoportot pedig döntően a kedvezőbb kórjóslatú, Grade I betegek alkották, mivel az esetükben nem volt indokolt az adjuváns kezelés. Ennek megfelelően csak a Grade II és Grade III betegek teljes túlélési idejét vizsgálva ez a tendencia megfordult, a kemoterápiás csoport esetén az OST továbbra is 224 nap volt, a kontrollcsoporté azonban 152 napra csökkent. Ezek az eredményeink nagyon hasonlóak Arenas és mtsai. (2016) tanulmányához, ahol a citosztatikus csoport (mitoxantron) túlélési ideje a kezelésben egyáltalán nem részesült csoporthoz képest növekedett ugyan, de hozzánk hasonlóan ők sem tapasztaltak szignifikáns különbséget. Bár nekünk is sikerült megerősíteni a high-grade emlődaganatok kemoterápiarezisztenciáját, az ezzel kapcsolatos eredményeinket limitálja az alacsony betegszám, a nem megfelelő betegszelekció és kísérleti elrendezés, valamint az utánkövetés nehézsége. Még inkább releváns eredmény eléréséhez más módon megtervezett kísérletre lett volna szükség (pl. azonos stádiumú és Grade-besorolású betegek), a mi kutatásunk fókuszában azonban a COX-2-expresszió vizsgálata állt.

Meg kell jegyeznünk, hogy a terápiás beavatkozások hatása nem megfelelően vizsgálható ennyire heterogén és sok változóval rendelkező viszonylag szűk populációban ($n = 42$). Ugyanakkor, nem volt célunk biztos statisztikai elemzéseket adni, hiszen a kezelési csoportokba sorolás alapját az adhatja, ha a különböző kezelésekből részesülők ugyanolyan vagy nagyon hasonló stádium-, malignitási és korcsoportokba tartoznának. Sajnos nekünk erre nem volt lehetőségünk. Mégis, tendenciákat szeretnénk volna felvetni, és nem gondoljuk, hogy a kezelése hatására független lenne a többi paramétertől. Megjegyeznénk azt is, hogy olyan vizsgálatokat még a nemzetközi állatorvosi szakirodalomban sem lehet olvasni, amelyek esetében annyira homogén csoportokat hasonlítottak volna össze, mint amilyeneket az emberek esetében lehet.

4.3.4. A stádiumbasorolás és a túlélés kapcsolata

A malignus daganatos betegek teljes és recidívamentes túlélésének összehasonlításakor a következőt tapasztaltuk: az I., a II. és a III. stádium között nem találtunk szignifikáns különbséget, de a IV. stádiumú betegek túlélése szignifikánsan elmaradt a többitől ($p < 0,0001$). Ez utóbbi megfigyelésünk egyezett más publikációkban leírt tapasztalatokkal (Rasotto és mtsai. 2017), ahol szintén azt találták, hogy a IV. stádiumú, nyirokcsomó áttétet

mutató betegek túlélése jelentősen rosszabb, mint a többi stádiumú betegé. Rasotto és mtsai (2017) lényegesen nagyobb számú beteggel foglalkoztak, mint mi, és az általuk leírt túlélések 210 napnak (nyirokcsomó áttéttel) és 900 napnak (nyirokcsomó áttét nélkül) bizonyultak. A mi esetünkben mindössze 5 db Stage IV beteg volt 20 napos medián túléléssel, míg ők 52 ilyen esetet vizsgáltak és 117 nyirokcsomó áttét nélküli esetet. Ebben a vizsgálatban adjuváns kezelést nem alkalmaztak, kizárólag sebészileg távolították el a daganatokat. Ugyanakkor ők egyéb stádiummeghatározást nem végeztek. A mi esetünkben a IV. stádiumú betegek túlélése jelentősen elmaradt a más vizsgálatokban tapasztaltaktól (Arenas és mtsai., 2016; Rasotto és mtsai., 2017). Ennek magyarázata részben az alacsony esetszám. A rosszabb túlélési adatainkat az is okozhatta, hogy a mi malignus emlődaganatos eseteinkben a daganatok többnyire jelentősen nagyobbak voltak, mint számos publikációban tapasztalhatóak (Gundim és mtsai., 2016; Abadie és mtsai., 2018).

Összességében elmondhatjuk, hogy vizsgálatainkkal sikeresen igazoltuk a kiindulási hipotéziseinket: az eddigi kutatási eredményeknek megfelelően detektáltuk a COX-2 emelkedett expresszióját kutyák előrehaladott és nagyméretű emlődaganatai esetén, valamint egyértelmű összefüggést találtunk a COX-2-expresszió és a tumorméret között. Tendenciájában igazoltuk az emelkedett expresszió és a rosszabb klinikai kimenetel (csökkent teljes és recidívamentes túlélési idő), valamint a malignitás foka közötti összefüggést. Ezek a megfigyeléseink megfelelnek azoknak az irodalmi adatoknak miszerint a COX-2 létfontosságú szerepet tölt be a tumorgenezisben, a daganatok növekedésében, a malignitás fokában, valamint a metasztázisra és a recidívára való hajlam rizikójának kialakításában (Schmidt és mtsai., 2001; Stack és DuBois, 2001; Madhusudan és Harris, 2002; Sharma és mtsai., 2005; Dias Pereira és mtsai., 2009). Ezeknek a felfedezéseknek köszönhetően a nemszteroid gyulladáscsökkentők (különös tekintettel a szelektív COX-2 gátlókra) a jövőben fontos szerepet tölthetnek majd be a kutyák rosszindulatú emlődaganatainak kiegészítő terápiájában is. Hatványozottan igaz ez a magas COX-2-expressziót mutató high-grade formákra. Ez utóbbit egyébként a firocoxib pozitív terápiás hatásának megerősítésével nekünk is sikerült igazolni. Különösen jelentős ez annak ismeretében, hogy ezeknek a daganatoknak a kemoterápiarezisztenciája miatt eddig nem állt rendelkezésre kellően hatékony adjuváns kezelési mód.

Vizsgálatunk során megállapítottuk, hogy a COX-2-immunhisztokémia magas prognosztikai értékkel rendelkezik és az egyedre szabott gyógyászat alapja lehet az emlődaganatos kutyák esetében. Intenzív és magas (esetünkben > 50%) expresszió esetén a kezelő állatorvosnak a műtéti terápiát követően mindenképpen javasolnia kell a COX-2-gátló terápiát, hiszen az elérhető szerek közül jelenlegi ismereteink alapján a firocoxib hatékonysága bizonyított.

Általánosságban elmondható, hogy a COX-2-festődés nem daganatspecifikus tulajdonság, valamint nehezen standardizálható. A különböző minták nagyon eltérő festődését más szerzők is megtapasztalták. Ez jelentősen rontja ennek a markernek a diagnosztikában való használhatóságát. Ugyanakkor az egyre fokozódó COX-2-expresszió jelentős biológiai tulajdonság, amely a malignitás és a tumorterjedés velejárója lehet. Nem véletlen, hogy egészen magas (50%-os) határértéken tapasztalhatunk szignifikáns különbséget a túlélési időkben.

4.4. Tirozin-kinázok vizsgálata kutyák emlődaganatai esetén

Tanulmányunk fő célja a tumorgenezisben szerepet játszó tirozin-kinázok vizsgálata volt kutyák emlődaganatai esetén és ezáltal új, jövőbeli terápiás célpontok azonosítása. Jelenleg kutyák high-grade emlőtumorai esetén a betegek adjuváns kezelése nem megoldott, mivel ezek a daganatok nem reagálnak megfelelően a hagyományos citosztatikus kezelésre. Humán emlődaganatok esetében régóta ismert tény bizonyos receptor tirozin-kinázok diszregulációja és fokozott expressziója. Ezek közül legismertebb a tumorgenezisben is szereplő HER-2 (ErbB2), amely az emlőrákok 20–30%-ában megtalálható és negatív prognosztikai faktorként rövidebb túléléssel jár. Ennek célzott gátlása emberek esetén a rutin terápia része (Slamon és mtsai., 1989).

