



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Sylwia Stanisława Wilk

**Ocena molekularnego mechanizmu
przerzutowania komórek kostniakomięsaka
psów - badania proteomiczne
z uwzględnieniem zastosowania
nanocząstek złota**

Analysis of the molecular mechanism of canine osteosarcoma
metastasis - proteomic analyses including the use of gold
nanoparticles

Rozprawa doktorska
Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
dr hab. Katarzyny Agnieszki Zabielskiej-Koczywąs prof. SGGW
Laboratorium Nanoonkologii Doświadczalnej i Klinicznej
Katedra Chorób Małych Zwierząt i Klinika, Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa rok 2025

**Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej
przygotowanej przez doktoranta Szkoły Doktorskiej SGGW**

Oświadczam, że **rozprawa doktorska autorstwa Sylwii Stanisławy Wilk została przygotowana pod moim kierunkiem na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW** i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 08.08.2025r. Czytelny podpis promotora Kataryna Zabielec
-Kocuga

**Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej
będącego doktorantem Szkoły Doktorskiej SGGW**

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że **niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW** i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 08.08.2025r. Czytelny podpis autora rozprawy Sylvia Wilk

Szczególne podziękowania składam

dr hab. Katarzynie Zabielskiej-Koczywąs

*Za nieocenioną pomoc, wsparcie oraz inspirującą opiekę naukową
na każdym etapie przygotowania rozprawy.*

Rodzicom

*Za Waszą miłość, cierpliwość i wiarę we mnie każdego dnia mojego życia.
Dziękuję Wam za wszystko, co pozwoliło mi dotrzeć aż tutaj.*

Maksimowi

*Za Twoją obecność, dojrzałość i cierpliwość.
Jesteś moim największym wsparciem.*

Dziękuję.

Spis treści

Streszczenie.....	9
Summary.....	11
Lista artykułów zamieszczonych w pracy doktorskiej wraz z danymi bibliograficznymi.....	13
Wykaz skrótów.....	14
1. Wstęp.....	17
2. Cele pracy.....	28
3. Materiały i metody.....	29
4. Wyniki.....	38
5. Dyskusja.....	43
6. Wnioski.....	47
7. Bibliografia.....	49
8. Artykuły stanowiące cykl publikacji oraz oświadczenia współautorów.....	60

Streszczenie

Kostniakomięsak (ang. *osteosarcoma*) jest najczęściej występującym pierwotnym nowotworem kości u psów, charakteryzującym się dużą agresywnością biologiczną i skłonnością do szybkiego dawania przerzutów. Szacuje się, że w momencie stawiania rozpoznania u około 90% pacjentów występują mikroprzerzuty - głównie do płuc. Pomimo dostępności terapii skojarzonych, obejmujących najczęściej postępowanie chirurgiczne oraz chemioterapię adiuwantową, rokowanie dla pacjentów pozostaje niekorzystne. Uzasadnia to potrzebę poszukiwania nowych strategii terapeutycznych i lepszego zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podstaw progresji tego nowotworu.

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z trzech powiązanych tematycznie artykułów naukowych: pracy przeglądowej opisującej dotychczas poznane czynniki biorące udział w procesie przerzutowania kostniakomięsaka, oryginalnej pracy badawczej obejmującej analizę proteomiczną psich komórek kostniakomięsaka oraz oryginalnej pracy badawczej oceniającej właściwości nanocząstek złota stabilizowanych glutationem (AuNPs-GSH) hamowania przerzutowania psich komórek kostniakomięsaka. Część pracy opisana w pierwszym artykule oryginalnym skupiała się na identyfikacji molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za migrację i inwazyjność komórek kostniakomięsaka, ze szczególnym uwzględnieniem roli alfa 2 makroglobuliny (A2M). Technika spektrometrii mas MALDI-TOF/TOF zastosowano do porównawczej analizy proteomu komórek psiego kostniakomięsaka i psich osteoblastów, identyfikując osiem białek o istotnie różnej ekspresji: A2M, białko związane z rękami i więzami 298 (CFAP298), ogólny czynnik transkrypcyjny II-I (GTF2I), białko lustrzanego obrazu polidaktylii 1 (MIPOL1), mutaza fosfoglicerynianowa 1 (PGAM1), enzym sprzęgający ubikwitynę/ ISG15 – E2 (UB2L6), białko adaptorowe receptora ektodysplazyny-A (EDARADD), białko zawierające powtórzenia bogate w leucynę 72 (LRRC72).

W badaniach proteomicznych, przeprowadzonych metodą spektrometrii mas MALDI TOF/TOF oraz Simple Western, wykazano obniżoną ekspresję A2M w psich komórkach kostniakomięsaka w porównaniu do psich osteoblastów. Metoda Simple Western, oparta na automatycznej elektroforezie kapilarnej i detekcji

chemiluminescencyjnej, pozwoliła na precyzyjną ocenę ekspresji A2M. Technika ta cechuje się wysoką czułością, powtarzalnością oraz znacznym skróceniem czasu analizy, stanowiąc nowoczesną alternatywę dla klasycznej metody Western blot. W dalszym etapie pracy, przy zastosowaniu testu gojenia rany wykazano hamujący wpływ A2M na migrację komórek kostniakomięsaka. Kolejna część badań, opisana w drugiej artykule oryginalnym koncentrowała się na ocenie aktywności biologicznej AuNPs-GSH pod kątem hamowania kluczowych etapów kaskady przerzutowania, takich jak migracja i angiogeneza, a także tworzenie kolonii komórek nowotworowych. W komórkach psiego kostniakomięsaka z linii OSCA-8, OSCA-32, D-17 wykazano, że AuNPs-GSH w stężeniach 200 $\mu\text{g/ml}$ i 500 $\mu\text{g/ml}$ istotnie ograniczają migrację komórek, natomiast stężenie 200 $\mu\text{g/ml}$ istotnie ogranicza ich klonogenność. AuNPs-GSH w stężeniu 500 $\mu\text{g/ml}$ wykazuje działanie antyangiogenne w badaniach przeprowadzonych na modelu błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kurzego. Ponadto, traktowanie komórek Au-GSH NPs w stężeniu 500 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny skutkowało istotnym wzrostem ekspresji A2M w komórkach psiego kostniakomięsaka z linii OSCA-8 i OSCA-32. Wzrost ekspresji A2M jako inhibitora proteaz może wskazywać na potencjalny mechanizm działania AuNPs-GSH poprzez hamowanie aktywności proteolitycznej w mikrośrodowisku guza.

W niniejszej rozprawie doktorskiej, po raz pierwszy wykazano zdolność A2M do hamowania migracji komórek kostniakomięsaka w warunkach *in vitro*, a także hamujący wpływ Au-GSH NPs na poszczególne etapy procesu przerzutowania komórek kostniakomięsaka psów: migrację, angiogenezę, a także klonogenność.

Praca stanowi istotny wkład w rozwój przedklinicznej onkologii weterynaryjnej i wskazuje na potencjalne właściwości przeciwnowotworowe A2M i AuNPs-GSH. Konieczne są jednak dalsze badania *in vitro* oraz *in vivo* w celu potwierdzenia możliwości wykorzystania badanych substancji w przyszłości w leczeniu kostniakomięsaka u psów.

Słowa kluczowe: alfa-2-makroglobulina, kostniakomięsak psów, nanocząstki złota, przerzutowanie

Summary

Osteosarcoma is the most common primary bone tumor in dogs, characterized by high biological aggressiveness and a tendency to rapidly metastasize. It is estimated that at the time of diagnosis, approximately 90% of patients already have micrometastases mainly to the lungs. Despite the availability of combined therapies, most commonly involving surgical intervention and adjuvant chemotherapy, the prognosis for patients remains poor. This justifies the need to search for new therapeutic strategies and to better understand the molecular mechanisms underlying the progression of this malignancy.

This doctoral dissertation integrates three thematically related scientific articles: a review article describing the currently known factors involved in the metastatic process of osteosarcoma, an original research article presenting a proteomic analysis of canine osteosarcoma cells, and a second original research article evaluating the anti-metastatic properties of glutathione-stabilized gold nanoparticles (AuNPs-GSH) in canine osteosarcoma cells. The first research article focused on identifying molecular mechanisms responsible for osteosarcoma cell migration and invasiveness, with particular emphasis on the role of alpha-2-macroglobulin (A2M). MALDI TOF/TOF mass spectrometry (MS) was used for comparative proteomic analysis of canine osteosarcoma cells and osteoblasts, identifying eight proteins with significantly different expression: A2M, cilia- and flagella-associated protein 298 (CFAP298), general transcription factor II-I (GTF2I), mirror-image polydactyly 1 protein (MIPOL1), phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1), ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2 (UB2L6), ectodysplasin-A receptor-associated adaptor protein (EDARADD), and leucine-rich repeat-containing protein 72 (LRRC72).

Proteomic studies using MALDI-TOF/TOF MS and Simple Western techniques showed reduced A2M expression in osteosarcoma cells compared to canine osteoblasts. The Simple Western method, based on automated capillary electrophoresis and chemiluminescent detection, enabled precise assessment of A2M expression. This technique is characterized by high sensitivity, reproducibility, and significant time efficiency, making it a modern alternative to the classical Western blot. In the next stage of the study, a wound healing assay demonstrated an inhibitory effect of A2M on osteosarcoma cell migration.

The second research article focused on evaluating the biological activity of AuNPs-GSH in terms of inhibiting key stages of the metastatic cascade, such as migration, angiogenesis, and tumor cell colony formation. In canine osteosarcoma cells (from OSCA-8, OSCA-32, D-17 cell lines), AuNPs-GSH at concentrations of 200 and 500 µg/ml significantly reduced cell migration, while the 200 µg/ml concentration significantly inhibited clonogenicity. AuNPs-GSH at 500 µg/ml exhibited antiangiogenic activity in studies conducted using the chick embryo chorioallantoic membrane model. Furthermore, treatment of osteosarcoma cells with 500 µg/ml of Au-GSH NPs for 24 hours resulted in a significant increase in A2M expression in OSCA-8 and OSCA-32 canine osteosarcoma cell lines. The increase in A2M expression, as a protease inhibitor, may indicate a potential mechanism of action of AuNPs-GSH through inhibition of proteolytic activity in the tumor microenvironment.

For the first time, the ability of A2M to significantly inhibit osteosarcoma cell migration *in vitro* was demonstrated. Likewise, the previously undescribed inhibitory effect of Au-GSH NPs on various stages of the metastatic process of canine osteosarcoma - migration, angiogenesis, and clonogenicity - was shown.

This work constitutes a significant contribution to the development of preclinical veterinary oncology and highlights the potential anti-cancer properties of A2M and AuNPs-GSH. However, further *in vitro* and *in vivo* studies are necessary to validate these findings.

Keywords: alpha-2-macroglobulin, canine osteosarcoma, gold nanoparticles, metastasis

Lista artykułów zamieszczonych w pracy doktorskiej wraz z danymi bibliograficznymi

Artykuł 1

Wilk, S. S., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2021). Molecular Mechanisms of Canine Osteosarcoma Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3639. <https://doi.org/10.3390/ijms22073639>

IF=6,2; 140 pkt. MNiSW

Artykuł 2

Wilk, S. S., Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2024). Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms25073989>

IF=4,9; 140 pkt. MNiSW

Artykuł 3

Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102>

IF=4,9; 140 pkt. MNiSW

Łączny współczynnik wpływu (ang. Impact Factor, IF) publikacji składających się na rozprawę doktorską wynosi **IF=16**, a ich łączna punktacja to **420 pkt.** według kryteriów Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Punktacja jest zgodna z aktualnym wykazem Journal Citation Reports oraz komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 05.01.2024 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych.

Wykaz skrótów

A2M - alfa 2 makroglobulina

AuNPs - nanocząstki złota

AuNPs-GSH - nanocząstki złota stabilizowane glutationem

BCA - test z kwasem bicynchoninowym

CAM - błona kosmówkowo-omoczeniowa zarodków kurzych

CC - rak szyjki macicy

CD147 - klaster różnicowania 147

CFAP298 - białko związane z rzęskami i wićmi 298

CnOb - psie osteoblasty

CT - tomografia komputerowa

CXCL12 - ligand 12 chemokiny zawierającej motyw C-X-C

CXCR - receptor chemokinowy typu C-X-C

DMEM - zmodyfikowana pożywka Eagle'a wg. Dulbecco

Dox - doksorubicyna

EDARADD - białko adaptorowe receptora ektodysplazyny-A

EGFR - receptor naskórkowego czynnika wzrostu

EMT - przejście nabłonkowo-mezenchymalne

FBS - płodowa surowica bydlęca

GTF2I - ogólny czynnik transkrypcyjny II-I

GSH - glutation

HAuCl₄ - chloroauran(III) wodoru

HGF-SF - czynnik wzrostu hepatocytów

ICC - wewnątrzwątrobowy rak dróg żółciowych

IDC -rak przewodowy piersi

IF - współczynnik wpływu

IGF-1 - insulinopodobny czynnik wzrostu 1

IGF1-R- receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1

IL-8 - interleukina 8

LRRC72 - białko zawierające powtórzenia bogate w leucynę 72

MALDI-TOF/TOF MS - spektrometria mas z laserową desorpcją wspomaganą matrycą i analizą czasu przelotu

MIPOL1 - białko lustrzanego obrazu polidaktylii 1

miR - mikroRNA

MMP-2 - metaloproteinaza 2

MMP-9 - metaloproteinaza 9

MP-AES - mikrofalowa spektrometria emisyjna z plazmą

MRI - rezonans magnetyczny

MS - spektrometria mas

NPs - nanocząstki

NPC - rak nosogardzieli

PBS - bufor fosforanowy

PGAM1- mutaza fosfoglicerynianowa 1

PI3K/AKT- szlak sygnałowy kinazy fosfatydyloinozytolo-3 oraz kinazy białkowej B

PTEN - fosfataza homologiczna do tensyny

Rt - stosunek intensywności

SCID - ciężki złożony niedobór odporności

SD - odchylenie standardowe

SMAD - białka pośredniczące w przekazywaniu sygnału TGF- β

STAT-3 - białka przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję 3

TAZ - koaktywator transkrypcyjny z motywem wiążącym PDZ

TEM - transmisyjna mikroskopia elektronowa

TF - czynnik transkrypcyjny

TGF- β - transformujący czynnik wzrostu beta

TNF - czynnik martwicy nowotworów

TrkA - Receptor tropomiozyny A

TSCC - rak płaskonabłonkowy języka

UB2L6 - enzym sprzęgający ubikwitynę

uPA - urokinazowy aktywator plazminogenu

VEGF-A - czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego A

YAP -białko związane z Yes

1. Wstęp

1.1. Kostniakomięsak psów

Kostniakomięsak (ang. *osteosarcoma*) jest najczęściej występującym nowotworem kości u psów, stanowiąc około 80-98% pierwotnych nowotworów kości u tego gatunku zwierząt i 5-6% wszystkich nowotworów u psów (Cavalcanti, Amstalden, Guerra, & Magna, 2004). Częstość występowania kostniakomięsaka u psów szacuje się na 0,037%, co odpowiada 3-4 przypadkom nowego zachorowania na 10000 psów rocznie (Neill et al., 2023).

Kostniakomięsaki to nowotwory pochodzenia mezenchymalnego rozwijające się z prekursorów osteoblastów. Istnieją różne podtypy histologiczne kostniakomięsaka psów: podtyp osteoblastyczny, fibroblastyczny, fenotypy chondroblastyczne i teleangiektaktyczne, klasyfikowane w oparciu o cechy morfologiczne i charakterystykę różnicowania komórek nowotworowych (Starkey, Scase, Mellersh, & Murphy, 2005). Nowotwór ten charakteryzuje się produkcją nieprawidłowej macierzy kostnej, agresywnym naciekiem na otaczające tkanki oraz skłonnością do przerzutów, głównie do płuc, a także innych kości (Cavalcanti et al., 2004; Ragland, Bell, Lopez, & Siegal, 2002). Inne lokalizacje przerzutów kostniakomięsaka obejmują m.in. wątrobę, śledzionę lub węzły chłonne (Dernell, Straw, & Withrow, 2001). Szacuje się, że w momencie stawiania rozpoznania u około 80-90% pacjentów występują mikroprzerzuty w płucach (Selvarajah & Kirpensteijn, 2010). Przypadki kostniakomięsaka najczęściej dotyczą dużych i olbrzymich ras psów, takich jak dogi niemieckie, rottweilery czy wilczarze irlandzkie (Selmic, Burton, Thamm, Withrow, & Lana, 2014). Kostniakomięsak najczęściej diagnozowany jest u psów w średnim wieku, ze szczytem zachorowalności w wieku od 7 do 9 lat (Dernell et al., 2001). Kostniakomięsak psów pozostaje wyzwaniem terapeutycznym, gdyż pomimo postępów w leczeniu, rokowanie dla większości psów jest nadal ostrożne do złego, co podkreśla potrzebę prowadzenia dalszych badań nad biologią tego nowotworu i nowymi metodami leczenia.

1.1.1 Objawy kliniczne, diagnostyka i leczenie

Objawy kliniczne kostniakomięsaka obejmują ból i kulawiznę, obrzęk w okolicy kości objętej procesem nowotworowym oraz występowanie patologicznych złamań

kości (Brekhus, Labus, Seguin, Puttlitz, & Gadomski, 2024; Nolan, Uzan, Green, Lana, & Lascelles, 2022). Diagnostyka choroby opiera się przede wszystkim na technikach obrazowych, takich jak: radiografia - uznawana za podstawową metodę diagnostyczną, pozwalającą na wykrycie charakterystycznych zmian w kości (osteoliza i nowotworowy rozrost tkanki kostnej), tomografia komputerowa (ang. *computed tomography*, CT) - stosowana do dokładniejszej oceny rozległości zmiany nowotworowej i planowania zabiegów chirurgicznych, rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance imaging*, MRI) - umożliwiający dokładną ocenę sąsiadujących tkanek miękkich (Besalti et al., 2016; Dernell et al., 2001; Selmic et al., 2014). Potwierdzenie postawienia rozpoznania kostniakomięsaka i jednocześnie wykluczenie innych nowotworów kości wymaga wykonania biopsji oraz badania histopatologicznego zmienionego fragmentu kości. Najczęściej materiał pobierany jest metodą biopsji gruboigłowej lub wycinkowej (Simpson, Rizvanov, Jeyapalan, de Brot, & Rutland, 2022). Ocena zaawansowania choroby (ang. *staging*) jest kluczowa dla prognozy i planowania leczenia. Obejmuje ona najczęściej scyntyografię kości, umożliwiającą wykrycie przerzutów do innych kości, oraz CT klatki piersiowej - niezbędną do wykrycia obecności przerzutów do płuc (Dernell et al., 2001; Selmic et al., 2014).

Podstawową metodą leczenia kostniakomięsaka u psów jest chirurgiczne usunięcie fragmentu kości objętej procesem nowotworowym, często zabieg ten polega na amputacji kończyny (Berg, 1996; Szewczyk, Lechowski, & Zabielska, 2015). Alternatywnie, w przypadkach gdy amputacja nie jest możliwa do wykonania, stosuje się techniki zachowawcze, takie jak endoprotezy lub allografy kostne (Morello et al., 2001). Radioterapia stosowana jest jako leczenie paliatywne w celu złagodzenia bólu oraz jako terapia adiuwantowa po zabiegu chirurgicznym. Wykazano, że radioterapia zmniejsza ból i poprawia jakość życia psów, choć jej skuteczność w wydłużeniu czasu przeżycia jest ograniczona (Coomer et al., 2009). Chemioterapia jest często stosowana jako leczenie uzupełniające po zabiegu chirurgicznym, w celu zahamowania rozwoju mikroprzerzutów (Dernell et al., 2001). Najczęściej stosowanymi lekami przeciwnowotworowymi są: doksorubicyna, karboplatyna i cisplatyna, które wykazują umiarkowaną skuteczność w wydłużaniu czasu przeżycia (Berg, 1996; Bergman et al., 1996). Nowe podejścia do leczenia kostniakomięsaka u psów obejmują: immunoterapię, terapię genową oraz terapie celowane (Kisseberth & Lee, 2021; Mason, 2020). Jednakże wiele opisywanych form immunoterapii wykazało jedynie ograniczoną zdolność do

istotnego wydłużenia czasu przeżycia psów lub krótszy czas przeżycia w porównaniu ze standardowo stosowanym leczeniem. Czas przeżycia psów z kostniakomięsakiem zależy od kilku czynników, takich jak lokalizacja guza, obecność przerzutów oraz zastosowane metody leczenia. Średni czas przeżycia po amputacji kończyny objętej procesem nowotworowym wynosi około 4-6 miesięcy, podczas gdy uzupełnienie leczenia chirurgicznego chemioterapią adiuwantową może wydłużyć ten okres do około 10-12 miesięcy (Mueller, Fuchs, & Kaser-Hotz, 2007). Od momentu postawienia rozpoznania choroby 2-letni czas przeżycia dotyczy mniej niż 20% psów (Selmic et al., 2014).

1.1.2 Patofizjologia kostniakomięsaka oraz rola wybranych białek i genów w procesie przerzutowania

Przerzutowanie (ang. *metastasis*) jest to proces rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych z miejsca powstania guza pierwotnego do odległych narządów i tkanek, gdzie tworzą one wtórne ogniska nowotworowe, określane jako przerzuty. Zjawisko to stanowi jeden z najistotniejszych czynników warunkujących złośliwość nowotworów i odpowiada za zdecydowaną większość zgonów pacjentów onkologicznych – zarówno w medycynie człowieka, jak i weterynaryjnej (Steeg, 2006). Zdolność do przerzutowania nie jest cechą wszystkich komórek nowotworowych, lecz jedynie subpopulacji posiadającej odpowiednie cechy fenotypowe i molekularne (Christine L. Chaffer, 2011). W przeciwieństwie do nowotworów ograniczonych do ogniska pierwotnego, które najczęściej można skutecznie leczyć chirurgicznie lub z zastosowaniem radioterapii, choroba uogólniona na skutek występowania przerzutów jest często nieuleczalna (Steeg, 2006).

Komórki nowotworowe przerzutują następującymi drogami: drogą hematogeną, limfatyczną, a także przez rozsiew do jam ciała, drogą wszczepienia (implantacyjną) i drogą ciągłości anatomicznej (Bayraktar, Chen, Corvigno, Liu, & Sood, 2024). Droga szerzenia się nowotworu zależy od typu histologicznego guza, jego lokalizacji anatomicznej oraz właściwości biologicznych komórek nowotworowych i ich interakcji z mikrośrodowiskiem (El-tanani et al., 2024; Zhou & Lei, 2021). Komórki kostniakomięsaka przerzutują drogą hematogeną, a proces przerzutowania obejmuje kilka głównych etapów: neowaskularyzację w obrębie guza pierwotnego, inwazję lokalną i intrawazację, transport i zatrzymanie w naczyniach krwionośnych,

ekstrawazację i migrację oraz rozwój w lokalizacji drugorzędowej (Hapach, Mosier, Wang, & Reinhart-King, 2019). Schemat przedstawiający poszczególne etapy kaskady przerzutowania znajduje się w publikacji przeglądowej będącej częścią rozprawy doktorskiej: **Wilk, S. S., & Zabielska-Koczywas, K. A. (2021).** Molecular Mechanisms of Canine Osteosarcoma Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3639. <https://doi.org/10.3390/ijms22073639> (str.3).

Zrozumienie mechanizmów molekularnych odpowiadających za przerzutowanie oraz rozpoznanie potencjalnych celów molekularnych jest kluczowe dla rozwoju nowych metod leczenia kostniakomięśaka. Obecnie jednak dostępnych jest niewiele wyników badań odnośnie genów i białek zaangażowanych w poszczególne etapy kaskady przerzutowania komórek psiego kostniakomięśaka. Proces przerzutowania kostniakomięśaka jest złożony i zależny od wielu czynników molekularnych, których rola została częściowo poznana dzięki badaniom przeprowadzonym metodami *in vitro* i *in vivo*. Poniżej, w formie tabeli, przedstawiono spis białek oraz genów potencjalnie zaangażowanych w mechanizmy przerzutowania psiego kostniakomięśaka wraz z krótką charakterystyką (tabela 1). Tabela oraz charakterystyka zostały opracowane na podstawie przeglądu aktualnej literatury naukowej i stanowią część autorskiej publikacji przeglądowej przygotowanej w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej. Jednocześnie stanowią wprowadzenie do tematu pracy i punkt wyjścia dla jej części eksperymentalnej, która skupia się na analizie proteomicznej komórek kostniakomięśaka o różnym fenotypie oraz możliwości zastosowania nanocząstek złota stabilizowanych glutationem (Au-GSH NPs) jako substancji hamujących przerzutowanie komórek kostniakomięśaka.

Białka/Geny	Etap(y) kaskady przerzutowania
p63	Inwazja; migracja
Aneksyny	Inwazja; migracja
CD-147	Inwazja
Kolagen	Migracja
CXCR-4	Migracja
EGFR	Migracja
Ezryna, p-ERM	Inwazja; migracja
HGF-SF, receptor Met	Inwazja
IGF-1, IGF-1R	Inwazja
Integryny	Inwazja; migracja
miR-9, miR-34a	Inwazja; migracja
Snail2	Migracja; inwazja; intrawazacja
STAT3	Inwazja
TF	Inwazja
TGFβ	Inwazja; migracja
TrkA	Przeżycie komórek nowotworowych w miejscach przerzutów
Wimentyna	Migracja
YAP i TAZ	Migracja; przeżycie komórek w krwioobiegu i w miejscach przerzutów

Tabela 1. Białka i geny potencjalnie zaangażowane w proces przerzutowania kostniakomięsaka u psów, wytypowane w badaniach *in vitro* i/lub *in vivo*. Tabela w języku polskim została przygotowana na podstawie tabeli 1 z publikacji przeglądowej: Wilk S.S., Zabielska-Koczywas K.A., *Molecular Mechanisms of Canine Osteosarcoma Metastasis*, *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22(7), 3639 (str.12-13) będącej częścią niniejszej rozprawy doktorskiej.

Jednym z kluczowych regulatorów procesu przerzutowania opisywanych w literaturze jest czynnik transkrypcyjny p63, należący do rodziny białek p53 (Candi et al., 2007). Szczególnie istotna wydaje się izoforma ΔNp63, której nadekspresja stwierdzana jest zarówno w liniach komórkowych, jak i w pierwotnych kostniakomięsakach u psów (Cam et al., 2016). Podwyższona ekspresja ΔNp63 pozytywnie koreluje z zwiększonym potencjałem do dawania przerzutów. Badania wykazały, że ΔNp63 indukuje aktywację białka przekazującego sygnał i aktywującego transkrypcję 3 (ang. *signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3), prowadząc do zwiększonej produkcji interleukiny 8 (*interleukin 8*, IL-8) oraz czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego A (ang. *vascular endothelial growth factor A*, VEGF-A), zwiększając zdolność do migracji i inwazji komórek nowotworowych (Cam et al., 2016). Badania *in vivo* z zastosowaniem modelu myszy z ciężkim złożonym niedoborem odporności (ang. *severe combined immunodeficiency*, SCID) potwierdzają związek między zwiększoną ekspresją ΔNp63 a obecnością przerzutów, co czyni go potencjalnym celem terapii molekularnej (Cam et al., 2016).

Czynnik transkrypcyjny STAT3 jest kolejnym istotnym regulatorem transkrypcyjnym, którego aktywacja odgrywa rolę w rozwoju i progresji nowotworów mezenchymalnych, w tym kostniakomięsaka (Aggarwal et al., 2006). W badaniach

Fossey i wsp. wykazano, że hamowanie STAT3 skutkuje spadkiem ekspresji metaloproteiny 2 (ang. *matrix metalloproteinase-2*, MMP-2) i VEGF w komórkach kostniakomięsaka (Fossey et al., 2009). Wyniki te sugerują udział STAT3 w remodelowaniu macierzy zewnątrzkomórkowej oraz angiogenezie. Dodatkowo, Gardner i wsp. wykazali, że usunięcie STAT3 z komórek ludzkiego i psiego kostniakomięsaka (linie komórkowe ABRAMS i OSCA-8) metodą CRISPR-Cas9 powoduje obniżenie podstawowej i kompensacyjnej glikolizy. Redukcja glikolizy bezpośrednio wpływa się na zmniejszenie inwazyjności komórek nowotworowych (Gardner, Fenger, Roberts, & London, 2022).

Kolejnym białkiem, które zostało wskazane jako istotne w procesie przerzutowania kostniakomięsaka jest Snail2. Snail2, będący czynnikiem transkrypcyjnym z rodziny Snail, uczestniczy w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w reorganizację cytoszkieletu (Nieto, 2002). Wykazano, że zmniejszenie ekspresji Snail2 prowadzi do obniżenia ruchliwości komórek psiego kostniakomięsaka z linii D17, przy jednoczesnym braku wpływu na adhezję komórek. Z kolei, nadekspresja Snail2 poprawia organizację cytoszkieletu i zwiększa liczbę połączeń adhezyjnych, co sprzyja migracji komórek (Sharili et al., 2011). W badaniach prowadzonych na modelu błony kosmówkowo-omoczniowej zarodków kurzych (ang. *chick embryo chorioallantoic membrane*, CAM) wykazano, że obniżenie poziomu Snail2 znacząco ogranicza inwazyjność komórek kostniakomięsaka i ich zdolność do tworzenia przerzutów (Sharili, Allen, Smith, Price, & McGonnell, 2013). Snail2 reguluje także ekspresję metaloproteinaz (ang. *metalloproteinases*, MMP), co wskazuje na jego rolę w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej i promowaniu migracji komórek nowotworowych (K. Zhang et al., 2011).

Wimentyna, jako białko pośrednie cytoszkieletu charakterystyczne dla komórek mezenchymalnych, odgrywa istotną rolę w utrzymaniu integralności strukturalnej komórek, ich elastyczności i zdolności migracyjnych (Fuchs, 1994; Roy, Wycisło, Pondenis, Fan, & Das, 2017). Choć kostniakomięsak wywodzi się z komórek mezenchymalnych, przejście epitelialno-mezenchymalne (ang. *epithelial–mesenchymal transition*, EMT) może również zachodzić w jego komórkach, co obserwowano w przypadku ludzkich komórek kostniakomięsaka (Habel et al., 2019). W psich liniach komórkowych kostniakomięsaka zaobserwowano istotnie podwyższoną ekspresję

wimentyny w komórkach o potencjale przerzutowym w porównaniu z komórkami nieprzerzutującymi (Roy et al., 2017).

Wśród czynników wzrostu szczególną uwagę zwrócono na VEGF, insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. *insulin-like growth factor 1*, IGF-1), transformujący czynnik wzrostu β (ang. *transforming growth factor beta*, TGF β), czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor / scatter factor*, HGF-SF) oraz receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR). VEGF, jako główny promotor angiogenezy, jest związany z gorszym rokowaniem i zwiększoną częstością występowania przerzutów zarówno w kostniakomięsaku u ludzi jak i u psów (Kaya et al., 2000). Obniżenie jego ekspresji w komórkach psiego kostniakomięsaka ograniczało tworzenie struktur naczyńopodobnych w badaniach *in vitro* (test tworzenia struktur naczyńowych komórek śródbłonna w układzie transwell, ang. *transwell endothelial tube formation assay*) (Cam et al., 2016). IGF-1 oraz jego receptor (ang. *insulin-like growth factor 1 receptor*, IGF1-R) indukują proliferację osteoblastów oraz komórek kostniakomięsaka. Wykazano, że wysoka ekspresja IGF1-R wiąże się ze skróconym czasem przeżycia psów z kostniakomięsakiem (MacEwen et al., 2004). TGF β działa zarówno poprzez kanoniczny szlak Smad, jak i szlaki niekanoniczne (Derynck, Akhurst, & Balmain, 2001). Blokowanie szlaku Smad skutkowało zmniejszeniem migracji komórek nowotworowych, choć efekt ten był zmienny w zależności od linii komórkowej (Portela et al., 2014). Receptor Met, aktywowany przez HGF-SF, oraz receptor EGFR również ulegają nadekspresji w komórkach psiego kostniakomięsaka i są powiązane z bardziej agresywnym fenotypem i procesem przerzutowania, poprzez promowanie proliferacji, migracji i inwazji komórek nowotworowych (De Maria et al., 2009; MacEwen et al., 2003, 2004).

Integryny $\beta 1$ i $\beta 4$ także zostały powiązane z inwazyjnością i zdolnością przerzutowania komórek kostniakomięsaka (Stefanidakis & Koivunen, 2006). Podobną funkcję pełni klasteryzacja 147 (ang. *cluster of differentiation 147*, CD147) – białko błonowe, które indukuje produkcję MMPs, wspierając inwazję komórek nowotworowych (Lu, Lv, Kim, Ha, & Kim, 2012). Także wysoka ekspresja kolagenu w komórkach przerzutowych wskazuje na jego rolę w reorganizacji mikrośrodowiska guza (Song et al., 2020).

Ezryna, jako białko łączące cytoszkielet z błoną komórkową, reguluje adhezję i ruchliwość komórek (Fehon, McClatchey, & Bretscher, 2010). Jej fosforylacja może być kluczowa w inicjacji procesu przerzutowania (Algrain, Turunen, Vaheri, Louvard, & Arpin, 1993). Koaktywatory transkrypcyjne: białko związane z Yes i koaktywator transkrypcyjny z motywem wiążącym PDZ (ang. *Yes-associated protein*, YAP, *transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*, TAZ), uczestniczące w kontroli proliferacji i migracji, również opisane zostały w agresywnym fenotypie OSA – szczególnie TAZ, którego obniżenie skutkuje ograniczeniem zdolności migracyjnych komórek nowotworowych (Hiemer, Szymaniak, & Varelas, 2014).

Receptor tropomiozyny A (ang. *tropomyosin receptor kinase A*, TrkA), reguluje proliferację i przeżycie komórek OSA (Fan, Barger, Sprandel, & Fredrickson, 2008). Receptor chemokinowy typu C-X-C 4 (ang. *C-X-C chemokine receptor*, CXCR-4), aktywowany przez ligand 12 chemokiny zawierającej motyw C-X-C (ang. *C-X-C motif chemokine ligand 12*, CXCL12), odpowiada za ukierunkowaną migrację komórek i może brać udział w przerzutowaniu kostniakomięsaka (Byrum, Pondenis, Fredrickson, Wycislo, & Fan, 2016; T.M. Fan, A.M. Barger, R.L. Fredrickson, D. Fitzsimmons, 2008).

W zakresie regulacji potranskrypcyjnej genów, istotną rolę odgrywają mikroRNA (ang. *microRNA*, miR) – miR-9 promuje inwazyjność i migrację komórek kostniakomięsaka, podczas gdy miR-34a działa antagonistycznie, ograniczając te właściwości (Fenger et al., 2016; Lopez et al., 2018).

Dodatkowo, ekspresja białek z rodziny aneksyn, takich jak aneksyna 1 (obniżona ekspresja) i aneksyna 2 (podwyższona ekspresja), różnicuje komórki o odmiennym potencjale przerzutowania (Roy et al., 2017).

Czynnik tkankowy (ang. *tissue factor*, TF), białko transbłonowe uczestniczące w kaskadzie krzepnięcia, poprzez funkcje prokoagulacyjne i sygnalizacyjne wspiera rozrost i przerzutowanie nowotworów (Rak, Milsom, & Yu, 2008). Jego ekspresja w kostniakomięsaku wykazuje zmienność zależną od linii komórkowej (Stokol, Daddona, Mubayed, Trimpert, & Kang, 2011).

Urokinazowy aktywator plazminogenu (ang. *urokinase-type plasminogen activator*, uPA), uczestniczący w aktywacji plazminogenu i degradacji macierzy

zewnątrzkomórkowej, wykazuje podwyższoną ekspresję w kostniakomięsaku u psów. Zwiększony poziom uPA koreluje z agresywnym przebiegiem choroby i niekorzystnym rokowaniem, co czyni go potencjalnym celem terapeutycznym (Matsuyama, Wood, Speare, Schott, & Mutsaers, 2022).

Szczegółowy opis wyżej scharakteryzowanych białek i genów w kontekście przerzutowania kostniakomięsaka psów znajduje się w publikacji przeglądowej stanowiącej artykuł nr 1 wchodzący w skład przedstawionej rozprawy doktorskiej: “Molecular Mechanisms of Canine Osteosarcoma Metastasis” Sylwia Stanisława Wilk, Katarzyna Zabielska-Koczywās. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 31;22(7):3639. doi: 10.3390/ijms22073639. PMID: 33807419; PMCID: PMC8036641. W wymienionej publikacji aktywator plazminogenu urokinazy i jego potencjalna rola w przerzutowaniu komórek kostniakomięsaka psów nie zostały wymienione, ponieważ dane literaturowe odnośnie ich roli w procesie przerzutowania pojawiły się po opublikowaniu powyższego artykułu (Matsuyama et al., 2022).

1.1.3 Znaczenie alfa-2-makroglobuliny w procesie przerzutowania

Alfa 2 makroglobulina (ang. *alpha-2-macroglobulin*, A2M) to duże białko osocza, które fizjologicznie pełni funkcję inhibitora proteaz. Odgrywa także istotną rolę w regulacji proliferacji komórkowej, działając jako hormon lub modulator odpowiedzi immunologicznej (G. Zhang et al., 2022). Swój potencjał przeciwnowotworowy wykazuje poprzez hamowanie szlaków: kinazy fosfatydyloinozytolo-3 oraz kinazy białkowej B (ang. *phosphoinositide 3-kinase / protein kinase B signaling pathway*, PI3K/AKT), SMAD i Wnt/ β -kateniny oraz aktywację fosfatazy homologicznej do tensyny (ang. *phosphatase and TENSin homolog*, PTEN (Kurz et al., 2017)). Jednym z kluczowych mechanizmów działania A2M w kontekście procesu przerzutowania komórek nowotworowych jest jej zdolność do wiązania i hamowania MMP. Nadekspresja MMP prowadzi do degradacji błony podstawnej, promując proces przerzutowania poprzez zwiększenie zdolności migracji i inwazji komórek nowotworowych (Cuéllar, Cuéllar, & Scuderi, 2016; Lindner et al., 2010).

Na podstawie przeglądu dostępnych doniesień literaturowych, oraz wyników uzyskanych podczas wykonywania badań w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej A2M zostało wybrane jako przedmiot szczegółowej analizy w niniejszej rozprawie doktorskiej.

1.2. Zastosowanie nanocząstek złota w onkologii

Nanocząstki złota (ang. gold nanoparticles, AuNPs) wykorzystywane są w badaniach nad nowymi metodami leczenia nowotworów ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne. AuNPs charakteryzują się stabilnością chemiczną, biokompatybilnością oraz możliwością łatwej modyfikacji funkcjonalności powierzchni (Yeh, Creran, & Rotello, 2012). Nanocząstki dzięki swoim rozmiarom (1-100 nm), mogą skutecznie wnikać do komórek nowotworowych, co stanowi jedną z kluczowych cech dla ich potencjalnego zastosowania w nowoczesnych strategiach leczenia przeciwnowotworowego (Yeh et al., 2012). Dodatkowo, dzięki swoistym właściwościom optycznym i fizycznym, AuNPs mogą być wykorzystywane w technikach obrazowania takich jak CT, MRI, mikroskopia elektronowa oraz obrazowanie fluorescencyjne (Jain, Hirst, & O'Sullivan, 2012; Jun, Lee, & Cheon, 2008; Kisseberth & Lee, 2021; Popovtzer et al., 2008). Ponadto, mogą być sprzężone z ligandami, które specyficznie wiążą się z markerami nowotworowymi, umożliwiając wczesne wykrywanie nowotworów u ludzi i zwierząt (Huang, Jain, El-Sayed, & El-Sayed, 2007), jak również pełnić rolę nośników leków przeciwnowotworowych, co pozwala na precyzyjne dostarczanie leków do komórek nowotworowych (Dykman & Khlebtsov, 2011; Małek et al., 2021). Dzięki możliwości modyfikacji powierzchni, AuNPs mogą być sprzężone z różnymi cząsteczkami terapeutycznymi, takimi jak leki, białka czy kwasy nukleinowe. Zastosowanie AuNPs jako nośników leków może zwiększyć skuteczność terapii, zmniejszając jednocześnie skutki uboczne stosowanych leków (Paciotti et al., 2004). Najnowsze badania przeprowadzone na modelach nowotworów człowieka wskazują na potencjalne zastosowanie AuNPs w hamowaniu przerzutowania komórek nowotworowych. Li i wsp. wykazali, że AuNPs poprawiały strukturę i funkcjonowanie naczyń krwionośnych czerniaka złośliwego, co prowadziło do zwiększenia przepływu krwi, zmniejszenia hipoksji oraz ograniczenia intrawazacji i rozwoju przerzutów (Li W, Li X, Liu S, Yang W, Pan F, Yang XY, Du B, Qin L, 2017). W badaniach przeprowadzonych przez Shi i wsp. zaobserwowano, że złote nanopręty (ang. *gold nanorods*, AuNRs) hamowały aktywność metaloproteinazy 9 (ang. *Matrix Metalloproteinase-9*, MMP-9) w komórkach raka piersi, co skutkowało ograniczeniem inwazji i zdolności przerzutowania komórek (Shi et al., 2023). Z kolei, pierwsze wyniki badań prowadzonych w medycynie weterynaryjnej przez Małek i współpracowników wykazały, iż AuNPs stabilizowane glutationem (AuNP-GSH) hamują ekstraswazację

komórek psiego kostniakomięsa jako jednego z kluczowych etapów kaskady przerzutowania (Małek et al., 2023).

