

# **Działanie owocystatyny na przeszczepialne, mysie nowotwory gruczołu mlekowego**

## **STRESZCZENIE**

Rak gruczołu piersiowego jest najczęstszym nowotworem, a także pierwszą przyczyną zgonów spowodowanych nowotworami u kobiet na całym świecie. Opublikowane badania pokazały, że ważną rolę w rozwoju nowotworów odgrywają enzymy proteolityczne - proteinazy cysteinowe. Ich aktywność jest kontrolowana przez naturalnie występujące inhibitory – cystatyny. Doniesienia literaturowe wskazują, że zachowanie odpowiedniej równowagi między proteinazami oraz ich inhibitorami – cystatynami jest bardzo ważne we właściwym funkcjonowaniu organizmu. Z tego względu celem pracy było zbadanie działania monomeru cystatyny wyizolowanego z białka jaja kurzego (tzw. owocystatyna), mającego potencjalne działanie onkostatyczne.

Głównym celem realizowanych badań była ocena wpływu owocystatyny na stopień martwicy, apoptozę oraz nasilenie proliferacji komórek w mysich nowotworach gruczołu mlekowego. Ponadto przeprowadzono ocenę objętości oraz masy guzów nowotworowych po terapii owocystatyną, a także wykonano analizę zmiany masy ciała zwierząt podczas trwania eksperymentu.

W badaniach zastosowano zwierzęcy model doświadczalny – samice szczepu Balb/c. Zwierzętom podskórnice przeszczepiono komórki linii raka gruczołu mlekowego 4T1. W momencie osiągnięcia przez guzy średnicy ok. 1 cm rozpoczęto dootrzewnowe podawanie owocystatyny. Owocystatynę podawano w dwóch dawkach, 5 mg/kg m.c oraz 10 mg/kg m.c., wybranych na podstawie wcześniej przeprowadzonych testów toksykologicznych. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta z guzami nowotworowymi, lecz nieotrzymujące badanego związku. Dodatkowo badano grupy myszy zdrowych otrzymujące owocystatynę, a także sól fizjologiczną. Nieoczekiwanie, po piątym podaniu eksperyment został przerwany z powodu nagłej śmierci większości myszy otrzymujących owocystatynę. Po zakończeniu eksperymentu pobrano i zabezpieczono materiał do dalszych badań. Na uzyskanym materiale nowotworowym wykonano reakcje IHC celem określenia nasilenia ekspresji markera proliferacji Ki-67, oceniono nasilenie martwicy oraz apoptozy komórek nowotworowych. Ponadto, zbadano 84 geny związane z rakiem gruczołu piersiowego

z wykorzystaniem metody Real-time PCR. Wykonano także analizę zmiany masy ciała zwierząt uczestniczących w eksperymencie oraz porównano objętości i masy guzów nowotworowych po terapii owocystatyną w porównaniu do guzów kontrolnych. Podczas trwania eksperymentu najprawdopodobniej doszło do zespołu lizy guza nowotworowego (TLS), z tego powodu część myszy nie dotrwała do 6 podania owocystatyny.

Ponadto, analiza genów zaangażowanych w rozwój raka gruczołu piersiowego wykazała zwiększony poziom Interleukiny-6 (Il-6) w guzach myszy otrzymujących owocystatynę w porównaniu do guzów kontrolnych. Badania IHC wykazały obniżony poziom ekspresji markera proliferacji Ki-67 w guzach pobranych od myszy otrzymujących badany związek w porównaniu do myszy kontrolnych. Ocena histologiczna guzów H&E wykazała, że guzy myszy kontrolnych, nieotrzymujących owocystatynę, charakteryzowały się niższym stopniem martwicy w porównaniu do guzów myszy, które otrzymywały owocystatynę. Guzy nowotworowe zwierząt otrzymujące dawki 5 oraz 10 mg/kg m.c. charakteryzowały się martwicą odpowiednio na poziomie 52% oraz 56%, podczas gdy w guzach kontrolnych martwica utrzymywała się na poziomie 40%. Badanie apoptozy metodą TUNEL pokazało wyższy stopień apoptozy w guzach nowotworowych pobranych od zwierząt otrzymujących owocystatynę w obu dawkach (5 mg/ kg m.c. oraz 10 mg/kg m.c.) w odniesieniu do guzów kontrolnych, nieotrzymujących badanego związku. Analiza zmiany masy ciała zwierząt przeprowadzona w trakcie trwania eksperymentu nie wykazała istotnej różnicy w obrębie grup zwierząt zdrowych otrzymujących kontrolnie sól fizjologiczną lub badaną owocystatynę. Jakkolwiek zauważono różnicę w masie ciała zwierząt z guzami nowotworowymi. Myszy kontrolne obciążone nowotworem cechowały się niższą masą ciała w porównaniu do myszy z guzami otrzymującymi dawkę 5 mg/kg m.c. oraz 10 mg/kg/m.c..

Wyniki badań zaprezentowanych w niniejszej rozprawie wskazują na onkostatyczne działanie owocystatyny w mysim modelu raka gruczołu mlekowego. Świadczy o tym zarówno wzrost nekrozy, apoptozy, jak też obniżenie ekspresji antygenu proliferacyjnego Ki-67 oraz zmniejszenie objętości guzów nowotworowych po terapii owocystatyną. Co istotne, sama owocystatyna u zdrowych myszy nie powodowała toksyczności, gdyż nie zauważono utraty masy ciała oraz zmian w ocenie morfologii serca, płuc, nerek oraz wątroby. Wartości badanych enzymów wątrobowych również mieściły się w zakresie norm laboratoryjnych. Nieoczekiwane zakończenie eksperymentu sugeruje, że doszło do zespołu rozpadu nowotworu (TLS), co związane było z zastosowaniem terapii owocystatyną

u zwierząt z guzami nowotworowymi. Nagły rozpad komórek nowotworowych może być związany ze zwiększonym poziomem Il-6, badanej w trakcie eksperymentu.

Podsumowując, można stwierdzić, że owocystatyna potencjalnie może znaleźć zastosowanie w terapii wspomagającej leczenie raka gruczołu piersiowego, jednakże wymagane są dalsze badania, które poprzedzą badania kliniczne.

**Słowa kluczowe:** *owocystatyna, 4T1, rak gruczołu piersiowego, Ki-67, apoptoza, nekroza, Il-6, TLS*