Vizsgálatunk célja a kutyák emlődaganataiban a következő tirozin-kinázok, valamint a VEGF detektálása volt real-time PCR eljárás segítségével: VEGFR1, VEGFR2, EGFR, ErbB2 (HER-2), PDGFR α , KIT, illetve MET. Megállapítottuk, hogy a felsorolt faktorok mindegyike szignifikánsan magasabb mennyiségben van jelen a daganatos emlőszövetben, mint ugyanazon egyed egészséges emlőjében. A VEGFR1, VEGFR2, VEGF emelkedett expressziós értékeinek tekintetében eredményeink hasonlóak az irodalmi adatokhoz. Több tanulmány állapított meg a kutyák emlődaganataiban magasabb értéket és egy autokrin hurok létét is feltételezik. A daganatsejtek képesek VEGF termelésére, ami a receptoraihoz kapcsolódva beindítja azok autofoszforylációját, ez pedig fokozott angiogenezishez vezet. (Restucci és mtsai., 2004; Millanta és mtsai., 2006; Al-Dissi és mtsai., 2010). A VEGF angiogén faktorként különböző útvonalakon keresztül szabályozza az endothelsejtek differenciálódását, proliferációját, migrációját, valamint antiapoptotikus tulajdonságú.

Restucci és mtsai. (2004) hozzánk hasonlóan megállapították, hogy a kevésbé differenciált (tehát magasabb Grade-besorolású) tumoroknak szignifikánsan magasabb a VEGFR1-és VEGF-szintje, mint a kevésbé malignus daganatoké. Ennek oka, hogy a magasabb Grade-besorolású tumorok agresszívebbek, emiatt növekedésük is gyorsabb, így bennük könnyebben alakulnak ki hypoxiás, illetve nekrotikus területek. Restucci és mtsai. (2004) immunhisztokémiai módszerekkel vizsgálták az emlőtumorok VEGFR1-, illetve VEGF-expresszióját és azt tapasztalták, hogy az erősen emelkedett expresszió szignifikáns nekrozissal társult. Ez valószínűsíti azt, hogy a VEGF–VEGFR autokrin hurok a daganat hypoxiás stimulusra adott válasza. Ez alapján feltételezhető, hogy malignus daganatok esetén a VEGF–VEGFR-tengely kulcsszerepet játszik az endothelmigrációban, illetve -proliferációban, valamint ezzel egy időben a neoplasztikus sejtek proliferációjában és a daganat növekedésében.

Emellett az emelkedett VEGFR- és VEGF-expresszió fokozhatja a metasztatikus hajlamot, részben a neovaszkularizáció, részben pedig az újonnan képződött vérerek falának megnövekedett permeabilitása által. Összességében elmondható, hogy az általunk is tapasztalt emelkedett VEGF- és VEGFR-expresszió negatív prognosztikai faktorként magyarázatot adhat a high-grade emlőtumorok néhány tipikus tulajdonságára, mint a gyors növekedés és a korai áttétképzés.

Az EGFR2 esetében nem tapasztaltuk a VEGF-hez és a VEGFR1-hez hasonló, high-grade emlőtumorokban két különböző módszerrel is látott, szignifikánsan emelkedett értékeket. Emelkedett VEGFR2-szintet leírtak kutyák Grade III agydaganataiban (Dickinson és mtsai., 2006), azonban ez az expressziós mintázat tumortípus-függőnek tűnik. Ez azt valószínűsíti, hogy a VEGFR2 kutyák emlőtumorainak esetében – az agydaganatokban tapasztaltakkal ellentétben – nem játszik jelentős szerepet a daganat progressziójában és a jelátvitel ebben az esetben döntően a VEGFR1 receptoron keresztül történik.

Humán emlődaganatok esetén ismert tény a PDGFR1, EGFR és ErbB2 emelkedett expressziója. A PDGFR1/PDGFR- α emelkedett expressziója nők emlőrákja esetén a daganat fokozott progressziójával jár együtt (Carvalho és mtsai., 2005). Ehhez hasonlóan számos humán emlődaganat-típusban leírták az EGFR és ErbB2 fokozott expresszióját is, ami nagyobb daganatmérettel, alacsonyabb differenciáltsági fokkal és rosszabb prognózissal jár (Bhargava és mtsai., 2005; Tan és Yu, 2007; Masuda és mtsai., 2012). Ezekhez az adatokhoz hasonlóan kutyák esetében mi is emelkedett PDGFR1, EGFR és ErbB2 mRNS-szintet tapasztaltunk, de döntően a low-grade emlődaganatokból származó mintákban. Ezek a tirozin-kinázok az emberekben tapasztaltakhoz hasonlóan kutyákban is növelik a tumor agresszivitási fokát és a humán onkológiához hasonlóan a jövőben potenciális terápiás célpontok lehetnek. Az ErbB2 (HER-2) emelkedett expressziója tekintetében eredményeink megfelelnek az irodalmi adatoknak, miszerint a nagy mintaszámon végzett immunhisztokémiai vizsgálatok a malignus emlődaganatok 29,7%-ában igazolták a HER-2 fokozott expresszióját. A kizárólag sebészi úton kezelt, fokozott HER-2-expressziót mutató kutyák egyéves és kétéves túlélési aránya, valamint a teljes túlélési ideje is jobb volt a HER-2-negatív csoporténál, bár a különbség egyik esetben sem volt szignifikáns (Hsu és mtsai., 2009). Ez a tény megmagyarázza azt, hogy miért nem mértünk a magasabb Grade-besorolású csoportokban szignifikánsan emelkedett expressziót.

Vizsgálataink igazolták, hogy más neoplasztikus kórképekhez hasonlóan a MET fokozott expressziója kutyák emlődaganataiban is megfigyelhető, valamint hogy a Grade III emlődaganatokban mennyisége az alacsonyabb malignitású csoportokhoz viszonyítva szignifikánsan emelkedett. Ezek az eredmények megegyeznek azokkal az irodalmi adatokkal, melyek szerint a c-met fokozott jelenléte rosszabb prognózissal jár együtt, mivel onkogén receptor tirozin-kinázként jelentős szerepet tölt be a daganatok proliferációjában,

növekedésében, angiogenezisében és a metasztázisok képződésében (Stellrecht és Gandhi, 2009).

Kutyák egyre több daganatos megbetegedése esetén leírták a KIT-mutációt, amely tumorsejtekben fokozott proliferációt és/vagy csökkent apoptotikus hajlamot okoz. Vizsgálataink igazolták Kubo és mtsai. (1998) által korábban leírt emelkedett c-kit-expressziót kutyák emlődaganatai esetén. Megállapítottuk továbbá, hogy a Grade III daganatokban a c-kit mennyisége az alacsonyabb malignitású csoportokhoz viszonyítva szignifikánsan emelkedett, amely részben magyarázhatja ezeknek a tumoroknak az agresszivitását és rosszabb kórjóslatát.

A c-KIT és c-MET jelátviteli utak nők emlőrákja esetén is rosszabb prognózishoz és tumorprogresszióhoz társulnak (Ho-Yen és mtsai., 2015; Liu és mtsai., 2015), ami megerősíti további anti-c-KIT és anti-c-MET hatóanyagok fejlesztésének szükségességét. A mi eredményeink a Grade II és Grade III csoportokban alátámasztják ennek létjogosultságát.