2. Cele pracy

1. Zebranie informacji na temat molekularnych mechanizmów przerzutowania kostniakomięsa u psów na podstawie przeglądu dostępnej literatury naukowej.
2. Przeprowadzenie proteomicznej analizy porównawczej linii komórkowych kostniakomięsa psów o różnych fenotypach złośliwości (OSCA-8 i OSCA-32) z komórkami psich osteoblastów (CnOb)
3. Ocena ekspresji A2M w komórkach psiego kostniakomięsa metodą Simple Western
4. Ocena wpływu alfa 2 makroglobuliny (A2M) na migrację komórek kostniakomięsa psów z linii OSCA-8 i OSCA-32 w badaniach *in vitro*.
5. Ocena wpływu nanocząstek złota stabilizowanych glutationem (Au-GSH NPs) na wybrane etapy kaskady przerzutowania komórek psiego kostniakomięsa w badaniach *in vitro* oraz *in ovo*.
6. Ocena wpływu Au-GSH NPs na ekspresję A2M w komórkach psiego kostniakomięsa z linii OSCA-8 i OSCA-32 jako możliwego mechanizmu działania AuNPs.

Hipoteza badawcza:

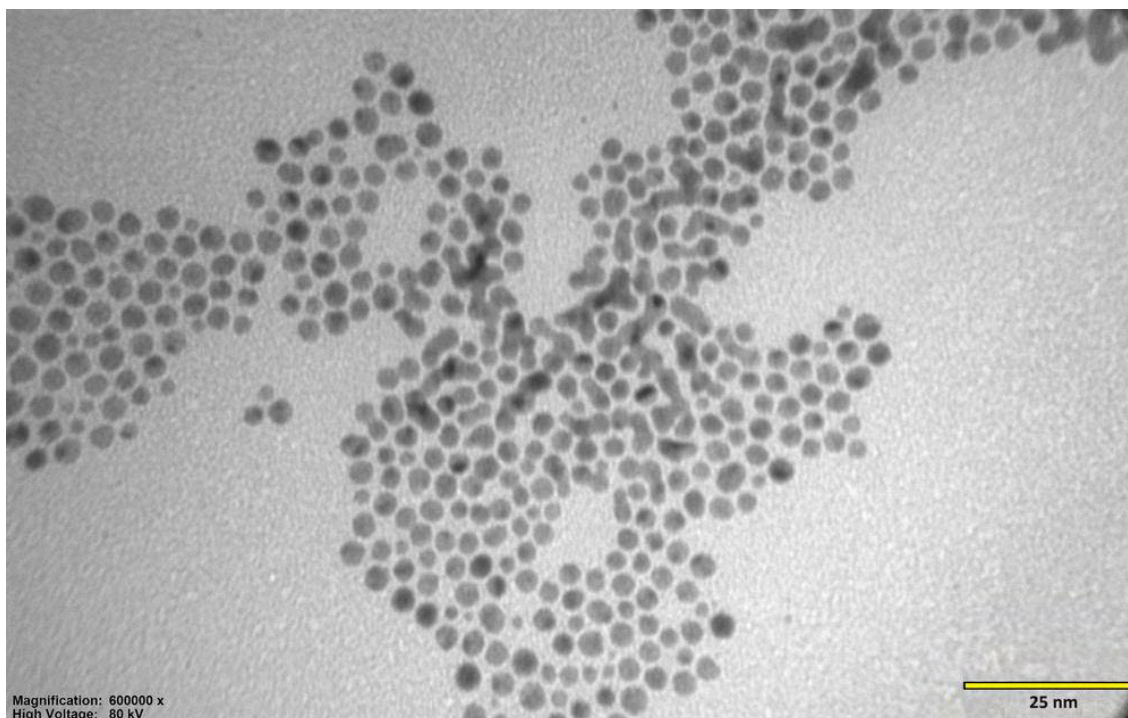
AuNPs-GSH hamują wybrane etapy kaskady przerzutowania (migracja, angiogeneza) komórek psiego kostniakomięsa w badaniach *in vitro* oraz *in ovo*.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

W badaniach wykorzystano trzy linie komórkowe psiego kostniakomięsaka: OSCA-8 i OSCA-32 (Kerafast, Boston, USA) oraz D17 (ATCC, Manassas, USA), różniące się fenotypem złośliwości. OSCA-8 i OSCA-32 to linie komórkowe wywodzące się z guzów pierwotnych, reprezentujące odpowiednio wysoce złośliwy i umiarkowanie złośliwy fenotyp, natomiast D17 to linia przerzutowa o złośliwym fenotypie (Modesto et al., 2020; Scott et al., 2011). Dodatkowo wykorzystano psie osteoblasty (CnOb; Cell Applications, San Diego, USA) jako kontrolę negatywną.

W celu oceny właściwości przeciwnowotworowych zastosowano Au-GSH NPs, które zostały zsyntetyzowane przez zespół dr hab. Michała Wójcika (Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski) metodą redukcji chemicznej z użyciem chloroauranu (III) wodoru (HAuCl_4) i glutationu jako liganda stabilizującego. Nanocząstki miały kulisty kształt i średnicę rdzenia $4,3 \pm 1,1$ nm. Potencjał zeta wynosił $-52,9 \pm 10,6$ mV, co wskazuje na wysoką stabilność koloidalną uzyskanej zawiesiny. Charakterystyka fizykochemiczna obejmowała transmisyjną mikroskopię elektronową (ang. *transmission electron microscopy*, TEM) z użyciem mikroskopu EM-1400Flash (JEOL Co., Tokio, Japonia) oraz pomiar potencjału zeta z wykorzystaniem analizatora Zetasizer Nano-ZS (Malvern Panalytical, Malvern, Worcestershire, UK).



Rycina 1. Obraz TEM zsyntetyzowanych Au-GSH NPs; widoczny kulisty kształt nanocząstek i jednorodność pod względem wielkości. Skala: 25 nm. Rycina oryginalnie pochodzi z publikacji: Wilk S.S. i wsp., *The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines*, *International Journal of Molecular Sciences* 2025, 26(13), 6102, będącej częścią niniejszej rozprawy doktorskiej.

Do badań odnośnie angiogenezy wykorzystano zarodki kurze rasy Ross 308 (n = 30; ZWD, Białobrzegi, Polska).

Szczegółowy opis materiałów zastosowanych w badaniach będących częścią rozprawy doktorskiej znajduje się w artykułach nr 2 i nr 3 w sekcjach Materiały i Metody: Wilk, S. S., Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2024). Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms25073989> (str.10-13) oraz Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102> (str.10-14)

3.2 Metody

3.2.1. Hodowla komórkowa

Komórki psiego kostniakomięsaka oraz psie osteoblasty (CnOb) hodowano w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂) w zmodyfikowanej pożywce Eagle'a wg Dulbecco (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (Fetal Bovine Serum, FBS) i antybiotyków: Primocin (InvivoGen, Waltham, MA, USA) oraz roztwór penicyliny–streptomycyny 100× (HyClone™, Marlborough, MA, USA), a eksperymenty prowadzono na komórkach w logarytmicznej fazie wzrostu. Do oceny żywotności komórek wykorzystano barwienie błękitem trypanu oraz automatyczny licznik komórek Countess II (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

Szczegółowy opis metodyki hodowli komórkowej znajduje się w artykule nr 2 i nr 3 wchodzących w skład rozprawy doktorskiej w sekcjach Materiały i metody: **Wilk, S. S., Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywās, K. A.** (2024). Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms25073989> (str.10) oraz **Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywās, K. A.** (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102> (str.10).

3.2.2. Analiza proteomiczna metodą dwukierunkowej elektroforezy białek (2DE) oraz spektrometrii mas z jonizacją laserową wspomaganą matrycą i pomiarem czasu przelotu

W celu przeprowadzenia analizy proteomicznej metodą dwuwymiarowej elektroforezy białek (2DE) oraz spektrometrii mas z jonizacją laserową wspomaganą matrycą i pomiarem czasu przelotu (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight/Time-of-Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF/TOF MS) przygotowano lizaty białkowe z komórek linii OSCA-8, OSCA-32 oraz CnOb poprzez ich zawieszenie w buforze RIPA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), z dodatkiem inhibitora proteaz (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), (1:100), a następnie

określono stężenie białka metodą spektrofotometryczną z użyciem aparatu MaestroNano (Maestrogen, Xinzhu, Tajwan). W celu identyfikacji różnic w ekspresji białek pomiędzy psimi osteoblastami a komórkami nowotworowymi z linii OSCA-8 i OSCA-32, zastosowano metodę 2DE, a następnie MALDI-TOF/TOF MS. Zastosowanie tych metod pozwoliło na wykrycie i identyfikację białek o istotnie zmienionej ekspresji w liniach nowotworowych w stosunku do psich osteoblastów. Do analizy spotów białkowych zastosowano kryteria obejmujące wartość $p \leq 0,05$, wartość Mascot Score (MS) > 61 oraz zmienność ekspresji białka wyrażoną jako stosunek intensywności (ang. *relative intensity ratio*, Rt) $< 0,67$ lub $> 1,5$ pomiędzy OSCA-8/ CnOb i OSCA-32/CnOb. Wartość MS odnosi się do sumarycznej wiarygodności dopasowania peptydów do konkretnego białka na podstawie danych zawartych w bazie programu Mascot, co pozwala na identyfikację analizowanego białka.

Szczegółowy opis metodyki analizy proteomicznej znajduje się w artykule nr 2 wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej: Wilk, S. S. et al. (2024), *Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration*, *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989, <https://doi.org/10.3390/ijms25073989> (str.10–12).

3.2.3. Izolacja i oznaczenie stężenia białka przy użyciu testu z kwasem bicynchoninowym (ang. *bicinchoninic acid assay*, BCA)

W celu przeprowadzenia analizy ekspresji białek metodą Simple Western, opisaną w dalszej części rozprawy, przygotowano lizaty białkowe z komórek linii OSCA-8, OSCA-32 oraz CnOb poprzez ich zawieszenie w buforze RIPA z dodatkiem inhibitora proteaz (1:100). Następnie oznaczono całkowite stężenie białka w próbkach metodą BCA z wykorzystaniem spektrofotometru Infinite 200 PRO MNano Plate Reader (Tecan, Zurych, Szwajcaria), przy długości fali 562 nm. Metoda BCA opiera się na tworzeniu barwnego kompleksu pomiędzy jonami miedzi (Cu^{2+}), białkiem i kwasem bicynchoninowym, którego intensywność jest proporcjonalna do zawartości białka i mierzona spektrofotometrycznie.

Szczegółowy opis metodyki izolacji i oznaczenia stężenia białka w badanych próbkach znajduje się w artykule nr 2 i nr 3 wchodzących w skład rozprawy doktorskiej w sekcjach Materiały i metody: Wilk, S. S., Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk,

S., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2024). Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms25073989> (str. 12) oraz Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102> (str. 11-12).

3.2.4. Analiza ekspresji białka A2M metodą Simple Western

W celu oceny ekspresji A2M w komórkach psiego kostniakomięsaka z linii OSCA-8 i OSCA-32 oraz CnOb, a następnie oceny wpływu Au-GSH NPs na ekspresję A2M przeprowadzono analizy metodą Simple Western z wykorzystaniem aparatu Jess (Protein Simple, Minneapolis, MN, USA). W pierwszym etapie badań nad ekspresją A2M oceniono saturację przeciwciała pierwszorzędowego oraz liniowości białka, co umożliwiło precyzyjne ustalenie optymalnych warunków detekcji. Do oznaczeń właściwych zastosowano przeciwciało pierwszorzędowe anty-A2M (MAB1938, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) w stężeniu 1:6,25 oraz przeciwciało drugorzędowe anty-mysie (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA). Komórki kostniakomięsaka psów (linie OSCA-8 i OSCA-32) traktowano przez 24 godziny AuNP-GSH w stężeniu 500 µg/ml (objętość 5 ml) przed wykonaniem lizatów białkowych. Analizy przeprowadzono przy użyciu systemu Jess (Protein Simple, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA), który umożliwia automatyczną elektroforezę w układzie mikrokapilar i detekcję sygnału chemiluminescencyjnego. Zastosowanie metody Simple Western pozwoliło na ilościową i jakościową ocenę poziomu A2M w próbkach o małej objętości, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej powtarzalności i czułości pomiarów. Normalizacja ekspresji oparta była na całkowitej zawartości białka w każdej próbce. Wyniki poddano analizie z wykorzystaniem oprogramowania Compass for Simple Western (wersja 7.0, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA). Do analizy statystycznej wyników wykorzystano próbki spełniające następujące kryteria: różnice w powierzchni pod krzywą (ang. *area under curve*, AUC) dla całkowitej ilości białka pomiędzy próbkami < 20%, stosunek sygnału do szumu (ang. *signal-to-noise ratio*, S/N) ≥ 10 , oraz stosunek sygnału do tła (ang. *signal-to-background ratio*) ≥ 3 .

Metoda Simple Western z normalizacją do całkowitej ilości białka w próbce umożliwia szybką i zautomatyzowaną ilościową analizę ekspresji białek, co stanowi istotną zaletę w porównaniu z konwencjonalną metodą Western blot, który jest metodą jakościową, a dodatkowo czasochłonną i pracochłonną. Dzięki wysokiej czułości, powtarzalności oraz ograniczeniu ryzyka błędów związanych z obsługą manualną, Simple Western stanowi alternatywę dla klasycznej metody Western blot. Czas jednego pełnego cyklu analizy przy użyciu metody Simple Western wynosi około 4–6 godzin, podczas gdy tradycyjny Western blot może trwać nawet 24-48 godzin. Ponadto, podczas jednego cyklu pracy urządzenia Jess możliwa jest jednoczesna analiza do 24 różnych próbek, przy minimalnym zużyciu odczynników oraz materiału biologicznego (Sormunen et al., 2023).

Szczegółowy opis metodyki Simple Western znajduje się w artykule nr 2 i nr 3 wchodzących w skład rozprawy doktorskiej w sekcjach Materiały i metody: **Wilk, S. S.,** Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2024). Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms25073989> (str. 12) oraz **Wilk, S. S.,** Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102> (str.12).

3.2.5 Ocena zdolności migracyjnych komórek nowotworowych - test gojenia rany (ang. *wound healing assay*)

Migracja komórek nowotworowych jest jednym z kluczowych etapów procesu przerzutowania, umożliwiającym komórkom opuszczenie guza pierwotnego i kolonizację odległych tkanek. W celu oceny wpływu A2M na zdolność migracji komórek przeprowadzono test gojenia rany na liniach komórkowych psiego kostniakomięsaka OSCA-8 i OSCA-32. Wpływ Au-GSH NPs na migrację oceniono na liniach: OSCA-8, OSCA-32 oraz D-17. Komórki wysiewano do plastikowych insertów dwukomorowych (ang. *2-well Ibidi culture inserts*, Ibidi GmbH, Niemcy) w ilości 3×10^4 i traktowano A2M (10 i 30 mM) lub Au-GSH NPs (200 i 500 $\mu\text{g/mL}$) przez 24 godziny. Obserwacje migracji komórek poprzez ranę powstałą po usunięciu insertów

prowadzono w 3 punktach czasowych (T=0, 12 i 24 godz.) przy użyciu mikroskopu odwróconego Zeiss Primovert (Niemcy), a ilościowe pomiary szerokości rany wykonano w programie Zen Pro.

Szczegółowy opis metodyki testu gojenia rany znajduje się w artykule nr 2 i nr 3 wchodzących w skład rozprawy doktorskiej w sekcjach Materiały i metody: **Wilk, S. S.**, Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2024). Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms25073989> (str. 13) oraz **Wilk, S. S.**, Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102> (str. 11).

3.2.6 Test klonogenności (ang. *clonogenic assay*)

Test klonogenności umożliwia ocenę zdolności pojedynczych komórek nowotworowych do przeżycia, długoterminowej proliferacji i tworzenia kolonii po ekspozycji na badany czynnik, co odzwierciedla ich potencjał proliferacyjny oraz skuteczność zastosowanej badanej substancji w hamowaniu tych procesów. W celu określenia wpływu Au-GSH NPs na klonogenność, komórki OSCA-8, OSCA-32 oraz D-17 wysiane uprzednio na płytce 6-dołkowe traktowano Au-GSH NPs w stężeniach 200 µg/ml oraz 500 µg/ml przez 24 godziny. Następnie hodowano w standardowych warunkach przez 7 dni, umożliwiając komórkom tworzenie kolonii. Powstałe kolonie utrwalano i barwiono 0,5% roztworem fioletu krystalicznego, a następnie obrazowano za pomocą aparatu Canon 100D, w celu przeprowadzenia jakościowej analizy.

Szczegółowy opis metodyki testu klonogenności znajduje się w artykule nr 3 wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej w sekcjach Materiały i metody: **Wilk, S. S.**, Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102> (str.13).

3.2.7 Akumulacja AuNPs-GSH w komórkach kostniakomięsaka metodą mikrofalowej spektrometrii emisyjnej z plazmą

Metoda mikrofalowej spektrometrii emisyjnej z plazmą (ang. *Microwave Plasma-Atomic Emission Spectroscopy*, MP-AES) to technika analityczna umożliwiająca precyzyjne oznaczenie stężenia metali na podstawie emisji światła przez wzbudzone atomy danego pierwiastka. W celu określenia wnikania Au-GSH NPs do komórek nowotworowych, komórki z linii OSCA-8, OSCA-32 oraz D-17 traktowano Au-GSH NPs w stężeniach 200 i 500 µg/ml przez 24 godziny. Następnie komórki zostały zmineralizowane, a zawartość złota w próbkach oznaczono przy użyciu spektrometru MP-AES Agilent 4200 (Agilent Technologies, Japonia). Uzyskane wyniki posłużyły do obliczenia liczby nanocząstek zaabsorbowanych przez jedną komórkę nowotworową oraz wydajności wnikania Au-GSH NPs do komórek nowotworowych. Wyliczenia opierały się na przeliczeniu ilości złota oznaczonego metodą MP-AES na liczbę atomów złota (z wykorzystaniem masy atomowej i liczby Avogadra), a następnie na liczbę nanocząstek przypadających na komórkę, uwzględniając średnicę cząstki i gęstość złota.

Szczegółowy opis metodyki MP-AES znajduje się w artykule nr 3 wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej w sekcjach Materiały i metody: **Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102> (str.13).**

3.2.8 Ocena właściwości antyangiogennych Au-GSH NPs na modelu CAM

Angiogeneza jest jednym z pierwszych etapów procesu przerzutowania, niezbędnym do rozwoju nowotworu. W celu oceny wpływu Au-GSH NPs na tworzenie nowych naczyń krwionośnych, wykonano badania na modelu *in ovo*. Model ten, znany od 1911 roku pozwala na szybką i wiarygodną ocenę właściwości pro- i antyangiogennych badanych substancji (Nowak-Sliwinska et al., 2014). Komórki OSCA-32 traktowano przez 24 godziny Au-GSH NPs (w stężeniu 500 µg/ml), a następnie naniesiono na błonę kosmówkowo-omoczniovą zarodków kurzych (CAM)

w ilości 5×10^6 za pomocą pipety w szóstym dniu inkubacji. Analizując strukturę sieci naczyniowej oceniano wpływ Au-GSH NPs na powstawanie nowych naczyń krwionośnych po 72 godzinach. Obrazowanie prowadzono mikroskopem cyfrowym VHX-900F (Keyence).

Szczegółowy opis metodyki testu angiogenezy znajduje się w artykule nr 3 wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej w sekcjach Materiały i metody: **Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywas, K. A. (2025).** The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102> (str.12).

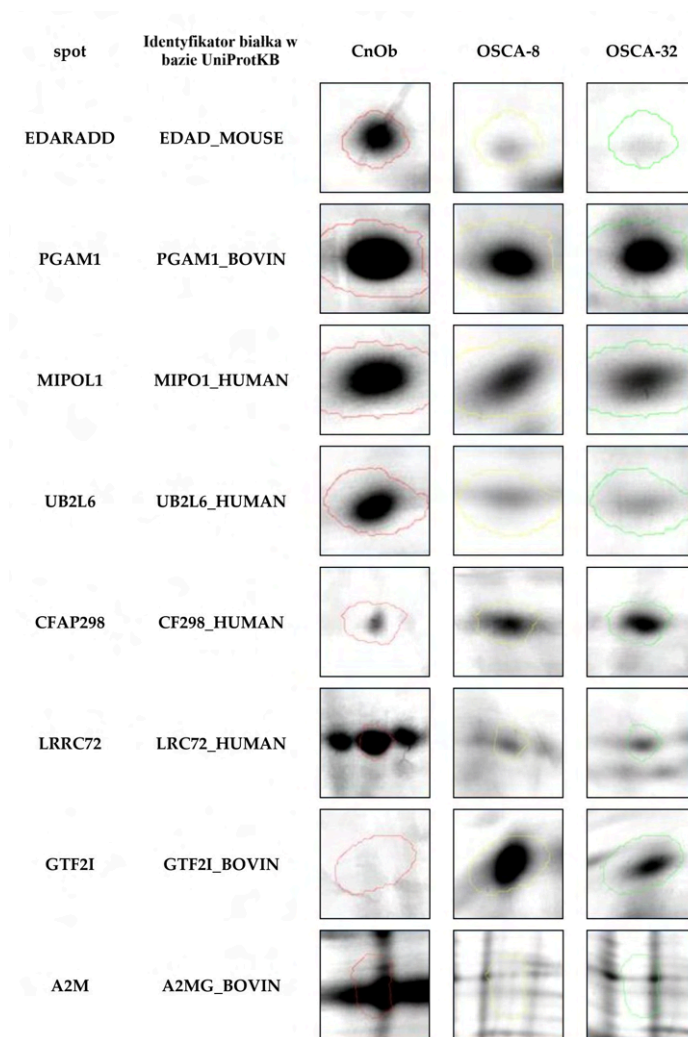
3.2.9 Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną wyników wykonano w programie GraphPad Prism 9.0. (USA). Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*, SD). Istotność oceniano przy $p \leq 0,05$, do analizy zastosowano test t-Studenta lub ANOVA z testem Tukey'a po fakcie (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

4. Wyniki

4.1. Profil proteomiczny komórek kostniakomięsaka psów

W przeprowadzonej analizie proteomicznej z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF/TOF MS, na podstawie ponad dwóch tysięcy punktów białkowych wykrytych metodą elektroforezy dwukierunkowej, po przeprowadzeniu analizy statystycznej z wykorzystaniem testu ANOVA oraz testu Tukey'a po fakcie, zidentyfikowano osiem białek o istotnie zmienionej ekspresji ($p \leq 0,05$) w komórkach kostniakomięsaka psów z linii OSCA-8 i/lub OSCA-32 w porównaniu do CnOb (Ryc. 2). Dwa spośród nich – białko związane z rzęskami i wićmi 298 (ang. cilia and flagella associated protein 298, CFAP298) oraz ogólny czynnik transkrypcyjny II-I (ang. *general transcription factor II-I*, GTF2I) – wykazywały zwiększoną ekspresję w komórkach nowotworowych w porównaniu do CnOb. Pozostałe sześć białek charakteryzowało się obniżonym poziomem ekspresji w komórkach kostniakomięsaka niż w CnOb: białko lustrzanego obrazu polidaktylii 1 (ang. *mirror image polydactyly 1*, MIPOL1), alfa-2-makroglobulina (ang. *alpha-2-macroglobulin*, A2M), mutaza fosfoglicerynianowa 1 (ang. *phosphoglycerate mutase 1*, PGAM1), enzym sprzęgający ubikwitynę/ISG15 – E2 (ang. *ubiquitin/ ISG15-conjugating enzyme E2 L6*, UB2L6), białko adaptorowe receptora ektodysplazyny-A (ang. *adaptor protein of the ectodysplasin-A receptor*, EDARADD) oraz białko zawierające powtórzenia bogate w leucynę 72 (ang. *Leucine-Rich Repeat-Containing protein 72*, LRRC72). Do dalszych analiz wytypowano białko A2M ze względu na doniesienia naukowe odnośnie roli tego białka w procesie przerzutowania komórek nowotworowych (Kurz et al., 2017; Lindner et al., 2010)



Rycina 2. Przykładowe żele elektroforezy dwukierunkowej przedstawiające białka o istotnie zmienionej ekspresji ($p \leq 0,05$) w komórkach kostniakomięsaka psów (linie OSCA-8 i OSCA-32) w porównaniu z CnOb, zidentyfikowane za pomocą techniki MALDI-TOF/TOF MS. Rycina w języku polskim została przygotowana na podstawie ryciny 2 z publikacji oryginalnej: Wilk S.S., Michalak K., Owczarek E.P., Winiarczyk S., Zabielska-Koczywās K.A., *Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration*, International Journal of Molecular Sciences 2024, 25(7), 3989 (str.4) będącej częścią niniejszej rozprawy doktorskiej.

4.2. Niższa ekspresja A2M w komórkach psiego kostniakomięsaka względem CnOb

W kolejnym etapie pracy potwierdzono ekspresję białka A2M za pomocą metody Simple Western. Walidacja przeciwciała pierwszorzędowego anti-A2M (MAB1938, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA), obejmowała ocenę stopnia jego saturacji oraz wyznaczenie liniowego zakresu detekcji białka. Minimum 90% saturację przeciwciała anti-A2M uzyskano przy stężeniu przeciwciała 1:6.25. Zakres liniowości detekcji białka w homogenatach komórkowych (CnOb, OSCA-8, OSCA-32) przy

stężeniu przeciwciała 1:6,25 mieścił się w przedziale 0,2–0,5 mg/ml białka całkowitego, do analiz właściwych zastosowano 0,2mg/ml .

W analizie Simple Western wykazano wysoką ekspresję A2M w komórkach CnOb, natomiast w liniach kostniakomięsaka OSCA-8 i OSCA-32 wykazano bardzo niską ekspresję badanego białka , przy czym najniższą ekspresję odnotowano w komórkach z linii OSCA-32. Zaobserwowana różnica pomiędzy komórkami nowotworowymi a zdrowymi może wskazywać na potencjalny związek A2M z fenotypem złośliwości i zdolnością komórek nowotworowych do przerzutowania, co stanowiło punkt wyjścia do dalszych badań z wykorzystaniem tego białka w niniejszej pracy. W związku z powyższym, w kolejnych etapach pracy oceniono wpływ A2M na migrację komórek kostniakomięsaka jako jednego z kluczowych etapów procesu przerzutowania. Wybór tego etapu kaskady przerzutowania oparto na wcześniejszych obserwacjach Lindnera i wsp., którzy wykazali, że wzrost stężenia A2M prowadzi do istotnego zahamowania migracji komórek ludzkiego glejaka (Lindner et al., 2010).

Szczegółowy opis wyników analizy Simple Western został zaprezentowany w artykule nr 2 wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej w sekcji Wyniki: **Wilk, S. S., Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2024). Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms25073989> (str.5, ryc.3)**

4.3 .Wpływ A2M na migrację komórek nowotworowych

W teście gojenia rany w komórkach z obydwu badanych linii nowotworowych: OSCA-8 oraz OSCA-32 zaobserwowano istotne ($p \leq 0,001$) zahamowanie migracji po inkubacji komórek kostniakomięsaka z linii OSCA-8 i OSCA 32 z A2M w stężeniach 10 mM i 30 mM, zarówno po 12, jak i 24 godzinach, co wskazuje na potencjalną zdolność A2M do ograniczania migracji komórek nowotworowych i jego możliwą rolę jako czynnika hamującego proces przerzutowania komórek kostniakomięsaka u psów.

Szczegółowy opis wyników testu gojenia rany został zaprezentowany w artykule nr 2 wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej w sekcji Wyniki: **Wilk, S. S., Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2024). Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine**

Osteosarcoma Cell Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms25073989> (str.5-8, ryc.4-7)

4.4. Wpływ AuNPs-GSH na komórki kostniakomięsaka psów

AuNPs-GSH w stężeniach 200 µg/ml oraz 500 µg/ml istotnie ($p \leq 0,001$) ograniczały zdolność komórek z linii OSCA-8, OSCA-32 oraz D17 do migracji, zarówno po 12, jak i 24 godzinach inkubacji. Analiza przeprowadzona na modelu CAM wykazała, że AuNPs-GSH w stężeniu 500 µg/ml hamujepowstawania nowych naczyń krwionośnych, co wskazuje na ich potencjalne działanie antyangiogenne. Dodatkowo, zastosowanie AuNPs-GSH w stężeniu 200 µg/ml prowadziło do wyraźnego zahamowania zdolności tworzenia kolonii przez komórki nowotworowe. Co ciekawe, efekt ten był mniej nasilony w przypadku wyższego stężenia AuNPs-GSH (500 µg/ml). W celu oceny, czy wyniki uzyskane w teście klonogenności są powiązane z wchłanianiem AuNPs-GSH do komórek nowotworowych, wykonano analizę wnikania AuNPs-GSH do komórek nowotworowych metodą MP-AES. Największy stopień wnikania Au-NPs -GSH ($11,79 \pm 2,54\%$) odnotowano w komórkach OSCA-32 traktowanych przez 24h AuNPs-GSH w stężeniu 200 µg/ml. Z kolei najniższy poziom absorpcji zaobserwowano w komórkach D-17 traktowanych AuNPs-GSH w stężeniu 500 µg/ml ($0,47 \pm 0,06\%$). W badanych liniach komórkowych poziom absorpcji AuNPs-GSH był wyższy dla każdej z linii komórkowych w stężeniu 200 µg/ml niż w stężeniu 500 µg/ml. Mechanizm odpowiedzialny za bardziej efektywne wnikanie AuNPs-GSH przy niższym stężeniu może wynikać z faktu, że na powierzchni nanocząstek tworzy się tak zwana korona białkowa – dynamiczna warstwa białek wiążących się z nimi po kontakcie z płynami biologicznymi. Jej skład i struktura mogą wpływać na właściwości biologiczne nanocząstek, mechanizmy internalizacji, rozmieszczenie w organizmie oraz skuteczność działania (Fangquin, Landfester, & Jiang, 2024). Rola tej otoczki w interakcjach AuNPs-GSH z komórkami kostniakomięsaka pozostaje nieznana, mechanizm wnikania AuNPs do komórek psiego kostniakomięsaka nie jest w pełni poznany, co uzasadnia potrzebę prowadzenia dalszych badań.

Uzyskane wyniki wskazują na przeciwnowotworowe właściwości AuNPs-GSH, obejmujące ich potencjalną zdolność do hamowania wybranych etapów kaskady

przerzutowania, takich jak migracja i angiogeneza, a także ograniczania klonogenności komórek nowotworowych.

Szczegółowy opis wyników testu gojenia rany, testu klonogenności, badań *in ovo* oraz analizy MP-AES został zaprezentowany w artykule nr 3 wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej w sekcji Wyniki: **Wilk, S. S.,** Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102> (str.3-8, ryc.1-9, tab.1).

4.5. Wpływ AuNPs-GSH na ekspresję A2M

Po 24-godzinnym traktowaniu komórek z linii OSCA-8 oraz OSCA-32 500 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs-GSH stwierdzono wysoce istotny ($p \leq 0,001$) wzrost ekspresji A2M w komórkach linii OSCA-8 oraz istotny ($p \leq 0,05$) wzrost ekspresji tego białka w przypadku komórek z linii OSCA-32 w porównaniu do komórek tych linii nie traktowanych AuNPs-GSH. Uzyskane wyniki wskazują, że Au-GSH NPs mogą wpływać na ekspresję A2M w komórkach kostniakomięsaka, a regulacja tego białka może być jednym z mechanizmów ograniczających zdolność nowotworu do tworzenia przerzutów. Szczegółowa rola A2M w procesie przerzutowania komórek nowotworowych psiego kostniakomięsaka wskazuje na potrzebę prowadzenia dalszych badań.

5. Dyskusja

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej ukazują nowe dane dotyczące profilu proteomicznego komórek kostniakomięsa psów, a także wskazują potencjalną rolę A2M i AuNPs-GSH w hamowaniu przerzutowania. W analizie proteomicznej stanowiącej pierwszy etap pracy, wytypowano osiem białek o istotnie ($p \leq 0,05$) różnej ekspresji pomiędzy komórkami psiego kostniakomięsa a CnOb. Część z nich była wcześniej opisywana w literaturze w kontekście chorób nowotworowych człowieka. Wykazano, że EDARADD, związany z sygnalizacją receptora czynnika martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor*, TNF) hamuje apoptozę komórek w raku płaskonabłonkowym języka (ang. *tongue squamous cell carcinoma*, TSCC) (Li, Bai, Han, Li, & Meng, 2020). Białko MIPOL1, związane z występowaniem wad rozwojowych u ludzi, może pełnić funkcję supresora nowotworzenia, między innymi poprzez regulację szlaku AKT. Obniżoną ekspresję MIPOL1 wykazano w raku nosogardzieli (ang. *nasopharyngeal carcinoma*, NPC) (Leong, Cheung, Kwok, & Lung, 2020). UBE2L6 bierze udział w degradacji białek i regulacji apoptozy, a jego obniżoną ekspresję opisano w raku szyjki macicy (ang. *cervical cancer*, CC) (Q. Zhang, Qiao, Wang, Ding, & Chen, 2018). GTF2I uczestniczy w kontroli ekspresji genów związanych z proliferacją i różnicowaniem komórek, a jego nadekspresję obserwowano w guzach grasicy (Lang, Kazdal, Mohr, & Anamaterou, 2023). Z kolei PGAM1, enzym glikolityczny, wykazuje podwyższoną ekspresję w wielu nowotworach, między innymi w raku płuca, wątroby, jelita grubego, piersi i glejakach, indukując wzrost i metabolizm komórek nowotworowych (Yang, Tao, Zhong, Yang, & Chen, 2022). Choć niektóre z tych białek wykazują odmienny profil ekspresji w kostniakomięsaku psów niż w innych nowotworach, dalsze badania – w tym walidacja z wykorzystaniem technik Western blot lub Simple Western – są konieczne dla pełniejszego zrozumienia ich znaczenia biologicznego. W analizie proteomicznej wykazano istotnie niższą ($p \leq 0,05$) ekspresję A2M w komórkach kostniakomięsa z linii OSCA-8 i OSCA-32 w porównaniu do psich osteoblastów. W ludzkich nowotworach, ekspresja A2M wykazuje zróżnicowaną korelację z rokowaniem, zależnie od typu nowotworu (Olbromski, Mrozowska, Piotrowska, Kmiecik, & Smolarz, 2024; G. Zhang et al., 2022). W przypadku inwazyjnego raka przewodowego piersi (ang. *invasive ductal carcinoma*, IDC) odnotowano zwiększoną ekspresję A2M w tkance guza, związaną z wyższym stopniem złośliwości i gorszym rokowaniem, przez

co może być potencjalnym markerem prognostycznym choroby. Z kolei, w raku jelita grubego, podobnie jak w IDC, chociaż ekspresja A2M była podwyższona, to jednak korelowała z korzystniejszym rokowaniem i dłuższym całkowitym czasem przeżycia pacjentów (Olbromski et al., 2024). W wewnątrzwątrobowym raku dróg żółciowych (ang. *intrahepatic cholangiocarcinoma*, ICC) opisano niższą ekspresję A2M w porównaniu z prawidłową tkanką przewodów żółciowych. Autorzy badań sugerują, że obniżenie A2M w przypadku ICC stanowi negatywny czynnik prognostyczny (G. Zhang et al., 2022). Podobnie, obniżoną ekspresję tego białka w stosunku do prawidłowych komórek opisano w gruczolakoraku płuca (ang. *lung adenocarcinoma*, LUAD), gdzie na podstawie analiz bioinformatycznych powiązano ją z bardziej agresywnym fenotypem tego nowotworu (Lee et al., 2022). Powyższe dane wskazują na niejednoznaczną rolę tego białka w patogenezie nowotworów, różniącą się w zależności od typu nowotworu. A2M może pełnić zarówno funkcję promotora, jak i inhibitora progresji choroby, co podkreśla jego potencjalne znaczenie jako markera prognostycznego lub celu terapeutycznego, a dokładne poznanie jego roli wymaga dalszych badań.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że egzogenna A2M istotnie hamowała migrację komórek kostniakomięsaka linii OSCA-8 i OSCA-32, co wskazuje na jej potencjalne działanie hamujące przerzutowanie. Podobny efekt hamowania migracji wskutek ekspozycji na A2M opisano w przypadku komórek ludzkiego glejaka w badaniach *in vitro* (Lindner et al., 2010). Niniejsza praca prezentuje pierwsze doniesienie opisujące bezpośredni wpływ A2M na zdolność do hamowania migracji komórek kostniakomięsaka u psów. Uzyskane wyniki wskazują na potencjalne zastosowanie A2M jako czynnika terapeutycznego w leczeniu kostniakomięsaka u psów, jednak konieczna jest dalsza walidacja w badaniach *in vitro* i *in vivo*.

W dalszej części pracy oceniono potencjalne działanie przeciwnowotworowe AuNPs-GSH z wykorzystaniem modelu kostniakomięsaka psów. Wcześniejsze doświadczenia *in vitro* na komórkach tego nowotworu, opublikowane przez Małek i współpracowników wykazały, że połączenie doksorubicyny ze stabilizowanymi glutationem nanocząstkami złota (Au-GSH-Dox) może potencjalnie zwiększać skuteczność leczenia kostniakomięsaka u psów. Au-GSH-Dox wykazały większą cytotoksyczność w porównaniu do samej doksorubicyny, szczególnie w komórkach nowotworowych wykazujących lekooporność, co wskazuje na potencjalną możliwość

przewyciężenia oporności na chemioterapię w tej chorobie nowotworowej (Małek et al., 2021). W badaniach *in vivo* z wykorzystaniem modelu CAM wykazano, że AuNPs-GSH mogą skutecznie hamować ekstrawazację komórek kostniakomięsaka psów - jeden z kluczowych etapów kaskady przerzutowania. W badaniach na modelu CAM zaobserwowano, że AuNPs-GSH znacząco zmniejszają wskaźnik ekstrawazacji komórek nowotworowych, co sugeruje ich potencjalne zastosowanie jako czynnika hamującego przerzutowanie kostniakomięsaka psów (Małek et al., 2023). W badaniach będących częścią niniejszej rozprawy doktorskiej skupiono się na ocenie wpływu AuNPs-GSH na inne etapy kaskady przerzutowania - migrację oraz angiogenezę. Wykazano, że AuNPs-GSH hamują migrację w stężeniu 200 µg/ml i 500 µg/ml oraz angiogenezę w stężeniu 500 µg/ml. Hamowanie migracji komórek nowotworowych przez AuNPs zostało wcześniej opisane w ludzkim raku jajnika przez Ali i współautorów (Ali et al., 2017). Według badaczy, nagromadzenie AuNPs w obrębie błony jądrowej może przyczyniać się zarówno do wzrostu sztywności jądra komórkowego, jak i do nasilenia ekspresji białka lamininy A/C, co skutkuje ograniczeniem zdolności komórek nowotworowych do migracji i inwazji (Ali et al., 2017). Antyangiogenne działanie AuNPs może być związane z wcześniej opisywanymi w literaturze mechanizmami molekularnymi działania AuNPs, takimi jak hamowanie ekspresji VEGF, zmniejszenie aktywności MMPs, a także zahamowanie kluczowych szlaków regulujących angiogenezę, takich jak PI3K/Akt (Darweesh, Ayoub, & Nazzal, 2019). Dodatkowo, w niniejszej pracy wykazano, że traktowanie komórek psiego kostniakomięsaka AuNPs-GSH w stężeniu 200 µg/ml wyraźnie zmniejszało klonogenność komórek kostniakomięsaka. Co istotne, AuNPs-GSH w stężeniu 200 µg/ml hamowało tworzenie kolonii komórek linii OSCA-8, OSA-32 i D-17 w większym stopniu niż w stężeniu 500 µg/ml. Mechanizm, który odpowiada za skuteczniejsze ograniczenie zdolności komórek kostniakomięsaka psów do tworzenia kolonii przy niższym stężeniu Au-GSH NPs, nie został dotąd poznany i wymaga dalszych badań. Efekt ten może być związany z większą absorpcją AuNPs-GSH przez badane komórki nowotworowe przy stężeniu 200 µg/ml, w porównaniu do absorpcji przy stężeniu 500 µg/ml, co zostało wykazane w badaniu metodą MP-AES. Mechanizm silniejszej absorpcji Au-NPs-GSH może wynikać z faktu, iż na powierzchni nanocząstek tworzy się korona białkowa, która wpływa na ich działanie i interakcje z komórkami nowotworowymi (Fangquin et al., 2024). Kolejnym istotnym obserwowanym efektem działania AuNPs-GSH było znaczące zwiększenie ekspresji

A2M w komórkach kostniakomięsaka po 24-godzinnej ekspozycji na AuNPs w stężeniu 500 µg/ml. Wpływ ten może być związany z hamowaniem migracji komórek nowotworowych, obserwowanym w niniejszych badaniach, również po podaniu egzogenego A2M.

