

## STRESZCZENIE

Wzrost zachorowalności i śmiertelności powodowany chorobami nowotworowymi sprawia, że badania nad nimi zajmują jedno z pierwszoplanowych miejsc we współczesnej patologii ludzi i zwierząt. U psów i kotów blisko 20% zejść śmiertelnych i eutanazji wykonywanych ze względów lekarskich ma bezpośredni związek z chorobą nowotworową. Nowotwory gruczołu sutkowego u kotów, pod względem częstości występowania, zajmują trzecie miejsce po nowotworach skóry i nowotworach układu krwiotwórczego. Nowotwory złośliwe gruczołu sutkowego kotek cechuje podobna budowa mikroskopowa i zbliżony przebieg kliniczny do nowotworów piersi u ludzi, co w połączeniu z krótszym okresem życia zwierząt sprawia, że są one wykorzystywane w badaniach porównawczych jako naturalny modele doświadczalne. Uzyskane w tych badaniach wyniki mogą być wykorzystywane zarówno w medycynie jak i weterynarii. Wśród głównych czynników zwiększających ryzyko rozwoju nowotworu gruczołu sutkowego u kotek wymienia się brak sterylizacji wykonanej do pierwszego roku życia, długotrwałe stosowanie leków blokujących cykl rujowy, starszy wiek, otyłość oraz niebilansowaną, wysokokaloryczną dietę. Od 80% do 90% usuwanych chirurgicznie guzów ma charakter złośliwy skutkując wysokim odsetkiem przypadków wznowy i przerzutów. Implikuje to potrzebę stosowania chemioterapii pooperacyjnej. Wyniki przeprowadzonych badań klinicznych wskazują, że chemioterapia adjuwantowa, z zastosowaniem doksorubicyny i jej pochodnych, zaliczanych do grupy antracyklin, wspomagająca leczenie chirurgiczne może wpływać korzystnie zarówno na czas remisji choroby jak i czas całkowitego przeżycia zwierząt. Skłania to do poszukiwania wskaźników prognostycznych na podstawie, których możliwe byłoby określenie prawdopodobnego przebiegu choroby po zabiegu operacyjnym oraz wskaźników predykcyjnych umożliwiających określenie przewidywanej odpowiedzi na leczenie z zastosowaniem leków cytostatycznych. Mając na uwadze fakt, że większość leków cytostatycznych oddziałuje na komórki aktywnie dzielące się, podstawowym wskaźnikiem chemiowrażliwości nowotworu jest określenie frakcji komórek będących w aktywnym cyklu komórkowym. W badaniach histopatologicznych przy ocenie nasilenia proliferacji komórkowej w nowotworach obok tradycyjnej metody polegającej na liczeniu komórek wykazujących figury podziału mitotycznego wykorzystuje się ocenę immunoekspresji białek regulatorowych,

których poziom zmienia się w zależności od fazy cyklu komórkowego. Jednym z najczęściej oznaczanych jest antygen Ki-67. Innym i jak dotychczas sporadycznie ocenianym w patologii nowotworów u zwierząt markerem proliferacji jest topoizomeraza II $\alpha$  (Topo II $\alpha$ ) będąca jednocześnie celem molekularnym dla leków przeciwnowotworowych z grupy jej inhibitorów, do których należy doksorubicyna. Hamowanie funkcji Topo II $\alpha$  przez doksorubicynę prowadzi do powstania licznych wiązań wewnątrz nici DNA, które blokują podstawowe procesy życiowe – transkrypcję i replikację. Komórki z uszkodzonym DNA eliminowane są następnie na drodze apoptozy. Wyniki badań odnoszące się do nowotworów piersi u kobiet wskazują na związek pomiędzy nasileniem immunohistochemicznej ekspresji Topo II $\alpha$  w komórkach nowotworowych, a wrażliwością na leki z grupy jej inhibitorów. Badania własne przeprowadzono w grupie 70 złośliwych nabłonkowych nowotworów gruczołu sutkowego pochodzących od kotek poddanych zabiegowi mastektomii. Materiał tkankowy utrwalano w 10% formalinie, a następnie przeprowadzono przez wzrastające stężenia roztworów alkoholowych i ksylen do bloczków parafinowych. Wykonane na mikrotomie saneczkowym preparaty mikroskopowe zabarwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną, a w uzasadnionych przypadkach mucykarminem i metodą p.a.S., a następnie oceniono wg klasyfikacji nowotworów gruczołu sutkowego kotów z uwzględnieniem stopniowania złośliwości histologicznej. Do oznaczeń immunohistochemicznych wykorzystano system detekcji kompleksów antygen - przeciwciało oparty na drugorzędowych przeciwciałach połączonych z biotyną skierowanych przeciwko stosowanemu mysim pierwotnym przeciwciałom monoklonalnym. Enzymem znaczącym miejsce reakcji była peroksydaza chrzanowa skoniugowana ze streptawidyną, a chromogenem czterochlorowodorek-3,3'-dwuaminobenzydyny, utleniany przez peroksydazę w obecności wody utlenionej. W badaniach oznaczono, a następnie porównano immunohistochemiczną ekspresję Topo II $\alpha$  z ekspresją antygeny Ki-67 oraz liczbą komórek wykazujących figury podziału mitotycznego w różnych typach histologicznych zdiagnozowanych nowotworów. Doboru wskaźników proliferacji dokonano biorąc pod uwagę ich funkcje w cyklu komórkowym przy uwzględnieniu mechanizmów działania leków cytostatycznych i zasad chemioterapii nowotworów jak również wyniki przeprowadzonych dotychczas badań nad ich wartością prognostyczną. Dodatkowo poddano ocenie zależność badanych wskaźników proliferacji z ekspresją białka E-kadheryny odpowiedzialnej za adhezję komórkową oraz z innymi, uznanymi