Vizsgálataink megerősítették azt a tényt, hogy az onkogén tirozin-kinázok fontos szerepet játszanak a daganatnövekedésben, proliferációban, angiogenezisben és metasztázisképzésben (Stellrecht és Gandhi, 2009). Eredményeink kutyák esetében elsőként mutatják be a tirozin-kinázok komplex és szimultán szabályozási zavarát, nem csak egyetlen receptor, hanem gének sokaságának érintettsége révén. Eredményeink igazolták azt is, hogy a jövőben az emlődaganatok gyógykezelésekor figyelembe kell venni a tirozin-kinázok potenciális diszregulációját és a hatékony terápia tervezéséhez szükséges lehet ezek szintjének mérése, majd azok célzott gátlása.

Vizsgálatunk limitáló tényezője az alacsony mintaszám és emiatt a különböző szövettani típusú emlődaganatok alacsony száma volt. Ettől függetlenül az adataink bizonyították a VEGF, valamint számos tirozin-kináz (VEGFR1, PDGFR1, c-KIT és c-MET) fokozott expresszióját és szabályozási zavarát kutyák emlődaganatai esetén. A betegek kis száma ellenére az a tény, hogy az egészséges és daganatos mintákat ugyanattól a betegtől azonos időben vettük, sokkal megbízhatóbbá teszi a statisztikai összehasonlítások eredményeit. Összességében elmondhatjuk, hogy a jövőben a kutyák rosszindulatú emlődaganatai a tirozinkináz-gátlókkal kapcsolatos vizsgálatok potenciális célpontjai lehetnek.

5. Új tudományos eredmények

1. Kutatócsoportunk Magyarországon elsőként vizsgálta lymphomás kutyákból származó nyirokcsomóminták Pgp-expresszióját és annak prognosztikai értékét. A vizsgálati módszerünk validálása után meghatároztunk egy Pgp-expressziós cut-off értéket (35%), amely magas prognosztikai és diagnosztikai értékkel bír, ezáltal még a kemoterápiás kezelés megkezdése előtt segítségünkre lehet a leginkább hatékony terápiás protokoll kiválasztásában (egyedre szabott gyógyászat).
2. Magyarországon elsőként írtuk le kutyák emlődaganatainak fokozott, szimultán Pgp-, ill- p53-expresszióját, ezzel részben magyaráztuk a daganattípus kemoterápia-rezisztenciáját. Az emlődaganatos minták csaknem mindegyikében mutatkozott bizonyos mértékű Pgp-expresszió. Ezek az eredményeink megfelelnek annak a klinikai megfigyelésnek, miszerint a kutyák emlődaganatai a Pgp-szubsztrát citosztatikumokra rezisztensek. Ennek magyarázata, hogy az esetleges kezdeti tumorregressziót követően az eredetileg alacsonyabb szintű Pgp-expressziót mutató tumorokban is szelektálódik egy olyan terápia-rezisztens klón, amely túlszaporodva már nem mutat jelentősebb regressziót a gyógykezelés hatására.
3. Megállapítottuk, hogy kutyák emlődaganatai esetében p53-immunhisztokémia nem rendelkezik megfelelő prediktív értékkel.
4. Detektáltuk a COX-2 emelkedett expresszióját kutyák előrehaladott és nagyméretű emlődaganatai esetén, valamint egyértelmű összefüggést találtunk a COX-2-expresszió és a tumorméret között. Tendenciájában igazoltuk az emelkedett expresszió és a rosszabb klinikai kimenetel (csökkent teljes és recidívamentes túlélési idő), valamint a malignitás foka közötti összefüggést. Megerősítettük a COX-2-immunhisztokémia prognosztikai értékét kutyák emlődaganatai esetén és meghatároztunk egy 50%-os határértéket, amely kifejezetten prognosztikai értékűnek bizonyul. Eredményeink alapján a kutyák emlődaganatai a COX-2-gátló terápia potenciális célpontjai lehetnek.
5. Vizsgálatainkkal igazoltuk számos onkogén tirozin-kináz (VEGFR1, PDGFR1, c-KIT és c-MET), illetve a VEGF fokozott expresszióját, valamint diszregulációját kutyák emlődaganatai esetében. Elsőként igazoltuk kutyák emlődaganatai esetén a felsorolt onkogének komplex diszregulációját. Eredményeink alapján a kutyák emlődaganatai a tirozinkináz-gátló terápia potenciális célpontjai lehetnek.

6. Irodalomjegyzék

Abadie J., Nguyen F., Loussouarn D., Peña L., Gama A., Rieder N., Belousov A., Bemelmans I., Jaillardon L., Ibisch C., Campone M.: **Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance.** Breast Cancer Res Treat 167. 459-468, 2018.

Accioly M.T., Pacheco P., Maya-Monteiro C.M., Carrossini N., Robbs B.K., Oliveira S.S., Kaufmann C., Morgado-Diaz J.A., Bozza P.T., Viola J.P.: **Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells.** Cancer Res 68. 1732–1740, 2008.

Al-Dissi A.N., Haines D.M., Singh B., Kidney B.A.: **Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas.** Can Vet J, 51. 1109–1114, 2010.

Anadol E., Yar Saglam A.S., Gultiken N., Karakas K., Alcigir E., Alkan H., Kanca H.: **Expression of iNOS, COX-2 and VEGF in canine mammary tumours and non-neoplastic mammary glands: Association with clinicopathological features and tumour grade.** Acta Vet Hung 65. 382-393, 2017.

Angèle S., Jones C., Reis Filho J.S., Fulford L.G., Treilleux I., Lakhani S.R., Hall J.: **Expression of ATM, p53, and the MRE11-Rad50-NBS1 complex in myoepithelial cells from benign and malignant proliferations of the breast.** J Clin Pathol 57. 1179-1184, 2004.

Araújo M.R., Campos L.C., Damasceno K.A., Gamba C.O., Ferreira E., Cassali G.D.: **HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival.** Res Vet Sci 106. 121-130, 2016.

Arenas C., Peña L., Granados-Soler J.L., Pérez-Alenza M.D.: **Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study.** Vet Rec. doi: 10.1136/vr.103398. Epub 2016 Jul 4.

Aresu L., Martini V., Rossi F., Vignoli M., Sampaolo M., Aricò A., Laganga P3., Pierini A., Frayssinet P., Mantovani R., Marconato L.: **Canine indolent and aggressive lymphoma: clinical spectrum with histologic correlation.** Vet Comp Oncol 13. 348-362, 2015.

Argyle D.J., Khanna C., Giancristofaro N.: **Tumor biology and metastasis.** In: **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology.** 6th Ed. Vail D.M., Thamm D.H., Liptak J.M. Saunders Elsevier, 36-60, 2019.

Arun B., Goss P.: **The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention.** Semin Oncol 31. 22-29, 2004.

Barbareschi M., Pecciarini L., Cangi M.G., Macrì E., Rizzo A., Viale G., Doglioni C.: **p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast.** Am J Surg Pathol 25. 1054-1060, 2001.

Bauer N.B., Zervos D., Moritz A.: **Argyrophilic nucleolar organizing regions and Ki67 equally reflect proliferation in fine needle aspirates of normal, hyperplastic, inflamed, and neoplastic canine lymph nodes (n = 101).** J Vet Intern Med 21. 928-935, 2007.

Baumann D., Hauser B., Hubler M., Flückiger M.: **Signs of metastatic disease on thoracic radiographs of dogs suffering from mammary gland tumours: a retrospective study (1990-1998).** Schweiz Arch Tierheilkd 146. 431-435, 2004.

Benjamin S.A., Lee A.C., Saunders W.J.: **Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles.** Vet Pathol 36. 423-436, 1999.

Bergh J., Norberg T., Sjogren S., Lindgren A., Holmberg L., Coplete J.: **Sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy.** NatureMed 1. 1029-1034, 1995.