Według najlepszej wiedzy autorki, przeprowadzone analizy stanowią nowatorskie i wcześniej nie opisywane zagadnienia w kontekście potencjalnego zastosowania w przyszłości A2M oraz Au-GSH NPs w leczeniu kostniakomięsaka psów. Należy jednak podkreślić, że badania zawarte w pracy mają charakter analiz wstępnych i wymagają dalszej walidacji w rozszerzonych badaniach *in vitro* na większej liczbie linii komórkowych o wysokim potencjale przerzutowym oraz *in vivo*. Co istotne, w ramach niniejszej pracy przeprowadzono analizę proteomiczną, na podstawie której wytypowano osiem białek różnicujących komórki psiego kostniakomięsaka i psie osteoblasty. Wyniki analizy proteomicznej przyczyniają się do lepszego zrozumienia biologii tego nowotworu. W przyszłości pogłębienie analiz molekularnych, jak również ocena skuteczności terapeutycznej wytypowanych białek, może przyczynić się do opracowania nowych strategii leczenia w onkologii weterynaryjnej.

Dyskusja niniejszej rozprawy została częściowo opracowana na podstawie sekcji Dyskusja artykułów nr 2 i nr 3, stanowiących część cyklu publikacyjnego tej pracy doktorskiej: **Wilk, S. S., Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2024).** Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms25073989> (str. 8-10) oraz **Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2025).** The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102> (str. 8-9).

6. Wnioski

1. Przerzutowanie psich komórek kostniakomięsaka jest procesem regulowanym przez liczne białka i geny, w tym te związane z migracją, adhezją komórkową oraz przebudową macierzy pozakomórkowej. Dostępna jest ograniczona liczba badań *in vitro* oraz *in vivo* potwierdzających rolę poszczególnych białek i genów w procesie przerzutowania komórek psiego kostniakomięsaka, co wskazuje na potrzebę prowadzenia badań w tym zakresie.

2. Na podstawie przeprowadzonej analizy proteomicznej z wykorzystaniem spektrometrii mas MALDI-TOF/TOF zidentyfikowano osiem białek o istotnie zmienionej ekspresji w komórkach kostniakomięsaka psów (z linii OSCA-8 i OSCA-32) w porównaniu do psich osteoblastów (CnOb). Dwa białka – CFAP298 i GTF2I – wykazywały podwyższoną ekspresję, natomiast sześć białek charakteryzowało się obniżoną ekspresją: MIPOL1, A2M, PGAM1, UB2L6, EDARADD oraz LRRC72. Wyniki analizy proteomicznej dostarczają nowych informacji istotnych dla zrozumienia biologii kostniakomięsaka psów.

3. W badaniach metodą Simple Western wykazano niższą ekspresję białka A2M w komórkach psiego kostniakomięsaka (z linii OSCA-8 i OSCA-32) niż w CnOb. A2M w stężeniu 10 i 30 mM hamowało migrację komórek kostniakomięsaka (z linii OSCA-8 i OSCA-32) po 12 i 24 godzinach, co potwierdza jej potencjalną rolę w ograniczaniu zdolności przerzutowania tego nowotworu.

4. Stabilizowane glutationem nanocząstki złota (AuNPs-GSH) w stężeniach 200 µg/ml i 500 µg/ml istotnie hamowały migrację komórek kostniakomięsaka (z linii: OSCA-8, OSCA-32, D-17) po 12 i 24 godzinach inkubacji, co wskazuje na ich potencjalną zdolność do ograniczania właściwości komórek psiego kostniakomięsaka do dawania przerzutów odległych.

5. AuNPs-GSH w stężeniu 200 µg/ml zmniejszały zdolność komórek kostniakomięsaka do tworzenia kolonii, co wskazuje na ich potencjalną rolę w hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych.

6. AuNPs-GSH w stężeniu 500 µg/ml wykazywały działanie hamujące neowaskularyzację w badaniach prowadzonych na modelu błony

kosmówkowo-omoczniowej zarodków kurzych (CAM), co sugeruje ich właściwości antyangiogenne.

7. Uzyskane wyniki badań *in vitro* oraz *in ovo* wskazują, że AuNPs-GSH wykazują właściwości przeciwnowotworowe i hamują zdolność komórek kostniakomięsa do przerzutowania, przez co mogą mieć potencjalne zastosowanie w leczeniu kostniakomięsaków u psów, jednak zastosowania AuNPs-GSH w leczeniu tego nowotworu wymaga dalszych badań, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

8. Wzrost ekspresji A2M po 24-godzinnej inkubacji komórek psiego kostniakomięsa (z linii OSCA-8 i OSCA-32) z AuNPs-GSH w stężeniu 500 µg/ml może stanowić jeden z mechanizmów działania przeciwnowotworowego AuNPs-GSH.

Przeprowadzone prace badawcze potwierdziły hipotezę badawczą, iż Au-GSH NPs hamują wybrane etapy kaskady przerzutowania kostniakomięsaków psów (migracja, angiogeneza) w badaniach *in vitro* oraz *in ovo*.

7. Bibliografia

1. Aggarwal, B. B., Sethi, G., Kwang, S. A., Sandur, S. K., Pandey, M. K., Kunnumakkara, A. B., Ichikawa, H. (2006). Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: Modern target but ancient solution. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1091, 151–169. <https://doi.org/10.1196/annals.1378.063>
2. Algrain, M., Turunen, O., Vaheri, A., Louvard, D., & Arpin, M. (1993). Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *Journal of Cell Biology*, 120(1), 129–140. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.1.129>
3. Bayraktar, E., Chen, S., Corvigno, S., Liu, J., & Sood, A. K. (2024). Commentary Ovarian cancer metastasis: Looking beyond the surface. *Cancer Cell*, 42(10), 1631–1636. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2024.08.016>
4. Berg, J. (1996). Canine osteosarcoma. Amputation and chemotherapy. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 26(1), 111–121. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(96\)50010-0](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(96)50010-0)
5. Bergman, P. J., MacEwen, E. G., Kurzman, I. D., Henry, C. J., Hammer, A. S., Knapp, D. W., Withrow, S. J. (1996). Amputation and carboplatin for treatment of dogs with osteosarcoma: 48 cases (1991 to 1993). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10(2), 76–81. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1996.tb02031.x>
6. Besalti, O., Caliskan, M., Can, P., Vural, S. A., Aigin, O., & Ahlat, O. (2016). Imaging and surgical outcomes of spinal tumors in 18 dogs and one cat. *Journal of Veterinary Science*, 17(2), 225–234. <https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.2.225>
7. Brekhus, C., Labus, K., Seguin, B., Puttlitz, C., & Gadomski, B. (2024). Patient-specific finite element modeling for fracture risk prediction in a canine model of osteosarcoma. *Annals of Translational Medicine*, 12(1), 5–5. <https://doi.org/10.21037/atm-23-1699>
8. Byrum, M. L., Pondenis, H. C., Fredrickson, R. L., Wycislo, K. L., & Fan, T. M. (2016). Downregulation of CXCR4 Expression and Functionality After Zoledronate Exposure in Canine Osteosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*,

1187–1196. <https://doi.org/10.1111/jvim.14257>

9. Cam, M., Gardner, H. L., Roberts, R. D., Fenger, J. M., Guttridge, C., London, C. A., & Cam, H. (2016). Δ Np63 mediates cellular survival and metastasis in canine osteosarcoma. *Oncotarget*, 7(30). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10406>.
10. Candi, E., Dinsdale, D., Rufini, A., Salomoni, P., Knight, R. A., Mueller, M., ... Melino, G. (2007). TAp63 and Δ Np63 in cancer and epidermal development. *Cell Cycle*, 6(3), 274–284. <https://doi.org/10.4161/cc.6.3.3797>
11. Cavalcanti, J. N., Amstalden, E. M. I., Guerra, J. L., & Magna, L. C. (2004). Osteosarcoma in dogs: clinical-morphological study and prognostic correlation. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 41(5), 299–305. <https://doi.org/10.1590/s1413-95962004000500002>
12. Christine L. Chaffer, R. A. W. (2011). A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*, 331(March), 1559–1564. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>.
13. Coomer, A., Farese, J., Milner, R., Liptak, J., Bacon, N., & Lurie, D. (2009). Radiation therapy for canine appendicular osteosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(1), 15–27. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2008.00177.x>
14. Cuéllar, J. M., Cuéllar, V. G., & Scuderi, G. J. (2016). α 2-Macroglobulin: Autologous Protease Inhibition Technology. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 27(4), 909–918. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2016.06.008>
15. Darweesh, R. S., Ayoub, N. M., & Nazzal, S. (2019). Gold nanoparticles and angiogenesis: molecular mechanisms and biomedical applications. *Int J Nanomedicine*, 14, 7643–7663. <https://doi.org/doi:10.2147/IJN.S223941>
16. De Maria, R., Miretti, S., Iussich, S., Olivero, M., Morello, E., Bertotti, A., ... Di Renzo, M. F. (2009). Met Oncogene Activation Qualifies Spontaneous Canine Osteosarcoma As a Suitable Pre-Clinical Model of Human Osteosarcoma. *Journal of Pathology*, 218(3), 399–408. <https://doi.org/10.1002/path.2549>
17. Dernell, W. S., Straw, R. C., & Withrow, S. J. (2001). Tumors of the skeletal system.

In Withrow S.J., MacEwen E.G., eds. *Small Animal Clinical Oncology* (3rd ed., pp. 378–417). Philadelphia, USA: W.B. Saunders.

18. Derynck, R., Akhurst, R. J., & Balmain, A. (2001). TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genetics*, 29(2), 117–129. <https://doi.org/10.1038/ng1001-117>
19. Dykman, L. A., & Khlebtsov, N. G. (2011). Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and L. Prospects. *Acta Naturae*, 3(2), 34–55.
20. El-tanani, M., Arman, S., Babiker, R., Rangraze, I., Kapre, S., Srivastsa, S., ... Tambuwala, M. M. (2024). Unraveling the tumor microenvironment : Insights into cancer metastasis and therapeutic strategies. *Cancer Letters*, 591(March), 216894. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216894>
21. Fan, T. M., Barger, A. M., Sprandel, I. T., & Fredrickson, R. L. (2008). Investigating TrkA expression in canine appendicular osteosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(5), 1181–1188. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0151.x>
22. Fangquin, F., Landfester, K., & Jiang, S. (2024). In situ characterization techniques of protein corona around nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 53(22). <https://doi.org/10.1039/d4cs00507d>
23. Fehon, R. G., McClatchey, A. I., & Bretscher, A. (2010). Organizing the cell cortex: The role of ERM proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(4), 276–287. <https://doi.org/10.1038/nrm2866>
24. Fenger, J. M., Roberts, R. D., Iwenofu, O. H., Bear, M. D., Zhang, X., Couto, J. I., ... London, C. A. (2016). MiR-9 is overexpressed in spontaneous canine osteosarcoma and promotes a metastatic phenotype including invasion and migration in osteoblasts and osteosarcoma cell lines. *BMC Cancer*, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2837-5>
25. Fossey, S. L., Liao, A. T., McCleese, J. K., Bear, M. D., Lin, J., Li, P. K., ... London, C. A. (2009). Characterization of STAT3 activation and expression in canine and human osteosarcoma. *BMC Cancer*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-81>

26. Fuchs, E. (1994). Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function, and Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 63(1), 345–382. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.63.1.345>
27. Gardner, H. L., Fenger, J. M., Roberts, R. D., & London, C. A. (2022). Characterizing the metabolic role of STAT3 in canine osteosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 20(4), 817–824. <https://doi.org/10.1111/vco.12841>
28. Habel, N., Stefanovska, B., Carène, D., Patiño-Garcia, A., Lecanda, F., & Fromigué, O. (2019). CYR61 triggers osteosarcoma metastatic spreading via an IGF1R β -dependent EMT-like process. *BMC Cancer*, 19(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5282-4>
29. Hapach, L. A., Mosier, J. A., Wang, W., & Reinhart-King, C. A. (2019). Engineered models to parse apart the metastatic cascade. *Npj Precision Oncology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0092-3>
30. Hiemer, S. E., Szymaniak, A. D., & Varelas, X. (2014). The transcriptional regulators TAZ and YAP direct transforming growth factor β -induced tumorigenic phenotypes in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 289(19), 13461–13474. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.529115>
31. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2007). Gold nanoparticles: Interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine*, 2(5), 681–693. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.5.681>
32. Jain, S., Hirst, D. G., & O’Sullivan, J. M. (2012). Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *British Journal of Radiology*, 85(1010), 101–113. <https://doi.org/10.1259/bjr/59448833>
33. Jun, Y. W., Lee, J. H., & Cheon, J. (2008). Chemical design of nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance imaging. *Angewandte Chemie - International Edition*, 47(28), 5122–5135. <https://doi.org/10.1002/anie.200701674>
34. Kaya, M., Wada, T., Akatsuka, T., Kawaguchi, S., Nagoya, S., Shindoh, M., ... Ishii, S. (2000). Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clinical Cancer*

Research, 6(2), 572–577.

35. Kisseberth, W. C., & Lee, D. A. (2021). Adoptive Natural Killer Cell Immunotherapy for Canine Osteosarcoma. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(June), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.672361>
36. Kurz, S., Thieme, R., Amberg, R., Groth, M., Jahnke, H. G., Pieroh, P., ... Birkenmeier, G. (2017). The anti-tumorigenic activity of A2M—A lesson from the naked mole-rat. *PLoS ONE*, 12(12), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189514>
37. Lang, M., Kazdal, D., Mohr, I., & Anamaterou, C. (2023). Differences and similarities of GTF2I mutated thymomas in different Eurasian ethnic groups, 12(9), 1842–1844. <https://doi.org/10.21037/tlcr-23-396>
38. Lee, H. C., Chang, C. Y., Huang, Y. C., Wu, K. L., Chiang, H. H., Chang, Y. Y., ... Tsai, Y. M. (2022). Downregulated ADAMTS1 Incorporating A2M Contributes to Tumorigenesis and Alters Tumor Immune Microenvironment in Lung Adenocarcinoma. *Biology*, 11(5), 1–15. <https://doi.org/10.3390/biology11050760>
39. Leong, M. M. L., Cheung, A. K. L., Kwok, T. C. T., & Lung, M. L. (2020). Functional characterization of a candidate tumor suppressor gene, Mirror Image Polydactyly 1, in nasopharyngeal carcinoma. *International Journal of Cancer*, 146(10), 2891–2900. <https://doi.org/10.1002/ijc.32732>
40. Li, M., Bai, Y., Han, K., Li, X., & Meng, J. (2020). Knockdown of ectodysplasin-A receptor-associated adaptor protein exerts a tumor-suppressive effect in tongue squamous cell carcinoma cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3337–3347. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8578>
41. Li W, Li X, Liu S, Yang W, Pan F, Yang XY, Du B, Qin L, P. Y. (2017). Gold nanoparticles attenuate metastasis by tumor vasculature normalization and epithelial – mesenchymal transition inhibition. *Int J Nanomedicine*, 12, 3509–3520. <https://doi: 10.2147/IJN.S128802>.
42. Lindner, I., Hemdan, N. Y. A., Buchold, M., Huse, K., Bigl, M., Oerlecke, I., ... Birkenmeier, G. (2010). A2-Macroglobulin Inhibits the Malignant Properties of Astrocytoma Cells By Impeding B-Catenin Signaling. *Cancer Research*, 70(1),

- 277–287. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1462>
43. Lopez, C. M., Yu, P. Y., Zhang, X., Yilmaz, A. S., London, C. A., & Fenger, J. M. (2018). MiR-34a regulates the invasive capacity of canine osteosarcoma cell lines. *PLoS ONE*, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190086>
 44. Lu, Q., Lv, G., Kim, A., Ha, J. M., & Kim, S. (2012). Expression and clinical significance of extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN/CD147, in human osteosarcoma. *Oncology Letters*, 5(1), 201–207. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.981>
 45. M.R.K. Ali, Y. Wu, D. Ghosh, B.H. Do, K. Chen, M.R. Dawson, N. Fang, T.A. Sulchek, M. A. E.-S. (2017). Nuclear membrane-targeted gold nanoparticles inhibit cancer cell migration and invasion. *ACS Nano*, 11(1), 3716–3726. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08345>.Nuclear
 46. MacEwen, E. G., Kutzke, J., Carew, J., Pastor, J., Schmidt, J. A., Tsan, R., ... Radinsky, R. (2003). c-Met tyrosine kinase receptor expression and function in human and canine osteosarcoma cells. *Clinical and Experimental Metastasis*, 20(5), 421–430. <https://doi.org/10.1023/A:1025404603315>
 47. MacEwen, E. G., Pastor, J., Kutzke, J., Tsan, R., Kurzman, I. D., Thamm, D. H., ... Radinsky, R. (2004). IGF-1 receptor contributes to the malignant phenotype in human and canine osteosarcoma. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92(1), 77–91. <https://doi.org/10.1002/jcb.20046>
 48. Małek, A., Taciak, B., Sobczak, K., Grzelak, A., Wójcik, M., Mieczkowski, J., ... Zabielska-Koczywaś, K. A. (2021). Enhanced cytotoxic effect of doxorubicin conjugated to glutathione-stabilized gold nanoparticles in canine osteosarcoma—in vitro studies. *Molecules*, 26(12). <https://doi.org/10.3390/molecules26123487>
 49. Małek, A., Wojnicki, M., Borkowska, A., Wójcik, M., Ziólek, G., Lechowski, R., & Zabielska-Koczywaś, K. (2023). Gold Nanoparticles Inhibit Extravasation of Canine Osteosarcoma Cells in the Ex Ovo Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12). <https://doi.org/10.3390/ijms24129858>
 50. Mason, N. J. (2020). Comparative immunology and immunotherapy of canine

- osteosarcoma. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1258, 199–221.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-43085-6_14
51. Matsuyama, A., Wood, G. A., Speare, R., Schott, C. R., & Mutsaers, A. J. (2022). Prognostic significance of the urokinase plasminogen activator system in tissue and serum of dogs with appendicular osteosarcoma. *PLoS ONE*, 17(9 September), 1–20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273811>
 52. Modesto, P., Leonardo, J., Fernandez, C., Martini, I., Zoccola, R., Pugliano, M. C., ... Razzuoli, E. (2020). Characterization of D-17 Canine Osteosarcoma Cell Line and Evaluation of Its Ability to Response to Infective Stressor Used as Alternative Anticancer Therapy. [https://doi: 10.3390/ani10111981](https://doi.org/10.3390/ani10111981)
 53. Morello, E., Buracco, P., Martano, M., Peirone, B., Capurro, C., Valazza, A., ... Sora, M. (2001). Bone allografts and adjuvant cisplatin for the treatment of canine appendicular osteosarcoma in 18 dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 42(2), 61–66. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2001.tb01993.x>
 54. Mueller, F., Fuchs, B., & Kaser-Hotz, B. (2007). Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Research*, 27(1 A), 155–164.
 55. Neill, D. G. O., Edmunds, G. L., Gilmore, J. U., Church, D. B., Rutherford, L., Smalley, M. J., & Brodbelt, D. C. (2023). Dog breeds and conformations predisposed to osteosarcoma in the UK : a VetCompass study. *Canine Medicine and Genetics*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40575-023-00131-2>
 56. Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(3), 155–166.
<https://doi.org/10.1038/nrm757>
 57. Nolan, M. W., Uzan, O. C., Green, N. A., Lana, S. E., & Lascelles, B. D. X. (2022). Intensity of perioperative analgesia but not pre-treatment pain is predictive of survival in dogs undergoing amputation plus chemotherapy for extremity osteosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 20(3), 568–576.
<https://doi.org/10.1111/vco.12808>
 58. Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., Iruela-arisppe, M. L., & Angeles, L. (2014). The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering.

- Angiogenesis*, 17(4), 779–804. <https://doi.org/10.1007/s10456-014-9440-7>.The
59. Olbromski, M., Mrozowska, M., Piotrowska, A., Kmiecik, A., & Smolarz, B. (2024). Prognostic significance of lipoprotein receptor-related protein-1 in various cancers, *14*(6), 3036–3058. <https://doi.org/10.62347/VUJV9180>
 60. Paciotti, G. F., Myer, L., Weinreich, D., Goia, D., Pavel, N., McLaughlin, R. E., & Tamarkin, L. (2004). Colloidal gold: A novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, 11(3), 169–183. <https://doi.org/10.1080/10717540490433895>
 61. Popovtzer, R., Agrawal, A., Kotov, N. A., Popovtzer, A., Balter, J., Carey, T. E., & Kopelman, R. (2008). Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer. *Nano Letters*, 8(12), 4593–4596. <https://doi.org/10.1021/nl8029114>
 62. Portela, R. F., Fadl-Alla, B. A., Pondenis, H. C., Byrum, M. L., Garrett, L. D., Wycislo, K. L., ... Fan, T. M. (2014). Pro-tumorigenic effects of transforming growth factor beta 1 in canine osteosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(3), 894–904. <https://doi.org/10.1111/jvim.12348>
 63. Ragland, B. D., Bell, W. C., Lopez, R. R., & Siegal, G. P. (2002). Cytogenetics and Molecular Biology of Osteosarcoma. *Laboratory Investigation*, 82(4), 365–373. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780431>
 64. Rak, J., Milsom, C., & Yu, J. (2008). Tissue factor in cancer. *Current Opinion in Hematology*, 15(5), 522–528. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283063a3e>
 65. Roy, J., Wycislo, K. L., Pondenis, H., Fan, T. M., & Das, A. (2017). Comparative proteomic investigation of metastatic and non-metastatic osteosarcoma cells of human and canine origin. *PLoS ONE*, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183930>
 66. Scott, M. C., Sarver, A. L., Gavin, K. J., Thayanithy, V., Getzy, D. M., Newman, R. A., ... Modiano, J. F. (2011). Molecular subtypes of osteosarcoma identified by reducing tumor heterogeneity through an interspecies comparative approach. *Bone*, 49(3), 356–367. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.05.008>
 67. Selmic, L. E., Burton, J. H., Thamm, D. H., Withrow, S. J., & Lana, S. E. (2014).

- Comparison of carboplatin and doxorubicin-based chemotherapy protocols in 470 dogs after amputation for treatment of appendicular osteosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(2), 554–563. <https://doi.org/10.1111/jvim.12313>
68. Selvarajah, G. T., & Kirpensteijn, J. (2010). Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. *Veterinary Journal*, 185(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.010>
 69. Sharili, A. S., Allen, S., Smith, K., Hargreaves, J., Price, J., & McGonnell, I. (2011). Expression of Snail2 in long bone osteosarcomas correlates with tumour malignancy. *Tumor Biology*, 32(3), 515–526. <https://doi.org/10.1007/s13277-010-0146-1>
 70. Sharili, A. S., Allen, S., Smith, K., Price, J., & McGonnell, I. M. (2013). Snail2 promotes osteosarcoma cell motility through remodelling of the actin cytoskeleton and regulates tumor development. *Cancer Letters*, 333(2), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.01.027>
 71. Shi, Y., Pu, K., Yao, H., Chen, Y., Zheng, X., Zhao, L., & Ge, C. (2023). Gold nanorods inhibit tumor metastasis by regulating MMP-9 activity : Implications for radiotherapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 15(7), 1–8. <https://doi.org/doi:10.1021/acsami.2c20944>
 72. Simpson, S., Rizvanov, A. A., Jeyapalan, J. N., de Brot, S., & Rutland, C. S. (2022). Canine osteosarcoma in comparative oncology: Molecular mechanisms through to treatment discovery. *Frontiers in Veterinary Science*, 9(5). <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.965391>
 73. Song, Z., Pearce, M. C., Jiang, Y., Yang, L., Goodall, C., Miranda, C. L., ... Maier, C. S. (2020). Delineation of hypoxia-induced proteome shifts in osteosarcoma cells with different metastatic propensities. *Scientific Reports*, 10(1), 727. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56878-x>
 74. Sormunen, A., Koivulehto, E., Alitalo, K., Saksela, K., Laham-Karam, N., & Ylä-Herttuala, S. (2023). Comparison of Automated and Traditional Western Blotting Methods. *Methods and Protocols*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/mps6020043>

75. Starkey, M. P., Scase, T. J., Mellersh, C. S., & Murphy, S. (2005). Dogs really are man's best friend - Canine genomics has applications in veterinary and human medicine! *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 4(2), 112–128. <https://doi.org/10.1093/bfpg/4.2.112>
76. Steeg, P. S. (2006). Tumor metastasis : mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Medicine*, 12(8), 895–904. <https://doi.org/10.1038/nm1469>
77. Stefanidakis, M., & Koivunen, E. (2006). Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: Role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood*, 108(5), 1441–1450. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-005363>
78. Stokol, T., Daddona, J. L., Mubayed, L. S., Trimpert, J., & Kang, S. (2011). Evaluation of tissue factor expression in canine tumor cells. *American Journal of Veterinary Research*, 72(8), 1097–1106. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.8.1097>
79. Szewczyk, M., Lechowski, R., & Zabielska, K. (2015). What do we know about canine osteosarcoma treatment? – review. *Veterinary Research Communications*, 39(1), 61–67. <https://doi.org/10.1007/s11259-014-9623-0>
80. T.M. Fan, A.M. Barger, R.L. Fredrickson, D. Fitzsimmons, and L. D. G. B. (2008). Investigating CXCR4 expression in canine appendicular osteosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(5), 602–608. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0151.x>
81. Yang, G., Tao, F., Zhong, H., Yang, C., & Chen, J. (2022). European Journal of Medicinal Chemistry Targeting PGAM1 in cancer : An emerging therapeutic opportunity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 244(August), 114798. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114798>
82. Yeh, Y.-C., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012). Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology, 4(6), 1871–1880. <https://doi.org/10.1039/c1nr11188d>.Gold
83. Zhang, G., Liu, X., Sun, Z., Feng, X., Wang, H., Hao, J., & Zhang, X. (2022). A2M is a potential core gene in intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC Cancer*, 22(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09070-2>

84. Zhang, K., Chen, D., Jiao, X., Zhang, S., Liu, X., Cao, J., ... Wang, D. (2011). Slug enhances invasion ability of pancreatic cancer cells through upregulation of matrix metalloproteinase-9 and actin cytoskeleton remodeling. *Laboratory Investigation*, 91(3), 426–438. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.201>
85. Zhang, Q., Qiao, L., Wang, X., Ding, C., & Chen, J. J. (2018). UHRF1 epigenetically down-regulates UbcH8 to inhibit apoptosis in cervical cancer cells. *Cell Cycle*, 17(3), 300–308. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1403686>
86. Zhou, H., & Lei, P. (2021). Progression of Metastasis through Lymphatic System. *Cells*, 10(3):627. <https://doi.org/10.3390/cells10030627>

8. Artykuły stanowiące cykl publikacji oraz oświadczenia współautorów



Review

Molecular Mechanisms of Canine Osteosarcoma Metastasis

Sylwia S. Wilk and Katarzyna A. Zabielska-Koczywas *

Department of Small Animal Diseases and Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland; sylwia_wilk@sggw.edu.pl

* Correspondence: katarzyna_zabielska@sggw.edu.pl; Tel.: +48-225936136

Abstract: Osteosarcoma (OSA) represents the most common bone tumor in dogs. The malignancy is highly aggressive, and most of the dogs die due to metastasis, especially to the lungs. The metastatic process is complex and consists of several main steps. Assessment of the molecular mechanisms of metastasis requires in vitro and especially in vivo studies for a full evaluation of the process. The molecular and biological resemblance of canine OSA to its human counterpart enables the utilization of dogs as a spontaneous model of this disease in humans. The aim of the present review article is to summarize the knowledge of genes and proteins, including *p63*, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), *Snail2*, ezrin, phosphorylated ezrin-radixin-moesin (p-ERM), hepatocyte growth factor-scatter factor (HGF-SF), epidermal growth factor receptor (EGFR), miR-9, and miR-34a, that are proven, by in vitro and/or in vivo studies, to be potentially involved in the metastatic cascade of canine OSA. The determination of molecular targets of metastatic disease may enhance the development of new therapeutic strategies.

Keywords: canine OSA; metastasis; molecular mechanisms; cell lines; in vitro; in vivo; animal models



Citation: Wilk, S.S.; Zabielska-Koczywas, K.A. Molecular Mechanisms of Canine Osteosarcoma Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3639. <https://doi.org/10.3390/ijms22073639>

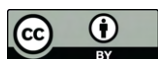
Academic Editor: Sabrina Strano

Received: 1 February 2021

Accepted: 26 March 2021

Published: 31 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Osteosarcoma (OSA) is the most common bone malignancy that occurs in dogs, accounting for 80–98% of malignant bone tumors [1,2], with an incidence rate estimated to be between at least 5.6 and 13.8/10,000 [3–5]. However, it should be pointed out that there is limited data on the statistics on OSA incidence in dogs, as there is no consistent method for reporting cancer in dogs, and the presented estimation is based on data from the 1990s. The origin of neoplasia includes osteoblastic cells producing osteoid or malignant mesenchymal cells. Prevalence is significantly higher in older dogs, with a mean age of 8 years, from large and giant breeds, and in most cases affects the appendicular skeleton (64% of patients) [1,6]. The common locations of this malignancy are the proximal humerus and distal radius (Figure 1A) or the distal femur and proximal tibia (Figure 1B). OSA demonstrates aggressiveness and a propensity to metastasize, most frequently to the lungs [1–3] (Figure 1C). Other sites of metastatic disease include the bones and soft tissue of internal organs, such as the liver, spleen, or lymph nodes [2]. It is estimated that at the moment of diagnosis, 80–90% of dogs have micrometastases in their lungs [7]. Despite surgical and chemotherapeutic treatment, less than 20% of dogs survive more than 2 years from diagnosis, probably due to metastatic disease [8].

OSA cells metastasize by hematogenous spread [9]. The process of metastasis is complex and involves several main steps: 1. neo-vascularization within the primary tumor, 2. local invasion and subsequent intravasation, 3. transportation and obstruction at vessels of the secondary site, 4. extravasation and migration, and 5. outgrowth at the secondary site [10] (Figure 2).

Understanding the molecular mechanisms driving metastasis, differences in tumor cells colonizing distant organs from those of primary tumor cells, and recognizing potential molecular targets are important steps in the effective development of anti-metastatic drugs [11]. Both in vitro and in vivo studies are needed to fully evaluate the molecular

mechanisms of candidate compounds [12,13]. The in vitro tests can be utilized to assess the invasive phenotype (transwell invasion assay) of canine OSA cells as well as their ability to migrate (wound healing assay (WHA)), which are the main steps of the metastatic cascade. The controlled environment of in vitro studies enables varying expressions of selected factors, which cannot be achieved in vivo [14]. Nevertheless, only in vivo modelling facilitates the mimicking of natural tumor cell behavior and its interactions with the local and systemic environments of a living organism, both crucial for anti-metastatic drug development [15]. Within in vitro cultures, tumor cells lose specific interactions corresponding to tissue formation, which may affect the expression of particular targets [14]. The perfect in vivo model to study preclinical metastasis should produce metastases within a few months, be immunocompetent with the tumor specimen, and be orthotopic [11]. The most widely used in vivo metastatic frameworks are immune-competent mice (engrafted with murine tumors) or immunosuppressed mice (xenografts) [15,16]. Moreover, the primary canine or human OSA tumor implantation into the side of an orthotopic mouse model exemplifies all of the metastatic cascade steps [16]. Other hosts occasionally used in metastatic research include zebrafish, *Drosophila*, and chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) [11]. The CAM has been shown to be a reliable model to study neoplastic cell extravasation—an important step of the metastatic cascade [17]. Furthermore, Kim and collaborators demonstrated [17] the potential utility of this model in the development of novel anti-metastatic strategies that specifically target neoplastic cell extravasation.

Mol. Sci. 2021, 22, x FOR PEER REVIEW

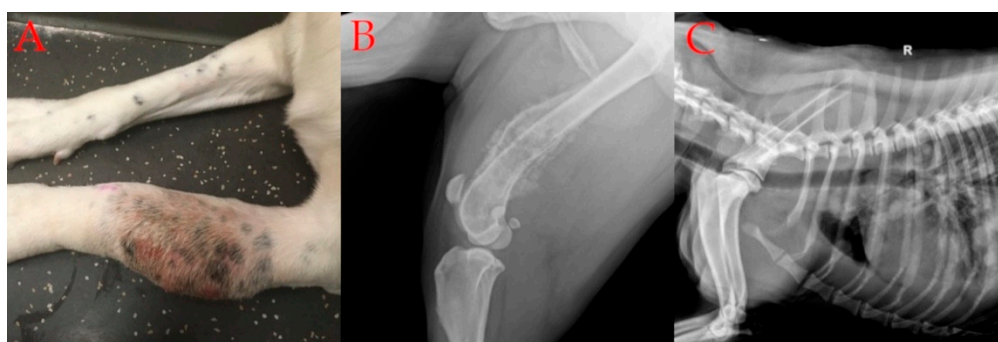


Figure 1. (A): Clinical appearance of an 11-month mixed breed dog with osteosarcoma; (B): X-ray of the primary canine osteosarcoma localized in the distal femur; (C): X-ray of lung metastases in canine osteosarcoma.

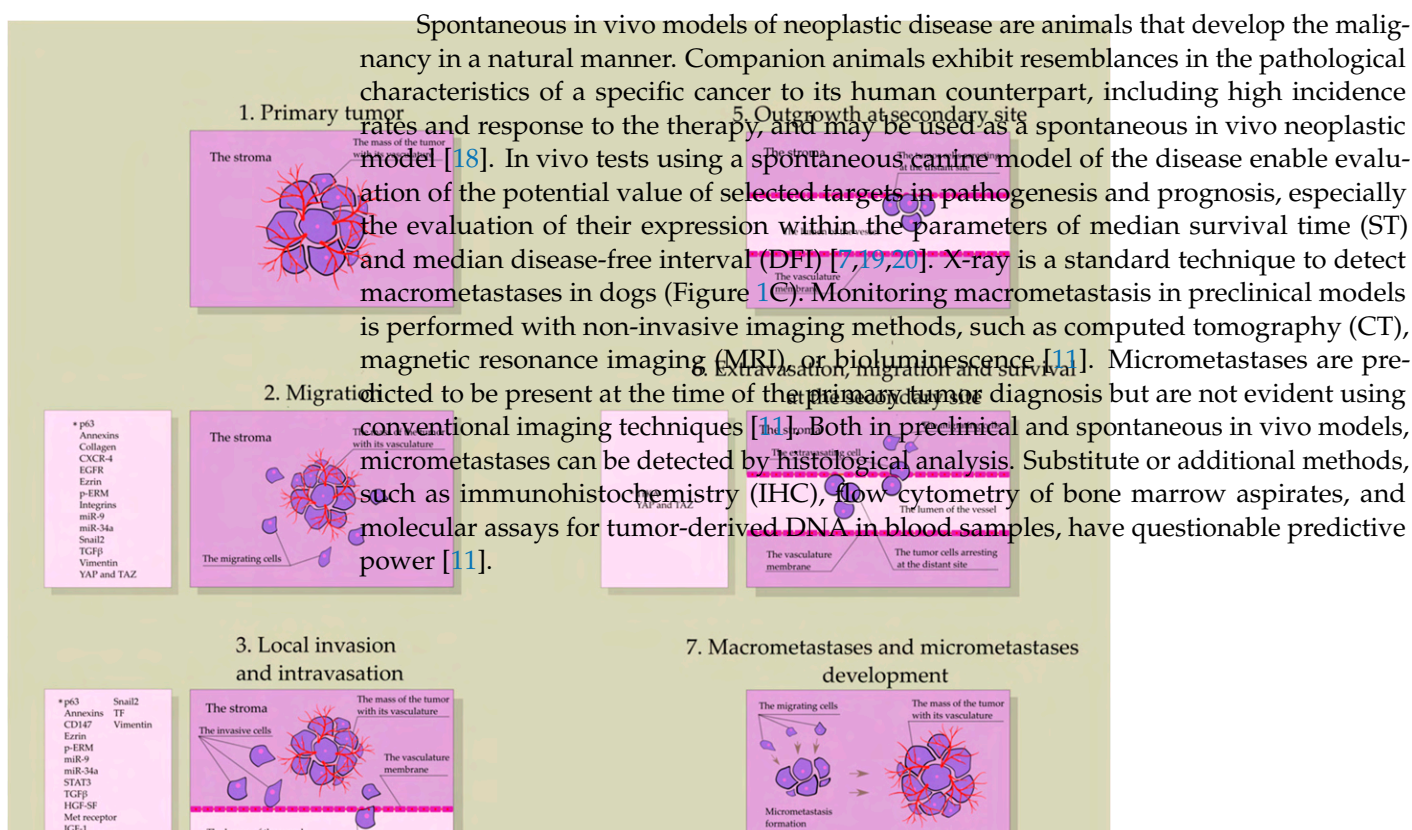




Figure 1. (A): Clinical appearance of an 11-month mixed breed dog with osteosarcoma; (B): X-ray of the primary canine osteosarcoma localized in the distal femur; (C): X-ray of lung metastases in canine osteosarcoma.

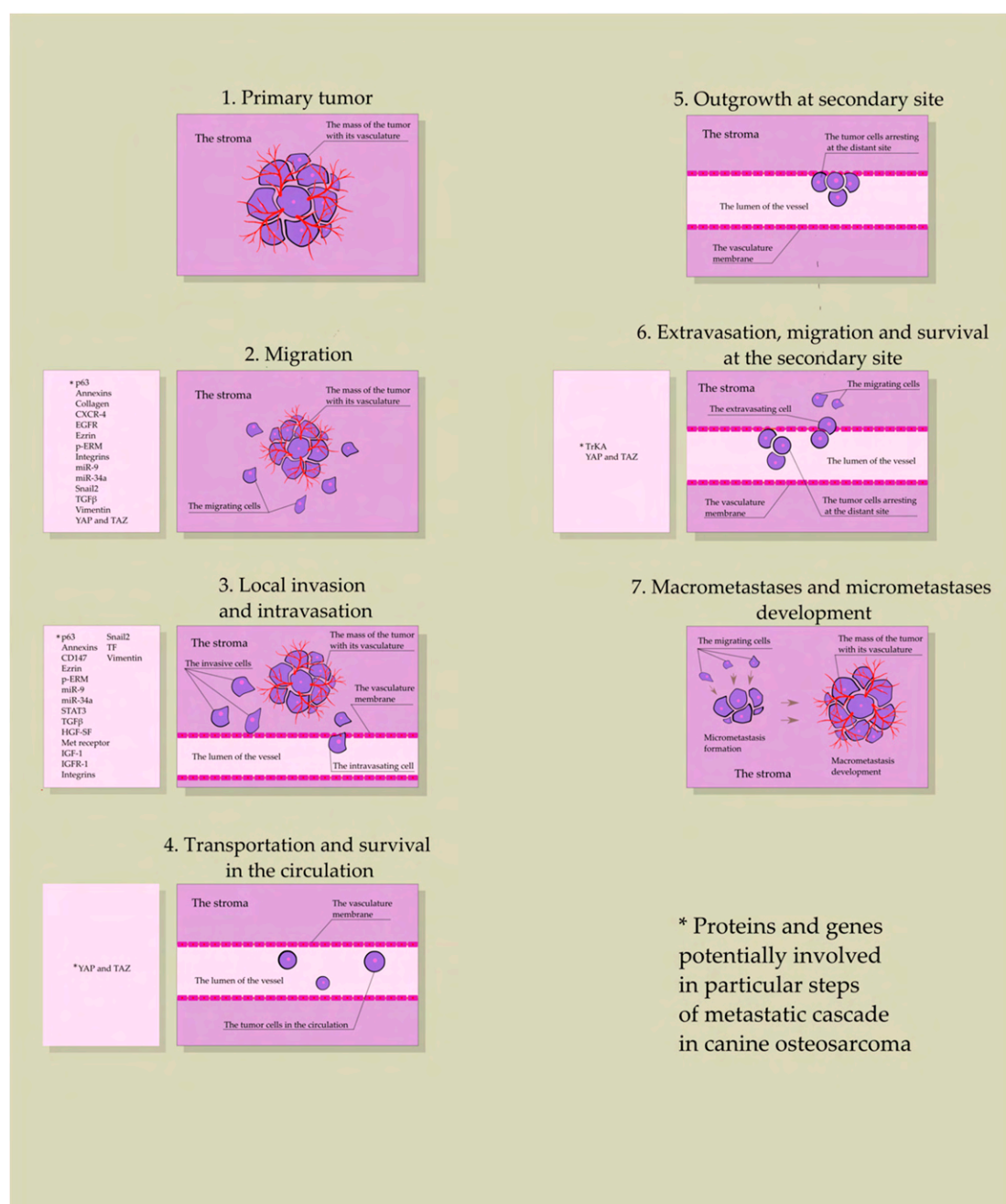


Figure 2. Steps of the metastatic cascade in canine osteosarcoma, including genes and proteins potentially involved in each step.