patomorfologicznymi wskaźnikami prognostycznymi takimi jak wielkość guza pierwotnego (pT), obecność komórek nowotworowych w naczyniach i narządach limfatycznych, a także stopień złośliwości histologicznej. Uwzględniono przy tym możliwość wykorzystania objętych badaniami wskaźników proliferacji jako elementów prognozowania przebiegu choroby nowotworowej oraz kwalifikacji pacjentów do leczenia systemowego nowotworów gruczołu sutkowego u kotek z zastosowaniem antracyklin.

Uzyskane w przeprowadzonych badaniach, opracowane statystycznie wyniki po skonfrontowaniu z danymi literaturowymi potwierdzają zasadność, stosowania oceny nasilenia proliferacji komórkowej w przypadku złośliwych nowotworów gruczołu sutkowego kotek jako wskaźnika prognostycznego. Wskaźnikiem proliferacji o potencjalnie największej wartości prognostycznej w przeprowadzonych badaniach okazał się indeks antygenu Ki-67, którego wartości korelowały istotnie dodatnio z wartościami indeksu ekspresji Topo II $\alpha$  oraz liczbą komórek z figurami mitotycznymi, oraz istotnie ujemnie z ekspresją E-kadheryny. Ponadto wykazano istotną statystycznie zależność tego wskaźnika proliferacji z wielkością guza pT oraz inwazyjnością komórek nowotworu w stosunku do naczyń limfatycznych, a także stopniowaniem histologicznej złośliwości nowotworów. Uzyskane wyniki odnoszące się do ekspresji Topo II $\alpha$  nie pozwalają na uznanie tego oznaczenia za wskaźnik prognostyczny. Natomiast oznaczenie to może służyć jako marker aktywności proliferacyjnej w nowotworach gruczołu sutkowego kotek. Jednocześnie, przez analogię do wyników uzyskiwanych w nowotworach piersi u kobiet można przypuszczać, że nowotwory gruczołu sutkowego kotek wykazujące dużą ekspresję Topo II $\alpha$  powinny lepiej reagować na leczenie farmakologiczne z zastosowaniem leków z grupy antracyklin niż nowotwory o małej ekspresji tego enzymu. Można zatem postawić hipotezę, że immunohistochemiczne oznaczenie ekspresji Topo II $\alpha$  w przypadku nowotworów gruczołu sutkowego u kotek mogłoby stanowić wartościowy wskaźnik predykcyjny do leczenia adjuwantowego z zastosowaniem leków rozprzegających funkcję tego enzymu i być pomocne w doborze pacjentów do chemioterapii. Niemniej jednak istnieje potrzeba weryfikacji przedstawionej hipotezy w badaniach klinicznych oceniających zależność pomiędzy ekspresją Topo II $\alpha$ , a odpowiedzią na leczenie w korelacji z innymi wskaźnikami prognostycznymi i predykcyjnymi.