Bergman P.J., Ogilvie G.K., Powers B.E.: **Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma.** J Vet Intern Med 10. 354-359, 1996.

Bergman P.J.: **Multidrug resistance.** In: Current Veterinary Therapy XIII, Ed: Kirk R.W. WB Saunders, 479-482. 2000.

Bhargava R., Gerald W.L., Li. A.R., Pan Q., Lal P., Ladanyi M., Chen B.: **EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations.** *Modern Pathology* 18. 1027-33, 2005.

Blagosklonny M.V.: **P53: an ubiquitous target of anticancer drugs.** *Int J Cancer* 98. 161-166, 2002.

Brunelle M., Sartin E.A., Wolfe L.G., Sirois J., Doré M.: **Cyclooxygenase-2 Expression in Normal and Neoplastic Canine Mammary Cell Lines.** *Vet Pathol* 43. 656–666, 2006.

Carter R.F., Valli V.E., Lumsden J.H.: **The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation.** *Can J Vet Res* 50. 154-164, 1986.

Carvalho I., Milanezi F., Martins A., Reis R.M., Schmitt F.: **Overexpression of platelet-derived growth factor receptor α in breast cancer is associated with tumour progression.** *Breast Cancer Res* 7. 788-795, 2005.

Carvalho M.I., Guimarães M.J., Pires I., Prada J., Silva-Carvalho R., Lopes C., Queiroga F.L.: **EGFR and Microvessel Density in Canine Malignant Mammary Tumours.** *Res Vet Sci* 95. 1094-1099, 2013.

Chan A.T., Giovannucci E.L., Meyerhardt J.A., Schernhammer E.S., Curhan G.C., Fuchs C.S.: **Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer.** *JAMA* 294. 914–923, 2005.

Chang E.T., Zheng T., Weir E.G., Borowitz M., Mann R.B., Spiegelman D., Mueller N.E.: **Aspirin and the risk of Hodgkin's lymphoma in a population-based case-control study.** *J Natl Cancer Inst* 96. 305–315, 2004.

Chang S.C., Chang C.C., Chang T.J., Wong M.L.: **Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002).** *J Am Vet Med Assoc* 227. 1625-1629, 2005.

Cherington J.M., Strawn L.M., Shawver L.K.: **New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents**. Adv Cancer Res 79. 1-38, 2008.

Chu L. L., Rutteman G. R., Kong J. M., Ghahremani M., Schmeing M., Misdorp W., van Garderen E., Pelletier J.: **Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia**. Breast Cancer Res Treat 50. 11–25, 1998.

Cort A., Ozben T., Saso L., De Luca C., Korkina L.: **Redox Control of Multidrug Resistance and Its Possible Modulation by Antioxidants**. Oxid Med Cell Longev 11. 1-17, 2016.

Costa C., Soares R., Reis-Filho J.S., Leitao D., Amendoeira I., Schmitt F.C.: **Cyclooxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer**. J Clin Pathol 55. 429–434, 2002.

de M. Souza C., Toledo-Piza E., Amarin R., Barboza A., Tobias K.M.: **Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment**. Can Vet J 50. 506-510, 2009.

Denkert C., Winzer K.J., Müller B.M., Weichert W., Pest S., Köbel M., Kristiansen G., Reles A., Siegert A., Guski H., Hauptmann S.: **Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma**. Cancer 15. 2978-2987, 2003.

Dhaliwal R.S., Kitchell B.E., Ehrhart E., Valli V.E., Dervisiz N.G.: **Clinicopathologic significance of histologic grade, pgg, and p53 expression in canine lymphoma**. J Am Anim Hosp Assoc 49. 175-184, 2013.

Dias Pereira P., Lopes C.C, Matos A.J F., Santos M., Gärtner F., Medeiros R., Lopes C.: **COX-2 Expression in Canine Normal and Neoplastic Mammary Gland**. J Comp Path 140. 247-253, 2009.

Dickinson P.J., Roberts B.N., Higgins, R.J., Leutenegger C.M., Bollen A.W., Kass P.H., LeCouteur R.A.: **Expression of receptor tyrosine kinases VEGFR-1 (FLT-1), VEGFR-2 (KDR), EGFR-1, PDGFRalpha and c-Met in canine primary brain tumours**. Vet Comp Oncol 4. 132-40, 2006.

Dolka I., Król M., Sapieryński R.: **Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study.** Res Vet Sci 105.124-133, 2016.

Doré M., Lanthier I., Sirois J.: **Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mammary Tumors.** Vet Pathol 40. 207–212, 2003.

Doré M.: **Cyclooxygenase-2 Expression in Animal Cancers.** Vet Pathol 48. 254-265, 2011.

Downing S., Chien M.B., Kass P.H., Moore P.E., London C.A.: **Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs.** Am J Vet Res 63. 1718-1723, 2002.

Drénou B., Amiot L., Lamy T., Le Prisé P.Y., Fauchet R.: **Multidrug resistance in aggressive lymphoproliferative disorders of T and natural-killer origin.** Leuk Lymphoma 30. 381-387, 1998.

Elledge R.M., Allred D.C.: **Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer.** Breast Cancer Res Treat 52. 79-98, 1998.

Etschmann B., Wilcken B., Stoevesand K., von der Schulenburg A., Sterner-Kock A.: **Selection of Reference Genes for Quantitative Real-time PCR Analysis in Canine Mammary Tumors Using the GeNorm Algorithm.** Vet Pathol 43. 934-942, 2006.

Fosmire S.P., Dickerson E.B., Scott A.M., Bianco S.R., Pettengill M.J., Meylemans H., Padilla M., Frazer-Abel A.A., Akhtar N., Getzy D.M., Wojcieszyn J., Breen M., Helfand S.C., Modiano J.F.: **Canine malignant hemangiosarcoma as a model of primitive angiogenic epithelium.** Lab Invest 84. 562-572, 2004.

Fosslien E.: **Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia.** Ann Clin Lab Sci 30. 3–21, 2000.

Frost D., Lasota J., Miettinen M.: **Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases.** Vet Pathol 40. 42-54, 2003.

Giles F.J., Kantarjian H.M., Bekele B.N., Cortes J.E., Faderl S., Thomas D.A., Manshour T., Rogers A., Keating M.J., Talpaz M., O'Brien S., Albitar M.: **Bone marrow cyclooxygenase-2 levels are elevated in chronic-phase chronic myeloid leukaemia and are associated with reduced survival.** Br J Haematol 119. 38–45, 2002.

Ginn, P. E.: **Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin embedded normal and neoplastic canine tissues.** Vet. Pathol 33. 533-541, 1996.

Goldman J.M., Melo J.V.: **Chronic myeloid leukemia — advances in biology and new approaches to treatment.** N Engl J Med 349. 1451–1464, 2003.

Goldschmidt M., Pena L., Rasotto R., Zapulli V.: **Classification and grading of canine mammary tumors.** Vet Pathol 48. 117-131, 2011.

Gramer I., Kessler M., Geyer J.: **Determination of MDR1 gene expression for prediction of chemotherapy tolerance and treatment outcome in dogs with lymphoma.** Vet Comp Oncol 13. 363-372, 2015.

Grandjean F., Brémaud L., Robert J., Ratinaud M.H.: **Alterations in the expression of cytochrome c oxidase subunits in doxorubicin-resistant leukemia K562 cells.** Biochem Pharmacol 63. 823-831, 2002.

Gundim L.F., de Araújo C.P., Blanca W.T., Guimarães E.C., Medeiros A.A.: **Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade.** Can J Vet Res 80. 318-322, 2016.

Haga S., Nakayama M., Tatsumi K., Maeda M., Imai S., Umesako S., Yamamoto H., Hilgers J., Sarkar N.H.: **Overexpression of the p53 gene product in canine mammary tumors.** Oncol Rep 8. 1215-1219, 2001.