The aim of the present review is to summarize the actual knowledge of proteins, genes, and nucleic acids implicated in the process of canine OSA metastasis, such as *p63*, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), Snail2, ezrin, phosphorylated ezrin-radixin-moesin (p-ERM), hepatocyte growth factor-scatter factor (HGF-SF), epidermal growth factor receptor (EGFR), and miR-9 and miR-34a (Figure 2), as they may act as biomarkers or play an important role in targeted drug delivery. Moreover, a determination of their functions in canine OSA requires investigation due to the biological and molecular resemblance of this tumor to its human counterpart. Canine OSA remains an *in vivo* model of the human malignancy, utilized in preclinical tests of novel treatment methods [20,21].

2. Search Methodology

This review was based on a search of the PubMed database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, accessed on 19 February 2021) using the terms “canine” OR “dogs”

AND “osteosarcoma” AND “cell line” AND “metastasis”. Out of 62 articles that meet the criteria, only original articles that included information on canine osteosarcoma metastasis at a molecular level were selected. This review is a synthesis of current knowledge in the field and highlights the genes and proteins involved in molecular mechanisms of canine osteosarcoma metastasis that, based on promising results of in vitro and/or in vivo studies, need further investigation. To fully cover a topic, the review also provides the information from other selected canine OSA articles (used in the introduction section) and particular proteins and genes to enhance the knowledge on their biological role.

3. Proteins and Genes Potentially Involved in Canine OSA Metastasis—In Vitro and In Vivo Studies

3.1. *p63*

p63 is a transcription factor that belongs to the *p53* family. *p63* encodes protein isoforms using two promoters: TAp63 and Δp63 [22]. Expression of the Δp63 isoform is often aberrant in several types of human neoplasias, and its upregulation is related to a poor prognosis [22]. Cam et al. [23] demonstrated an overexpression of Δp63 in canine OSA cell lines and primary OSA tumors in comparison to normal canine osteoblasts. In the same study, overexpression of Δp63 enhanced the number of invading D17 cells and improved their ability to migrate in a WHA. It was indicated that D17 cells overexpressing Δp63 exhibit increased phosphorylation of STAT3 and secretion of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), in comparison to control D17 cells. The data suggest that the role of Δp63 in cellular invasion and migration is presumably associated with activating STAT3, interleukin 8 (IL-8), and VEGF-A production [23].

The investigators performed further studies with severe combined immunodeficient (SCID) mice intravenously xenografted with canine OSA cells, which revealed that the expression of ΔNp63 correlates with the metastatic potential of OSA cells and is higher (three-fold more metastases, $p < 0.05$) in the OSA16 cell line when compared to the D17 cell line. In the same study, the correlation between ΔNp63 expression and metastasis was further confirmed by demonstrating an increased lung colonization of D17 cells overexpressing ΔNp63 after IV inoculation in SCID mice, in comparison to control D17 cells. The in vivo experiment data may highlight the involvement of ΔNp63 in the metastatic process of canine OSA. The authors suggest its role in mediating the expression of cytokines, such as IL-8, interleukin-11 (IL-11), and oncostatin M (OSM), but the exact molecular mechanism of ΔNp63 activity in metastasis remains unclear and requires further investigation [23]. Nevertheless, the results of both in vitro and in vivo studies clearly indicate that ΔNp63 is a potential target for novel anti-metastatic therapies for canine OSA.

3.2. *STAT3*

STAT3 is a protein from the family of transcription factors that plays a role in the development, progression, and process of metastasis in some types of neoplasias, including tumors of mesenchymal origin [24]. Activated STAT3 is associated with poor prognosis in some human malignancies, including lymphomas, blood, and solid tumors [25]. Fossey et al. [21] established the activation of STAT3 in numerous canine OSA tumors and canine cell lines. In the same study, the investigators demonstrated that the inhibition of STAT3 with the small-molecule Src inhibitor SU6656 or direct downregulation (by using the small-molecule inhibitor LL3 or siRNA to modulate STAT3 expression) showed a noticeable reduction of mRNAs encoding matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF), and led to downregulation of the proenzyme and active form of MMP-2 and decreased expression of the VEGF protein. The data suggest that STAT3 activity impacts metastasis and cell invasion through the expression of crucial proteins involved in these processes [21].

3.3. *Snail2*

Various *in vitro* studies (using the CAM assay and IHC of canine OSA tumors) assessed the role of *Snail2*, a zinc finger protein and transcription factor from the *Snail* family, in canine OSA metastasis. *Snail2* decreases the expression of E-cadherin, enabling the cells to break cell–cell connections [26]. Immunohistochemical analysis on archived canine OSA showed a significantly higher expression of *Snail2* in high-grade canine OSA tumors ($n = 11$) in comparison to intermediate-grade ($n = 5$) and low-grade ($n = 4$) samples [27]. Furthermore, the expression of *Snail2* in material derived from appendicular bone tumors was significantly higher than skull-derived OSA [27]. As it is well known that appendicular long bone OSA in dogs metastasizes in 80–90% of cases [1], while skull OSA metastases occur less frequently, according to Sharili et al. [27], this fact may suggest that *Snail2* could play a role in the process of cell migration. It should be considered that the study was performed on small numbers of dogs, and archived material was used for IHC, which may limit the results. Downregulation of *Snail2* by small interfering RNA demonstrated decreased motility of D17 cells using the scratch assay, suggesting that *Snail2* is required for migration [28]. However, overexpression of *Snail2* using a *Snail2* plasmid with a CMV promoter did not increase the motility of D17 cells. This could be due to the fact that D17 cells metastasize to the lungs and their migration rate cannot be enhanced by increasing *Snail2* activity, as they may already be migrating at their highest rate [28]. It was shown that the downregulation of *Snail2* can disorganize cytoskeleton architecture without impacting focal adhesions, and D17 cells with increased *Snail2* expression exhibited normal cytoskeleton organization and more focal adhesions [27]. This suggests that *Snail2* can regulate cell adhesion and cytoskeleton action in OSA, which can be associated with promoting cell migration and metastasis [28]. Further studies on the CAM model demonstrated that the ability to invade the stroma and intravasation of *Snail2* knockdown D17 cells was significantly reduced in comparison to control (D17) cells. Results obtained indicated that selectively blocking *Snail2* may reduce metastasis in patients with OSA [28]. In various human cancer cells (e.g., lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma), the function of *Snail2* in the metastatic processes is considered to be associated with the promotion of MMP expression, but the exact mechanism remains unknown [29,30]. MMPs are proteolytic, calcium-dependent, and zinc-containing enzymes from the metzincin superfamily that degrade and remodel the extracellular matrix [31]. In human medicine, MMP inhibitors were developed as antimetastatic agents. While they inhibited the tissue invasion of neoplastic cells in the metastatic cascade, they failed to show strong efficacy in phase II and III clinical trials [11]. In veterinary medicine, Lana et al. [32] detected significantly higher ($p < 0.001$) MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) expression in 30 high-grade OSA samples relative to nearby stromal control tissue. Loukopoulos et al. [33] demonstrated that the synthesis of pro-MMP-9 in canine OSA positively correlates with the histologic grade of the malignancy [34]. In further investigations, Loukopoulos et al. [33] established a noticeable expression of MMP-2 and MMP-9 in three newly derived canine OSA cell lines. Unfortunately, we found no studies of MMP expression in metastatic cell lines nor metastasis in canine patients with OSA despite clear evidence of correlation between MMP-2 and MMP-9 with tumor malignancy. As a result, it cannot be clearly stated whether MMPs play an important role in the metastatic cascade of canine OSA, and further molecular and *in vivo* studies are needed.

3.4. *Vimentin*

Vimentin is a structural protein expressed in cells of mesenchymal origin and accounts for the main constituent of their cytoskeleton. Physiologically, it is involved in sustaining structural integrity, flexibility, the shape of cells, as well as the processes of migration and adhesion [35,36]. In neoplasias of epithelial origin, vimentin serves as a biomarker of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [37]. During the EMT process, epithelial cells acquire the ability to migrate and invade, which is crucial to initiate the metastatic cascade [38,39]. Despite OSA's mesenchymal origin, human OSA cells are capable of

undergoing EMT, leading to increased motility and invasiveness [40]. Overexpression of vimentin in canine OSA is suspected to be associated with increased tumor cell motility, invasiveness, and a more aggressive phenotype [41]. Roy et al. [35] noticed a higher (over 3-fold) expression of vimentin in the canine OSA metastatic cell line HMPOS versus the non-metastatic cell line POS. A similar association was observed in their human counterparts, where expression of vimentin was higher in the metastatic 143B cell line versus the non-metastatic HOS cell line, although the increase was only 1.2-fold higher [35].

3.5. Growth Factors and Their Specific Receptors

The implication of growth factors in promoting the invasive phenotype of neoplastic cells has been described in various human and canine malignancies, including OSA [42,43].

3.5.1. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Plasma VEGF is a homodimer signal protein and a member of the platelet-derived growth factor family. Physiologically, VEGF is a mitogen for cells of endothelial origin and promotes angiogenesis [44,45]. Expression of this protein in primary tumors is associated with poor prognosis and high rates of metastasis in some types of human malignancies, including carcinomas of the gastrointestinal tract, hepatocellular carcinoma, and OSA [46–48]. In human OSA tumors, the VEGFA level was positively correlated with the presence of lung metastasis [48]. In vitro studies performed by Cam et al. [23] determined that Δ Np63 contributes to the production of VEGF in canine OSA through effects on STAT3 and IL-8. Depletion of Δ Np63 in canine OSA cells resulted in a decreased level of VEGF and a noticeable reduction of endothelial tube formation in transwell endothelial tube formation assays. These findings suggest that VEGF may be involved in the metastatic cascade of canine OSA by promoting the process of angiogenesis [23].

3.5.2. Insulin Growth Factor 1 (IGF-1) and Its Receptor

IGF-1, which plays a part in promoting the metabolic and growth effects of cells, is a polypeptide structurally homologous to proinsulin [49]. Regulating the process of osteoblast proliferation, IGFs are one of the most significant growth factors in human bone tissue. In culture, both human osteoblasts and OSA cells have receptors for IGF-1 and are able to proliferate in response to IGF-1 [42]. In veterinary medicine, treating cells with IGF-1 was shown to increase invasiveness in just one of three osteosarcoma cell lines (with high insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1-R) expression) [42]. This suggests a cell line-dependent role of IGF-1 in canine OSA invasive phenotypes. Furthermore, the investigators performed studies on immunodeficient mice indicating that aggressive in vivo behavior (tumorigenesis and occurrence of metastasis) of canine osteosarcoma cells positively correlates with the expression of IGF1-R [42]. However, the study was conducted on only three mice per group, which reduced the power of the study and may be unrepresentative of the population. Data regarding IGF1-R in canine OSA is limited to one study where immunostaining was performed and showed a shorter survival time in canine appendicular OSA patients with high IGF1-R immunoexpression compared to those with low IGF1-R [19]. Unfortunately, this study lacked further information on the role of IGF-1 and IGF1-R in the metastatic cascade.

3.5.3. Transforming Growth Factor Beta (TGF β)

TGF β is a secreted cytokine that exists in isoforms: TGF β 1, 2, and 3 [50]. All of the isoforms regulate the differentiation of mesenchymal stem cells, which affects the skeletal development of embryos. Postnatally, TGF β plays a part in bone homeostasis, including differentiation, proliferation, the survival of osteoblasts, as well as the motility of their precursors [51]. Activity of TGF β is mediated by two different pathways: the canonical (Smad dependent) and non-canonical (Smad independent) [50]. In human and canine OSA, the factor is implicated in the growth, migration, and invasion of tumor cells [52,53]. The expression of transforming growth factor beta receptors (TGF β RI and

TGF β RII) in both normal osteoblasts and five malignant canine OSA cell lines indicated that the TGF β signaling pathway is not characteristic of the malignant phenotype but is active in reparative osteoblasts [53]. The authors used a WHA to assess an alteration in canine OSA cell motility after blocking a Smad-dependent TGF β -mediated pathway (through treatment with LY2109761, a small-molecule inhibitor of TGF β RI and TGF β RII). Decreased migration was evaluated as cell line dependent, with the greatest reduction in the D17 cell line, moderate in the HMPOS cell line, and minimally altered in the Abrams cell line. Complete blocking of both canonical and non-canonical signaling did not result in diametrical inhibition of cell motility [53].

3.5.4. HGF-SF and Its Receptor (Met Receptor)

HGF-SF is a heterodimer that consists of two subunits: α and β [54]. The factor is produced by cells of mesodermal origin, and for the most part impacts the biological functions of epithelial and endothelial cells [55]. HGF-SF is a mitogen for certain cell types, such as hepatocytes, keratinocytes, or kidney epithelium [54]; it also stimulates cell motility [56]. The cell surface receptor for this growth factor is the c-Met tyrosine kinase receptor, encoded by *c-MET* [54]. Normal osteoblasts and osteoclasts express c-Met, but secretion of HGF-SF occurs only in osteoclasts. The factor is an inducer of proliferation in both osteoblasts and osteoclasts, and in osteoclasts, it affects cell motility [57]. Upregulation of c-Met was described in human and canine OSA [58–60]. The expression of c-Met can be associated with the metastatic phenotype of human OSA [61]. High expression of c-Met mRNA was demonstrated with Northern Blot and real-time PCR (RT-PCR) analysis of both canine OSA cell lines [57] and five of seven canine OSA biopsies [58]. Met-inhibiting molecules (met-specific interfering RNA and small-molecule inhibitor of Met catalytic activity PHA-665752) reduced the invasiveness of canine OSA cells [60]. The data suggest a contribution of HGF and the Met receptor on the metastatic phenotype of canine osteosarcoma [58,60].

3.5.5. EGFR (ErbB1, HER1)

EGFR belongs to the family of ErbB receptor proteins, containing four members: ErbB1, ErbB2, ErbB3, and ErbB4 [43]. This transmembrane receptor consists of two domains: extracellular, which is the ligand binding domain, and cytoplasmic, which encodes the EGF-regulated tyrosine kinase [61]. The major role of tyrosine kinase is to regulate cell proliferation [62]. In tumor development, deregulation of EGFR signaling results in the enhancement of cell proliferation, motility, and angiogenesis, as well as a decrease in apoptosis [63]. In human OSA, high expression of EGFR is associated with the occurrence of distant metastases and poor outcomes [64]. A noticeably higher expression of EGFR was determined in primary and metastatic canine OSA tumors compared to normal bone tissue specimens, as well as in several canine OSA cell lines [43]. Furthermore, the expression of EGFR was significantly higher in canine primary OSA metastases to the lungs, in comparison to extrapulmonary OSA metastases. The results indicate a potential role of EGFR in promoting an aggressive phenotype in canine OSA, although a potential molecular mechanism remains undescribed [43].

3.6. Integrins

Integrins are a family of glycoprotein receptors, heterodimers consisting of two subunits: alpha and beta. Their biological function is to regulate many cellular processes, including cell adhesion, migration, and metastasis [65]. Integrins play a part in the invasiveness of tumor cells by activating MMPs and consequently inducing a disintegration of the extracellular matrix (ECM) [66]. In human medicine, high expression of β 1 integrin was shown for OSA metastatic cell lines; it was not identified in two canine OSA cell lines (non-metastatic POS and artificially generated metastatic-HMPOS [35]). However, a strong limitation of the study was that it was performed only on two OSA cell lines: POS, derived from a primary spontaneous canine femoral OSA, and the HMPOS, which was derived

from POS after serial implantation into the lungs of nude mice [67]. In veterinary medicine, RT-PCR analyses revealed that $\beta 4$ integrin seems to be associated with an invasive phenotype of canine OSA cell lines. Additionally, inducing $\beta 4$ integrin genes in non-invasive canine OSA cells led to their acquirement of an invasive phenotype [68]. However, further in vitro and in vivo studies should be performed to confirm the role of $\beta 4$ integrins in the metastatic cascade.

3.7. CD147

CD147 (basigin; EMMPRIN-extracellular MMP inducer; cluster of differentiation CD147) is a plasma membrane protein of the immunoglobulin superfamily, with variable expression in a number of cell types, such as leukocytes, hematopoietic, endothelial, and epithelial cells [69]. Physiologically, it is involved in the regulation of biological processes, such as spermatogenesis [70], lymphocyte responsiveness [71], and MMP synthesis [69]. The expression of CD147 is also described in tumors, including human and canine OSA [35,72]. Stimulating the production of MMPs in neoplasias, CD147 implicates tumor invasiveness and the promotion of metastasis [72,73]. Roy et al. [35] established a 2.12-fold change in CD147 expression in HMPOS (artificially derived metastatic cell line) versus POS (non-metastatic cell line) and further confirmed it by western blot (WB), flow cytometry, and IHC of cell pellets. Similar results were obtained for canine patient samples (although examining only two distinct sets—with five sections of each—from paired primary tumor and lung metastasis samples), although the intensity of CD147 in IHC was not as intense as that in cell lines. The obtained results suggest that CD147 may potentially be considered as a metastatic biomarker and therapeutic target in canine OSA [35]. However, further studies of more cell lines (especially primary metastatic cell lines) and many more canine samples from both primary and metastatic OSA are obligatory to confirm this hypothesis.

3.8. Collagen

Collagen is the major structural protein component of the extracellular matrix of connective tissues [74]. It is suggested that enhanced collagen density may initiate a promotion of tumorigenesis, invasion, and metastasis in human breast carcinoma [75]. In human OSA, intercommunication between tumor cells and type I collagen mediates MMP-2 synthesis and activation [76]. Forty-six percent higher expression of collagen was demonstrated in the metastatic canine OSA cell line HMPOS versus the non-metastatic cell line POS [35]. The potential role of collagen in cell migration was further confirmed by experiments treating canine OSA cells with an inhibitor of P4AH1, a protein involved in collagen biosynthesis [77]. Inhibitor-treated HMPOS cells showed a higher dependency of cell migration on collagen synthesis under normal and hypoxic conditions, in comparison with the POS cell line. Song and collaborators also established that hypoxic conditions lead to upregulation of four proteins (P4HA1, PLOD1, PLOD2, and LOX) that are involved in collagen synthesis and a remodeling pathway in metastatic HMPOS [77]. Nevertheless, the strong limitation of both of the presented studies is that they were performed only on one metastatic OSA cell line (HMPOS).

3.9. Ezrin and p-ERM

Ezrin is a membrane-cytoskeleton linker that belongs to the ERM (ezrin/radixin/moesin) family. Ezrin plays a part in various biological processes, including cell adhesion and motility. The role of this protein is to link the plasma membrane to cytoplasmatic actin filaments [78]. This molecular connection enables an interaction between cells and their microenvironment and is proven necessary for metastasis [79]. Expression of ezrin has been identified in many human malignancies, with most significant aberrations in mesenchymal neoplasias [80]. Overexpression of this protein is associated with poor outcomes and a high propensity to metastasize. Jackson et al. [68] observed a correlation between higher ezrin mRNA expression and an invasive phenotype and found that expressing

ezrin in non-invasive canine OSA cells enhanced their invasive potential. Ezrin is located in an inactive state in the cytoplasm. Phosphorylation of threonine and tyrosine at the C-terminus of the protein leads to conformational activation of its structure and enables a linkage between the C-terminus and actin cytoskeleton, as well as a connection between the N-terminus and cell membrane or its proteins [81].

Ezrin phosphorylation is regulated in a dynamic manner by protein kinase C (PKC) during metastatic progression in both human and canine OSA. To determine the involvement of PKC in the phosphorylation of ezrin in canine OSA, the WHA was performed on four patient-derived ezrin-expressing canine OSA cell lines treated with specific small-molecule inhibitor of PKC [82]. Inhibition of PKC resulted in a noticeable decrease in cellular migration. The data suggest that PKC directed ezrin phosphorylation and the consequential migration of canine OSA cells [82]. An increased expression of ezrin and p-ERM was also demonstrated in vivo in HMPOS tumor tissue that metastasize to the lungs of mice 1 week after IT transplantation [83]. The expression of p-ERM decreased after 2 and 4 weeks. A non-metastatic cell line showed low or no expression of ezrin and p-ERM [83]. These results indicate a potential association between the expression of ezrin and p-ERM, the ability of canine OSA to metastasize, and an involvement of ezrin phosphorylation in early steps of the process [83]. In canine patients, a positive expression of ezrin and p-ERM was shown in 83% of spontaneous primary canine OSA samples [80]. Unfortunately, the study was performed only on primary OSA, not metastatic disease [81]. Dogs entered the study with no evidence of pulmonary metastasis on thoracic radiographs and no clinical evidence of metastasis to the other sides. However, the likely presence of micrometastasis can be assumed. The observed increase in ezrin and p-ERM in the primary tumor, combined with results from the study of Jaroensong et al. demonstrating [83] increased ezrin and p-ERM in the first week following IT tumor transplantation, may further support the idea that ezrin and p-ERM are involved early in the metastatic process. Early involvement may allow primary tumor cells to intravasate and transport to the lungs, after which p-ERM levels decrease as the metastatic tumor is established. Nevertheless, further investigations are required to evaluate the exact role of ezrin and p-ERM in the molecular mechanisms of canine OSA lung metastasis.

3.10. Yes-Associated Protein (YAP) and Transcriptional Coactivator with PDZ-Binding Motif (TAZ)

YAP and its paralog TAZ (also called WW domain-containing transcription regulator protein 1, WWTR1) are transcriptional coactivators that play a part in the transcription of genes implicated in cell proliferation and the suppression of apoptosis [84]. These proteins are expressed in almost every human solid tumor [85]. In the metastatic processes, YAP and TAZ facilitate cell migration, enhance cell survival in circulation and at secondary sites, and promote metabolic adaptation to the new environment [86]. TAZ and YAP mediate TGF β -induced carcinoma cell invasion and motility [87]. In metastatic canine OSA cell lines, TAZ depletion resulted in a significant decline in migratory ability, as opposed to non-metastatic primary tumor-derived cell lines [87]. Additionally, simultaneous TGF β treatment lead to a noticeable reduction of migration only in the metastatic cell line, not in those of primary tumor origin [88]. The data suggest that the modulatory effect of YAP, TAZ, and TAZ-mediated TGF β signaling on migration is cell line dependent. However, the impact of TAZ on the migration of metastatic-derived canine OSA cell lines is more distinct than the effect of YAP [88].

3.11. The Tropomyosin-Related Receptor A (TrkA)

TrkA is a receptor that mediates differentiation, mitogenesis, and survival of neurons, through binding of neurotrophin growth factors [89]. It is described that inhibition of TrkA signaling results in a reduction of proliferation and enhancement of apoptosis in murine and human immortalized osteoblast cell lines. Furthermore, the TrkA signaling pathway is believed to be involved in the proliferation and survival of canine OSA cells in both local and metastatic microenvironments [90]. Fan and collaborators [90] determined

the positive membranous immunostaining of TrKA in most OSA cells in 66% (10/15) of primary bone lesions and in 75% (9/12) of spontaneously occurring canine OSA metastases, suggesting that TrKA serves as a potential therapeutic target of both primary and metastatic canine OSA [90].

3.12. C-X-C Chemokine Receptor Type 4 (CXCR-4)

CXCR-4 is associated with tissue-specific metastases in human malignancies, due to the high concentration of its endogenous ligand-CXCL12, including metastases to the lungs, bones, lymph nodes, and the liver [91]. Fan and collaborators [92] discovered high expression of CXCR-4 in canine osteosarcoma cell lines and in 2 of 10 canine OSA pulmonary metastases. In the same study, the authors assessed that ligation of CXCR4 with exogenous CXCL12 induced directional migration of canine OSA cells [92]. Byrum and collaborators [93] observed the impairment of directional migration of canine OSA cells after reduction of CXCR4 following zoledronate treatment [93]. This result is consistent with the previously described research [92] and may indicate that the CXCR-4 contribution in canine OSA directs migration as a part of the metastatic process [92,93]. Further studies of both in vitro and in vivo on more samples are needed to confirm this hypothesis.

3.13. microRNA (miR-9 and miR-34a)

Micro RNAs (miRNAs) are small single-stranded nucleic acids that regulate the expression of the protein-coding genes following transcription. Affecting genes in many molecular pathways, miRNAs regulate physiological processes significant to cell homeostasis [94]. It is well described that alterations of miRNA expression commonly occur in human neoplasias, and they can target genes involved in the genesis, progression, and metastasis of tumors [95]. In both human and canine OSA, aberrant expression of miRNA is associated with poor prognosis due to a higher risk of metastasis and decreased response to chemotherapy [96].

Fenger et al. [96] observed an upregulation of miR-9 in canine OSA cell lines and in primary OSA tumors, in comparison to normal canine osteoblasts. Canine OSA cells overexpressing miR-9 exhibited enhanced invasiveness and migration in comparison to control cells. Inhibition of miR-9 in canine OSA cells resulted in their reduced migration and invasion [97]. These findings support the presumption that miR-9 plays a role in the promotion of migration and invasion in canine OSA cells. One protein regulated by miR-9 that may promote the metastatic phenotype is gelsolin. Diminishment of gelsolin in several types of neoplastic cells resulted in a reduction of their motility [97].

Lopez et al. [98] reported decreased expression of miR-34a in canine OSA tumors and OSA cell lines in comparison to normal canine osteoblasts. OSA cells transduced with pre-miR-34a lentiviral vector show reduced invasion, cell motility, and scattering [98]. Lopez et al. [98] identified Kruppel-like factor 4 (KLF4), Semaphorin 3E (SEMA3E), and VEGFA in transduced and non-transduced OSA cells. These genes are associated with cell migration, and their transcripts are downregulated in cells with mi-R34a overexpression [98]. KLF4, SEMA3E, and VEGFA are presumed as miR-34a target genes, and the results imply that miR-34a may play a role in canine OSA metastasis by regulating their expression [98]. In further studies, Lopez and collaborators [97] showed a 50% reduction of miR-34a expression in metastatic lesions in comparison to primary tumors. However, the limited number of the analyzed samples did not enable the establishment of strong conclusions about miR-34a expression and its role in metastases of canine OSA [98].

3.14. Annexins

Annexins are cellular proteins possessing the ability to dependently bind negatively charged phospholipids on calcium [99]. Annexins consist of two domains located on COOH and NH2 terminals, which are responsible for binding cell membrane phospholipids and cytoplasmic proteins, respectively. The major role of annexins is to provide a membrane scaffold for cells [100]. In humans, studies show a negative correlation between the

expression of annexin 1 and the progression of breast carcinoma [101]. In canine OSA, Roy et al. [35] determined a significant decrease in annexin 1 production in the highly metastatic cell line HMPOS in comparison to the non-metastatic cell line POS. Conversely, the expression of annexin 2 is noticeably higher in the HMPOS cell line than in the POS cell line [35].

3.15. Tissue Factor (TF)

Tissue factor (TF) (also called thromboplastin or coagulation factor 3) is a transmembrane protein that initiates the conversion of prothrombin to thrombin in the coagulation cascade [102]. Through procoagulant and signaling activity, TF contributes to growth processes, angiogenesis, and metastasis in human malignancies, including colorectal carcinoma, breast carcinoma, melanocarcinoma, and glioblastoma [103]. Enhanced expression of this protein is correlated with shorter ST in human lung carcinoma [104]. In dogs, expression of TF is significantly higher in neoplasias of epithelial origin, such as pulmonary adenocarcinoma and mammary gland tumors, in comparison with mesenchymal malignancies like canine fibrosarcoma [105]. Stokol et al. [105] indicated a cell line-dependent expression of this protein in canine OSA. The authors noticed zero or minimal expression of TF in HMPOS and D17 cell lines, while in the OS2.4 cell line, the amount of TF resembled the expression in fibrosarcoma cells [105]. Differences in expression among particular cell lines can be associated with in vivo tumor behavior, a point Stokol and collaborators imply is indispensable for further investigations [105].

4. Conclusions

In Vitro and in vivo studies concerning canine OSA metastasis provide information on the specific biology and behavior of malignancies. Moreover, establishment of the specific factors involved in this process enables a broad understanding of its molecular mechanisms, effects on specific steps of the metastatic cascade, and may assist in the revelation of new therapeutic strategies in metastatic disease. Several proteins were examined for their role in the metastatic cascade of canine OSA (Table 1) in vitro or/and in vivo, using either induced animal models or a spontaneous canine model of the disease. The present review summarizes the results of up-to-date knowledge on genes and proteins potentially involved in canine OSA metastasis and points to further directions investigators should consider following to truly understand the molecular pathways involved in canine OSA metastasis. The strongest evidence evaluating both in vitro and in vivo studies presented for proteins involved a particular step of the metastasis cascade: EGFR for neoplastic cell migration; HGF-SF and Met-receptor for invasion; and Δ Np63, ezrin, p-ERM, Snail2, miR-9, and miR-34a for both migration and invasion. Further validation of in vitro results (on several metastatic cell lines) with in vivo methods (with a large enough sample size) is needed to portray all steps of the canine OSA metastatic process and to further develop novel therapeutic strategies.

Table 1. Proteins and genes potentially involved in canine OSA metastasis evaluated with particular in vitro and/or in vivo methods.

Protein/Gene	In Vitro		In Vivo		Step(s) of the Metastatic Cascade
	Method	Cell Lines	Method	Samples	
<i>p63</i>	qRT-PCR; WB; TIA; quantitative migration assay; WHA [23]	Abrams, OSA8, OSA16, D17 [23]	necropsy and light microscopy [23]	SCID mice [23]	invasion; migration [23]
Annexins	peptide fingerprinting [35]	HMPOS, POS [35]	-	-	Invasion; migration [106,107]
CD147	peptide fingerprinting; WB; flow cytometry; confocal microscopy; IHC [35]	HMPOS, POS [35]	IHC [35]	spontaneously occurring canine osteosarcoma [35]	Invasion [72,73]
Collagen	peptide fingerprinting [35]; WHA [35,77]; nano-Lc-MS/MS analysis, parallel reaction monitoring (pRM) MS, WB [77]	HMPOS, POS [35,77]	-	-	Migration [77]
CXCR-4	directional migration assay [92,93] RT-PCR; WB; flow cytometry; IHC [92]	POS, HMPOS, COS31, Buck, D17 [92] K003 [93]	IHC [92]	spontaneously occurring canine osteosarcoma [92]	Migration [92,93]
EGFR	WB; IHC; qRT-PCR [43]	COS31, HMPOS, POS, D17, KOS-001, KOS-002, KOS-003, KOS-004 [43]	tissue microarray; IHC; qRT-PCR [43]	spontaneously occurring canine osteosarcoma [43]	Migration [63]
Ezrin p-ERM	Matrigel IA qRT-PCR; WHA [82]	MC-KOSA, SK-KOSA, BW-KOSA [68] KOS-001, KOS-002, KOS-003, KOS-004 [82]	IHC; necropsy; [82,83]	SCID mice [82] BALB/c nude mice [83]	invasion; migration [68]
HGF-SF Met receptor	Matrigel IA [58,60]; Northern blot; qRT-PCR [58];	D17 [58,60], D22 [60] Abrams, Grey [58]	Northern blot analysis; IHC [59]	spontaneously occurring canine osteosarcoma [59]	Invasion [58,60]

Table 1. Cont.

Protein/Gene	In Vitro		In Vivo		Step(s) of the Metastatic Cascade
	Method	Cell Lines	Method	Samples	
IGF-1 IGF1-R	Matrigel IA; WB; qRT-PCR [42,68], Northern blot [42]	Abrams, Grey, D17 [42], SK-KOSA, MC-KOSA, BW-KOSA [68]	Necropsy; karyotypic analysis; [42]	athymic nude mice [42]	Invasion [42,68]
Integrins	peptide fingerprinting [35]; RT-PCR [68]	HMPOS, POS [35], MC-KOSA, SK-KOSA, BW-KOSA [68]	-	-	invasion; migration [66,68]
miR-9 miR-34a	Matrigel IA; WHA; qRT-PCR; Nano-LC/MS/MS; [97,98], WB [97]	OSA8, OSA16 [97,98], OSA2, OSA40, OSA50, Abrams, D17 [98]	qRT-PCR [98]	spontaneously occurring canine osteosarcoma [97]	invasion, migration [97,98]
Snail2	WHA [28]; qRT-PCR [108]	D17 [28], OSCA-8 [108]	fluorescent microscopy [28]	the CAM model; [28]	invasion, migration [28,109], intravasation [28]
STAT3	WB; RT-PCR; gel zymography [21]	OSA8, OSA11M, OSA16, OSA29, OSA32, D17 [21]	-	-	Invasion [21]
TF	RT-PCR; flow cytometry; immunofluorescent microscopy [105]	HMPOS, D17, OS2.4 [105]	-	-	Invasion [110]
TGFβ	WHA [53]	HMPOS, Abrams, D17 [53]	-	-	Invasion, migration [52,53]
TrKA	-	-	IHC [90]	spontaneously occurring canine osteosarcoma [90]	survival of the tumor cells in metastatic tumor microenvironment [111]
Vimentin	peptide fingerprinting; confocal microscopy; WB [35]	HMPOS, POS [35]	-	-	invasion, migration [41]
YAP and TAZ	migration transwell assay [88]	D17, OVC-cOSA31, OVC-cOSA-75, OVC-cOSA-78 [88]	-	-	Migration [85,88], survival in circulation and at the secondary sites [86]

Author Contributions: S.S.W. performed the literature search, prepared a table and figures, and wrote a major part of the manuscript. K.A.Z.-K. contributed to writing the manuscript, critically reviewed the manuscript for important intellectual content, and prepared the manuscript for publication. The manuscript is part of a Ph.D. thesis by S.S.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors acknowledge Katarzyna Purzycka DVM, DipACVIM (Oncology) for providing Figure 1A and Jarosław Balcerzak DVM from the Kochanowskiego Veterinary Practice in Warsaw for providing Figure 1B,C.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interests related to this paper.

Abbreviations

CAM	chorioallantoic membrane
CID	Collision-induced dissociation
CMV	human cytomegalovirus
CT	computed tomography
DFI	disease-free interval
ECM	extracellular matrix
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ERM	ezzrin/radixin/moesin
HGF-SF	hepatocyte growth factor-scatter factor
IA	(Matrigel) invasion assay
IGF-1	insulin growth factor 1
IGF1-R	insulin-like growth factor receptor 1
IHC	immunohistochemistry
IL-8	interleukin-8
IL-11	interleukin-11
IT	intratibial
IV	intravenous
KLF4	Kruppel-like factor 4
MiRNA	micro RNA
MMPs	metalloproteinases
MRI	magnetic resonance imaging
mRNAs	messenger RNAs
MS	mass spectrometry
OSA	osteosarcoma
OSM	oncostatin M
p-ERM	phosphorylated ezrin-radixin-moesin
PKC	Protein Kinase C
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
rhHGF	recombinant human hepatocyte growth factor
SCID mice	severe combined immunodeficient mice
SEMA3E	Semaphorin 3E
SiRNA	silenced RNA
ST	survival time
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TF	tissue factor
TGFβ	transforming growth factor beta
TWI	transwell invasion
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFA	vascular endothelial growth factor A
WB	Western blot
WHA	wound healing assay
YAP	yes-associated protein

References

1. Cavalcanti, J.N.; Amstalden, E.M.I.; Guerra, J.L.; Magna, L.C. Osteosarcoma in dogs: Clinical-morphological study and prognostic correlation. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* **2004**, *41*, 299–305. [\[CrossRef\]](#)
2. Dernell, W.S.; Straw, R.C.; Withrow, S.J. Tumors of the Skeletal System. In *Small Animal Clinical Oncology*; Withrow, S.J., MacEwen, E.G., Eds.; W.B. Saunders: Philadelphia, PA, USA, 2001; pp. 378–417.
3. Dobson, J.M.; Samuel, S.; Milstein, H.; Rogers, K.; Wood, J.L.N. Canine neoplasia in the UK: Estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J. Small Anim. Pract.* **2002**, *43*, 240–246. [\[CrossRef\]](#)
4. Egenvall, A.; Nødtvedt, A.; Euler, H. Von Bone tumors in a population of 400 000 insured Swedish dogs up to 10 y of age: Incidence and survival. *Can. J. Vet. Res.* **2007**, *71*, 292–299.
5. Rowell, J.L.; McCarthy, D.O.; Alvarez, C.E. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol. Med.* **2011**, *17*, 380–388. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Szewczyk, M.; Lechowski, R.; Zabielska, K. What do we know about canine osteosarcoma treatment?—Review. *Vet. Res. Commun.* **2015**, *39*, 61–67. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Selvarajah, G.T.; Kirpensteijn, J. Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. *Vet. J.* **2010**, *185*, 28–35. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Selmic, L.E.; Burton, J.H.; Thamm, D.H.; Withrow, S.J.; Lana, S.E. Comparison of carboplatin and doxorubicin-based chemotherapy protocols in 470 dogs after amputation for treatment of appendicular osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* **2014**, *28*, 554–563. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Gebhard, C.; Miller, I.; Hummel, K.; Neschi née Ondrovics, M.; Schlosser, S.; Walter, I. Comparative proteome analysis of monolayer and spheroid culture of canine osteosarcoma cells. *J. Proteom.* **2018**, *177*, 124–136. [\[CrossRef\]](#)
10. Hapach, L.A.; Mosier, J.A.; Wang, W.; Reinhart-King, C.A. Engineered models to parse apart the metastatic cascade. *Npj Precis. Oncol.* **2019**, *3*. [\[CrossRef\]](#)
11. Anderson, R.L.; Balasas, T.; Callaghan, J.; Coombes, R.C.; Evans, J.; Hall, J.A.; Kinrade, S.; Jones, D.; Jones, P.S.; Jones, R.; et al. A framework for the development of effective anti-metastatic agents. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2019**, *16*, 185–204. [\[CrossRef\]](#)
12. Marx, V. Models: Stretching the skills of cell lines and mice. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 617–620. [\[CrossRef\]](#)
13. Solano, L.N.; Nelson, G.L.; Ronayne, C.T.; Jonnalagadda, S.; Jonnalagadda, S.K.; Kottke, K.; Chitren, R.; Johnson, J.L.; Pandey, M.K.; Jonnalagadda, S.C.; et al. Synthesis, in vitro, and in vivo evaluation of novel N-phenylindazolyl diarylureas as potential anti-cancer agents. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
14. Wessering, M.; Drewa, T. Will In Vitro Tests Replace Animal Models in Experimental Oncology? *J. Tissue Sci. Eng.* **2011**, *2*, 2–5. [\[CrossRef\]](#)
15. Gengenbacher, N.; Singhal, M.; Augustin, H.G. Preclinical mouse solid tumour models: Status quo, challenges and perspectives. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 751–765. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Chaffee, B.K.; Allen, M.J. A clinically relevant mouse model of canine osteosarcoma with spontaneous metastasis. *In Vivo* **2013**, *27*, 599–604.
17. Kim, Y.; Williams, K.C.; Gavin, C.T.; Jardine, E.; Chambers, A.F.; Leong, H.S. Quantification of cancer cell extravasation in vivo. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 937–948. [\[CrossRef\]](#)
18. Onaciu, A.; Munteanu, R.; Munteanu, V.C.; Gulei, D.; Raduly, L.; Feder, R.I.; Pirlog, R.; Atanasov, A.G.; Korban, S.S.; Irimie, A.; et al. Spontaneous and Induced Animal Models for Cancer Research. *Diagnostics* **2020**, *10*, 660. [\[CrossRef\]](#)
19. Maniscalco, L.; Iussich, S.; Morello, E.; Martano, M.; Gattino, F.; Miretti, S.; Biolatti, B.; Accornero, P.; Martignani, E.; Sánchez-Céspedes, R.; et al. Increased expression of insulin-like growth factor-1 receptor is correlated with worse survival in canine appendicular osteosarcoma. *Vet. J.* **2015**, *205*, 272–280. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Selvarajah, G.T.; Kirpensteijn, J.; van Wolferen, M.E.; Rao, N.A.S.; Fieten, H.; Mol, J.A. Gene expression profiling of canine osteosarcoma reveals genes associated with short and long survival times. *Mol. Cancer* **2009**, *8*, 72. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Fossey, S.L.; Liao, A.T.; McCleese, J.K.; Bear, M.D.; Lin, J.; Li, P.K.; Kisseberth, W.C.; London, C.A. Characterization of STAT3 activation and expression in canine and human osteosarcoma. *BMC Cancer* **2009**, *9*, 1–15. [\[CrossRef\]](#)
22. Candi, E.; Dinsdale, D.; Rufini, A.; Salomoni, P.; Knight, R.A.; Mueller, M.; Krammer, P.H.; Melino, G. Tap63 and ΔNp63 in cancer and epidermal development. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 274–284. [\[CrossRef\]](#)
23. Cam, M.; Gardner, H.L.; Roberts, R.D.; Fenger, J.M.; Guttridge, C.; London, C.A.; Cam, H. ΔNp63 mediates cellular survival and metastasis in canine osteosarcoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 48533–48546. [\[CrossRef\]](#)
24. Aggarwal, B.B.; Sethi, G.; Kwang, S.A.; Sandur, S.K.; Pandey, M.K.; Kunnumakkara, A.B.; Sung, B.; Ichikawa, H. Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: Modern target but ancient solution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1091*, 151–169. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Haura, E.B.; Turkson, J.; Jove, R. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2005**, *2*, 315–324. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Nieto, M.A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 155–166. [\[CrossRef\]](#)
27. Sharili, A.S.; Allen, S.; Smith, K.; Hargreaves, J.; Price, J.; McGonnell, I. Expression of Snail2 in long bone osteosarcomas correlates with tumour malignancy. *Tumor Biol.* **2011**, *32*, 515–526. [\[CrossRef\]](#)
28. Sharili, A.S.; Allen, S.; Smith, K.; Price, J.; McGonnell, I.M. Snail2 promotes osteosarcoma cell motility through remodelling of the actin cytoskeleton and regulates tumor development. *Cancer Lett.* **2013**, *333*, 170–179. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