Heller D.A., Clifford C.A., Goldschmidt M.H., Holt D.E., Shofer F.S., Smith A., Sorenmo K.U.: **Cyclooxygenase-2 Expression is Associated with Histologic Tumor Type in Canine Mammary Carcinoma.** Vet Pathol 42. 776-780, 2005.

Hellmén E., Bergstrom R., Holmberg L., Spangberg I.B., Hansson K., Lindren A.: **Prognostic factors in canine mammary tumours: a multivariate study of 202 consecutive cases.** Vet Pathol 30. 20-27, 1993.

Ho-Yen C.M., Jones J.L., Kermorgant S.: **The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: a review.** Breast Cancer Res 17:52. doi: 10.1186/s13058-015-0547-6, 2015.

Hsu W.L., Huang H.M., Liao J.W., Wong M.L., Chang SC.: **Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene.** The Veterinary Journal 180. 116-123, 2009.

Hurst E.A., Pang L.Y., Argyle D.J.: **The selective cyclooxygenase-2 inhibitor mavacoxil (Trocoxil) exerts anti-tumour effects in vitro independent of cyclooxygenase-2 expression levels.** Vet Comp Oncol 17. 194-207, 2019.

Kenessey I., Keszthelyi M., Krámer Z., Berta J., Adám A., Dobos J., Mildner M., Flachner B., Cseh S., Barna G., Szokol B., Orfi L., Kéri G., Döme B., Klepetko W., Tímár J., Tóvári J.. **Inhibition of c-Met with the specific small molecule tyrosine kinase inhibitor SU11274 decreases growth and metastasis formation of experimental human melanoma.** Curr Cancer Drug Targets 10. 332–342, 2010.

Khan K.N., Stanfield K.M., Trajkovic D., Knapp D.W.: **Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma.** Vet Pathol 38. 116–119, 2001.

Khuder S.A., Mutgi A.B.: **Breast cancer and NSAID use: a meta-analysis.** Br J Cancer 84. 1188–1192, 2001.

Kim J.H., Im K.S., Kim N.H., Yhee J.Y., Nho W.G., Sur J.H.: **Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: Histopathological and immunohistochemical study.** The Veterinary Journal 189. 318-322, 2010.

Kim Y.B., Kim G.E., Cho N.H., Pyo H.R., Shim S.J., Chang S.K., Park H.C., Suh C.O., Park T.K., Kim B.S.: **Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy.** Cancer 95. 531–539, 2002.

Kiupel M., Teske E., Bostock D.: **Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma.** Vet Pathol 36. 292-300, 1999.

Knapp D.W., Richardson R.C., Chan T.C., Bottoms G.D., Widmer W.R., DeNicola D.B., Teclaw R., Bonney P.L., Kuczek T.: **Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder.** J Vet Intern Med 8. 273–278, 1994.

Kristiansen V.M., Peña L., Díez Córdova L., Illera J.C., Skjerve E., Breen A.M., Cofone M.A., Langeland M., Teige J., Goldschmidt M., Sørenmo K.U.: **Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial.** J Vet Intern Med 30. 230-241, 2016.

Kubo K., Matsuyama S., Katayama K., Tsutsumi C., Yonezawa K., Shimada T., Kotani T., Sakuma S., Ohashi F., Takamori Y.: **Frequent expression of the c-kit proto-oncogene in canine malignant mammary tumor.** Journal of Veterinary Medicine and Science 60. 1335-1340, 1998.

Lavalle G.E., Bertagnolli A.C., Tavares W.L.F., Cassali G.D.: **COX-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas. Correlation with Angiogenesis and Overall Survival.** Vet Pathol 46. 1275–1280, 2009.

Lavalle G.E., De Campos C.B., Bertagnolli A.C., Cassali G.D.: **Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors.** In Vivo 26. 375-379, 2012.

Lee C. H., Kim W. H., Lim J. H., Kang M. S., Kim D. Y., Kweon O. K.: **Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors.** J Vet Sci 5. 63–69, 2004.

Lee J.J., Hughes C.S., Fine R.L., Page R.L.: **P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance.** Cancer 77. 1892-1898, 1996.

Lemmon M.A., Schlessinger J.: **Cell signaling by receptor tyrosine kinases.** Cell 141. 117-1134, 2010.

Levi M., Brunetti B., Sarli G., Benazzi C.: **Immunohistochemical Expression of P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein in Canine Mammary Hyperplasia, Neoplasia and Supporting Stroma.** J Comp Pathol 155. 277-285, 2016.

Levi M., Peña L., Alonso-Díez A., Brunetti B., Muscatello L.V., Benazzi C., Pérez-Alenza M.D., Sarli G.: **P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein in Canine Inflammatory and Noninflammatory Grade III Mammary Carcinomas.** *Vet Pathol* 56. 840-847, 2019.

Liou J.-Y., Aleksic N., Chen S.-F., Han T.-J., Shyue S.-K., Wu K.K.: **Mitochondrial localization of cyclooxygenase-2 and calcium-independent phospholipase A2 in human cancer cells: implication in apoptosis resistance.** *Exp Cell Res* 306. 75–84, 2005.

Levine A.J., Momand J., Finlay C.A.: **The p53 tumour suppressor gene.** *Nature* 351. 453-456, 1991.

Liu J., Liu X., Feng X., Liu J., Lv S., Zhang W., Niu, Y.: **C-kit overexpression correlates with KIT gene copy numbers increases in phyllodes tumors of the breast.** *Breast Cancer Res Treat* 149. 395-401, 2015.

London C., Mathie T., Stingle N., Clifford C., Haney S., Klein M.K., Beaver L., Vickery K., Vail D.M., Hershey B., Ettinger S., Vaughan A., Alvarez F., Hillman L., Kiselow M., Thamm D., Higginbotham M.L., Gauthier M., Krick E., Phillips B., Ladue T., Jones P., Bryan J., Gill V., Novasad A., Fulton L., Carreras J., McNeill C., Henry C., Gillings S.: **Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia) in solid tumours.** *Vet Comp Oncol* 10. 194-205, 2012.

London C.A., Malpas P.B., Wood-Follis S.L., Boucher J.F., Rusk A.W., Rosenberg M.P., Henry C.J., Mitchener K.L., Klein M.K., Hintermeister J.G., Bergman P.J., Couto G.C., Mauldin G.N., Michels G.M.: **Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision.** *Clin Cancer Res* 15. 3856-3865, 2009.

London C.A., Hannah A.L., Zadovoskaya R., Chien M.B., Kollias-Baker C., Rosenberg M., Downing S., Post G., Boucher J., Shenoy N., Mendel D.B., McMahon G., Cherrington J.M.: **Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies.** *Clin Cancer Res* 9. 2755-2768, 2003.

London C.A.: **Kinase dysfunction and kinase inhibitors.** *Vet Dermatol* 24. 181–187, 2013.

London C.A.: **Molecular/Targeted therapy of cancer.** In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 5th Ed. Withrow S.J., Vail D.M., Saunders Elsevier, 221-229, 2013.

Lopuszynski W., Szczubial M., Komsta R.: **Prognostic status of p53 protein accumulation in canine malignant mammary tumours.** Bull Vet Inst Pulawy 54. 105-111, 2010.

MacEwen E.G., Kutzke J., Carew J., Pastor J., Schmidt J.A., Tsan R., Thamm D.H., Radinsky R.: **c-Met tyrosine kinase receptor expression and function in human and canine osteosarcoma cells.** Clin Exp Metastasis 20. 421-430, 2003.

Madhusudan S., Harris A.L.: **Drug inhibition of angiogenesis.** Curr Opin Pharmacol 2. 403-414, 2002.

Masuda H., Zhang D., Bartholomeusz C., Doihara H., Hortobagyi G.N., Ueno, N.T.: **Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Cancer. Breast Cancer Research and Treatment.** Breast Cancer Res Treat 136. 336-345, 2012.

McEntee M.F., Cates J.M., Neilsen N.: **Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs.** Vet Pathol 39. 428–436, 2002.

Mealey K.L., Barhoumi R., Rogers K., Kochevar D.T.: **Doxorubicin induced expression of P-glycoprotein in a canine osteosarcoma cell line.** Cancer Lett 126. 187-192, 1998.

Mealy K.L., Bentjen S.A., Waiting D.K.: **Frequency of the mutant allele associated with ivermectin sensitivity in a sample of collies from the northwestern United States.** Am J Vet Res 63. 479-481, 2002.

Mechetner E., Kyshtoobayeva A., Zonis S., Kim H., Stroup R., Garcia R., Parker R.J., Fruehauf J.P.: **Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin.** Clin Cancer Res 4. 389-398, 1998.

Merlo D.F., Rossi L., Pellegrino C., Ceppi M., Cardellino U., Capurro C., Ratto A., Sambucco P.L., Sestito V., Tanara G., Bocchini V.: **Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy.** J Vet Intern Med 22. 976-984, 2008.

Millanta F., Silvestri G., Vaselli C., Citi S., Pisani G., Lorenzi D., Poli A.: **The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk- 1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops.** Research in Veterinary Science 81. 350-357, 2006.

Misdorp W., Hart A.A.M.: **Prognostic factors in canine mammary cancer.** Journal of the National Cancer Institute 56. 779–786, 1976.

Mohammed S.I., Knapp D.W., Bostwick D.G., Foster R.S., Khan K.N., Masferrer J.L., Woerner B.M., Snyder P.W., Koki A.T.: **Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder.** Cancer Res 59. 5647–5650, 1999.

Moore A.S., Leveille C.R., Reimann K.A., Shu H., Arias I.M.: **The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance.** Cancer Invest 13. 475-479, 1995.

Moore B.C., Simmons D.L.: **COX-2 inhibition, apoptosis, and chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** Curr Med Chem 11. 1131-1144, 2000.

Morita I., Schindler M., Regier M.K., Otto J.C., Hori T., DeWitt D.L., Smith W.L.: **Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2.** J Biol Chem 270. 10902–10908, 1995.

Munday J.S., Ariyaratna H., Aberdein D., Thomson N.A.: **Immunostaining for p53 and p16CDKN2A Protein Is Not Predictive of Prognosis for Dogs with Malignant Mammary Gland Neoplasms.** Vet Sci doi: 10.3390/vetsci6010034., 2019.

Nassar A., Radhakrishnan A., Cabrero I.A., Cotsonis G., Cohen C.: **COX-2 expression in invasive breast cancer: correlation with prognostic parameters and outcome.** Appl Immunohistochem Mol Morphol 15. 255-259, 2007.

Nasir L, Argyle D.: **Mutational analysis of the tumour suppressor gene p53 in lymphosarcoma in two bull mastiffs.** Vet Rec 145. 23-24, 1999.

Nguyen F., Peña L., Ibisch C., Loussouarn D., Gama A., Rieder N., Belousov A., Campone M., Abadie J.: **Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer.**

Part 1: natural history and prognostic factors. Breast Cancer Res Treat 167. 635-648, 2018.

Ochiai K., Azakami D., Morimatsu M., Hirama H., Kawakami S., Nakagawa T., Michishita M., Egusa A.S., Sasaki T., Watanabe M., Omi T.: **Endogenous Leu332Gln mutation in p53 disrupts the tetramerization ability in a canine mammary gland tumor cell line.** Oncol Rep 40. 488-494, 2018.

Otto J.C., Smith W.L.: **Prostaglandin endoperoxide synthases -1 and -2.** J Lipid Mediat Cell Signal 12. 139–156, 1995.

Pestili de Almeida E.M., Piche C., Sirois J., Dore M.: **Expression of cyclo-oxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs.** J Histochem Cytochem 49. 867–875, 2001.

Petterino C., Rosetti E., Bertoncetto D., Martini M., Zappulli V., Bargelloni L., Castagnaro M.: **Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (Clone C494) in canine mammary gland tumors.** J Vet Med 53. 174–178, 2006.

Queiroga F.L., Alves A., Pires I., Lopes C.: **Expression of Cox-1 and COX-2 in Canine Mammary Tumours.** Journal of Comparative Pathology 136. 177–185, 2007.

Queiroga F.L., Pires I., Parente M., Gregorio H., Lopes C.S.: **COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer.** The Veterinary Journal 88. 441–445, 2010.

Queiroga F.L., Perez-Alenza M.D., González-Gil A., Silván G., Peña L., Illera J.C.: **Quantification of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tumours by ELISA assay: clinical and prognostic implications.** Vet Comp Oncol 15. 383-390, 2017.

Queiroga F.L., Perez-Alenza M.D., Silvan G., Peña I., Lopes C., Illera J.C.: **COX-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance.** Anticancer research 25. 4269-4275, 2005.

Queiroga F.L., Pires I., Parente M., Gregório H., Lopes C.S.: **COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer.** *The Veterinary Journal* 189. 77-82, 2011.

Rakha E.A., Putti T.C., Abd El-Rehim D.M., Paish C., Green A.R., Powe D.G., Lee A.H., Robertson J.F., Ellis I.O.: **Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation.** *J Pathol* 208. 495-506, 2006.

Ramos-Vara J.A.: **Technical aspects of immunohistochemistry.** *Vet Pathol* 42. 405-426, 2005.

Ramos-Vara J.A., Miller M.A.: **Immunohistochemical detection of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) in canine epitheliotropic T-cell lymphoma (mycosis fungoides).** *Vet Pathol* 44. 74-79, 2007.

Rapisarda A., Melillo G.: **Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy.** *Adv Cancer Res* 114. 237-267, 2012.

Rasotto R., Berlato D., Goldschmidt M.H., Zappulli V.: **Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases.** *Vet Pathol* 54. 571-578, 2017.

Restucci B., Borzacchiello G., Maiolino P., Martano M., Paciello O., Papparella S.: **Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours.** *Journal of Comparative Pathology* 130. 99-104, 2004.

Rodo A., Malicka E.: **Immunohistochemical expression of protein p53 in neoplasms of the mammary gland in bitches.** *Pol J Vet Sci* 11. 89–95, 2008.

Salas-Araujo Y.J., Aburto E., Alonso R., Márquez-Alvarado A.A., Corona-Monjaras H., Romero-Romero L.: **Association of histological features with potential risk factors and survival in canine mammary tumors.** *Veterinaria México OA*. DOI: <http://dx.doi.org/10.21753/vmoa.3.1.359>, 2016.

Salinas C.A., Kwon E.M., Fitzgerald L.M., Feng Z., Nelson P.S., Ostrander E.A., Peters U., Stanford J. L.: **Use of aspirin and other nonsteroidal antiinflammatory medications in relation to prostate cancer risk.** *Am J Epidemiol* 172. 578–90. 2010.

Sanfilippo O., Ronchi E., De Marco C., Di Fronzi E., Silvestrini, E.: **Expression of P-glycoprotein in breast cancer tissue and in vitro resistance to doxorubicin and vincristin.** Eur J Cancer 27. 155–158, 1991.

Sawaki M., Ito Y., Akiyama F., Tokudome N., Horii R., Mizunuma N., Takahashi S., Horikoshi N., Imai T., Nakao A., Kasumi F., Sakamoto G., Hatake K.: **High prevalence of HER-2/neu and p53 overexpression in inflammatory breast cancer.** Breast Cancer 13. 172-178, 2006.