29. Joseph, M.J.; Dangi-Garimella, S.; Shields, M.A.; Diamond, M.E.; Sun, L.; Koblinkski, J.E.; Munshi, H.G. Slug is a downstream mediator of transforming growth factor- β 1-induced matrix metalloproteinase-9 expression and invasion of oral cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **2009**, *108*, 726–736. [\[CrossRef\]](#)
30. Zhang, K.; Chen, D.; Jiao, X.; Zhang, S.; Liu, X.; Cao, J.; Wu, L.; Wang, D. Slug enhances invasion ability of pancreatic cancer cells through upregulation of matrix metalloproteinase-9 and actin cytoskeleton remodeling. *Lab. Investig.* **2011**, *91*, 426–438. [\[CrossRef\]](#)
31. Verma, R.P.; Hansch, C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2223–2268. [\[CrossRef\]](#)
32. Lana, S.E.; Ogilvie, G.K.; Hansen, R.A.; Powers, B.E.; Dernell, W.S.; Withrow, S.J. Identification of matrix metalloproteinases in canine neoplastic tissue. *Am. J. Vet. Res.* **2000**, *61*, 111–114. [\[CrossRef\]](#)
33. Loukopoulos, P.; O'Brien, T.; Ghoddusi, M.; Mungall, B.A.; Robinson, W.F. Characterisation of three novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. *Res. Vet. Sci.* **2004**, *77*, 131–141. [\[CrossRef\]](#)
34. Loukopoulos, P.; Mungall, B.A.; Straw, R.C.; Thornton, J.R.; Robinson, W.F. Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. *Vet. Pathol.* **2003**, *40*, 382–394. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Roy, J.; Wycislo, K.L.; Pondenis, H.; Fan, T.M.; Das, A. Comparative proteomic investigation of metastatic and non-metastatic osteosarcoma cells of human and canine origin. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0183930. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Fuchs, E. Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function, and Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 345–382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Levin, C.; Jørgensen, T.; Forsare, C.; Ola, P.; Anna, B.; Falck, K.; Fernö, M.; Lövgren, K.; Aaltonen, K.; Rydén, L. Expression of epithelial–Mesenchymal transition—Related markers and phenotypes during breast cancer progression. *Breast Cancer Res. Treat.* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
38. Li, C.; Balazsi, G. A landscape view on the interplay between EMT and cancer metastasis. *Npj Syst. Biol. Appl.* **2018**, *4*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Revenco, T.; Nicodème, A.; Pastushenko, I.; Sznurkowska, M.K.; Latil, M.; Sotiropoulou, P.A.; Dubois, C.; Moers, V.; Lemaire, S.; de Maertelaer, V.; et al. Context Dependency of Epithelial-to-Mesenchymal Transition for Metastasis. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 1458–1468. [\[CrossRef\]](#)
40. Habel, N.; Stefanovska, B.; Carène, D.; Patiño-Garcia, A.; Lecanda, F.; Fromigué, O. CYR61 triggers osteosarcoma metastatic spreading via an IGF1R β -dependent EMT-like process. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 1–18. [\[CrossRef\]](#)
41. Amaral, C.B.; da Silva Leite, J.; Fonseca, A.B.M.; Ferreira, A.M.R. Vimentin, osteocalcin and osteonectin expression in canine primary bone tumors: Diagnostic and prognostic implications. *Mol. Biol. Rep.* **2018**, *45*, 1289–1296. [\[CrossRef\]](#)
42. MacEwen, E.G.; Pastor, J.; Kutzke, J.; Tsan, R.; Kurzman, I.D.; Thamm, D.H.; Wilson, M.; Radinsky, R. IGF-1 receptor contributes to the malignant phenotype in human and canine osteosarcoma. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *92*, 77–91. [\[CrossRef\]](#)
43. Selvarajah, G.T.; Verheije, M.H.; Kik, M.; Slob, A.; Rottier, P.J.M.; Mol, J.A.; Kirpensteijn, J. Expression of epidermal growth factor receptor in canine osteosarcoma: Association with clinicopathological parameters and prognosis. *Vet. J.* **2012**, *193*, 412–419. [\[CrossRef\]](#)
44. Gospodarowicz, D.; Abraham, J.A.; Schilling, J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7311–7315. [\[CrossRef\]](#)
45. Henzel, W.J.; Ferrara, N. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *161*, 851–858.
46. Maeda, K.; Chung, Y.S.; Ogawa, Y.; Kang, S.M.; Ogawa, M.; Sawada, T.; Sowa, M. Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Gastric Carcinoma. *Cancer Interdiscip. Int. J. Am. Cancer Soc.* **1996**, *77*, 858–863. [\[CrossRef\]](#)
47. Jinno, K.; Tanimizu, M.; Hyodo, I.; Nishikawa, Y.; Hosokawa, Y. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is a possible tumor marker for metastasis in human hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* **1998**, *33*, 376–382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Kaya, M.; Wada, T.; Akatsuka, T.; Kawaguchi, S.; Nagoya, S.; Shindoh, M.; Higashino, F.; Mezawa, F.; Okada, F.; Ishii, S. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 572–577.
49. Pollak, M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 915–928. [\[CrossRef\]](#)
50. Derynck, R.; Akhurst, R.J.; Balmain, A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* **2001**, *29*, 117–129. [\[CrossRef\]](#)
51. Wu, M.; Chen, G.; Li, Y. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* **2016**, *4*, 16009. [\[CrossRef\]](#)
52. Li, S.; Li, F.; Cheng, T. TGF- β 1 promotes osteosarcoma cell migration and invasion through the miR-143-versican pathway. *Cell Physiol. Biochem.* **2014**, *34*, 2169–2179. [\[CrossRef\]](#)
53. Portela, R.F.; Fadl-Alla, B.A.; Pondenis, H.C.; Byrum, M.L.; Garrett, L.D.; Wycislo, K.L.; Borst, L.B.; Fan, T.M. Pro-tumorigenic effects of transforming growth factor beta 1 in canine osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* **2014**, *28*, 894–904. [\[CrossRef\]](#)
54. Galimi, F.; Brizzi, M.F.; Comoglio, P.M. The hepatocyte growth factor and its receptor. *Stem Cells* **1993**, *11*, 22–30. [\[CrossRef\]](#)
55. Sonnenberg, E.; Meyer, D.; Weidner, K.M.; Birchmeier, C. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J. Cell Biol.* **1993**, *123*, 223–235. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

56. Bussolino, F.; Di Renzo, M.F.; Ziche, M.; Bocchietto, E.; Olivero, M.; Naldini, L.; Gaudino, G.; Tamagnone, L.; Coffer, A.; Comoglio, P.M. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J. Cell Biol.* **1992**, *119*, 629–641. [\[CrossRef\]](#)
57. Grano, M.; Galimi, F.; Zamboni, G.; Colucci, S.; Cottone, E.; Zallone, A.Z.; Comoglio, P.M. Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 7644–7648. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. 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* **2003**, *20*, 421–430. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Ferracini, R.; Angelini, P.; Cagliero, E.; Linari, A.; Martano, M.; Wunder, J.; Buracco, P. MET Oncogene Aberrant Expression in Canine Osteosarcoma. *J. Bone Jt. Surg. Am.* **2000**, *82*, 48. [\[CrossRef\]](#)
60. De Maria, R.; Miretti, S.; Iussich, S.; Olivero, M.; Morello, E.; Bertotti, A.; Christensen, J.G.; Biolatti, B.; Levine, R.A.; Buracco, P.; et al. Met Oncogene Activation Qualifies Spontaneous Canine Osteosarcoma as a Suitable Pre-Clinical Model of Human Osteosarcoma. *J. Pathol.* **2009**, *218*, 399–408. [\[CrossRef\]](#)
61. Oda, Y.; Naka, T.; Takeshita, M.; Iwamoto, Y.; Tsuneyoshi, M. Comparison of histological changes and changes in nm23 and c-MET expression between primary and metastatic sites in osteosarcoma: A clinicopathologic and immunohistochemical study. *Hum. Pathol.* **2000**, *31*, 709–716. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Cohen, S.; Carpenter, G. Epidermal Growth Factor. *Biochemistry* **1990**, *265*, 7709–7712.
63. Wu, H.; Muscato, N.E.; Gonzalez, A.; Shyr, Y. An EGFR and AKT Signaling Pathway was Identified with Mediation Model in Osteosarcomas Clinical Study. *Biomark. Insights* **2007**, *2*. [\[CrossRef\]](#)
64. Wang, S.L.; Zhong, G.X.; Wang, X.W.; Yu, F.Q.; Weng, D.F.; Wang, X.X.; Lin, J.H. Prognostic significance of the expression of HER family members in primary osteosarcoma. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 2185–2194. [\[CrossRef\]](#)
65. Giancotti, F.G.; Ruoslahti, E. Integrin Signaling. *Science* **1999**, *285*, 1028–1033. [\[CrossRef\]](#)
66. Stefanidakis, M.; Koivunen, E. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: Role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood* **2006**, *108*, 1441–1450. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Barroga, E.F.; Kadosawa, T.; Okumura, M.; Fujinaga, T. Establishment and Characterization of the Growth and Pulmonary Metastasis of a Highly Lung Metastasizing Cell Line from Canine Osteosarcoma in Nude Mice. *J. Vet. Med. Sci.* **1999**, *61*, 361–367. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Jackson, M.; Serada, N.; Sheehan, M.; Srinivasan, S.; Mason, N.; Id, M.G.; Avadhani, N. Mitochondrial genome and functional defects in osteosarcoma are associated with their aggressive phenotype. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0209489. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Yurchenko, V.; Constant, S.; Bukrinsky, M. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. *Immunology* **2006**, *117*, 301–309. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Saxena, D.K.; Oh-Oka, T.; Kadomatsu, K.; Muramatsu, T.; Toshimori, K. Behaviour of a sperm surface transmembrane glycoprotein basigin during epididymal maturation and its role in fertilization in mice. *Reproduction* **2002**, *123*, 435–444. [\[CrossRef\]](#)
71. Igakura, T.; Kadomatsu, K.; Taguchi, O.; Muramatsu, H.; Kaname, T.; Miyauchi, T.; Yamamura, K.I.; Arimura, K.; Muramatsu, T. Roles of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in behavior as to an irritating odor, lymphocyte response, and blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *224*, 33–36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Lu, Q.; Lv, G.; Kim, A.; Ha, J.M.; Kim, S. Expression and clinical significance of extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN/CD147, in human osteosarcoma. *Oncol. Lett.* **2012**, *5*, 201–207. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Su, J.; Chen, X.; Kanekura, T. A CD147-targeting siRNA inhibits the proliferation, invasiveness, and VEGF production of human malignant melanoma cells by down-regulating glycolysis. *Cancer Lett.* **2009**, *273*, 140–147. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Di Lullo, G.A.; Sweeney, S.M.; Körkkö, J.; Ala-Kokko, L.; San Antonio, J.D. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4223–4231. [\[CrossRef\]](#)
75. Provenzano, P.P.; Inman, D.R.; Eliceiri, K.W.; Knittel, J.G.; Yan, L.; Rueden, C.T.; White, J.G.; Keely, P.J. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med.* **2008**, *6*, 1–15. [\[CrossRef\]](#)
76. Elenjord, R.; Allen, J.B.; Johansen, H.T.; Kildalsen, H.; Svineng, G.; Mælandsmo, G.M.; Loennechen, T.; Winberg, J.O. Collagen i regulates matrix metalloproteinase-2 activation in osteosarcoma cells independent of S100A4. *FEBS J.* **2009**, *276*, 5275–5286. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Song, Z.; Pearce, M.C.; Jiang, Y.; Yang, L.; Goodall, C.; Miranda, C.L.; Milovancev, M.; Bracha, S.; Kolluri, S.K.; Maier, C.S. Delineation of hypoxia-induced proteome shifts in osteosarcoma cells with different metastatic propensities. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 727. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Fehon, R.G.; McClatchey, A.I.; Bretscher, A. Organizing the cell cortex: The role of ERM proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 276–287. [\[CrossRef\]](#)
79. Algrain, M.; Turunen, O.; Vaheri, A.; Louvard, D.; Arpin, M. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J. Cell Biol.* **1993**, *120*, 129–140. [\[CrossRef\]](#)
80. Bruce, B.; Khanna, G.; Ren, L.; Landberg, G.; Jirström, K.; Powell, C.; Borczuk, A.; Keller, E.T.; Wojno, K.J.; Meltzer, P.; et al. Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers. *Clin. Exp. Metastasis* **2007**, *24*, 69–78. [\[CrossRef\]](#)
81. Khanna, C.; Wan, X.; Bose, S.; Cassaday, R.; Olomu, O.; Mendoza, A.; Yeung, C.; Gorlick, R.; Hewitt, S.M.; Helman, L.J. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 182–186. [\[CrossRef\]](#)
82. Hong, S.H.; Osborne, T.; Ren, L.; Briggs, J.; Mazcko, C.; Burkett, S.S.; Khanna, C. Protein kinase C regulates ezrin-radixin-moesin phosphorylation in canine osteosarcoma cells. *Vet. Comp. Oncol.* **2011**, *9*, 207–218. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

83. Jaroensong, T.; Endo, Y.; Lee, S.J.; Kamida, A.; Mochizuki, M.; Nishimura, R.; Sasaki, N.; Nakagawa, T. Effects of transplantation sites on tumour growth, pulmonary metastasis and ezrin expression of canine osteosarcoma cell lines in nude mice. *Vet. Comp. Oncol.* **2012**, *10*, 274–282. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Huang, J.; Wu, S.; Barrera, J.; Matthews, K.; Pan, D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila homolog of YAP. *Cell* **2005**, *122*, 421–434. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Zancanato, F.; Cordenonsi, M.; Piccolo, S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 783–803. [\[CrossRef\]](#)
86. Zancanato, F.; Cordenonsi, M.; Piccolo, S. YAP and TAZ: A signalling hub of the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 454–464. [\[CrossRef\]](#)
87. Hiemer, S.E.; Szymaniak, A.D.; Varelas, X. The transcriptional regulators TAZ and YAP direct transforming growth factor β -induced tumorigenic phenotypes in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 13461–13474. [\[CrossRef\]](#)
88. Luu, A.K.; Schott, C.R.; Jones, R.; Poon, A.C.; Golding, B.; Hamed, R.; Dehesi, B.; Mutsaers, A.; Wood, G.A.; Vilorio-Petit, A.M. An evaluation of TAZ and YAP crosstalk with TGF β signalling in canine osteosarcoma suggests involvement of hippo signalling in disease progression. *BMC Vet. Res.* **2018**, *14*, 1–22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Reichardt, L.F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2006**, *361*, 1545–1564. [\[CrossRef\]](#)
90. Fan, T.M.; Barger, A.M.; Sprandel, I.T.; Fredrickson, R.L. Investigating TrkA expression in canine appendicular osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* **2008**, *22*, 1181–1188. [\[CrossRef\]](#)
91. Burger, J.A.; Kipps, T.J. CXCR4: A key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* **2006**, *107*, 1761–1767. [\[CrossRef\]](#)
92. Fan, T.M.; Barger, A.M.; Fredrickson, R.L.; Fitzsimmons, D.; Garrett, L.D. Investigating CXCR4 expression in canine appendicular osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* **2008**, *22*, 602–608. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Byrum, M.L.; Pondenis, H.C.; Fredrickson, R.L.; Wycislo, K.L.; Fan, T.M. Downregulation of CXCR4 Expression and Functionality After Zoledronate Exposure in Canine Osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* **2016**, 1187–1196. [\[CrossRef\]](#)
94. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **2004**, *431*, 350–355. [\[CrossRef\]](#)
95. Garzon, R.; Marcucci, G.; Croce, C.M. Targeting microRNAs in cancer: Rationale, strategies and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 775–789. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
96. Sahabi, K.; Selvarajah, G.T.; Abdullah, R.; Kqueen Cheah, Y.; Chin Tan, G. Comparative aspects of microRNA expression in canine and human cancers. *J. Vet. Sci.* **2018**, *19*, 162–171. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
97. Fenger, J.M.; Roberts, R.D.; Iwenofu, O.H.; Bear, M.D.; Zhang, X.; Couto, J.I.; Modiano, J.F.; Kisseberth, W.C.; London, C.A. MiR-9 is overexpressed in spontaneous canine osteosarcoma and promotes a metastatic phenotype including invasion and migration in osteoblasts and osteosarcoma cell lines. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 1–19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
98. Lopez, C.M.; Yu, P.Y.; Zhang, X.; Yilmaz, A.S.; London, C.A.; Fenger, J.M. MiR-34a regulates the invasive capacity of canine osteosarcoma cell lines. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0190086. [\[CrossRef\]](#)
99. Ghoshdastider, U.; Popp, D.; Burtinick, L.D.; Robinson, R.C. The expanding superfamily of gelsolin homology domain proteins. *Cytoskeleton* **2013**, *70*, 775–795. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
100. Gerke, V.; Moss, S. Annexins: From structure to function. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 331–371. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
101. Wang, L.; Bi, J.; Yao, C.; Xu, D.; Li, X.; Wang, S.; Li, L.; Zhang, D.; Wang, M.; Chang, G. Annexin A1 expression and its prognostic significance in human breast cancer. *Neoplasma* **2010**, *57*, 253–259. [\[CrossRef\]](#)
102. Bogdanov, V.Y.; Balasubramanian, V.; Hathcock, J.; Vele, O.; Lieb, M.; Nemerson, Y. Alternatively spliced human tissue factor: A circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 458–462. [\[CrossRef\]](#)
103. Rak, J.; Milsom, C.; Yu, J. Tissue factor in cancer. *Curr. Opin. Hematol.* **2008**, *15*, 522–528. [\[CrossRef\]](#)
104. Regina, S.; Valentin, J.B.; Lachot, S.; Lemarié, E.; Rollin, J.; Gruel, Y. Increased tissue factor expression is associated with reduced survival in non-small cell lung cancer and with mutations of TP53 and PTEN. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 1834–1842. [\[CrossRef\]](#)
105. Stokol, T.; Daddona, J.L.; Mubayed, L.S.; Trimpert, J.; Kang, S. Evaluation of tissue factor expression in canine tumor cells. *Am. J. Vet. Res.* **2011**, *72*, 1097–1106. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Kpetemey, M.; Dasgupta, S.; Rajendiran, S.; Das, S.; Gibbs, L.D.; Shetty, P.; Gryczynski, Z.; Vishwanatha, J.K. MIEN1, a novel interactor of Annexin A2, promotes tumor cell migration by enhancing AnxA2 cell surface expression. *Mol. Cancer* **2015**, *14*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
107. Zhao, C.; Zheng, S.; Yan, Z.; Deng, Z. CCL18 promotes the invasion and metastasis of breast cancer through Annexin A2. *Oncol. Rep.* **2020**, *43*, 571–580. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
108. Bulla, S.C.; Badial, P.R.; Silva, R.C.; Lunsford, K.; Bulla, C. Platelets Inhibit Migration of Canine Osteosarcoma Cells. *J. Comp. Pathol.* **2016**, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
109. Niinaka, Y.; Harada, K.; Fujimuro, M.; Oda, M.; Haga, A.; Hosoki, M.; Uzawa, N.; Arai, N.; Yamaguchi, S.; Yamashiro, M.; et al. Silencing of autocrine motility factor induces mesenchymal to epithelial transition and suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 9483–9493. [\[CrossRef\]](#)
110. Morris, D.R.; Ding, Y.; Ricks, T.K.; Gullapalli, A.; Wolfe, B.L.; Trejo, J. Protease-Activated Receptor-2 Is Essential for Factor VIIa and Xa—Induced Signaling, Migration, and Invasion of Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 307–315. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
111. Astolfi, A.; Nanni, P.; Landuzzi, L.; Ricci, C.; Nicoletti, G.; Rossi, I. An anti-apoptotic role for NGF receptors in human rhabdomyosarcoma. *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 1719–1725. [\[CrossRef\]](#)

Lek.wet.Sylwia Wilk

Laboratorium Nanoonkologii Doświadczalnej i Klinicznej
Katedra Chorób Małych Zwierząt i Klinika
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

sylwia_wilk@sggw.edu.pl

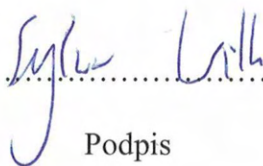
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Główniej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wilk, S. S., & Zabielska-Koczywas, K. A. (2021). Molecular Mechanisms of Canine Osteosarcoma Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3639.
<https://doi.org/10.3390/ijms22073639>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu przeglądu literatury, przygotowaniu tabel i rycin oraz napisaniu zasadniczej części manuskryptu.

.....

Podpis

Warszawa, dn.21.07.2025 r.

Dr hab.Katrzyzna Zabielska-Koczywās

Laboratorium Nanoonkologii Doświadczałnej i Klinicznej
Katedra Chorób Małych Zwierząt i Klinika
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

katarzyna_zabielska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Główniej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wilk, S. S., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2021). Molecular Mechanisms of Canine Osteosarcoma Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3639.
<https://doi.org/10.3390/ijms22073639>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współtworzeniu manuskryptu, krytycznym przeglądzie treści naukowej oraz przygotowaniu wersji manuskryptu do publikacji.



Podpis



Article

Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration

Sylwia S. Wilk¹, Katarzyna Michalak², Ewelina P. Owczarek^{1,3}, Stanisław Winiarczyk^{2,4}
and Katarzyna A. Zabielska-Koczywās^{1,*} 

¹ Department of Small Animal Diseases and Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159c, 02-787 Warsaw, Poland; sylwia_wilk@sggw.edu.pl (S.S.W.); ewoczarek@iimcb.gov.pl (E.P.O.)

² Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, University of Life Sciences, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland; katarzyna.michalak@up.lublin.pl (K.M.); stanislaw.winiarczyk@up.lublin.pl (S.W.)

³ Laboratory of RNA Biology, International Institute of Molecular and Cell Biology in Warsaw, 4 Ks. Trojdena, 02-109 Warsaw, Poland

⁴ National Veterinary Research Institute, Aleja Partyzantów 5, 24-100 Puławy, Poland

* Correspondence: katarzyna_zabielska@sggw.edu.pl; Tel.: +48-502-344-488

Abstract: Canine osteosarcoma (OSA) is an aggressive bone neoplasia with high metastatic potential. Metastasis is the main cause of death associated with OSA, and there is no current treatment available for metastatic disease. Proteomic analyses, including matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry (MALDI TOF/TOF MS), are widely used to select molecular targets and identify proteins that may play a key role in primary tumours and at various steps of the metastatic cascade. The main aim of this study was to identify proteins differently expressed in canine OSA cell lines with different malignancy phenotypes (OSCA-8 and OSCA-32) compared to canine osteoblasts (CnOb). The intermediate aim of the study was to compare canine OSA cell migration capacity and assess its correlation with the malignancy phenotypes of each cell line. Using MALDI-TOF/TOF MS analyses, we identified eight proteins that were significantly differentially expressed ($p \leq 0.05$) in canine OSA cell lines compared to CnOb: cilia- and flagella-associated protein 298 (CFAP298), general transcription factor II-I (GTF2I), mirror-image polydactyly gene 1 protein (MIPOL1), alpha-2 macroglobulin (A2M), phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1), ubiquitin (UB2L6), ectodysplasin-A receptor-associated adapter protein (EDARADD), and leucine-rich-repeat-containing protein 72 (LRRC72). Using the Simple Western technique, we confirmed high A2M expression in CnOb compared to OSCA-8 and OSCA-32 cell lines (with intermediate and low A2M expression, respectively). Then, we confirmed the role of A2M in cancer cell migration by demonstrating significantly inhibited OSA cell migration by treatment with A2M (both at 10 and 30 mM concentrations after 12 and 24 h) in a wound-healing assay. This study may be the first report indicating A2M's role in OSA cell metastasis; however, further in vitro and in vivo studies are needed to confirm its possible role as an anti-metastatic agent in this malignancy.

Keywords: A2M; canine osteosarcoma; MALDI-TOF/TOF MS; Simple Western; wound-healing assay



Citation: Wilk, S.S.; Michalak, K.; Owczarek, E.P.; Winiarczyk, S.; Zabielska-Koczywās, K.A. Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 3989. <https://doi.org/10.3390/ijms25073989>

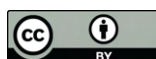
Academic Editor: Claudio Di Cristofano

Received: 13 February 2024

Revised: 25 March 2024

Accepted: 29 March 2024

Published: 3 April 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Osteosarcoma (OSA) is a mesenchymal-derived malignancy and the most common primary bone neoplasia in dogs [1]. The tumour is highly aggressive, and most affected animals die due to lung metastasis within 3–12 months of diagnosis, despite treatment [2]. Currently, methods of canine OSA therapy include surgery (either limb amputation or limb-sparing surgery), radiotherapy, and chemotherapy [3]. Currently, there are no available methods for OSA metastasis treatment. The process of metastasis is complex and consists of five main stages: (1) local invasion and migration, (2) intravasation, (3) survival during circulation, (4) extravasation, and (5) outgrowth at a secondary site [4]. Knowledge of

molecular targets for metastasis in OSA may enhance future treatment strategies. However, little is known about the genes and proteins involved in each step of the metastatic cascade. Evidence has been shown for the involvement of the epithelial growth factor receptor (EGFR) in neoplastic cell migration; hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and c-Met-receptor for invasion; and Δ Np63, ezrin, phosphorylated ezrin–radixin–moesin (p-ERM), Snail2, miR-9, and miR-34a for both migration and invasion [5]. However, the correlation between mRNA levels and protein concentrations remains typically poor and may be associated with post-transcriptional, translational, and degradation regulation and their role in determining protein concentrations [6,7]. Consequently, genome-wide expression studies should be followed by analyses of particular protein products using direct proteomics techniques, including mass spectrometry [7].

Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight spectrometry (MALDI-TOF/TOF MS) is applied to the analysis of biomolecules including carbohydrates, DNA chains, peptides, and proteins [8]. The method has been widely used in biology, especially in identifying microorganisms [9]. This technique's utility in canine and feline oncological studies has been reported for canine mammary carcinomas and feline fibrosarcomas [10,11]. Klopfeisch et al. [10] identified 21 proteins that were significantly differentially expressed in metastatic and non-metastatic canine mammary carcinomas. Most of these proteins are associated with biological functions linked to metastatic spread such as cell adhesion, extracellular matrix modulation, and hypoxia resistance, making them potentially new markers for metastatic mammary carcinomas [10]. Zabielska-Koczywas et al. [11] identified three significantly ($p \leq 0.05$) differentially expressed proteins (annexin A5 (ANXA5), annexin A3 (ANXA3), and meiosis-specific nuclear structural protein 1 (MNS1)) in doxorubicin-resistant fibrosarcomas compared to doxorubicin-sensitive ones, and claimed that they may be involved in the chemotherapy resistance of feline fibrosarcomas. Our main aim for this study was to identify proteins that are differentially expressed in canine OSA cell lines (OSCA-8 and OSCA-32) with different phenotypes of aggressiveness, and CnOb. We also sought to validate the roles of selected proteins in cancer cell migration, an important step in the metastatic cascade. Our intermediate aim for this study was to compare OSCA-8 and OSCA-32 cell migration capacity and assess their correlation with malignancy phenotypes from each cell line. Our comprehensive proteomic analyses of OSA cells with different molecular phenotypes of aggressiveness expanded our knowledge of tumour biology and could be a first step toward targeted therapy [12]. To the best of our knowledge, we are the first to perform proteomic analyses of canine OSA cell lines and CnOb using MALDI TOF/TOF MS analyses.

2. Results

2.1. Proteins Differently Expressed in Canine OSA Cells in Comparison to Osteoblasts

Eight out of two thousand protein spots detected in the process of two-dimensional electrophoresis (2DE) were selected and identified using MALDI TOF/TOF MS analyses as significantly differentially expressed ($p \leq 0.05$) in canine OSA cell lines (OSCA-8 and OSCA-32) compared to CnOb (Table 1). Two of these, cilia- and flagella-associated protein 298 (CFAP298) and general transcription factor II-I (GTF2I), were upregulated in OSA cell lines, while six proteins, namely mirror-image polydactyly 1 protein (MIPOL1), alpha-2-macroglobulin (A2M), phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1), ubiquitin (UB2L6), ectodysplasin-A receptor-associated adapter protein (EDARADD), and leucine-rich-repeat-containing protein 72 (LRRC72), were downregulated in OSA cells compared to the control (Figures 1 and 2). Figure 1 shows an example of polyacrylamide gel with marked spots. The top-scoring results were obtained from species including humans (*Homo sapiens*), mice (*Mus musculus*), and domestic cattle (*Bos taurus*). These results can be explained by the limited availability of dog sequences in the Swiss-Prot database used in our research (www.uniprot.org, accessed on 3 December 2020).

Table 1. Significantly ($p \leq 0.05$) differentially expressed proteins in canine osteosarcoma cells (for OSCA-8 and OSCA-32 cell lines) versus canine osteoblasts (CnOb) identified using MALDI-TOF/TOF MS.

ID	Protein	Accession Number (UniProtKB)	Score	Match	MW (Da) **	pI *	Modif.	Seq. Cov (%)	Rt CnOb/OSCA-32	Rt CnOb/OSCA-8
1	Ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2	O14933	95	6	17,757	7.71	C, Ac, Ox	26	0.664	0.383
2	Leucine-rich-repeat-containing protein 72	A6NJI9	150	14	33,863	8.91	C, Ac, Ox	36	0.471	0.287
3	General transcription factor II-I	A7MB80	84	13	110,569	7.13	C, Ac, Ox	14	4.14	8.65
4	Cilia- and flagella-associated protein 298	P57076	68	10	33,374	6.99	C, Ac	27	3.78	6.46
5	Mirror-image polydactyly 1 protein	Q8TD10	105	11	51,847	5.55	C, Ac, Ox	17	0.56	0.60
6	Alpha-2-macroglobulin	Q7SIH1	158	14	168,953	5.71	C, Ac, Ox	17	0.19	0.48
7	Leucine-rich repeat receptor associated adapter protein	Q8VHX2	74	5	24,251	5.04	C, Ac, Ox	33	0.59	0.23
8	Phosphoglycerate mutase 1	Q3SZ62	77	10	28,852	6.67	C, Ac, Ox	37	0.71	0.64

Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 3989 FOR PEER REVIEW 3 of 18

(*Homosapiens*), mice (*Musmusculus*), and domestic cattle (*Bos taurus*). These results can be explained by the limited availability of dog sequences in the Swiss-Prot database used in our research (www.uniprot.org, accessed on 3 December 2020).

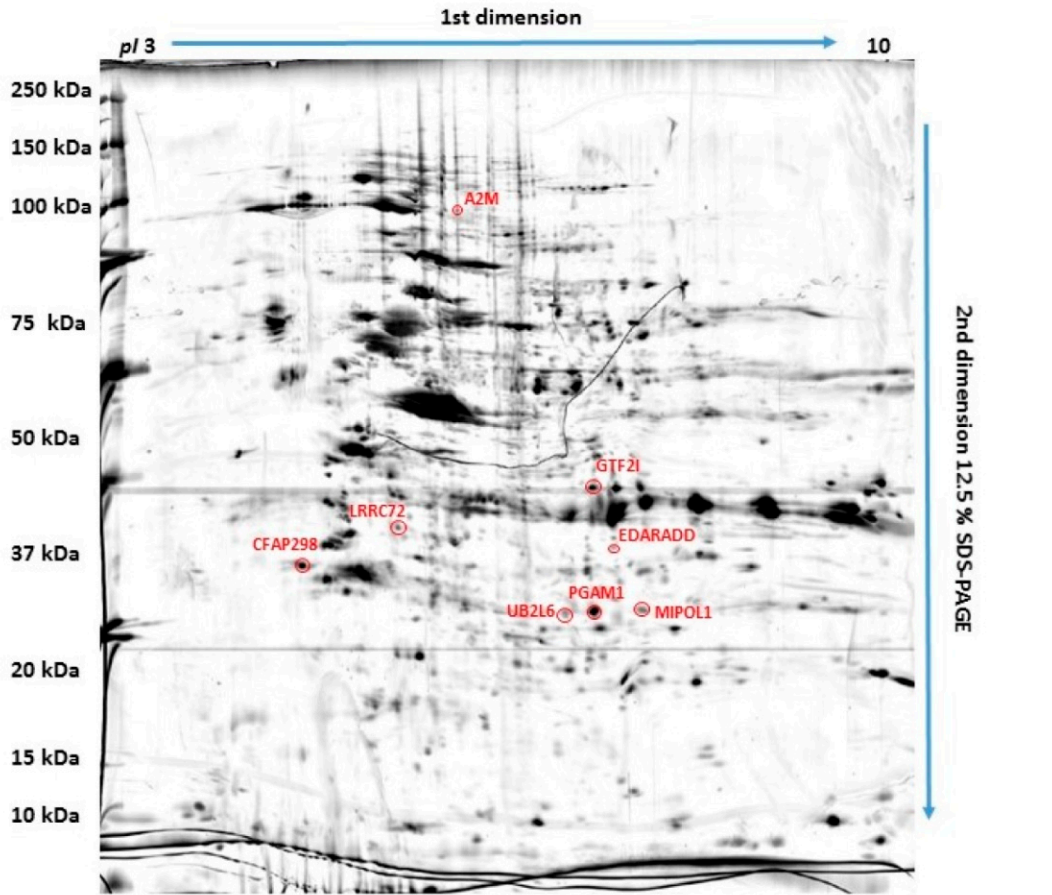


Figure 1. Polyacrylamide gel with eight red-marked protein spots which were selected as significantly differentially expressed in osteosarcoma cells compared to canine osteoblasts.

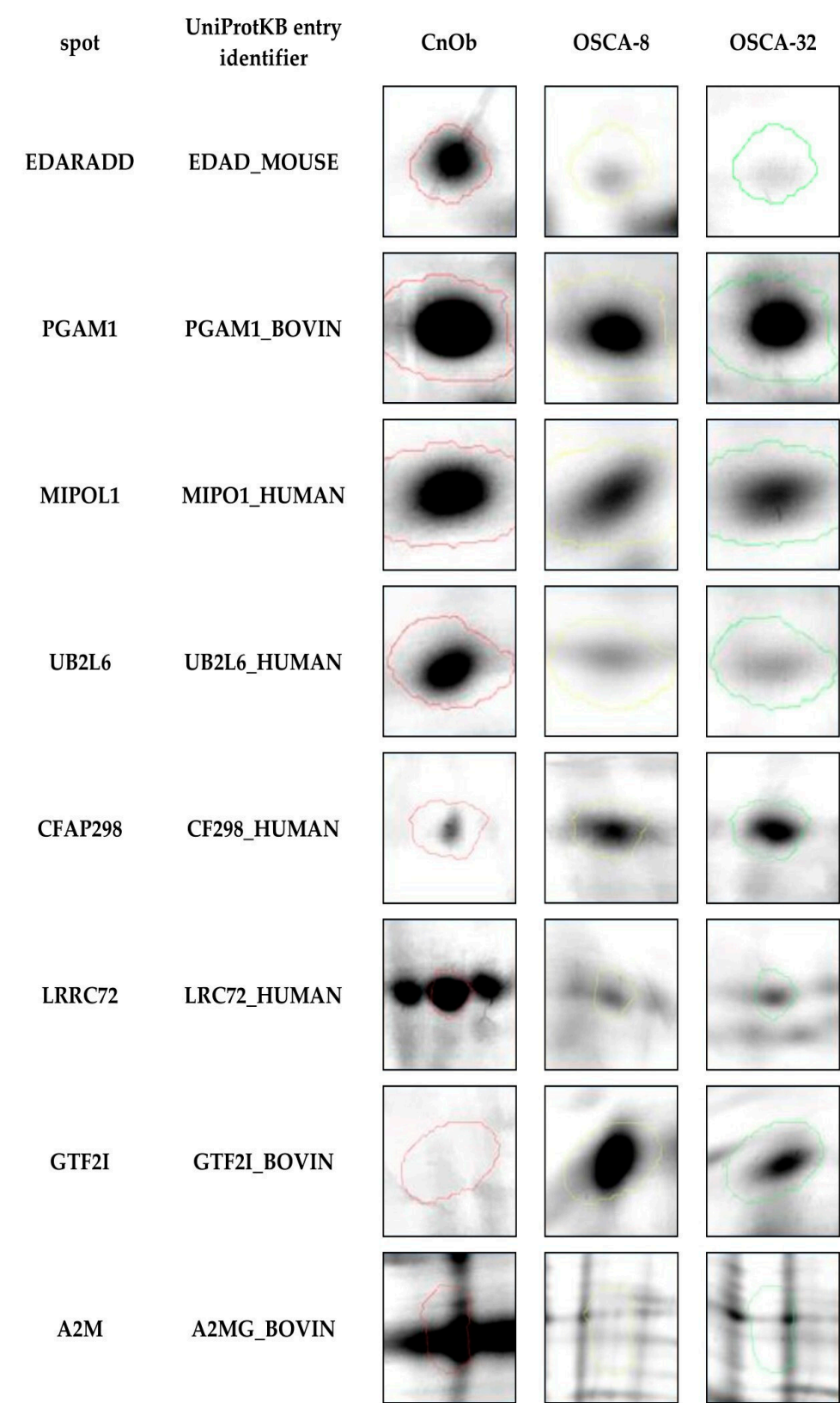


Figure 2. Representative two-dimensional electrophoresis gels of significantly (p < 0.05) differentially expressed proteins in canine cells (from the OSCA-8 and OSCA-32 cell lines) versus canine osteoblasts (CnOb).

2.2. Expression of A2M Protein in Canine OSA Cell Lines and CnOb

Primary antibody validation for the Simple Western technique, including antibody saturation and protein linear range assessment, is essential for performing protein expression analyses. The primary A2M antibody MAB1938 (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) saturation reached a minimum of 90% using a dilution of 1:6.25. The protein linear range was assessed for all samples (OSCA-8, OSCA-32, and CnOb) with a 1:6.25 antibody concentration between 0.2 and 0.5 mg/mL (Supplementary Figure S1). The Simple Western analyses showed high A2M expression in CnOb, and low and intermediate A2M expression in the OSCA-32 and OSCA-8 cell lines, respectively (Figure 3). The positive control for A2M expression is shown in Supplementary Figure S1.

Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, x FOR PEER REVIEW

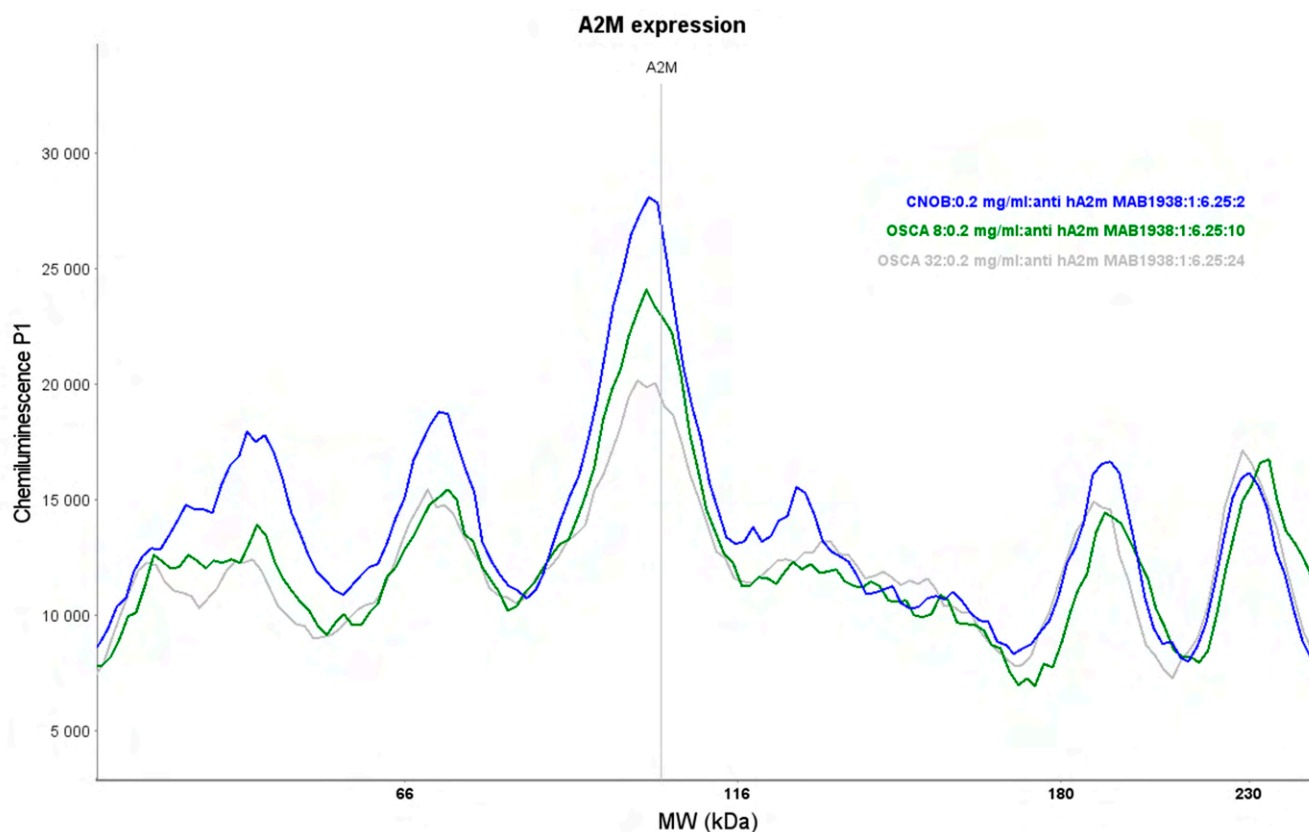


Figure 3: The Simple Western assessment of A2M expression in CnOb (blue line) as well as the OSCA-8 (green line) and OSCA-32 (grey line) cell lines.

2.3. The Influence of A2M on the Migration Rate of OSCA-8 and OSCA-32 Cell Lines

An *in vitro* wound-healing assay was used to analyse the A2M protein's inhibition of OSCA-8 and OSCA-32 cell migration. In the cell lines, both the applied concentrations (10 mM and 30 mM) of A2M significantly ($p \leq 0.0001$ after 12 h and $p \leq 0.0001$ after 24 h) inhibited cancer cell migration compared to the control (without A2M) (Figure 4). Additionally, in the wound-healing assay, we evaluated the migration of OSCA-8 (highly malignant phenotype phenotypic cells) and OSCA-32 (intermediately malignant phenotype phenotypic cells) of OSCA cells compared to CnOb (Figure 5). The migration rates of OSCA cells were significantly higher ($p < 0.001$) than of the control (Figure 5). Moreover, 24 h (Figure 5) rate was significantly higher ($p < 0.001$) than of the control (Figure 5). Moreover, the migration rate was significantly higher (OSCA-8 cells) in highly malignant OSCA-8 cells than in intermediately malignant OSCA-32 cells at $t = 12$ h (Figure 5).

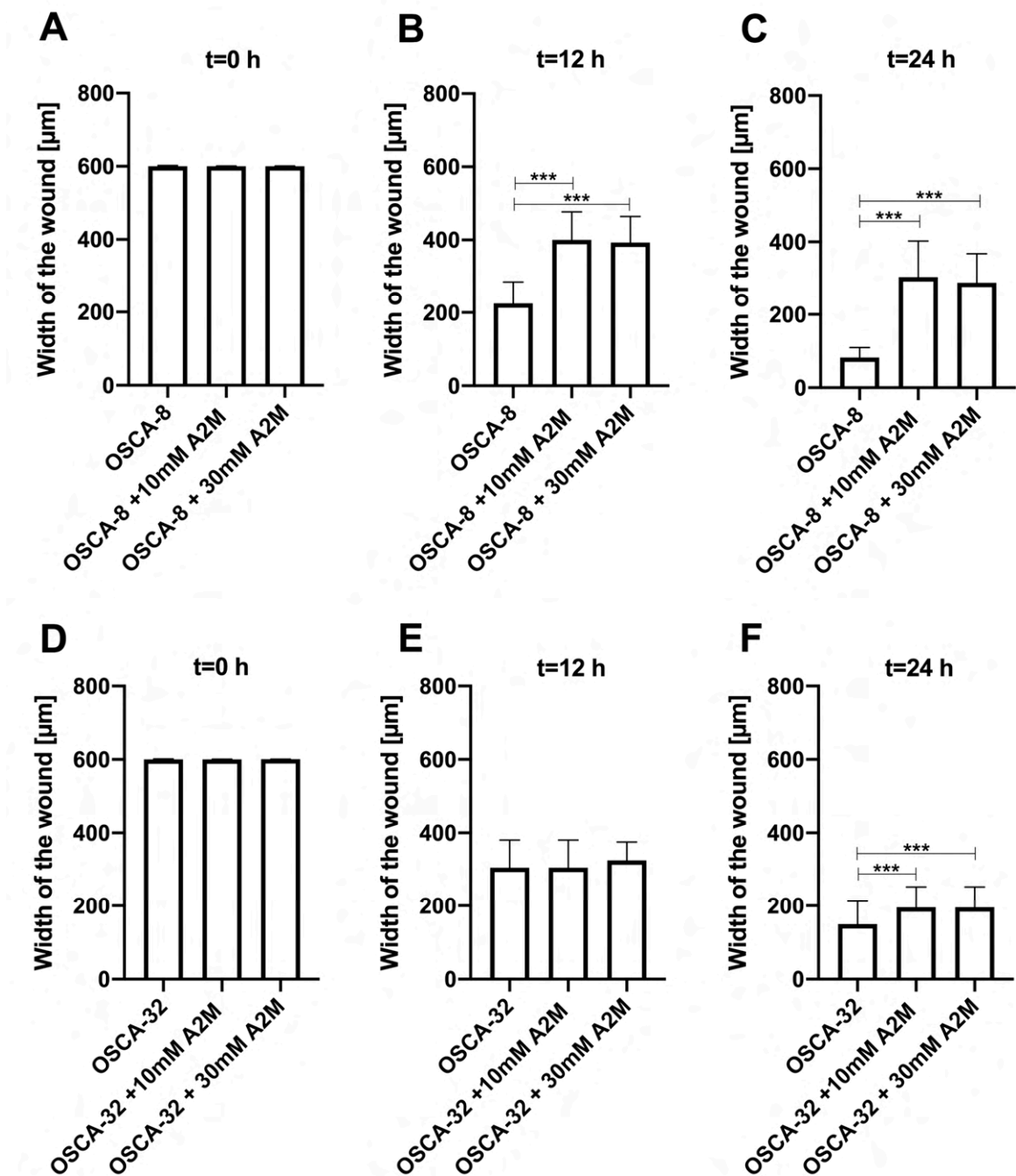


Figure 4. Bar graphs showing the A2M protein's effect in two concentrations (10 mM and 30 mM) on inhibiting the migration of canine osteosarcoma cells from the OSCA-8 cell line at (A) —t₀ (0 h); (B) —t₁ (12 h); (C) —t₂ (24 h) and OSCA-32 cell line at (D) —t₀ (0 h); (E) —t₁ (12 h); (F) —t₂ (24 h); *** —high statistical significance at $p < 0.001$.

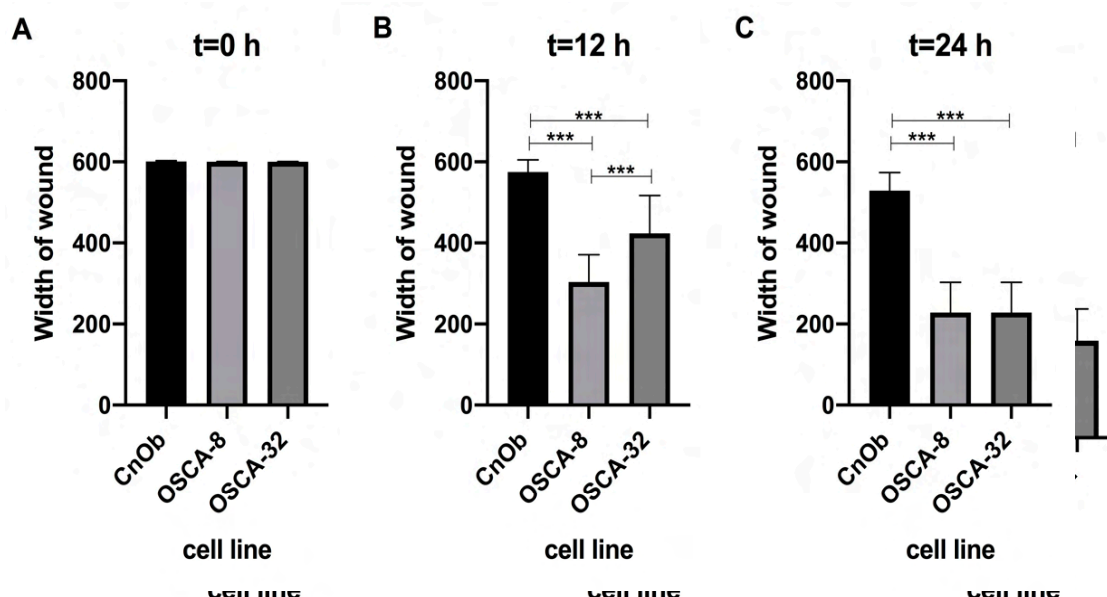


Figure 5. Bar graphs showing the migration rate of canine OSCA-8 and OSCA-32 compared to the control cell line CnOb at (A) t_0 (0 h); (B) t_1 (12 h); and (C) t_2 (24 h). ***—high statistical significance at $p < 0.001$.

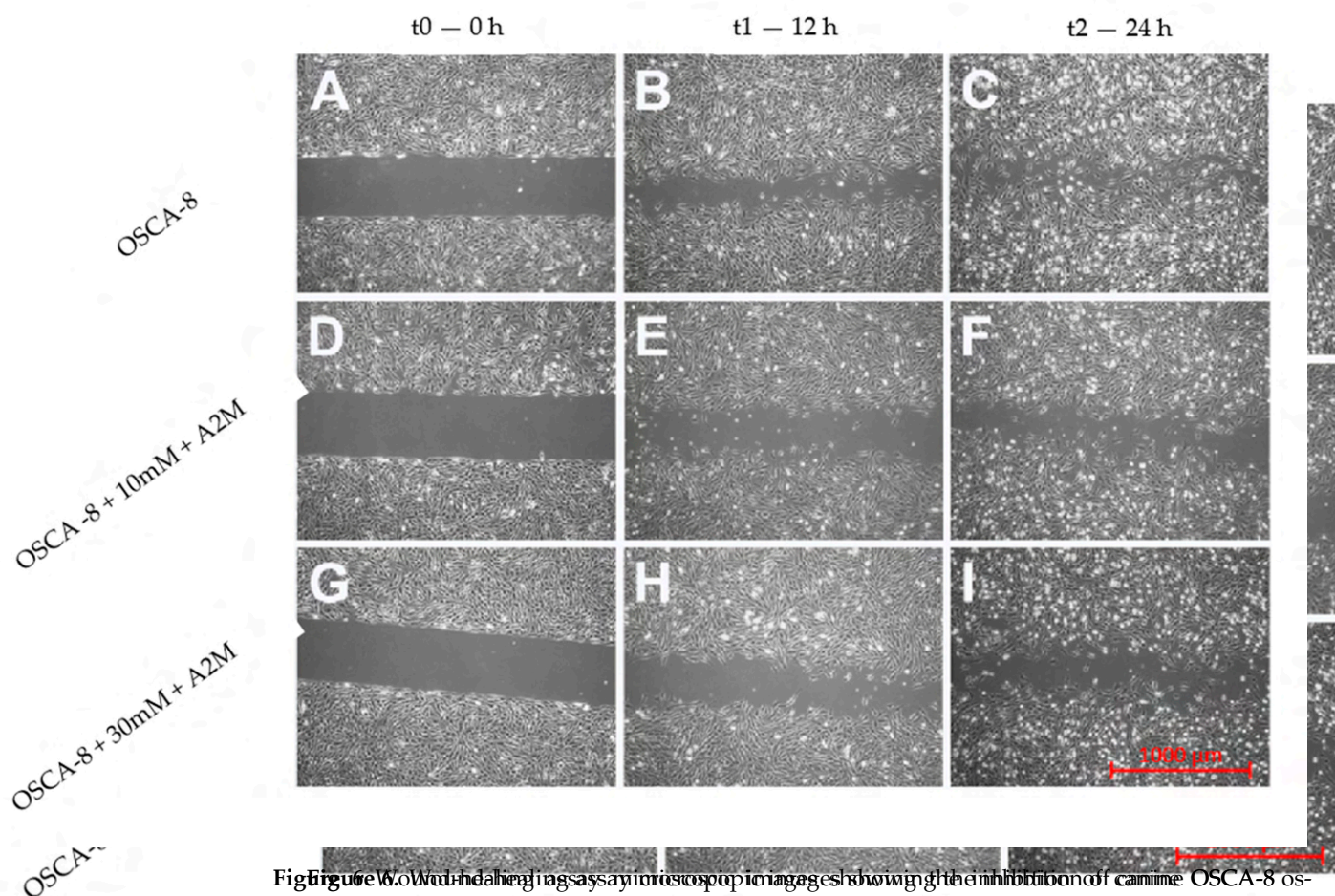


Figure 6. Wound healing assay images showing the inhibition of canine OSCA-8 osteosarcoma cell migration by A2M (scale bar). Untreated cells at t_0 (0 h) (A); t_1 (12 h) (B); t_2 (24 h) (C); cells incubated with 10 mM A2M at t_0 (0 h) (D); t_1 (12 h) (E); t_2 (24 h) (F); cells incubated with 30 mM A2M at t_0 (0 h) (G); t_1 (12 h) (H); t_2 (24 h) (I) images showing the inhibition of canine OSCA-8 osteosarcoma cell migration by A2M (scale bar). Untreated cells at t_0 (0 h) (A); t_1 (12 h) (B); t_2 (24 h) (C); cells incubated with 10 mM A2M at t_0 (0 h) (D); t_1 (12 h) (E); t_2 (24 h) (F); cells incubated with 30 mM A2M at t_0 (0 h) (G); t_1 (12 h) (H); t_2 (24 h) (I).

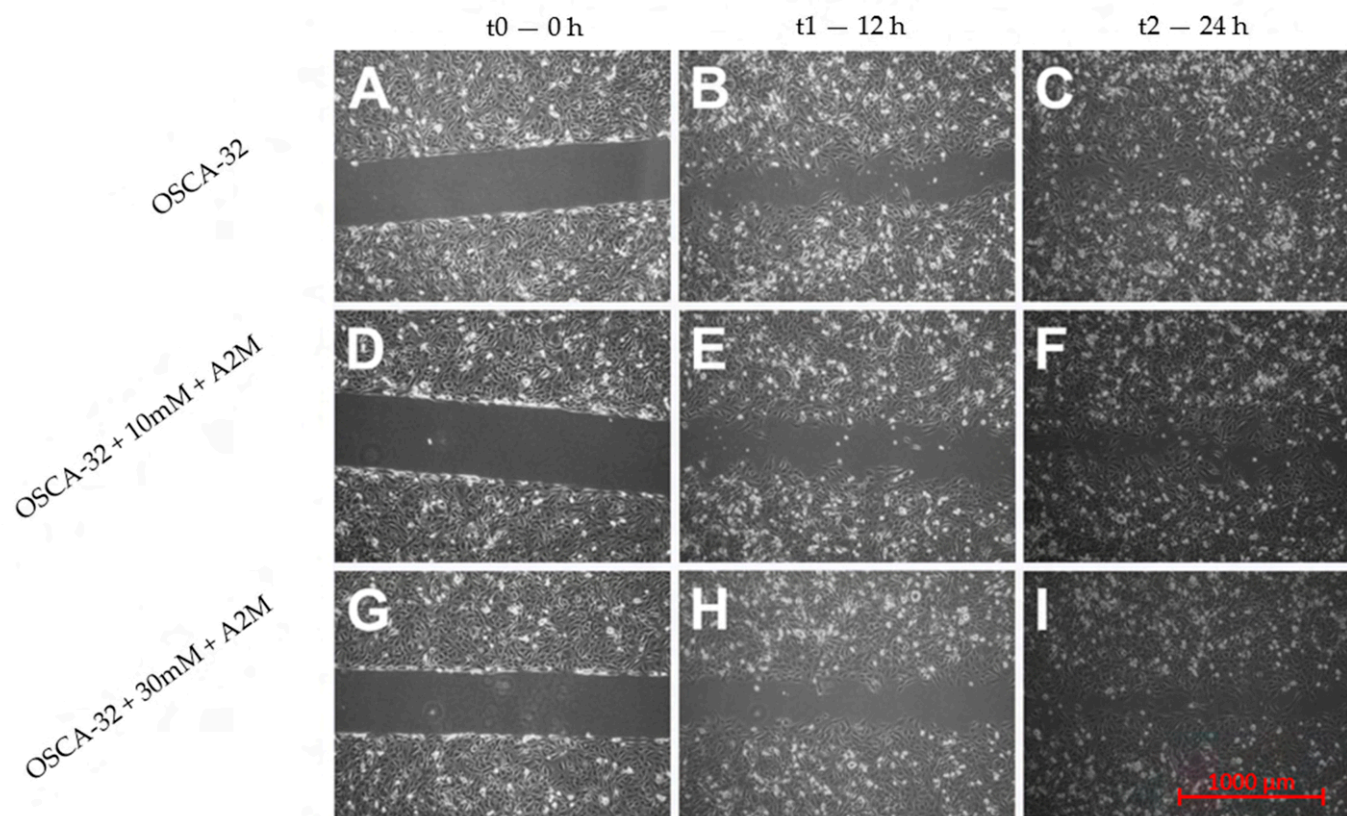


Figure 7: Wound-healing assay microscopic images showing the inhibition of canine OSCA-32 osteosarcoma cell migration by A2M. Untreated cells at t0 (0 h) (A); t1 (12 h) (B); t2 (24 h) (C); cells incubated with 10 mM A2M at t0 (0 h) (D); t1 (12 h) (E); t2 (24 h) (F); cells incubated with 30 mM A2M at t0 (0 h) (G); t1 (12 h) (H); t2 (24 h) (I).

3. Discussion

MALDI-TOF/TOF MS is a widely used technique in proteomics and metabolomics with practical applications, especially in microbiology [9], for identifying bacteria and fungi [13,14]. However, MALDI-TOF/TOF MS has also been used in human oncological research as a potential diagnostic tool for identifying tumour biomarkers, including head and neck squamous cell carcinoma, prostate cancer, renal cancer, bladder cancer, lung cancer, and OSA [15–18]. In veterinary oncology, there are reports of using this method in the proteomic analysis of several tumours including mammary cancer in dogs [10], various types of canine oral tumours (including melanoma, squamous cell carcinoma, and benign tumours) [19], canine and feline lymphoma [20,21], feline fibrosarcoma [11], and canine OSA [12]. The advantages of using MALDI-TOF/TOF MS in oncological studies include the high sensitivity and speed of analyses, wide mass range coverage, and the low cost of consumables. Additionally, the method is considered easy to use and requires a low volume of samples for analyses [22]. However, the crucial disadvantage of the technique is its dependence on data quality and instrument settings, including the calibration used for peak identification and its protocols [23]. The cost of the MALDI-TOF/TOF MS instrument is also not negligible, nor is the need for an experienced person to perform the analyses. Moreover, the software version used to generate and visualise MS data may influence its accuracy. The raw data of MS analyses typically contain noise, whereas the true signal elements, and pre-processing is usually needed before final analysis [22]. As a result, the data obtained by MALDI-TOF/TOF MS analyses should be further validated with other techniques such as Western blot or Simple Western, i.e., quantitative analysis of capillary-based protein separation with other techniques such as Western blot or Simple Western, i.e., quantitative analysis of capillary-based protein separation (and increases detection methods of

human errors during the analyses), reproducibility, ease of use, and the quantification of protein expression [24]. In our studies, MALDI-TOF/TOF MS analysis revealed different expressions in eight proteins of OSA cells compared to CnOb (Figure 2, Table 1), out of which the qualitative Simple Western technique further confirmed the lower expression of A2M in canine OSA cells compared to osteoblasts (Figure 3).

Alpha-2-macroglobulin (A2M) is a plasma protein that modulates the activity of proteases by inhibiting them [25]. A2M protein has the molecular structure of tetramers, and its identical subunits have a molecular weight of approximately 179,000 Da, including the carbohydrate groups [26,27]. For human samples in the Simple Western method, a specific band was detected for A2M at approximately 178 kDa [Simple Western™ producer guidelines: https://www.rndsystems.com/products/human-alpha-2-macroglobulin-antibody-257316_mab1938#product-citations, accessed on 15 March 2021]. The main characteristic region of A2M proteins is called the “bait region”, which contains cleavage sites for different proteinases. However, A2M may exhibit differences in molecular weight, depending on heating and reduced conditions during in vitro procedures [28]. The mass of A2M may vary according to specific post-translational modifications such as glycosylation or disulphide bond creation.

A2M modulates cell proliferation and may function as a hormone, immune modulator, and cytokine [25]. Recently, A2M has been shown to influence tumour cell adhesion, migration, and growth by inhibiting tumour-promoting signalling pathways, e.g., PI3K/AKT and SMAD, and upregulating *PTEN* [29]. Lindner et al. [30] described human astrocytoma cells’ dependence on migration and invasion upon exposure to A2M in serial concentrations, where a negative correlation between the A2M concentration and migration and invasion rates was observed. According to the authors, the malignant properties of the tumour can be inhibited by acting on the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), which is a receptor for A2M. A probable mechanism for A2M cancer cell migration inhibition in astrocytoma cells may be related to impeding the Wnt/beta-catenin signalling pathway [30].

Moreover, A2M-inactivated proteolytic enzymes, including plasmin, urokinase-type plasminogen activators, and metalloproteases, have demonstrated involvement in the tumour invasion process [31–33]. Additionally, Amini et al. [34] established A2M expression in hibernating common carp plasma (HCCP) using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and assessed its influence on murine melanoma cell functions, including migration. Cells treated with HCCP showed a higher inhibitory effect on migration compared to the control. According to the authors, HCCP (characterised by the increased expression of A2M) had significant anti-migration efficacy and may be considered a novel therapeutic agent for cancer treatment [34]. In both in vitro and in vivo studies, Lee et al. [35] showed that the downregulation of A2M and decreased A2M protein expression levels were positively correlated with decreased ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 1 (ADAMTS1). Moreover, bioinformatics analyses suggest that both A2M and ADAMTS1 expressions are correlated with more aggressive phenotypes of lung adenocarcinoma. Similar to our studies, low A2M expression was shown in adenocarcinoma tissues compared to healthy ones. A2M was shown to play a role in activating the epithelial–mesenchymal transition (EMT) and promoting metastasis in lung adenocarcinoma. A2M expression was negatively correlated with patients’ overall survival [35]. Zhang and collaborators described A2M downregulation in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) compared to normal bile duct tissue, suggesting this gene’s potential utility as an adverse prognostic factor [25]. Moreover, the authors suggested that the positive relation between A2M overexpression and better prognosis for patients suffering from ICC indicated that A2M may be a potential drug used for cancer treatment [25]. Our first attempt at inhibiting canine OSA cell migration by adding A2M both at 10 mM and 30 mM (Figure 4) is the first promising result for A2M’s future use in veterinary oncology.

On the other hand, in human primary and metastatic OSA, A2M was shown to be upregulated [36,37]. Liu et al. suggested that A2M may act as oncogene and be consistently

involved in the pathophysiological process of human osteosarcoma [36], suggesting that, together with LRP1, it may be considered as potential therapeutic targets [37].

To the best of our knowledge, the present study is the first to establish lower A2M expression in canine OSA cells compared to normal osteoblasts and demonstrate its possible anti-migration capacity in wound-healing assays. The significant ($p \leq 0.05$ or $p \leq 0.001$) inhibition of canine OSA cell migration by adding either 10 mM or 30 mM A2M for both 12 h and 24 h cell culture demonstrates A2M's potential as a therapeutic agent for metastatic canine OSA. However, A2M's influence on the metastatic process of canine OSA, including the possible molecular mechanisms of inhibiting cancer cell migration, invasion, and proliferation, as well as its potential role in future antimetastatic therapies, require further in vitro and in vivo investigations. Further investigations should include the following: multidirectional studies on the molecular mechanism of A2M's inhibition of migration, invasiveness and tumorigenesis, which, according to the current knowledge, is probably related to upregulation of LRP1 and frizzled receptor (FZD); the inhibition of the expression of Wnt ligands and, hence, the autocrine activation of Wnt/ β -catenin signalling; and the relocation of beta catenin and the induction of cellular cadherins, which act as tumor suppressors [30]. There is also evidence that A2M regulates tumor cell growth by upregulating PTEN and inhibiting tumour-promoting signalling pathways such as PI3K/AKT and SMAD, making A2M a promising anticancer drug which should also be further assessed [25].

4. Materials and Methods

4.1. Cell Lines

Two canine OSA cell lines (OSCA-8 and OSCA-32) (Kerafast, Boston, MA, USA) and primary CnOb (Cell Applications, San Diego, CA, USA) were used in this study. The OSCA-8 cell line was derived from the left shoulder tumour of an intact 1-year-old male Rottweiler. The gene expression profile of this cell line was consistent with that established in the most malignant molecular phenotype of OSA [38,39]. The OSCA-32 cell line was derived from a tumour in the left wrist of a 9-year-old spayed female Great Pyrenees. The gene expression profile of the OSCA-32 cell line was consistent with that established in the less aggressive molecular phenotype of OSA [38,40].

CnOb obtained from normal healthy canine bones were used as a negative control.

4.2. Cell Culture

Osteosarcoma cells (OSCA-8 and OSCA-32—passages 12 and 15) were cultivated under aseptic conditions in sterile chambers with laminar air flow using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, Life Technologies, Gibco, Waltham, MA, USA) and antibiotics (Primocin—InvivoGen, Waltham, MA, USA, and penicillin–streptomycin 100 $\times$ solution—HyClone™, Marlborough, MA, USA) and 1% HEPES buffer (HyClone™, USA), while CnOb (passage 7) were grown using Canine Osteoblast Growth Medium (Cell Applications, San Diego, CA, USA) supplemented with 10% FBS (Life Technologies, Gibco, Waltham, MA, USA) and antibiotics (Primocin—InvivoGen, Waltham, MA, USA) and penicillin–streptomycin 100 $\times$ solution—HyClone™, Marlborough, MA, USA). Cultures were grown in a CO₂ incubator under standard conditions (37 °C, 5% CO₂, 95% humidity). All experiments were performed when the cells, in the logarithmic growth phase, reached 75–80% confluence. Cell viability was assessed with trypan blue using an Invitrogen Countess II automatic cell counter (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

4.3. 2DE Electrophoresis and MALDI-TOF/TOF MS Analysis

4.3.1. Protein Isolation, Cleaning, and Precipitation

The homogenisation and isolation of the proteins contained in cell pellets (OSCA-8, OSCA-32, CnOb, $n = 7$ per group) were performed using a solution containing RIPA buffer (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich,

Saint Louis, MO, USA). In detail, the cell suspension in the test tube was centrifuged ($300\times g$, 3 min, room temperature (RT)) and resuspended in 1.5 mL of phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, Waltham, MA, USA). A suspension originating from one culture flask was divided into three samples of 0.5 mL and centrifuged ($300\times g$, 3 min, RT). Protease Inhibitor Cocktail and RIPA buffer were mixed in a proportion of 1:100. The supernatant was removed and 200 μ L of RIPA buffer/protease inhibitor cocktail solution was added. After being vortexed ($3\times$, 5 s every 5 min), the solutions were centrifuged ($16,400\times g$, 15 min, 4°C). A spectrophotometric method was used to determine the protein concentration using Maestro Nano (Maestrogen, Xinzhu, Taiwan) equipment, which measured the absorbance at 280 nm. Measurements were performed according to the manufacturer by dropping two microliters and transmitting an optical beam by passing a beam of electromagnetic radiation towards the blank solution.

4.3.2. Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2DE)

For the first dimension of electrophoresis, isoelectric focusing was performed. Pellets containing 200 μ g of protein were dissolved in a rehydration buffer (Bio-Rad, Warsaw, Poland). The obtained protein solutions were applied to a rehydration plate (Hoefer IEF100, Hoefer, Inc., Holliston, MA, USA) and covered with 17 cm of immobilised pH gradient (IPG) linear strips for isoelectric focusing (pH 3–10, Bio-Rad, Warsaw, Poland). After 12 h of rehydration, strips with soaked proteins were transferred to an IEF-100 Hoefer apparatus (Hoefer IEF100, Hoefer, Inc., Holliston, MA, USA) for focusing. Afterwards, strips were equilibrated in dithiothreitol (1.30 mM) and iodoacetamide (1.35 mM) solutions.

For the second dimension, gel electrophoresis was performed with a 12.5% polyacrylamide gel using a Bio-Rad PROTEAN II xi Cell chamber. The conditions for vertical separation were as follows: 600 V, 30 mA, 30 W per gel. The electrophoretic chamber was filled with 0.025 M Tris/glycine buffer pH 8.3. Following protein electrophoretic separation, proteins were silver-stained, with silver nitrate used for impregnation along with formaldehyde for reduction, and the proteins were then scanned using an Image Scanner III (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). The gel images were analysed in Delta2D (DECODON, Greifswald, Germany) software for statistical (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$) and graphical analyses, including manual selection of false positive and false negative spots. The selected protein spots were removed from the polyacrylamide gel with a scalpel, transferred to microtubes, rinsed with water, and discoloured. Reduction and alkylation were performed with dithiothreitol and iodoacetamide, respectively. The gel pieces were digested by trypsin according to the manufacturer's instructions (Trypsin Gold, Promega, Madison, WI, USA) in 50 mM of an ammonium bicarbonate water solution environment for 12 h in an incubator (37°C). Proteins were extracted from gels with a 50:45:5 acetonitrile solution (Merck, Rahway, NJ, USA), water, and trifluoroacetic acid (Merck, Rahway, NJ, USA) using an ultrasonic bath at room temperature. The extraction was repeated three times, and every step lasted 15 min. Finally, extracts were concentrated in a CentriVap (Labconco local seller A.G.A Analytical, Warsaw, Poland). The obtained peptide pellets were dissolved in 10 μ L of 0.1% trifluoroacetic acid and purified using Sample Prep Pipette Tips (ZipTip 0.2 μ L, C18, Millipore, Merck, Rahway, NJ, USA).

4.3.3. MALDI-TOF/TOF MS Analysis

We performed a MALDI-TOF/TOF MS analysis by applying 1 μ L of a purified protein sample to an AnchorChip detection plate. Then, when the sample was completely dry, 1 μ L of the α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Bruker, Bremen, Germany) matrix was used for covering sample spots. At the same time, 0.5 μ L of a peptide standard was spotted on the calibration field (Peptide Calibration Standard II, Bruker, Bremen, Germany). Mass spectra were recorded in the range of 700–4000 Da using a MALDI-TOF/TOF spectrometer (Ultraflex extreme MALDI TOF/TOF, Bruker, Bremen, Germany) and flex Control 3.3 software (Bruker, Bremen, Germany). Next, using flex Analysis 3.0 software (Bruker, Bremen, Germany), a list of peaks with signal-to-noise ratios >3 was

created. After removing environmental contaminants, the peak list was transferred to BioTools 3.2 (Bruker, Bremen, Germany) and compared to Mascot 2.2 using a Swiss-Prot database [<https://www.uniprot.org/>, accessed on 20 December 2020]. The results of the MALDI-TOF/TOF MS analysis were assessed using the following criteria from previously established protocols [10,11]: $p \leq 0.05$, Mascot Score ≥ 61 , Rt OSCA-8/CnOb and OSCA-32/CnOb ≤ 0.67 or ≥ 1.5 , according to previously published protocols.

4.4. Validation of Protein Expression Using Simple Western

4.4.1. Protein Isolation, Cleaning, and Precipitation

Homogenisation and isolation of the protein contained in the cell pellets (OSCA-8, OSCA-32, CnOb, $n = 3$ per group) were performed in the same manner as described in Section 4.3.1. The homogenates were analysed for protein concentration using the bicinchoninic acid assay (BCA) method. The BCA reagent was prepared according to the manufacturer's protocol for the BCA Protein Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK). On a 96-well plate, 200 μ L of the BCA reagent and 10 μ L of protein homogenate were applied to each well (three technical replicates for each sample). To prepare the standard curve, we used a starting concentration of 1 mg/mL of bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich). In the standard curve, the following concentrations of BSA/RIPA solution were used: 0, 200 $\times$, 400 $\times$, 600 $\times$, 800 $\times$, and 1000 $\times$. A spectrophotometric analysis was performed at a temperature of 37 °C and wavelength of 562 nm using an Infinite 200 PRO M Nano Plate Reader (Tecan, Zurich, Switzerland) with Tecan I-Control 2.0 Software (Tecan, Zurich, Switzerland).

4.4.2. Qualitative Protein Expression Analyses

A2M expression detected with MALDI TOF/TOF MS analysis was validated by the Simple Western technique using a Jess analyser (Protein Simple, Minneapolis, MN, USA). Standard pack reagents were prepared according to Jess guidelines with reagents from the EZ Standard Pack (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA). The EZ Standard Pack 12–230 kDa (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) contains a ready-to-use biotinylated ladder, a fluorescent 5 $\times$ master mix, and a DTT solution. In a clear tube, DTT was mixed with 40 μ L of deionised water to produce a 400 mM solution. The master mix was mixed with 20 μ L of sample buffer and 20 μ L of prepared 400 mM DTT solution. The optimal protein concentration depends on the expression level of the assessed protein. The protein homogenates were mixed with a sample diluent: 0.1 $\times$ sample buffer (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA). One part of the 5 $\times$ fluorescent master mix was combined with four parts of diluted lysate in a microcentrifuge tube. Denaturation of the samples was performed at 95 °C for 5 min. In the next step, the samples were vortexed, spun for 10 s and at 3000 rpm/min and then stored on ice. Primary antibody anti-human alpha-2-macroglobulin MAB1938 (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) was prepared and diluted with Antibody Diluent 2 (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA). A luminol-S and peroxide mix (in 1:1 proportion) was vortexed and stored on ice. All of the reagents, including a secondary anti-mouse antibody (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA), were applied to the 12–230 kDa separation module according to manufacturer guidelines.

Linear Range of Proteins and Primary Antibody Saturation Assessment

Before performing the main part of the experiment, the linear range of the proteins and 90% saturation of the primary antibody were determined to ensure the proper antibody and sample concentrations for A2M expression analyses. The following protein concentrations were used in each sample to assess the linear range of the proteins: 0.1; 0.2; 0.4; 0.5; and 0.6 mg/mL.

The concentration of anti A2M antibody MAB1938 (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) was used in the following antibody dilutions for antibody saturation assessment: 1:6.25; 1:12.5; 1:50; 1:100; 1:200; and 1:400.

4.5. Migration Rate Assessment in Canine OSA Cell Lines Treated with A2M

Cells were seeded in culture inserts (2-well Ibidi culture inserts, Ibidi GmbH, Grafelfing, Germany) at a density of 3×10^4 cells in each well. When around 90% confluence was reached, the culture inserts were removed. In the next step, the medium was removed, and mitomycin C (Abcam, Cambridge, UK) was added to a final concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$. Cell monolayers were incubated at 37 °C under standard conditions. After 3 h of incubation, the medium with mitomycin C was replaced with a serum-free medium in the control group, and an A2M-enriched medium was used in the second and third groups, with concentrations of 10 mM and 30 mM, respectively. Mitomycin C is a DNA synthesis inhibitor used for cell migration assessment. It ensures minimal loss of viability and maximizes the inhibition of cell division. Cells pre-treated with MMC inhibit cell proliferation, eliminating the contribution of those cells to wound closure and enabling cancer cell migration to truly be assessed [41,42]. To detect cancer cell migration, in the case of adherent cells, such as in our study, the cells need to bind to the bottom of the wells, and proliferation needs to be inhibited so that migration can be assessed [41]. Images of cells migrating within the scratch were captured at specific time points ($t_0 = 0$, $t_1 = 12$ h, $t_2 = 24$ h) using an inverted microscope (Primovert, Zeiss, Munich, Germany) at 4 $\times$ magnification. The captured figures were analyzed afterwards using Zen Pro 2012 (Zeiss, Munich, Germany), and cancer cell migration was evaluated by calculating the distance between the edges of the scratches (100 measurements for each scratch) according to the procedure described by Rodriguez et al. [43]. The experiment was repeated in triplicate. The wound-healing assay was also used to compare the migration rate of the canine OSA cell lines OSCA-8 and OSCA-32 to the migration rate of the CnOb. The experiment was performed in the same manner as described above, but in a serum-free medium for all groups.

5. Conclusions

Using MALDI-TOF/TOF MS analysis, eight proteins (GTF2I, MIPOL-1, CFAP298, PGAM1, UB2L6, EDARADD, LRRC72, and A2M) were found to be significantly differentially ($p \leq 0.05$) expressed in canine OSA cell lines (both OSCA-8 and OSCA-32) compared to CnOb. CFAP298 and GTF2I were upregulated, whereas MIPOL-1, PGAM1, UB2L6, EDARADD, LRRC72, and A2M were downregulated in OSA cells. The downregulated expression of A2M proteins was subsequently confirmed with a Simple Western qualitative analysis. The wound-healing assay results revealed a positive correlation between the malignant phenotype of OSA cells and the migration rate of canine OSA cells within the first 12 h. Moreover, we established a negative correlation between the migration rate of canine OSA cells treated with A2M, demonstrating that A2M acts as a migration inhibitor of canine OSA cells. This study may be the first report indicating A2M's possible use in canine OSA cell metastasis treatment. However, further in vitro and in vivo studies are needed to confirm whether A2M can also act as an anti-metastatic agent in this malignancy.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms25073989/s1>.

Author Contributions: Conceptualisation: K.A.Z.-K.; Data curation: S.S.W., K.M. and E.P.O.; funding acquisition: S.S.W., S.W. and K.A.Z.-K.; Investigation: S.S.W., K.M. and E.P.O.; Methodology: S.S.W., K.M. and K.A.Z.-K.; Project administration: S.S.W. and K.A.Z.-K.; Resources: K.A.Z.-K. and S.W.; Supervision: K.A.Z.-K.; Validation: S.S.W., K.M. and K.A.Z.-K.; Visualisation: S.S.W. and K.M.; Writing—original draft: S.S.W.; Writing—review and editing: K.M., E.P.O., S.W. and K.A.Z.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors acknowledge the support by the Ministry of Science and Higher Education (SPUB 505-30-023500-Q00454-99). These studies were also funded by internal funding from the Doctoral School of the Warsaw University of Life Sciences and internal funding from the Institute of Veterinary Medicine of the Warsaw University of Life Sciences. The funders had no role in the study design, data collection, analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: On request, raw data obtained within this study can be obtained from the Authors (S.S.W., K.M. and K.Z.-K.).