Schmidt B.R., Glickman N.W., DeNicola D.B., de Gortari A.E., Knapp D.W.: **Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs.** J Am Vet Med Assoc 218. 1783–1786, 2001.

Schneider R., Dorn C. R., Taylor, D. O. N.: **Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival.** J Natl Cancer Inst 43. 1249–1261, 1969.

Schneider B.P., Wang M., Radovich M., Sledge G.W., Badve S., Thor A., Flockhart D.A., Hancock B., Davidson N., Gralow J., Dickler M., Perez E.A., Cobleigh M., Shenkier T., Edgerton S., Miller K.D.: **Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100.** J Clin Oncol 26. 4672-4678, 2008.

Schreinemachers D.M., Everson R.B.: **Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study.** Epidemiology 5. 138–146, 1994.

Seibert K., Zhang Y, Leahy K., Hauser S., Masferrer J., Perkins W., Lee L., Isakson P.: **Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain.** Proc Natl Acad Sci USA 91. 12013–12017, 1994.

Sharma S., Zhu L., Yang S.C., Lin J., Hillinger S., Gardner B., Reckamp K., Strieter R.M., Huang M., Batra R.K., Dubinett S.M.: **Cyclooxygenase 2 inhibition promotes IFN γ dependent enhancement of antitumor responses.** J Immunol 175. 813–819, 2005.

Simonsson M., Björner S., Markkula A., Nodin B., Jirström K., Rose C., Borgquist S., Ingvar C., Jernström H.: **The prognostic impact of COX-2 expression in breast cancer depends**

on oral contraceptive history, preoperative NSAID use, and tumor size. Int J Cancer 140. 163-175, 2017.

Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A.: **Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.** Science 244. 707–712, 1989.

Sokołowska J., Urbańska K., Giziński S., Zabielska K., Lechowski R.: **Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in various subtypes of canine lymphomas.** Pol J Vet Sci 18. 123-130, 2015.

Sonneveld P.: **Multidrug resistance in haematological malignancies.** J Intern Med 247. 521-534, 2000.

Sorenmo K.: **Canine mammary gland tumors.** Vet Clin North Am Small Anim Pract. 33. 573-596, 2003.

Sorenmo K.U., Kristiansen V.M., Cofone M.A., Shofer F.S., Breen A.-M., Langeland M., Mongil C.M., Grondahl A.M., Teige J., Goldschmidt M.H.: **Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence.** Vet Comp Oncol 7. 162-172, 2009.

Sorenmo U.S., Worley D.R., Zappulli V.: **Tumor of the mammary gland.** In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 6th Ed. Vail D.M., Thamm D.H., Liptak J.M. Saunders Elsevier, 604-625, 2019.

Stack E., DuBois R.N.: **Role of cyclooxygenase inhibitors for the prevention of colorectal cancer.** Gastroenterol Clin North Am 30. 1001-1010, 2001.

Stack E., DuBois R.N.: **Regulation of cyclo-oxygenase-2.** Best Pract Res Clin Gastroenterol 5. 787-800, 2001.

Steingold S.F., Sharp N.J., McGahan M.C., Hughes C.S., Dunn S.E., Page R.L.: **Characterization of canine MDR1 mRNA: its abundance in drug resistant cell lines and in vivo.** Anticancer Res 18. 393-400, 1998.

Stellrecht C.M., Gandhi V.: **MET receptor tyrosine kinase as a therapeutic anticancer target.** Cancer Letters Volume 280. 1–14, 2009.

Szakács G., Váradi A., Özvegy-Laczka C., Sarkadi B.: **The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox).** Drug Discov Today 9-10. 379-393, 2008.

Tamura M., Sebastian S., Gurates B.: **Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells.** J Clin Endocrinol Metab 87. 3504–3507, 2001.

Tan M., Yu D.: **Molecular Mechanisms of ErbB2-Mediated Breast Cancer Chemoresistance.** In: Yu D., Hung MC. (eds) Breast Cancer Chemosensitivity. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 608. Springer, New York, NY, 2007.

Thun M.J., Henley S.J., Patrono C.: **Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic and clinical issues.** J Natl Cancer Inst 94. 252-266, 2002.

Tomiyasu H., Goto-Koshino Y., Takahashi M., Fujino Y., Ohno K., Tsujimoto H.: **Quantitative analysis of mRNA for 10 different drug resistance factors in dogs with lymphoma.** J Vet Med Sci 72. 1165-1172, 2010.

Tse E., Kwong Y.L.: **How I treat NK/T-cell lymphomas.** Blood 121. 4997-5005, 2013.

Tsujii M., Kawano S., DuBois R.N.: **Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential.** Proc Natl Acad Sci USA 94. 3336–3340, 1997.

Tsujimura S., Saito K., Nakayamada S., Nakano K., Tanaka Y.: **Clinical relevance of the expression of P-glycoprotein on peripheral blood lymphocytes to steroid resistance in patients with systemic lupus erythematosus.** Arthritis Rheum 52. 1676-1683, 2005.

Vail D.M., MacEwen E.G.: **Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer.** Cancer Invest 18. 781-792, 2000.

Vail M., Pinkerton M., Young K.M.: **Hematopoietic tumors**. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 6th Ed. Vail D.M., Thamm D.H., Liptak J.M. Saunders Elsevier, 668-772, 2019.

Valli V.E., Bienzle D., Meuten D.J.: **Tumors of the hemolymphatic system**. In: Tumors of domestic animals. 5th Ed. Meuten D.J. Wiley Blackwell, 203-288, 2017.

Valli V.E., San Myint M., Barthel A., Bienzle D., Caswell J., Colbatzky F., Durham A., Ehrhart E.J., Johnson Y., Jones C.: **Classification of canine malignant lymphomas according to the world health organization criteria**. Vet Pathol 48. 198-211, 2011.

Valli V.E., Kass P.H., Myint M.S., Scott F.: **Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival**. Vet Pathol 50. 738-748, 2013.

Vascellari M., Capello K., Carminato A., Zanardello C., Baioni E., Mutinelli F.: **Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer**. Prev Vet Med 126. 183-189, 2016.

Veldhoen N., Stewart J., Brown R., Milner J.: **Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog**. Oncogene 16. 249-255, 1998.

Veterinary cooperative oncology group - common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. Vet Comp Oncol 14. 417-446, 2016.

Wang S.L., Lee J.J., Liao AT.: **Chemotherapy-induced neutropenia is associated with prolonged remission duration and survival time in canine lymphoma**. Vet J 205. 69-73, 2015.

Williams C.S., Mann M., DuBois R.N.: **The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development**. Oncogene 18. 7908–7916, 1999.

Wolf J.C., Ginn P.E., Homer B., Fox L.E., Kurzman I.D.: **Immunohistochemical detection of p53 tumor suppressor gene protein in canine epithelial colorectal tumors.** Vet Pathol 34. 394–404, 1997.

Yamada O., Kobayashi M., Sugisaki O., Ishii N., Ito K., Kuroki S., Sasaki Y., Isotani M., Ono K., Washizu T., Bonkobara M.: **Imatinib elicited a favorable response in a dog with a mast cell tumor carrying a c-kit c.1523A>T mutation via suppression of constitutive KIT activation.** Vet Immunol Immunopathol 142. 101-106, 2011.

Yang P., Du C.W., Kwan M., Liang S.X., Zhang G.J.: **The impact of p53 in predicting clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis.** Sci Rep 3.2246. doi: 10.1038/srep02246. 2013.

Zandvliet M, Teske E.: **Mechanisms of Drug Resistance in Veterinary Oncology- A Review with an Emphasis on Canine Lymphoma.** Vet Sci 12. 150-184, 2015.