Acknowledgments: This manuscript is part of a Ph.D. thesis by Sylwia S. Wilk. Sylwia S. Wilk presented part of the results in personal communications with the International Congress of Small Animal Medicine PSAVA 2022 on 17 November 2022 in Łódź, “Proteomic analysis of canine osteosarcoma cells derived from tumours with various degrees of malignancy”, and at the Nanobiomedica Conference on 21 September 2023 in Warsaw, “The assessment of molecular mechanisms in canine osteosarcoma cell metastasis”, and as poster presentations at the Nanobiomedica Conference on 21 September 2023 in Warsaw, “Proteomic analysis of canine osteosarcoma cells with different molecular phenotypes”. The authors would like to acknowledge the support of Roman Lechowski as the chief of the Division of Small Animal Internal Diseases, a part of which was the Laboratory of Preclinical and Clinical Nano-oncology before September 2023.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 1
2DE	Two-dimensional gel electrophoresis
A2M	Alpha-2-macroglobulin
ANXA3	Annexin A3
ANXA5	Annexin A5
CFAP298	Cilia- and flagella-associated protein 298
CnOb	Canine osteoblasts
EDARADD	Ectodysplasin-A receptor-associated adapter protein
GTF2I	General transcription factor II-I
HCCP	Hibernating common carp plasma
ICC	Intrahepatic cholangiocarcinoma
LRRC72	Leucine-rich repeat-containing protein 72
MALDI-TOF/TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry
MIPOL-1	Mirror-image polydactyly gene 1 protein
OSA	Osteosarcoma
PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1
TGFβ	Transforming growth factor beta
UB2L6	Ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2

References

1. Beck, J.; Ren, L.; Huang, S.; Berger, E.; Bardales, K.; Mannheimer, J.; Mazcko, C.; LeBlanc, A. Canine and Murine Models of Osteosarcoma. *Vet. Pathol.* **2022**, *59*, 399–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Selvarajah, G.T.; Kirpensteijn, J. Prognostic and Predictive Biomarkers of Canine Osteosarcoma. *Vet. J.* **2010**, *185*, 28–35. [[CrossRef](#)]
3. Szewczyk, M.; Lechowski, R.; Zabielska, K. What Do We Know about Canine Osteosarcoma Treatment?—Review. *Vet. Res. Commun.* **2015**, *39*, 61–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hapach, L.A.; Mosier, J.A.; Wang, W.; Reinhart-King, C.A. Engineered Models to Parse Apart the Metastatic Cascade. *NPJ Precis. Oncol.* **2019**, *3*, 20. [[CrossRef](#)]
5. Wilk, S.S.; Zabielska-Koczywas, K.A. Molecular Mechanisms of Canine Osteosarcoma Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vogel, C.; Marcotte, E.M. Insights into the Regulation of Protein Abundance from Proteomic and Transcriptomic Analyses. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 227–232. [[CrossRef](#)]
7. Edfors, F.; Danielsson, F.; Hallström, B.M.; Käll, L.; Lundberg, E.; Pontén, F.; Forsström, B.; Uhlén, M. Gene-specific Correlation of RNA and Protein Levels in Human Cells and Tissues. *Mol. Syst. Biol.* **2016**, *12*, 883. [[CrossRef](#)]
8. Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R.C.; Chait, B.T. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1193A–1203A. [[CrossRef](#)]
9. Ashfaq, M.Y.; Da’na, D.A.; Al-Ghouti, M.A. Application of MALDI-TOF MS for Identification of Environmental Bacteria: A Review. *J. Environ. Manag.* **2022**, *305*, 114359. [[CrossRef](#)]
10. Klopffleisch, R.; Klose, P.; Weise, C.; Bondzio, A.; Multhaupt, G.; Einspanier, R.; Gruber, A.D. Proteome of Metastatic Canine Mammary Carcinomas: Similarities to and Differences from Human Breast Cancer. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 6380–6391. [[CrossRef](#)]

11. Zabielska-Koczywas, K.; Michalak, K.; Wojtalewicz, A.; Winiarczyk, M.; Adaszek, Ł.; Winiarczyk, S.; Lechowski, R. Proteomic Differences in Feline Fibrosarcomas Grown Using Doxorubicin-Sensitive and -Resistant Cell Lines in the Chick Embryo Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 576. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Gebhard, C.; Miller, I.; Hummel, K.; Neschi née Ondrovics, M.; Schlosser, S.; Walter, I. Comparative Proteome Analysis of Monolayer and Spheroid Culture of Canine Osteosarcoma Cells. *J. Proteom.* **2018**, *177*, 124–136. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Tsuchida, S.; Umemura, H.; Nakayama, T. Current Status of Matrix-Assisted Laser. *Molecules* **2020**, *25*, 4775. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Robert, M.G.; Cornet, M.; Hennebique, A.; Rasamoelina, T.; Caspar, Y.; Pondérand, L.; Bidart, M.; Durand, H.; Jacquet, M.; Garnaud, C.; et al. Maldi-Tof Ms in a Medical Mycology Laboratory: On Stage and Backstage. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1283. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Maurer, K.; Eschrich, K.; Schellenberger, W.; Bertolini, J.; Rupf, S.; Remmerbach, T.W. Oral Brush Biopsy Analysis by MALDI-ToF Mass Spectrometry for Early Cancer Diagnosis. *Oral Oncol.* **2013**, *49*, 152–156. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Hu, S.; Yu, T.; Xie, Y.; Yang, Y.; Li, Y.; Zhou, X.; Tsung, S.; Loo, R.R.; Loo, J.A.; Wong, D.T. Discovery of Oral Fluid Biomarkers for Human Oral Cancer by Mass Spectrometry. *Cancer Genom. Proteom.* **2007**, *4*, 55–64.
17. Zamboni, C.; Aresta, A. MALDI-TOF/MS Analysis of Non-Invasive Human Urine and Saliva Samples for the Identification of New Cancer Biomarkers. *Molecules* **2022**, *27*, 1925. [\[CrossRef\]](#)
18. Han, Z.; Peng, C.; Yi, J.; Wang, Y.; Liu, Q.; Yang, Y.; Long, S.; Qiao, L.; Shen, Y. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Profiling of Plasma Exosomes Evaluates Osteosarcoma Metastasis. *iScience* **2021**, *24*, 102906. [\[CrossRef\]](#)
19. Ployetch, S.; Jaresitthikunchai, J.; Phaonakrop, N.; Sakcamduang, W.; Manee-in, S.; Suriyaphol, P.; Roytrakul, S.; Suriyaphol, G. Utilizing MALDI-TOF MS and LC-MS/MS to Access Serum Peptidome-Based Biomarkers in Canine Oral Tumors. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 21641. [\[CrossRef\]](#)
20. McCaw, D.L.; Chan, A.S.; Stegner, A.L.; Mooney, B.; Bryan, J.N.; Turnquist, S.E.; Henry, C.J.; Alexander, H.; Alexander, S. Proteomics of Canine Lymphoma Identifies Potential Cancer-Specific Protein Markers. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 2496–2503. [\[CrossRef\]](#)
21. Marsilio, S.; Newman, S.J.; Estep, J.S.; Giarretta, P.R.; Lidbury, J.A.; Warry, E.; Flory, A.; Morley, P.S.; Smoot, K.; Seeley, E.H.; et al. Differentiation of Lymphocytic-Plasmacytic Enteropathy and Small Cell Lymphoma in Cats Using Histology-Guided Mass Spectrometry. *J. Vet. Intern. Med.* **2020**, *34*, 669–677. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Merlos Rodrigo, M.A.; Zitka, O.; Krizkova, S.; Moulick, A.; Adam, V.; Kizek, R. MALDI-TOF MS as Evolving Cancer Diagnostic Tool: A Review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *95*, 245–255. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Kirchner, M.; Xu, B.; Steen, H.; Steen, J.A.J. Libfbi: A C++ Implementation for Fast Box Intersection and Application to Sparse Mass Spectrometry Data. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 1166–1167. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Sormunen, A.; Koivulehto, E.; Alitalo, K.; Saksela, K.; Laham-Karam, N.; Ylä-Herttuala, S. Comparison of Automated and Traditional Western Blotting Methods. *Methods Protoc.* **2023**, *6*, 43. [\[CrossRef\]](#)
25. Zhang, G.; Liu, X.; Sun, Z.; Feng, X.; Wang, H.; Hao, J.; Zhang, X. A2M Is a Potential Core Gene in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *BMC Cancer* **2022**, *22*, 5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Sottrup-Jensen, L.; Stepanik, T.M.; Kristensen, T. Primary Structure of Human A2-Macroglobulin. V. The Complete Structure. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 8318–8327. [\[CrossRef\]](#)
27. Wong, S.G.; Dessen, A. Structure of a Bacterial A2-Macroglobulin Reveals Mimicry of Eukaryotic Innate Immunity. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4917. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Roberts, R.C.; Hall, P.K.; Nikolai, T.F.; McKenzie, A.K. Reduced Trypsin Binding Capacity of A2-Macroglobulin in Diabetes. *Clin. Chim. Acta* **1986**, *154*, 85–101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Kurz, S.; Thieme, R.; Amberg, R.; Groth, M.; Jahnke, H.G.; Pieroh, P.; Horn, L.C.; Kolb, M.; Huse, K.; Platzer, M.; et al. The Anti-Tumorigenic Activity of A2M—A Lesson from the Naked Mole-Rat. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0189514. [\[CrossRef\]](#)
30. Lindner, I.; Hemdan, N.Y.A.; Buchold, M.; Huse, K.; Bigl, M.; Oerlecke, I.; Ricken, A.; Gaunitz, F.; Sack, U.; Naumann, A.; et al. A2-Macroglobulin Inhibits the Malignant Properties of Astrocytoma Cells By Impeding B-Catenin Signaling. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 277–287. [\[CrossRef\]](#)
31. Newton, C.S.; Loukinova, E.; Mikhailenko, I.; Ranganathan, S.; Gao, Y.; Haudenschild, C.; Strickland, D.K. Platelet-Derived Growth Factor Receptor-β (PDGFR-β) Activation Promotes Its Association with the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP): Evidence for Co-Receptor Function. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27872–27878. [\[CrossRef\]](#)
32. Lagrange, J.; Lecompte, T.; Knopp, T.; Lacolley, P.; Regnault, V. Alpha-2-Macroglobulin in Hemostasis and Thrombosis: An Underestimated Old Double-Edged Sword. *J. Thromb. Haemost.* **2022**, *20*, 806–815. [\[CrossRef\]](#)
33. Cuéllar, J.M.; Cuéllar, V.G.; Scuderi, G.J. A2-Macroglobulin: Autologous Protease Inhibition Technology. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* **2016**, *27*, 909–918. [\[CrossRef\]](#)
34. Amini, E.; Rahgozar, S.; Golpich, M.; Kefayat, A.; Fesharaki, M. Potential Anti-Cancer Effects of Hibernating Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Plasma on B16-F10 Murine Melanoma: In Vitro and in Vivo Studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *238*, 124058. [\[CrossRef\]](#)
35. Lee, H.C.; Chang, C.Y.; Huang, Y.C.; Wu, K.L.; Chiang, H.H.; Chang, Y.Y.; Liu, L.X.; Hung, J.Y.; Hsu, Y.L.; Wu, Y.Y.; et al. Downregulated ADAMTS1 Incorporating A2M Contributes to Tumorigenesis and Alters Tumor Immune Microenvironment in Lung Adenocarcinoma. *Biology* **2022**, *11*, 760. [\[CrossRef\]](#)

36. Liu, J.; Wu, S.; Xie, X.; Wang, Z.; Lei, Q. Identification of Potential Crucial Genes and Key Pathways in Osteosarcoma. *Hereditas* **2020**, *157*, 29. [[CrossRef](#)]
37. Niu, F.; Zhao, S.; Xu, C.Y.; Chen, L.; Ye, L.; Bi, G.B.; Tian, G.; Gong, P.; Nie, T.H. Identification and Functional Analysis of Differentially Expressed Genes Related to Metastatic Osteosarcoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 10797–10801. [[CrossRef](#)]
38. Scott, M.C.; Sarver, A.L.; Gavin, K.J.; Thayanithy, V.; Getzy, D.M.; Newman, R.A.; Cutter, G.R.; Lindblad-Toh, K.; Kisseberth, W.C.; Hunter, L.E.; et al. Molecular Subtypes of Osteosarcoma Identified by Reducing Tumor Heterogeneity through an Interspecies Comparative Approach. *Bone* **2011**, *49*, 356–367. [[CrossRef](#)]
39. Scott, M.C.; Temiz, N.A.; Sarver, A.E.; Larue, R.S.; Susan, K.; Varshney, J.; Wolf, N.K.; Moriarity, B.S.; Timothy, D.; Brien, O.; et al. Comparative Transcriptome Analysis Quantifies Immune Cell Transcript Levels, Metastatic Progression and Survival in Osteosarcoma. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 326–337. [[CrossRef](#)]
40. Fenger, J.M.; Roberts, R.D.; Iwenofu, O.H.; Bear, M.D.; Zhang, X.; Couto, J.I.; Modiano, J.F.; Kisseberth, W.C.; London, C.A. MiR-9 Is Overexpressed in Spontaneous Canine Osteosarcoma and Promotes a Metastatic Phenotype Including Invasion and Migration in Osteoblasts and Osteosarcoma Cell Lines. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 784. [[CrossRef](#)]
41. Varankar, S.S.; Bapat, S.A. Migratory Metrics of Wound Healing: A Quantification Approach for in Vitro Scratch Assays. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Walewska, M.; Małek, A.; Taciak, B.; Wojtalewicz, A.; Wilk, S.; Wojtkowska, A.; Zabielska-Koczywas, K.; Lechowski, R. PEG-Liposomal Doxorubicin as a Potential Agent for Canine Metastatic Osteosarcoma—In Vitro and Ex Ovo Studies. *J. Vet. Res.* **2023**, *67*, 297–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Rodriguez, L.G.; Wu, X.; Guan, J.L. Wound-Healing Assay. *Methods Mol. Biol.* **2005**, *294*, 23–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Lek.wet.Sylwia Wilk

Laboratorium Nanoonkologii Doświadczalnej i Klinicznej
Katedra Chorób Małych Zwierząt i Klinika
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

sylwia_wilk@sggw.edu.pl

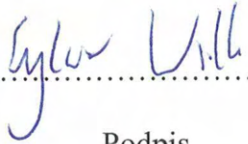
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównnej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wilk, S. S., Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywas, K. A. (2024).
Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell
Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989.
<https://doi.org/10.3390/ijms25073989>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badawczej, pozyskaniu finansowania, zarządzaniu projektem, udziale w przeprowadzeniu eksperymentów, opracowaniu metodologii, walidacji i porządkowaniu danych, przygotowaniu części graficznej, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu oraz udziale w jego redakcji.


.....
Podpis

Lublin, dn.24.06.2025 r.

Dr Katarzyna Michalak

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Lublin ul. Głęboka 30,20-612 Lublin

katarzyna.michalak@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wilk, S. S., Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywąs, K. A. (2024).
Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell
Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989.

<https://doi.org/10.3390/ijms25073989>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu i porządkowaniu danych,
przeprowadzaniu badań eksperymentalnych, współtworzeniu metodyki badawczej, walidacji uzyskanych
wyników, przygotowaniu materiałów wizualnych oraz redakcji i korekcie manuskryptu.



Podpis

Warszawa, dn.21.07.2025 r.

Dr hab.Katrzyna Zabielska-Koczywās

Laboratorium Nanoonkologii Doświadczalnej i Klinicznej
Katedra Chorób Małych Zwierząt i Klinika
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

katarzyna_zabielska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Główniej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wilk, S. S., Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2024).
Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell
Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989.
<https://doi.org/10.3390/ijms25073989>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badawczej, pozyskaniu finansowania, zarządzaniu projektem, zapewnieniu zasobów, opracowaniu metodologii, nadzorze merytorycznym, walidacji wyników oraz uczestnictwie w redakcji manuskryptu.



Podpis

Warszawa, dn.26.06.2024 r.

Mgr inż. Ewelina Patrycja Owczarek

Laboratorium Biologii RNA
Międzynarodowy Instytut Biologii
Molekularnej i Komórkowej w Warszawie
Warszawa ul.Ks.Trojdena 4
02-109 Warszawa

ewowczarek@iimcb.gov.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkół Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wilk, S. S., Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywas, K. A. (2024).
Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell
Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989.
<https://doi.org/10.3390/ijms25073989>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu i porządkowaniu danych, udziale w przeprowadzeniu badań, weryfikacji uzyskanych wyników oraz uczestnictwie w procesie przeglądu i redakcji manuskryptu.



Podpis

Lublin, dn.24.06.2025 r.

Prof. dr hab. Stanisław Winiarczyk

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Lublin ul. Głęboka 30,20-612 Lublin

stanislaw.winiarczyk@up.lublin.pl

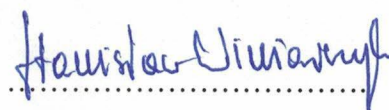
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wilk, S. S., Michalak, K., Owczarek, E. P., Winiarczyk, S., & Zabielska-Koczywąs, K. A. (2024).
Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell
Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3989.
<https://doi.org/10.3390/ijms25073989>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pozyskaniu finansowania, zapewnieniu zasobów
niezbędnych do przeprowadzenia badań oraz w procesie przeglądu i redakcji manuskryptu.



Podpis



Article

The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines

Sylwia S. Wilk ¹, Klaudia I. Kukier ¹, Arkadiusz M. Michałowski ¹ , Marek Wojnicki ² , Bartosz Smereczyński ³, Michał Wójcik ³ and Katarzyna A. Zabielska-Koczywas ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Experimental and Clinical NanoOncology, Department of Small Animal Diseases and Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland; sylwia_wilk@sggw.edu.pl (S.S.W.); klaudia_kukier@sggw.edu.pl (K.I.K.); arkadiusz_michalowski@sggw.edu.pl (A.M.M.)
- ² Faculty of Non-Ferrous Metals, AGH University of Krakow, Al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Poland; marekw@agh.edu.pl
- ³ Faculty of Chemistry, University of Warsaw, Pasteura 1, 02-093 Warsaw, Poland; b.smereczyns@student.uw.edu.pl (B.S.); mwojcik@chem.uw.edu.pl (M.W.)
- * Correspondence: katarzyna_zabielska@sggw.edu.pl

Abstract

Osteosarcoma (OSA) is the most common primary bone malignancy in dogs, characterized by aggressive growth and high metastatic potential. Despite advances in treatment, the prognosis for affected animals remains poor, mainly due to metastatic disease. Metastasis is a complex process that involves forming new blood vessels in the primary tumor (angiogenesis), intravasation, the transport of cancer cells to other locations, extravasation, and the growth of cancer cells in the secondary site. Gold nanoparticles (AuNPs), due to their unique physicochemical properties, are considered promising tools in cancer therapy, both as drug delivery systems and potential anti-metastatic agents. Previously, it has been demonstrated that 500 µg/mL glutathione-stabilized gold nanoparticles (Au-GSH NPs) inhibit cancer cell extravasation—one of the steps of the metastatic cascade. This study aimed to evaluate the anti-metastatic properties of Au-GSH NPs through their influence on OSA cell migration, proliferation, and colony formation in vitro, as well as their antiangiogenic properties on the chick embryo chorioallantoic (CAM) model. Additionally, we investigated whether these effects are associated with changes in alpha-2-macroglobulin (A2M) expression, as it was previously demonstrated to play an essential role in the metastatic cascade. Au-GSH NPs significantly inhibited migration and colony formation in canine osteosarcoma cells (from OSCA-8, OSCA-32, and D-17 cell lines) at 200 µg/mL concentrations. Interestingly, at 500 µg/mL, Au-GSH NPs inhibited angiogenesis on the CAM model and cancer cell migration, but fewer colonies were formed. These results may be directly related to the higher efficiency of Au-GSH NPs uptake by OSA cells at the dose of 200 µg/mL than at the dose of 500 µg/mL, as demonstrated using Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy (MP-AES). Moreover, this is the first study that demonstrates a significant increase in A2M expression in cancer cells after Au-GSH NPs treatment. This study provides new insight into the potential use of Au-GSH NPs as anti-metastatic agents in canine osteosarcoma, indicating that their anti-metastatic properties may be related to A2M. However, further in vitro and in vivo studies are needed to explore the molecular mechanism underlying these effects and to evaluate the clinical relevance of AuNPs in veterinary oncology.



Academic Editor: Jack A. Schalken

Received: 20 May 2025

Revised: 18 June 2025

Accepted: 19 June 2025

Published: 25 June 2025

Citation: Wilk, S.S.; Kukier, K.I.; Michałowski, A.M.; Wojnicki, M.; Smereczyński, B.; Wójcik, M.; Zabielska-Koczywas, K.A. The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: alpha 2 macroglobulin; canine osteosarcoma; gold nanoparticles; metastasis; migration; Simple Western

1. Introduction

Osteosarcoma (OSA) is the most common bone malignancy in dogs, accounting for 80–90% of primary bone tumors [1]. It is characterized by aggressive growth and a tendency to metastasize, most often to the lungs, the bones, and other visceral organs such as the spleen and liver [2]. Metastasis is a complex process, which includes five key stages: 1. the formation of new blood vessels within the primary tumor, 2. local invasion and subsequent entry into the blood vessels (intravasation), 3. transport and lodging in the vessels at the secondary site, 4. exit from the vessels (extravasation) and migration, and 5. growth at the secondary site [3]. OSA treatment typically involves a combination of surgery, chemotherapy, and radiotherapy, although the prognosis remains poor [4]. Despite advances in diagnostics and therapy, the median survival time of dogs with osteosarcoma treated by amputation and following chemotherapy is approximately 284 days [5].

Nanomedicine shows great potential in oncology. Recent advances in nanobiotechnology have produced nanocarrier systems for targeted drug delivery in cancer therapy, enhancing treatment outcomes and reducing side effects [6]. Nanoparticle-based therapies act through either passive or active targeting. Passive targeting relies on the enhanced permeability and retention (EPR) effect, which occurs due to the abnormal structure of tumor blood vessels and impaired lymphatic drainage. These factors allow nanoparticles to accumulate in tumor tissues, increasing drug concentration at the target site while minimizing systemic adverse effects [7]. Active targeting involves modifying nanoparticles with specific biomolecules such as ligands, antibodies, or peptides. These molecules selectively bind to overexpressed receptors on cancer cells, promoting better cellular uptake and enhancing the overall therapeutic effect [8].

Gold nanoparticles (AuNPs), due to their unique physicochemical properties, have been used as drug delivery systems (DDSs) and anticancer agents with hyperthermia but also as anti-metastatic agents. Among various AuNPs formulations, glutathione-stabilized AuNPs (Au-GSH NPs) were selected for this study due to their ultrasmall core size (typically below 3 nm), and the use of glutathione—a naturally occurring tripeptide—as a stabilizing ligand contributes significantly to their excellent aqueous dispersibility, low immunogenicity, favorable biodistribution, and ability to inhibit canine osteosarcoma cell extravasation, as previously demonstrated by our team [9]. Importantly, glutathione not only serves as a capping and stabilizing agent but also plays a role in enhancing the redox responsiveness of the nanoparticle surface, potentially enabling environment-sensitive behavior in biological systems. Additionally, the thiol–gold interaction forms strong covalent bonds that ensure high structural stability under physiological conditions.

Recent studies in human cancer models have shown that AuNPs can modulate key processes and aspects of metastasis development, including the epithelial–mesenchymal transition (EMT), matrix metalloproteinases (MMPs), and intracellular signaling pathways such as PI3K/AKT and Hippo. EMT is a crucial process in cancer progression that enables tumor cells to gain migratory and invasive properties [10–12]. Li et al. described that AuNPs improved the structure and function of tumor blood vessels, leading to increased blood flow and reduced hypoxia within tumors [13]. Normalizing the tumor vasculature decreased the intravasation of cancer cells and metastases. Additionally, AuNPs directly inhibited EMT by decreasing the expression of mesenchymal markers like vimentin and increasing epithelial markers such as E-cadherin. These combined effects resulted in a significant reduction in

lung metastases in human melanoma models treated with AuNPs [13]. Gold nanorods (Au NRs) can inhibit tumor invasion and metastasis by altering the structure of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), a key enzyme in cancer progression. Their effectiveness depends on the aspect ratio, with 3.3 being optimal for the maximum inhibition. Moreover, Au NRs with an aspect ratio of 3.3 suppress X-ray-induced tumor invasion [14]. These findings suggest that Au NRs could be developed as adjustable matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors for cancer treatment [14]. In recent studies, Małek et al. demonstrated that Au-GSH NPs effectively inhibit the extravasation of canine OSA cells (from OSCA-8 and OSCA-32 cell lines) using the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model, indicating their potential as an agent against this crucial step of the metastatic cascade [9].

Furthermore, we previously demonstrated A2M's role in the metastatic process in canine OSA, and proteomic analysis revealed the significantly lower expression of the A2M protein in two OSA cell lines (OSCA-8 and OSCA-32) compared to osteoblasts. A2M, as a protease inhibitor, is involved in the degradation of extracellular matrix components, a significant process in cancer cell invasion and metastasis [15]. Olbromski et al. investigated A2M expression in human cancers, including breast cancer (IDC), lung cancer (NSCLC), and colorectal cancer (CC), revealing distinct patterns across different malignancies. In IDC, A2M expression was elevated in tumor tissues and correlated with a higher tumor grade and poorer survival, suggesting a role in cancer progression. In NSCLC, A2M expression was decreased in tumor cells compared to non-malignant lung tissue, while its receptor LRP1 was upregulated in the tumor stroma, indicating a potential compensatory mechanism. In CC, A2M was increased in tumor tissues, similarly to IDC, but correlated with better overall survival. These findings highlight the complex role of A2M in cancer biology, with potential implications as a biomarker and therapeutic target, depending on the tumor type [16].

The main aim of this study was to evaluate the influence of Au-GSH NPs on different steps of the metastatic cascade: angiogenesis, migration, and colony formation for canine osteosarcoma. The intermediate aim of this study was to assess whether its mechanism of action is correlated with changes in A2M expression in OSA cells.

2. Results

2.1. Characterization of Synthesized Au-GSH NPs: Morphology and Colloidal Stability

The morphology and dispersion of the synthesized Au-GSH NPs were evaluated using transmission electron microscopy (TEM). As presented in Figure 1, the nanoparticles exhibit a predominantly spherical shape with a relatively uniform size distribution, reporting an average diameter of 4.3 ± 1.1 nm (Figure 2). A zeta potential of -52.9 ± 10.6 mV was found for Au-GSH NPs, indicating a high surface charge that ensures strong electrostatic repulsion between particles and prevents their aggregation. This value confirms the high colloidal stability of the nanoparticle suspension in aqueous solution [17].

2.2. Au-GSH NPs Are Not Cytotoxic to Canine OSA Cells from D-17 Cell Line

D-17 cells treated with 500 µg/mL (the maximum concentration that does not induce Au-GSH NP aggregation) Au-GSH NPs for 24 h under a contrast-phase microscope did not exhibit any signs of changes in morphology in comparison to the non-treated control cells (Figure 3). Both treated and untreated cells exhibit a similar elongated, spindle-like shape with a comparable density and arrangement. There is no visible evidence of structural damage, cell shrinkage, or detachment. Furthermore, the cell mortality assessed using the Countess II automated cell counter with trypan blue exclusion did not exceed 20% at either tested concentration (200 µg/mL and 500 µg/mL) in D-17 cells. For OSCA-32 and OSCA-8 cells, the same evaluations of morphology and viability were applied in a previous study

by our team [9]. The analyses showed comparable results: no morphological changes or cell mortality below 20%.

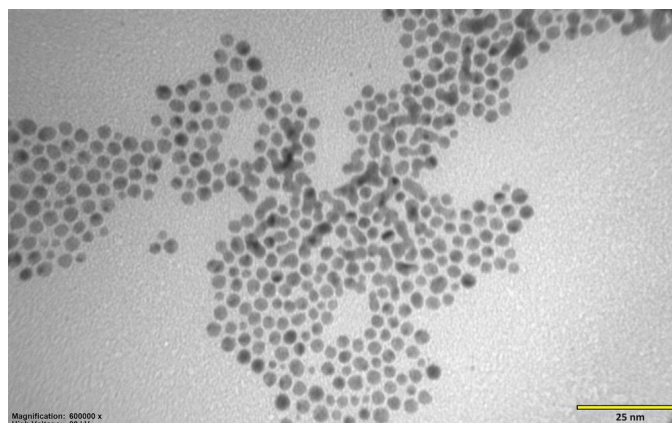


Figure 1. TEM images of Au-NPs stabilized with glutathione (Au-GSH NPs). The nanoparticles exhibit a spherical shape and uniform size distribution. No significant aggregation was observed, indicating the effective stabilization of the colloidal system. Scale bars: 25 nm.

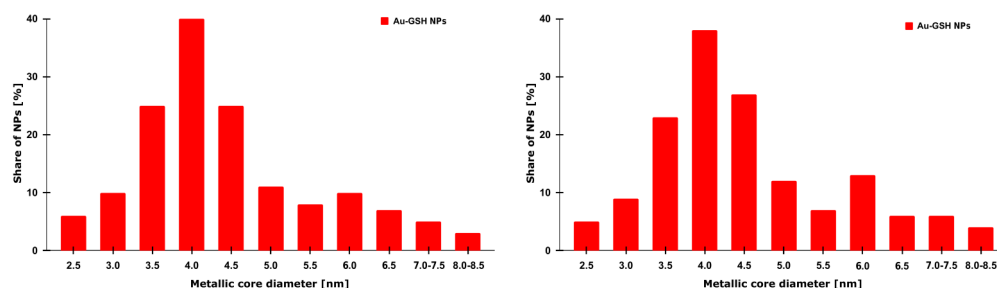


Figure 2. Size distribution histograms of the metallic core of Au-GSH nanoparticles (Au-GSH NPs). The diameters were estimated based on the scale bars visible in the respective TEM images using ImageJ software (version 1.51, 23 April 2018). The quantitative analysis illustrates the distribution of nanoparticle sizes within the examined sample.

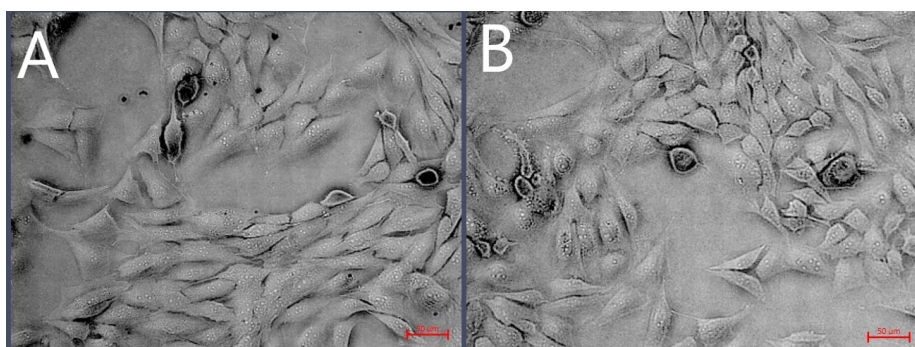


Figure 3. Phase-contrast microscopy images of D-17 cells treated with 500 µg/mL Au-GSH NPs (A) vs. non-treated (B) D-17 cells, shown at 20× magnification, scale bar 50 µm.

2.3. The Influence of Au-GSH NPs on the Migration Rate of the D-17, OSCA-8, and OSCA-32 Cell Lines

An in vitro wound-healing assay was used to analyze the influence of Au-GSH NPs on D-17, OSCA-8, and OSCA-32 cell migration. Au-GSH NPs in both concentrations (200 µg/mL and 500 µg/mL) significantly ($p \leq 0.001$ after 12 h and $p \leq 0.001$ after 24 h) inhibited OSA cell migration in comparison to the untreated cells (Figures 4–6 and S1–S3).

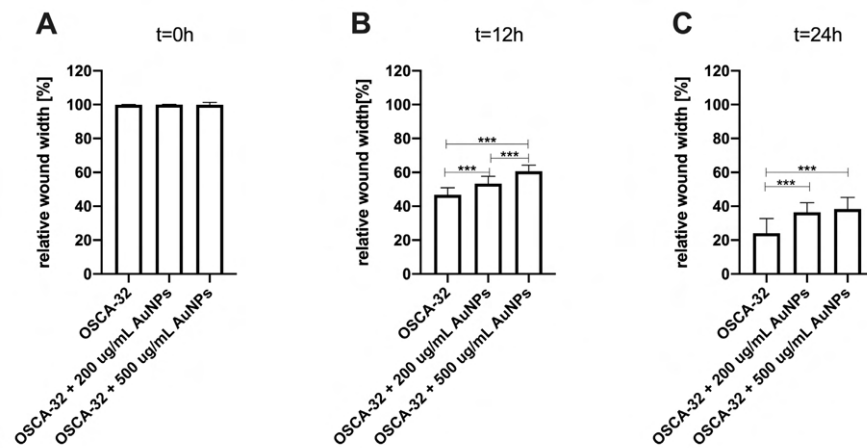


Figure 4. Bar graphs showing Au-GSH NP effects in two concentrations (200 µg/mL and 500 µg/mL) on inhibiting the migration of canine osteosarcoma cells from the OSCA-32 cell line at (A) t0 (0 h), (B) t1 (12 h), and (C) t2 (24 h). *** $p \leq 0.001$.

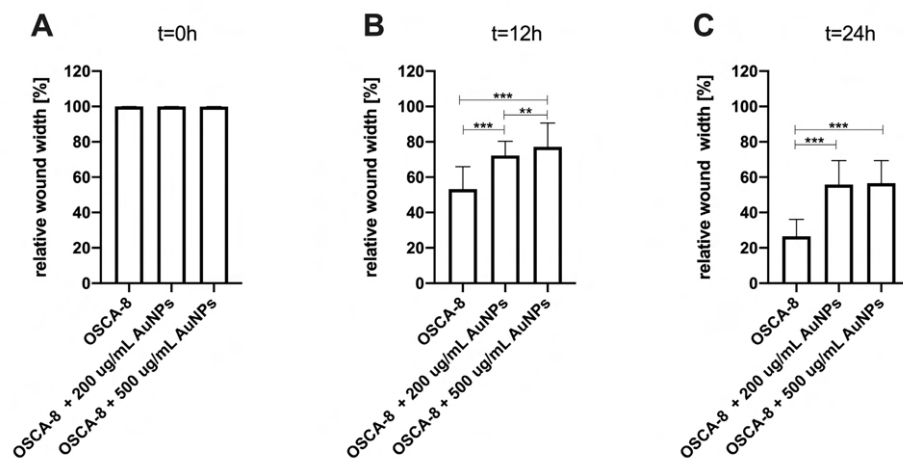


Figure 5. Bar graphs showing the Au-GSH NP effects in two concentrations (200 µg/mL and 500 µg/mL) on inhibiting the migration of canine osteosarcoma cells from the OSCA-8 cell line at (A) t0 (0 h), (B) t1 (12 h), and (C) t2 (24 h). *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$.

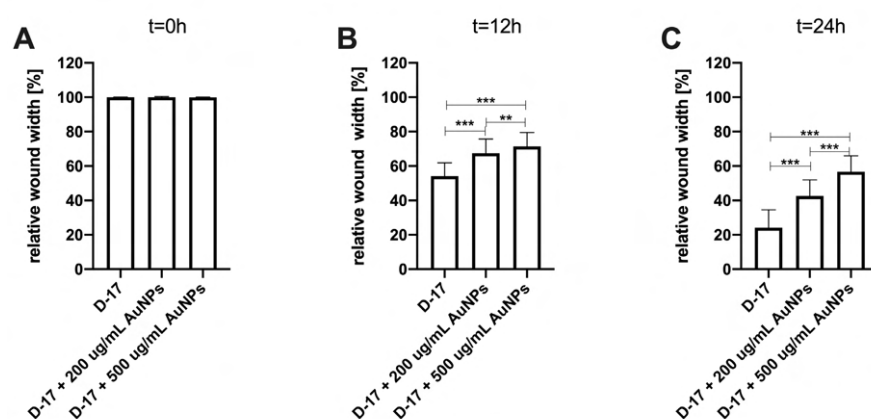


Figure 6. Bar graphs showing the Au-GSH NP effects in two concentrations (200 µg/mL and 500 µg/mL) on inhibiting the migration of canine osteosarcoma cells from the D-17 cell line at (A) t0 (0 h), (B) t1 (12 h), and (C) t2 (24 h). *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$.

2.4. Au-GSH NP Treatment Increases Expression of A2M Protein in Canine OSA Cells

Simple Western analysis revealed a highly significant increase in A2M expression in OSCA-8 cells ($p \leq 0.001$) and a significant increase in OSCA-32 cells ($p \leq 0.05$) following treatment with Au-GSH NPs, as compared to the non-treated groups (Figure 7).

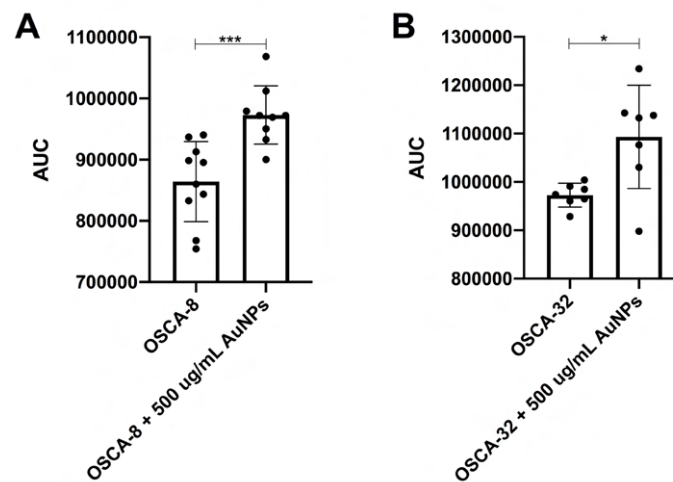


Figure 7. Bar graphs showing A2M expression in OSCA-8 (A) and OSCA-32 (B) cells following treatment with Au-GSH NPs. A highly significant increase in A2M expression was observed in OSCA-8 cells (** $p \leq 0.001$), and a significant increase was detected in OSCA-32 cells (* $p \leq 0.05$), compared to untreated control groups.

2.5. Au-GSH NPs Inhibit Angiogenesis in the CAM Assay with Canine OSA Cells

In the chick embryo CAM model, OSCA-32 treated with Au-GSH NPs demonstrated an inhibitory effect on angiogenesis after 72 h (Figure 8F), compared to the negative control with aqua pro injection (Figure 8B) and OSCA-8 alone, where newly formed small vessels and hemorrhagic areas are clearly visible (Figure 8D).

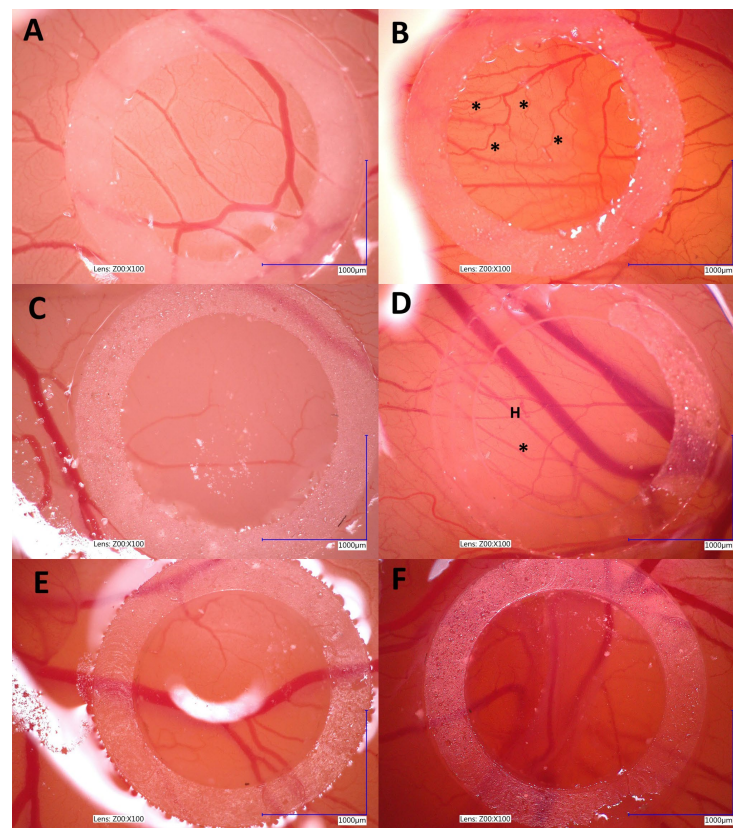


Figure 8. Representative images of angiogenesis in the CAM assay following treatment with OSCA-32 incubated with 500 µg/mL Au-GSH NPs. CAMs from the control group at T = 0 h (A) and T = 72 h (B). CAMs treated with OSCA-32 cells at T = 0 h (C) and T = 72 h (D). CAMs treated with OSCA-32 incubated with 500 µg/mL AuNPs at T = 0 h (E) and T = 72 h (F). Newly formed blood vessels are indicated by an asterisk (*), and hemorrhagic areas are marked with the letter H.

2.6. Au-GSH NP Effects on Canine OSA Cell Colony Formation

Au-GSH NPs in a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduced the number of colonies compared to untreated cells in all evaluated canine OSA cell lines (Figure 9B,E,H). Interestingly, the concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Au-GSH NPs has no or a much lower effect on colony formation in all tested cells (Figure 9C,F,I).