Zandvliet M., Teske E., Schrickx J.A., Mol J.A.: **A longitudinal study of ABC transporter expression in canine multicentric lymphoma.** Vet J 205. 263-271, 2015.

Zandvliet M., Teske E., Chapuis T., Fink-Gremmels J., Schrickx J.A.: **Masitinib Reverses Doxorubicin Resistance in Canine Lymphoid Cells by Inhibiting the Function of P-glycoprotein.** J Vet Pharmacol Ther 36. 583-587, 2013.

Zandvliet M., Teske E., Schrickx J.A.: **Multi-drug resistance in a canine lymphoid cell line due to increased P-glycoprotein expression, a potential model for drug-resistant canine lymphoma.** Toxicol In Vitro 28. 1498-506, 2014.

Zappulli V., Pena L., Rasotto R., Goldschmidt M.H., Gama A., Scruggs, J.L., Kiupel M.: **Surgical pathology of tumors of domestic animals.** Vol.: Mammary tumors. Davis-Thompson DVM Foundation. 1-197. 2019.

7. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

7.1. Lektorált, impakt faktoral rendelkező tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Koltai Zs., Vajdovich P.: **Expression of multidrug resistance membrane transporter (Pgp) and p53 protein in canine mammary tumours.** Acta Vet Hung 62(2). 194-204, 2014., IF (2014): 0.646

Koltai Zs., Szabó B., Jakus J., Vajdovich P.: **Tyrosine kinase expression analyses in canine mammary gland tumours - A pilot study.** Acta Vet Hung 66(2). 294-308, 2018., IF (2018): 1.059

Vajdovich P., Koltai Zs., Dékay V., Kungl K., Harnos A.: **Evaluation of Pgp (MDR1) immunohistochemistry in canine lymphoma - prognostic and clinical aspects.** Acta Vet Hung 66(2). 309-328, 2018., IF (2018): 1.059

Koltai Zs., Vajdovich P., Dékay V.: **A ciklooxigenáz-2 (COX-2) enzim expressziójának jelentősége a kisállatok daganatos kórképei esetén.** MÁL 136(10). 579-587, 2014., IF (2014): 0.185

Koltai Zs., Vajdovich P., Jakab Cs., Szabó B.: **A tirozinkináz-gátlás jelentősége a kisállatok daganatos kórképei esetén.** MÁL 139(8). 465-472, 2017., IF (2017): 0.196

7.2. Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Dékay V., Vajdovich P., Koltai Zs.: **A COX-2 enzim expressziójának immunohisztokémiai módszerrel történő vizsgálata kutyák emlődaganataiban.** Kisállatpraxis 13(5). 200-206, 2012.

7.3. Konferencia prezentációk

Koltai Zs., Dékay V., Vajdovich P.: **A COX-2-expressziójának vizsgálata kutyák emlődaganataiban.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2011.

Szabó B., Koltai Zs., Tóth B., Vajdovich P.: **Emlődaganatos és lymphomás kutyák betegségének lefolyását meghatározó fehérjék expressziójának vizsgálata.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2011.

Koltai Zs.: **A COX-2 és antagonistái szerepe az állatorvosi onkológiában.** Magyar Állatorvosi Onkológiai Társaság VII. konferenciája, 2012.

Szabó B., Machut J., Koltai Zs., Vajdovich P.: **Receptor tirozin-kinázok mRNS-expressziójának változása kutyák emlődaganataiban.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2012.

Szabó B., Koltai Zs., Vajdovich P.: **Expression of receptor tyrosine kinases in canine mammary gland tumours.** ESVONC Annual Congress 2013.

Dékay V., Karai E., Verebélyi T., Koltai Zs., Vajdovich P.: **A multidrogrezisztenciafehérje (MDR1) immunhisztokémiai és funkcionális vizsgálatának összehasonlítása lymphomás, emlődaganatos és mastocytomás kutyák vizsgálata során.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2015.

8. A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk

8.1. Lektorált, impakt faktoral rendelkező tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Lehner L., Czeibert K., Koltai Zs., Jakab Cs.: **Frontalis meningeoma eltávolítása bilaterális transzfrontalis feltárással kutyában.** MÁL 141(9). 533-545, 2019., IF (2018/2019): 0.143

8.2. Konferencia prezentációk

Szécsényi D., Vajdovich P., Koltai Zs.: **A terápia rezisztencia vizsgálata kutyák kemoterapiás kezelése során.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2006.

Vajdovich P., Besze A., Perge E., Koltai Zs.: **Lymphomás kutyák csontvelővizsgálati eredményeinek összefüggései a betegek klinikai és kórszövettani leleteivel.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2011.

Vajdovich P., Koltai Zs., Szendi E.: **A doxorubicin toxikus hatásának mérséklési lehetősége retrospektív vizsgálatok alapján. Dóziscsökkentés vagy előkezelés?** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2012.

Tóth B., Koltai Zs., Szendi E., Vajdovich P.: **Tapasztalatok a SYSMEX XT-2000 IV haematológiai automatával a klinikumban.** MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, 2015.

9. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Vajdovich Péternek a tíz éven át tartó támogatását és türelmét, valamint hogy a doktori munka során mindig számíthattam a segítségére. Sajnálom, hogy nem sikerült hamarabb befejeznem a dolgozatot. Szeretném megköszönni azt is, hogy általa megismerkedhettem a klinikai onkológiával és megtaláltam ezt az általam annyira szeretett szakterületet.

Köszönöm opponenseimnek, Benczik Juditnak és Balka Gyulának az értékes szakmai iránymutatást, gyorsaságukat, a rugalmasságukat, hogy rám szánták az idejüket és hogy segítettek jobbra tenni a dolgozatot.

Köszönöm Perge Edinának a szövettani és az immunhisztokémiai vizsgálatok során nyújtott segítségét, a folyamatos szakmai támogatását, barátságát és hogy bármikor felhívhatom.

Köszönöm az ÁHOK Kft., valamint a Kóréletani és Onkológiai Tanszék valamennyi volt és jelenlegi munkatársának a dolgozat elkészültében nyújtott segítségét. Külön köszönet illeti Szabó Bernadettet és Jakus Juditot a tirozin-kinázokkal kapcsolatos vizsgálatok során végzett munkájukért. Köszönöm TDK-s és szakdolgozatos hallgatóinknak (Eördögh Réka, Dékay Valéria, Ruhi Sood). Köszönöm Baricz Tamásnak, Bodzán Bálintnak, Csöndes Juditnak, Juhász Verának és Tóth Bálintnak a barátságukat és az együtt töltött sok vidám percet.

Köszönöm ÁOTE Doktori Iskola munkatársainak: Savanya Ágnesnek, aki ismeretlenül is mindig a segítségemre volt, valamint Vörös Károly volt és Bartha Tibor jelenlegi iskolavezetőnek az általuk tanúsított rugalmasságot.

Szeretném megköszönni Gáll Gergelynek az online műhelyvita lebonyolítása során nyújtott segítségét.

Köszönöm a DUO-VET Állatorvosi Rendelő valamennyi munkatársának, hogy tehermentesítettek, különösen Mahler Anikónak, aki a feladataim átvételével lehetővé tette, hogy az utolsó időben elég időt tudjak fordítani a disszertáció megírására, valamint Juhász Orsolyának a tézisfüzet elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönöm családomnak és barátaimnak a támogatásukat. Külön köszönöm férjemnek az általa biztosított családi háttérrel, hogy tehermentesített, átlendített a mélypontokon és addig nem hagyott békén, amíg be nem fejeztem a dolgozatot. Köszönöm kisfiamnak a disszertáció elkészítése során tanúsított türelmét, anyukámnak, hogy olyan sokszor vigyázott rá, amíg a dolgozatot írtam és húgomnak, hogy a távolból is támogatott.