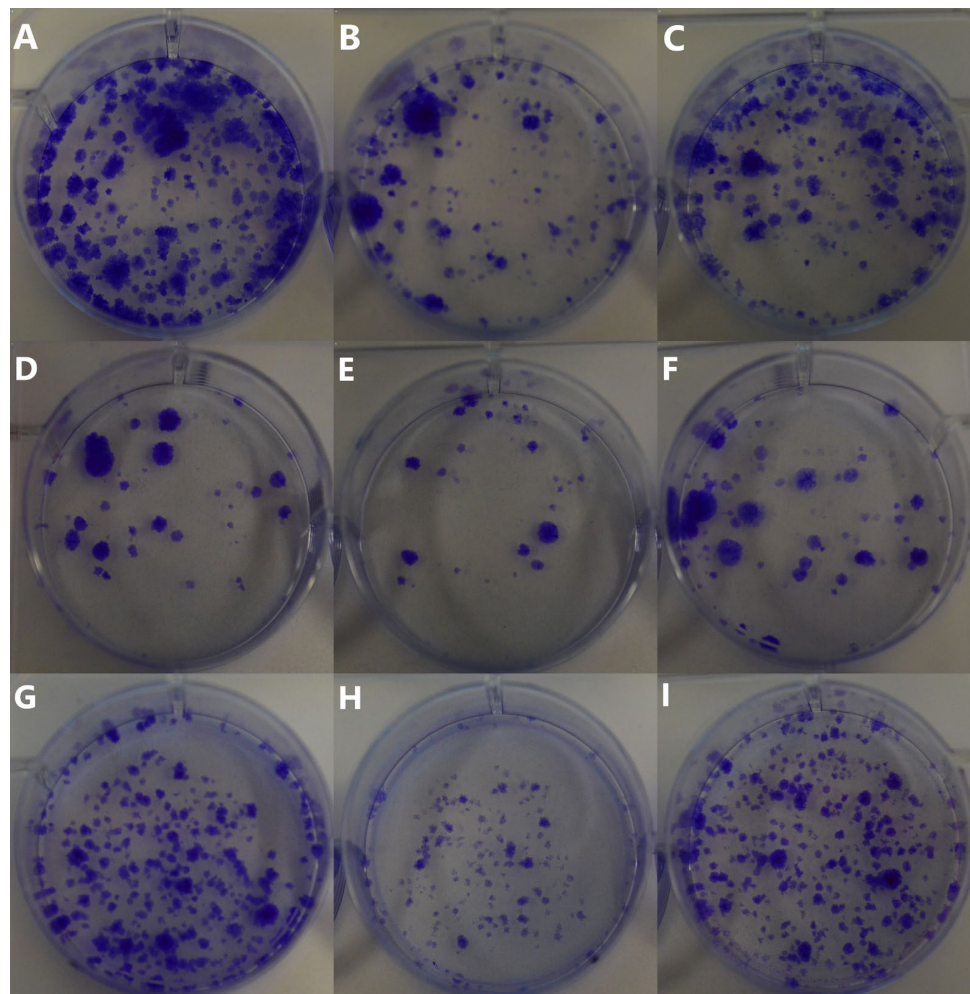


Figure 9. Effects of Au-GSH NPs on OSA cell colony forming after $t = 72$ h. Untreated D-17 cells (A), D-17 cells treated with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Au-GSH NPs (B) and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Au-GSH NPs (C); untreated OSCA-8 cells (D), OSCA-8 cells treated with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Au-GSH NPs (E) and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Au-GSH NPs (F); untreated OSCA-32 cells (G), OSCA-32 cells treated with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Au-GSH NPs (H) and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Au-GSH NPs (I).

2.7. Au-GSH NP Accumulation in OSA Cells

MP-AES was employed to measure nanoparticle uptake by OSA cells. After incubation with Au-GSH NPs, the OSA cells were separated, rinsed, and analyzed to determine their gold content. The average number of nanoparticles absorbed per cell was calculated using the known nanoparticle size and gold content. The rinsing process effectively removed unabsorbed Au-GSH NPs, as confirmed by filtrate analysis. The results, summarized in Table 1, indicate that the OSCA-8, OSCA-32, and D-17 cell lines absorbed Au-GSH NPs.

The data presented in this table shows that the uptake of Au-GSH NPs by OSA cells varies significantly depending on the cell line and the concentration of Au-GSH NPs used. The highest level of absorption was observed in both OSCA-32 cells treated with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Au-GSH NPs ($11.79 \pm 2.54\%$), while the lowest was found in D-17 cells treated with 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Au-GSH NPs ($0.47 \pm 0.06\%$) (Table 1).

Table 1. Uptake of Au-GSH NPs by OSA cells.

Cell Line	Number of Au-GSH NPs/Cell	Au-GSH NPs Absorbed, %
OSCA-8 + Au-GSH NPs 200 µg/mL	$1.80 \times 10^6 \pm 2.15 \times 10^6$	10.51 ± 5.99
OSCA-8 + Au-GSH NPs 500 µg/mL	$3.05 \times 10^5 \pm 2.53 \times 10^5$	4.42 ± 1.85
OSCA-32 + Au-GSH NPs 200 µg/mL	$6.32 \times 10^6 \pm 5.74 \times 10^5$	11.79 ± 2.54
OSCA-32 + Au-GSH NPs 500 µg/mL	$4.47 \times 10^6 \pm 7.74 \times 10^5$	5.22 ± 0.91
D-17 + Au-GSH NPs 200 µg/mL	$2.51 \times 10^6 \pm 2.32 \times 10^6$	2.38 ± 0.82
D-17 + Au-GSH NPs 500 µg/mL	$2.47 \times 10^6 \pm 8.98 \times 10^5$	0.47 ± 0.06

3. Discussion

The inhibition of metastasis is considered the fundamental aim in oncological treatment. AuNPs show promising potential as innovative agents for targeting and disrupting these complex processes. One of the key physical factors that influence the interaction of AuNPs with cancer cells and their efficacy in oncological applications includes their size [18]. Pan et al. determined that the cytotoxicity of AuNPs is size-dependent—small AuNPs (1 to 2 nm in diameter) are highly toxic to cervix carcinoma epithelial cells and melanoma cells, compared to non-toxic larger particles [19]. In this study, we did not observe any toxic effects or morphology changes (Figure 2) of 4.3 ± 1.1 nm at a dose of 500 µg/mL on D-17 OSA cells (cell viability > 80%), which is consistent with our previous research on the OSCA-32 and OSCA-8 cell lines and feline fibrosarcoma cell lines [9,20]. Besides the possible toxic effect, the size of AuNPs significantly impacts their cellular uptake—smaller AuNPs are more readily internalized by cells compared to larger ones [21].

The efficacy of AuNP-based therapies has been evaluated in terms of the steps of the metastatic cascade in various human cancer studies [12,22–24]. In this study, we observed the significant ($p \leq 0.05$ and $p \leq 0.001$) inhibition of canine OSA cell migration following the treatment with 200 µg/mL and 500 µg/mL AuNPs, respectively, in all tested cell lines (Figures 3–5). Our results of the migration assessment are consistent with those described in human oncological research. In human ovarian cancer, 20 nm AuNPs and 35 nm nuclear-targeted AuNPs inhibited the migration and invasion of tumor cells [10,12]. Previously, our team showed that Au-GSH NPs impact MMP2 expression in canine OSA cells [9]. In this study, we demonstrated that Au-GSH NPs increase the expression of A2M in canine OSA cells (Figure 9). A crucial feature of the A2M protein is its capacity to suppress a range of proteases, including MMPs involved in extracellular matrix remodeling [25,26]. Our study is the first one that demonstrates the influence of Au-GSH NPs on the increase in A2M expression in OSA cells, indicating that A2M's modulating mechanism may be one of multiple interacting mechanisms of Au-GSH NPs' anti-metastatic properties. Further studies, including those on the role of Au-GSH NPs in A2M and ADAMTS1 gene expression and their potential application in anti-metastatic therapies, are needed in vitro and in vivo.

Another integral part of the metastatic cascade is angiogenesis. This process enables the development of new blood vessels in the primary tumor. This mechanism is activated in response to hypoxia in the tumor microenvironment, leading to the production of vascular growth factors such as VEGF, which stimulate the formation of pathologically permeable vessels, promoting both tumor growth and the ability of tumors to metastasize [27]. The chorioallantoic membrane (CAM) model of chick embryos has been widely used for many years in tumor angiogenesis research [28]. Our study demonstrated the antiangiogenic properties of 500 µg/mL Au-GSH NPs in a canine OSA model (Figure 8). The inhibition of angiogenesis may be linked to molecular mechanisms previously described for AuNPs,

including the suppression of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, the inhibition of VEGF receptor (VEGFR) signaling pathways, a reduction in MMP activity, and the downregulation of key angiogenesis-related pathways such as PI3K/Akt and MAPK/ERK. These mechanisms impair endothelial cell proliferation, migration, and new vessel formation, contributing to the antiangiogenic effect [29].

Besides the metastatic cascade steps, the phenomenon of tumor proliferation (uncontrolled cell division) is a characteristic of cancer and an important driver of its progression. Proliferation directly impacts tumor growth, progression, and the development of metastases, making it an important focus in cancer research [30]. The colony formation assay shows the ability of cancer cells to undergo clonal expansion and form a colony, providing insights into the proliferative capacity of cancer cells and the efficacy of treatments [31]. Pendiuk et al. evaluated the negative correlation between the clonogenic capacity of human melanoma cells and the treatment with ultrasmall AuNPs (~3 nm) stabilized by the anionic polysaccharide gum arabic (GA-AuNPs) [32]. In our study, the observed effect of Au-GSH NPs (Figure 9) contrasts with the dose-dependent correlation reported by Pendiuk and collaborators [32]. Our findings reveal a more pronounced inhibition of colony formation in canine OSA cells at a dose of 200 µg/mL compared to 500 µg/mL (Table 1), suggesting a non-linear dose–response relationship. The results may be directly related to the higher efficiency of Au-GSH NP uptake by OSA cells at the dose of 200 µg/mL than at the dose of 500 µg/mL (Table 1). The highest Au-GSH NP accumulation visible for the OSCA-32 cell line at a concentration of 200 µg/mL corresponds to the highest inhibition of colony formation (Figure 9H). However, the direct mechanism underlying the more effective inhibition of colony formation at the lower dose of Au-GSH NPs in canine OSA cells remains unknown and needs further exploration. Furthermore, the formation of a protein corona on the surface of Au-GSH NPs cannot be excluded. When nanoparticles enter biological fluids, they rapidly adsorb various proteins, forming a dynamic protein corona that can significantly influence their biological identity and interactions with cells. The composition and structure of this corona are known to affect cellular uptake mechanisms, biodistribution, and overall therapeutic efficacy. However, the specific role of the protein corona in the uptake of AuNPs by cancer cells remains unclear and is not fully elucidated in the current literature. Therefore, further studies are warranted to investigate the composition of the protein corona formed on AuNPs under different physiological conditions and to understand how it influences their interaction with cancer cells.

To the best of our knowledge, the present study is the first to demonstrate the influence of Au-GSH NPs on canine OSA cells' migration, angiogenesis, and colony formation. However, the limitations of this study include the small number of cell lines analyzed during testing. The cell lines used in this study represent osteosarcoma models with varying degrees of aggressiveness and are the only commercially available canine OSA cell lines. Based on the available literature and molecular profiling, OSCA-8 is considered to exhibit a highly aggressive phenotype, while OSCA-32 and D-17 are classified as moderately aggressive [33,34]. Additional derived OSA cell lines with confirmed *in vivo* metastatic capacity, such as Abrams or TOT, should be included in future investigations to enhance the reliability of the obtained results and increase the power of statistical analyses [35]. Additionally, this study was restricted to *in vitro* and *in ovo* models, without *in vivo* validation, and focused only on selected steps of the metastatic cascade. It is necessary to emphasize that these are preliminary results, and further investigations are required to fully understand the therapeutic potential of Au-GSH NPs and their mechanism of anti-metastatic action in canine osteosarcoma.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Culture

Three canine OSA cell lines, OSCA-8, OSCA-32 (Kerafast, Boston, MA, USA), and D-17 (ATCC, Manassas, VA, USA), and a normal canine osteoblast cell line—CnOb (Cell Applications, San Diego, CA, USA)—were used. The OSCA-8 cell line was derived from a left shoulder tumor of an intact 1-year-old male Rottweiler. The OSCA-32 cell line was derived from a tumor in the left wrist of a 9-year-old spayed female Great Pyrenees. The D-17 cell line was derived from an osteosarcoma metastatic to the lung of an 11-year-old female poodle.

Osteosarcoma cells (OSCA-8, OSCA-32, and D-17) as well as CnOb were cultured under aseptic conditions in a sterile chamber with laminar airflow, model ESCO Airstream AC2-3E8 (ESCO, Warsaw, Poland). They were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Waltham, MA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Life Technologies, Gibco, Waltham, MA, USA), antibiotics (Primocin—InvivoGen, Waltham, MA, USA—and penicillin–streptomycin 100× solution—HyClone™, Marlborough, MA, USA), and 1% HEPES buffer (HyClone™, Marlborough, MA, USA). The cultures were incubated at 37 °C with 5% CO₂ and 95% humidity. Experiments were conducted when the cells reached 70–80% confluence during the logarithmic growth phase. Cell viability was measured using trypan blue with an Invitrogen Countess II automated cell counter (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

4.2. Au-GSH NP Synthesis

The beginning of synthesis was performed at room temperature (RT) by combining 4 mL of hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate solution (HAuCl₄ × 3 H₂O) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 126.97 mmol/dm³ with 40 mL of distilled water in a 250 mL flask. The mixture became yellow in color. Next, by gently mixing with a magnetic stirrer placed at the bottom of the flask, 270 mg (0.88 mmol) of GSH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in its reduced form was added. The mixture became orange-brown in color, and after a few minutes it became colorless. This was due to the fact that gold had undergone an initial reduction from the +III to +I oxidation state. Mixing was continued at RT, and after about an hour, the appearance of white turbidity was observed at the surface. This was caused by a decrease in pH, resulting in the precipitation of the unreacted GSH residue by the protonation of its carboxyl groups. To remove the turbidity, 5 mL of alkaline sodium bicarbonate (NaHCO₃) (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) was added to the mixture. This caused the reionization of GSH carboxyl groups and its redissolution in water. When the mixture became clear again, 83 mg (2.19 mmol) of sodium borohydride (NaBH₄) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution freshly dissolved in 11 mL of cold distilled water was added as a reducing agent. As a result, the mixture turned into a dark maroon color. This was due to the reduction of gold atoms from the +I to 0 oxidation state. After 2 h of mixing the mixture at RT, 26 mL of methanol (MeOH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to precipitate 4 nm structures. The mixture was placed into Falcon-like test tubes and centrifuged for 9 min, 8000 RPM, RT. The precipitate, containing larger structures, was discarded. Another portion of 53 mL of MeOH was added to the supernatant and centrifuged again, in the same conditions. This was conducted to precipitate structures of 2 nm in size. The supernatant, containing unreacted substrates and smaller structures, was discarded. The precipitate was suspended in distilled water. The suspension was placed in a dialysis membrane with 3500 MWCO pores (Spectra/Por 3, 45 × 29 mm). The membrane was placed in a crystallizer with spout, 500 mL, 115 mm (DURAN, Wertheim, Germany) filled with distilled water. The suspension was mixed using a magnetic stirrer for 3 days to purify it from residual impurities. Water was exchanged

every day. After dialysis was complete, the membrane content was placed in the Falcon-like test tube, and an equal volume of PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added, obtaining a clean Au-GSH structure. In order to measure the molecular concentration, three test tubes were prepared. Every tube was weighed 3 times on a precise scale. A total of 1 mL of the Au-GSH structure suspension was placed in each tube, using an automatic pipette. Tubes were then placed in an oven and dried for approx. 2 h at over 100 °C. After the water evaporated completely, the tubes were weighed again. The difference before and after the drying process was stated as the weight of the Au-GSH structure. TEM images (EM-1400Flash, JEOL Co., Tokyo, Japan) confirmed the proper size, shape, and dispersion of nanoparticles, and zeta potential (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Panalytical, Malvern, Worcestershire, UK) showed the physicochemical properties of the nanoparticles' surface and the stability of the colloid.

4.3. Migration Rate Assessment in Canine OSA Cell Lines Treated with Au-GSH NPs

Cells were seeded into culture inserts (2-well Ibidi culture inserts, Ibidi GmbH, Grafelfing, Germany) at a density of 3×10^4 cells per well. Once the cells reached approximately 90% confluence, the medium was replaced with one containing Mitomycin C (Abcam, Cambridge, UK)—a DNA synthesis inhibitor used to assess cell migration—at a final concentration of 10 µg/mL, ensuring the minimal loss of viability while effectively inhibiting cell division. The pre-treatment with Mitomycin C stops cell proliferation, allowing for a true evaluation of cancer cell migration by excluding the impact of proliferating cells on wound closure [36]. The cell monolayers were incubated at 37 °C under standard conditions. After 3 h, the Mitomycin C medium was replaced with a serum-free medium, enriched with AuNPs at concentrations of 0 µg/mL (control group), 200 µg/mL, and 500 µg/mL, and the culture inserts were removed. For adherent cells, like those in this study, it is essential that the cells attach to the bottom of the wells and that proliferation is halted to assess migration properly. Cell migration within the scratch was observed at specific time intervals ($t_0 = 0$ h; $t_1 = 12$ h; $t_2 = 24$ h) using an inverted microscope (Primovert, Zeiss, Munich, Germany) at $4\times$ magnification. The images captured were later analyzed using Zen Pro 2012 (Zeiss, Munich, Germany), and cancer cell migration was quantified by measuring the distance between the scratch edges (100 measurements per scratch) following the method described by Rodriguez et al. [37]. This experiment was conducted in triplicate.

4.4. Au-GSH NP Effects on A2M Expression in OSA Cells

4.4.1. Protein Isolation, Cleaning, and Precipitation

Proteins from cell pellets (OSCA-8, OSCA-32 treated and untreated with 500 µg/mL Au-GSH NPs ($n = 7$ per group), and CnOb (positive control)) were homogenized and isolated using a solution composed of RIPA buffer (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) combined with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), in a 1:100 ratio. Specifically, the cell suspension was centrifuged at $300\times g$ for 3 min at room temperature (RT) and resuspended in 1.5 mL of phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, Waltham, MA, USA). The suspension obtained from a single culture flask was split into three 0.5 mL samples and centrifuged again ($300\times g$, 3 min, RT). After removing the supernatant, 200 µL of this prepared solution was added to the pellet. The mixture was vortexed three times for 5 s at 5 min intervals and subsequently centrifuged at $16,400\times g$ for 15 min at 4 °C. Protein concentrations in the homogenates were assessed using the bicinchoninic acid (BCA) assay. A BCA reagent was prepared following the instructions from the BCA Protein Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK). For the analysis, 200 µL of the BCA reagent and 10 µL of protein homogenate were added to each well of a 96-well plate, with each sample measured in triplicate. A standard curve was prepared using a bovine

serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) stock solution at an initial concentration of 1 mg/mL. The standard curve included the following BSA/RIPA solution concentrations: 0, 200 $\times$, 400 $\times$, 600 $\times$, 800 $\times$, and 1000 $\times$. Spectrophotometric readings were performed at 37 °C with a wavelength of 562 nm using the Infinite 200 PRO M Nano Plate Reader (Tecan, Zurich, Switzerland), operated with Tecan I-Control 2.0 Software (Tecan, Zurich, Switzerland).

4.4.2. Quantitative Protein Expression Analyses

The expression of A2M was assessed by the use of the Simple Western technique with total protein normalization in a Jess analyzer (Protein Simple, Minneapolis, MN, USA). Reagents from the EZ Standard Pack (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) were prepared following the Jess protocol. The EZ Standard Pack 12–230 kDa includes a pre-prepared biotinylated ladder, a 5 $\times$ fluorescent master mix, and a DTT solution. To prepare a 400 mM DTT solution, 40 μ L of deionized water was combined with DTT in a clear tube. The master mix was then combined with 20 μ L of 10 $\times$ sample buffer and 20 μ L of the prepared DTT solution. Protein homogenates were diluted with 0.1 $\times$ sample buffer (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) to achieve the appropriate protein concentration for analysis, which varies based on the expression level of the target protein. A 5 $\times$ fluorescent master mix was diluted with the lysate at a 1:4 ratio in a microcentrifuge tube. Samples were denatured at 95 °C for 5 min, then vortexed, spun at 3000 rpm for 10 s, and placed on ice.

The primary anti-human A2M antibody (MAB1938, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) was diluted using Milk-free Antibody Diluent (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA). A luminol-S and peroxide mixture (1:1 ratio) was vortexed and kept on ice. All reagents, including the secondary anti-mouse antibody (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA), were applied to the 12–230 kDa separation module in accordance with the manufacturer's instructions. The primary antibody saturation was 1:6.25 and at a concentration of 0.2 mg/mL according to the previously published protocol for A2M expression in canine OSA cells [33]. Total protein expression levels were normalized using the total protein detection module, ensuring the accurate quantification of protein levels across samples. The obtained data were analyzed using the Compass for Simple Western software (version 7.0, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA). The results were analyzed using the following criteria: total protein area under the curve differences between samples < 20% (Figure S4), signal-to-noise ratio > 10, and signal-to-background ratio > 3.

4.5. Au-GSH NP Effects on Angiogenesis—Chick Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay

Fertilized eggs of the domestic chicken (*Gallus gallus*) (Ross 308) ($n = 30$) were incubated under the following conditions: 37 °C and 70% humidity in a Fest Midi I incubator (F.U.H. Walenski, Gostyn, Poland) according to the previously described protocol with modifications [38]. Briefly, on the sixth day of incubation, a small window was made in each eggshell, and a sterile silicon ring (7 mm in external, 5 mm in internal diameter, 2 mm thick) was placed onto the CAM under aseptic conditions. The chick embryos were divided into three groups ($n = 10$ per group). For each group, the medium with 5×10^6 untreated OSA cells, OSA cells treated with Au-GSH NPs (prepared as described in Section "Preparation of OSA Cells Treated with Au-GSH NPs") for 24 h, and an aqua pro injection (control group) was injected into the silicone rings. Embryo survival was assessed by using an ovoscope after 24 and 48 h, with an average viability of 50%. Angiogenesis was observed at specific time intervals ($t_0 = 0$ h; $t_1 = 72$ h) using a VHX-900F lightning digital microscope (Keyence International Bedrijvenlaan, Mechelen, Belgium) at 4 $\times$ magnification. Images were captured with VHX-900F Ver 1.6.1.0 software (Keyence International Bedrijvenlaan, Mechelen, Belgium).

Preparation of OSA Cells Treated with Au-GSH NPs

OSCA-32 cells were plated in 6-well plates (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) at a density of 5×10^5 cells per well. Once the cells reached approximately 70% confluence, they were treated with Au-GSH NPs (500 $\mu\text{g/mL}$, 1 mL per well) for 24 h. Following the treatment, the cells were collected, washed twice with PBS, and prepared for subsequent experiments. The 500 $\mu\text{g/mL}$ Au-GSH NP concentration used in this study was selected based on previously published results with Au-GSH NP extravasation efficacy for OSA cells used on the CAM model [9].

4.6. Au-GSH NP Effects on Canine OSA Cell Colony Formation

OSCA-8, OSCA-32, and D-17 cells were seeded at a density of 5×10^3 cells per well into 6-well plates. A total of 24 h later, the medium was replaced with AuNP-containing medium at concentrations of 200 $\mu\text{g/mL}$ and 500 $\mu\text{g/mL}$ and one without AuNPs (negative control), and cells were incubated for 24 h in standard conditions. After that, the medium was replaced with standard culture medium, and cells were maintained until the seventh day of the experiment. Then the cells were fixed with methanol in two steps: a 12 min incubation followed by a 70 min incubation at room temperature, rinsing using ultra-pure water after each step. Crystal violet staining (0.1% in 95% ethanol) was applied and left overnight. Excess stain was rinsed off with ultra-pure water, and staining was repeated for enhanced visibility. All experiments were repeated in triplicate. Photographs of the stained wells were captured using a D3500 camera (Nikon, Tokyo, Japan) to analyze the nanoparticle effects on cell growth [31].

4.7. Accumulation of Au-GSH NPs in Canine OSA Cells by Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy (MP-AES)

OSCA-8, OSCA-32, and D-17 cells were seeded into 25 cm² flasks for adherent cell culture (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). A total of 24 h later, the medium was replaced with Au-GSH NP-containing medium (5 mL medium per flask, at concentrations 200 and 500 $\mu\text{g/mL}$), and cells were incubated for 24 h. To determine the number of AuNPs absorbed by the cells, first, the cells were mineralized using concentrated nitric acid (65%, Avantor, Gliwice, Poland). Then, concentrated hydrochloric acid (36%, Avantor, Gliwice, Poland) was added. Mixing nitric acid with hydrochloric acid in a 1:3 volume ratio produced aqua regia, resulting in a transparent yellow solution. This solution was then analyzed using MP-AES (MP-AES Agilent 4200, Tokyo, Japan). An analytical standard solution (SCP Science, Baie-D'Urfe, QC, Canada; LOT: S160615016, $1001 \pm 4 \mu\text{g/mL}$) was used as a reference material and appropriately diluted to create a 5-point calibration curve. Each calibration point and measurement were repeated three times. The determined concentration was then used to calculate the number of nanoparticles per cell, assuming that the density of Au-GSH NPs is equivalent to that of bulk gold (19.28 g/cm³), the average nanoparticle radius is 2.15 nm, and the number of cells in the mineralized sample is known.

4.8. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) with data presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) and statistical significance set at $p \leq 0.05$. For the A2M protein expression levels of untreated and AuNP-treated osteosarcoma cells, a two-tailed unpaired Student's *t*-test was used. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison post hoc test was applied to assess statistical differences between each group for cell migration. Statistical significance was marked with an asterisk at $p \leq 0.05$ (*), and high statistical

significance was marked at $p \leq 0.01$ (**) and very high statistical significance was stated as $p \leq 0.001$ (***).

4.9. Use of Generative AI

Generative artificial intelligence (GenAI) tool (Chat GPT 4.o, since March 2024) was used to assist in the preparation of this manuscript by combining individual images into composite figures (Figures 3, 8 and 9). Grammarly Pro software was used to check the style and grammar of the English used.

The final version of this manuscript was manually checked and approved by the authors.

5. Conclusions

Au-GSH NPs exhibit inhibitory effects on key tumorigenic processes in canine OSA cells (OSCA-8, OSCA-32, and D-17): migration, angiogenesis, and proliferation. Additionally, the inhibition of colony formation was more pronounced at 200 µg/mL than at 500 µg/mL, which may be related to the higher Au-GSH NP cell internalization at the lower concentration. This is the first study demonstrating the influence of Au-GSH NPs on the increase in A2M expression, which may be related to the anti-metastatic efficacy of Au-GSH NPs; however, further analyses are required to elucidate the exact mechanisms underlying these observations. Furthermore, Au-GSH NPs effectively suppressed angiogenesis in the CAM model, further supporting their potential to limit metastatic progression. These preliminary findings highlight the therapeutic potential of Au-GSH NPs in canine osteosarcoma treatment; however, further in vivo studies are needed to assess their clinical relevance in veterinary oncology.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms26136102/s1>.

Author Contributions: Conceptualization: K.A.Z.-K.; Data curation: S.S.W., K.I.K., A.M.M., B.S. and M.W. (Marek Wojnicki); Funding acquisition: S.S.W. and K.A.Z.-K.; Investigation: S.S.W., K.I.K., A.M.M., B.S. and M.W. (Marek Wojnicki); Methodology: S.S.W., K.A.Z.-K., K.I.K., A.M.M., B.S., M.W. (Marek Wojnicki) and M.W. (Michał Wójcik); Project administration: S.S.W. and K.A.Z.-K.; Resources: K.A.Z.-K., M.W. (Michał Wójcik) and S.S.W.; Supervision: K.A.Z.-K.; Validation: S.S.W., K.A.Z.-K., M.W. (Michał Wójcik) and M.W. (Marek Wojnicki); Visualization: S.S.W., A.M.M. and B.S.; Writing—original draft: S.S.W.; Writing—review and editing: K.A.Z.-K., K.I.K., A.M.M., B.S., M.W. (Marek Wojnicki) and M.W. (Michał Wójcik). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Part of this study was funded by the Doctoral School of the Warsaw University of Life Sciences—SGGW. The publication was financed by the Science Development Fund of the Warsaw University of Life Sciences—SGGW.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: On request, the raw data obtained in this study can be obtained from the authors (S.S.W., M.W. (Marek Wojnicki), M.W. (Michał Wójcik) and K.A.Z.-K.).

Acknowledgments: This manuscript is part of a Ph.D. thesis by Sylwia S. Wilk.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

A2M	alpha-2-macroglobulin
Au-GSH NPs	glutathione-stabilized gold nanoparticles

AuNPs	gold nanoparticles
BCA	bicinchoninic acid
CAM	chorioallantoic membrane
CnOb	canine osteoblast
DDS	drug delivery system
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial–mesenchymal transition
ETV7	ETS variant transcription factor 7
FBS	fetal bovine serum
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
LRP1	low-density lipoprotein receptor-related protein 1
MMP	matrix metalloproteinase
MP-AES	microwave plasma atomic emission spectroscopy
OSA	osteosarcoma
OSCA-8	canine osteosarcoma cell line 8
OSCA-32	canine osteosarcoma cell line 32
PBS	phosphate-buffered saline
PI3K/AKT/mTOR	phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mechanistic target of rapamycin
PLD	phospholipase D
PLD1	phospholipase D1
PLD2	phospholipase D2
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor receptor-2

References

1. Anfinson, K.P.; Grotmol, T.; Bruland, O.S.; Jonasdottir, T.J. Breed-Specific Incidence Rates of Canine Primary Bone Tumors—A Population Based Survey of Dogs in Norway Résumé. *Can. J. Vet. Res.* **2011**, *75*, 209–215. [[PubMed](#)]
2. Beck, J.; Ren, L.; Huang, S.; Berger, E.; Bardales, K.; Mannheimer, J.; Mazcko, C.; LeBlanc, A. Canine and Murine Models of Osteosarcoma. *Vet. Pathol.* **2022**, *59*, 399–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hapach, L.A.; Mosier, J.A.; Wang, W.; Reinhart-King, C.A. Engineered Models to Parse Apart the Metastatic Cascade. *Npj Precis. Oncol.* **2019**, *3*, 1–8. [[CrossRef](#)]
4. Poon, A.C.; Matsuyama, A.; Mutsaers, A.J. Recent and Current Clinical Trials in Canine Appendicular Osteosarcoma. *Can. Vet. J.* **2020**, *61*, 301–308.
5. Selmic, L.E.; Burton, J.H.; Thamm, D.H.; Withrow, S.J.; Lana, S.E. Comparison of Carboplatin and Doxorubicin-Based Chemotherapy Protocols in 470 Dogs after Amputation for Treatment of Appendicular Osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* **2014**, *28*, 554–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Yu, X.; Jia, S.; Yu, S.; Chen, Y.; Zhang, C.; Chen, H.; Dai, Y. Recent Advances in Melittin-Based Nanoparticles for Antitumor Treatment: From Mechanisms to Targeted Delivery Strategies. *J. Nanobiotechnol.* **2023**, *21*, 454. [[CrossRef](#)]
7. Fu, L.; Zhang, Y.; Farokhzad, R.A.; Mendes, B.B.; Conde, J.; Shi, J. 'Passive' Nanoparticles for Organ-Selective Systemic Delivery: Design, Mechanism and Perspective. *Chem. Soc. Rev.* **2024**, *52*, 7579–7601. [[CrossRef](#)]
8. Wang, B.; Hu, S.; Teng, Y.; Chen, J.; Wang, H.; Xu, Y.; Wang, K.; Xu, J.; Cheng, Y. Current Advance of Nanotechnology in Diagnosis and Treatment for Malignant Tumors. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 200. [[CrossRef](#)]
9. Małek, A.; Wojnicki, M.; Borkowska, A.; Wójcik, M.; Ziółek, G.; Lechowski, R.; Zabielska-Koczywąs, K. Gold Nanoparticles Inhibit Extravasation of Canine Osteosarcoma Cells in the Ex Ovo Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 9858. [[CrossRef](#)]
10. Arvizo, R.R.; Saha, S.; Wang, E.; Robertson, J.D.; Bhattacharya, R.; Mukherjee, P. Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by a Self-Therapeutic Nanoparticle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 6700–6705. [[CrossRef](#)]
11. Roy, M.; Hussain, F. Mitigation of Breast Cancer Cells' Invasiveness via Down Regulation of ETV7, Hippo, and PI3K/MTOR Pathways by Vitamin D3 Gold-Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 5348. [[CrossRef](#)]
12. Ali, M.R.K.; Wu, Y.; Ghosh, D.; Do, B.H.; Chen, K.; Dawson, M.R.; Fang, N.; Sulchek, T.A.; El-Sayed, M.A. Nuclear Membrane-Targeted Gold Nanoparticles Inhibit Cancer Cell Migration and Invasion. *ACS Nano* **2017**, *11*, 3716–3726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Li, W.; Li, X.; Liu, S.; Yang, W.; Pan, F.; Yang, X.Y.; Du, B.; Qin, L. PY Gold Nanoparticles Attenuate Metastasis by Tumor Vasculature Normalization and Epithelial–Mesenchymal Transition Inhibition. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 3509–3520. [\[CrossRef\]](#)
14. Shi, Y.; Pu, K.; Yao, H.; Chen, Y.; Zheng, X.; Zhao, L.; Ge, C. Gold Nanorods Inhibit Tumor Metastasis by Regulating MMP-9 Activity: Implications for Radiotherapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15*, 9034–9043. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Lindner, I.; Hemdan, N.Y.A.; Buchold, M.; Huse, K.; Bigl, M.; Oerlecke, I.; Ricken, A.; Gaunitz, F.; Sack, U.; Naumann, A.; et al. A2-Macroglobulin Inhibits the Malignant Properties of Astrocytoma Cells By Impeding B-Catenin Signaling. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 277–287. [\[CrossRef\]](#)
16. Olbromski, M.; Mrozowska, M.; Piotrowska, A.; Kmiecik, A.; Smolarz, B. Prognostic Significance of Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 in Various Cancers. *Am. J. Cancer Res.* **2024**, *14*, 3036–3058. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Zabielska-Koczywas, K.; Wojtalewicz, A.; Użarowska, E.; Klejman, A.; Wojtkowska, A.; Dolka, I.; Wojnicki, M.; Sobczak, K.; Wójcik, M.; Shen, H.; et al. Distribution of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles in Feline Fibrosarcomas and Their Role as a Drug Delivery System for Doxorubicin—Preclinical Studies in a Murine Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1021. [\[CrossRef\]](#)
18. Shanei, A.; Akbari-zadeh, H.; Attaran, N.; Reza, M. Effect of Targeted Gold Nanoparticles Size on Acoustic Cavitation: An in Vitro Study on Melanoma Cells. *Ultrasonics* **2020**, *102*, 106061. [\[CrossRef\]](#)
19. Pan, Y.; Neuss, S.; Leifert, A.; Fischler, M.; Wen, F.; Simon, U.; Schmid, G.; Brandau, W.; Jahnen-dechent, W. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* **2007**, *3*, 1941–1949. [\[CrossRef\]](#)
20. Wójcik, M.; Lewandowski, W.; Król, M.; Pawłowski, K.; Mieczkowski, J.; Lechowski, R.; Zabielska, K. Enhancing Anti-Tumor Efficacy of Doxorubicin by Non-Covalent Conjugation to Gold Nanoparticles—In Vitro Studies on Feline Fibrosarcoma Cell Lines. *PLoS ONE* **2015**, *3*, e0124955. [\[CrossRef\]](#)
21. Fan, M.; Han, Y.; Gao, S.; Yan, H.; Cao, L.; Li, Z.; Liang, X. Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Diagnosis and Therapy. *Theranostics* **2020**, *10*, 4944–4957. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Pastushenko, I.; Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 212–226. [\[CrossRef\]](#)
23. Park, S.Y.; Kim, B.; Cui, Z.; Park, G.; Choi, Y.W. Anti-Metastatic Effect of Gold Nanoparticle-Conjugated Maclura Tricuspidata Extract on Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 5317–5331. [\[CrossRef\]](#)
24. Balakrishnan, S.; Bhat, F.A.; Raja Singh, P.; Mukherjee, S.; Elumalai, P.; Das, S.; Patra, C.R.; Arunakaran, J. Gold Nanoparticle–Conjugated Quercetin Inhibits Epithelial–Mesenchymal Transition, Angiogenesis and Invasiveness via EGFR/VEGFR-2-Mediated Pathway in Breast Cancer. *Cell Prolif.* **2016**, *49*, 678–697. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Cuéllar, J.M.; Cuéllar, V.G.; Scuderi, G.J. A2-Macroglobulin: Autologous Protease Inhibition Technology. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* **2016**, *27*, 909–918. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Lehmann, G.L.; Ginsberg, M.; Nolan, D.J.; Rodr, C.; Zeng, S.; Voigt, A.P.; Mullins, R.F.; Rafii, S.; Rodriguez-boulan, E.; Benedicto, I. Retinal Pigment Epithelium-Secreted VEGF-A Induces Alpha-2-Macroglobulin Expression in Endothelial Cells. *Cells* **2022**, *11*, 297. [\[CrossRef\]](#)
27. Miranda, I.; Jahan, N.; Shevde, L.A. The Metastatic Cascade through the Lens of Therapeutic Inhibition. *Cell Rep. Med.* **2025**, *6*, 101872. [\[CrossRef\]](#)
28. Shing, Y.; Folkman, J.; Haudenschild, C.; Lund, D.; Crum, R.; Klagsbrun, M. Angiogenesis Is Stimulated by a Tumor-Derived Endothelial Cell Growth Factor. *J. Cell. Biochem.* **1985**, *287*, 275–287. [\[CrossRef\]](#)
29. Darweesh, R.S.; Ayoub, N.M.; Nazzal, S. Gold Nanoparticles and Angiogenesis: Molecular Mechanisms and Biomedical Applications. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 7643–7663. [\[CrossRef\]](#)
30. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [\[CrossRef\]](#)
31. Franken, N.A.P.; Rodermond, H.M.; Stap, J.; Haveman, J.; Bree, C. Van Clonogenic Assay of Cells in Vitro. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2315–2319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Pendiuk Gonçalves, J.; Fraga da Cruz, A.; Ribeiro de Barros, H.; Santana Borges, B.; Almeida Soares de Medeiros, L.C.; Soares, M.J.; Padovan dos Santos, M.; Grassi, M.T.; Chandra, A.; del Mercato, L.L.; et al. Beyond Gold Nanoparticles Cytotoxicity: Potential to Impair Metastasis Hallmarks. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *157*, 221–232. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Wilk, S.S.; Michalak, K.; Owczarek, E.P.; Winiarczyk, S.; Zabielska-Koczywas, K.A. Proteomic Analyses Reveal the Role of Alpha-2-Macroglobulin in Canine Osteosarcoma Cell Migration. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 3989. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Gola, C.; Giannuzzi, D.; Rinaldi, A.; Iussich, S.; Modesto, P.; Morello, E.; Buracco, P.; Aresu, L.; Maria, R. De Genomic and Transcriptomic Characterization of Canine Osteosarcoma Cell Lines: A Valuable Resource in Translational Medicine. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 666838. [\[CrossRef\]](#)
35. Wilson-Robles, H.; Franks, K.; Pool, R.; Miller, T. Characterization of Five Newly Derived Canine Osteosarcoma Cell Lines. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 357. [\[CrossRef\]](#)
36. Walewska, M.; Małek, A.; Taciak, B.; Wojtalewicz, A.; Wilk, S.; Wojtkowska, A.; Zabielska-Koczywas, K.; Lechowski, R. PEG-Liposomal Doxorubicin as a Potential Agent for Canine Metastatic Osteosarcoma—In Vitro and Ex Ovo Studies. *J. Vet. Res.* **2023**, *67*, 297–305. [\[CrossRef\]](#)

37. Rodriguez, L.G.; Wu, X.; Guan, J.L. Wound-Healing Assay. *Methods Mol. Biol.* **2005**, *294*, 23–29. [[CrossRef](#)]
38. Pingwara, R.; Ulewicz, K.; Mucha, J.; Tonecka, K.; Pilch, Z.; Taciak, B.; Mori, M.; Berardozi, S.; Botta, B.; Rygiel, T.P.; et al. Interferon Lambda 2 Promotes Mammary Tumor Metastasis via Angiogenesis Extension and Stimulation of Cancer Cell Migration. *J. Physiol. Pharmacol.* **2017**, *68*, 573–583.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Warszawa, dn.21.07.2025 r.

Lek.wet.Sylwia Wilk

Laboratorium Nanoonkologii Doświadczalnej i Klinicznej
Katedra Chorób Małych Zwierząt i Klinika
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

sylwia_wilk@sggw.edu.pl

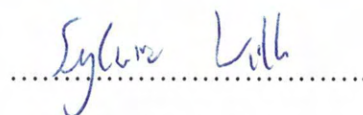
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Główny Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywas, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badawczej, pozyskaniu finansowania, zarządzaniu projektem, udziale w przeprowadzeniu eksperymentów, opracowaniu metodologii, walidacji i porządkowaniu danych, przygotowaniu części graficznej, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu oraz udziale w jego redakcji.



Podpis

Dr hab. Michał Wójcik

Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa
mwojcik@chem.uw.edu.pl

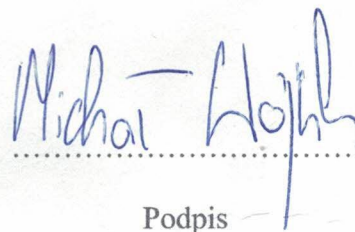
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywas, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102>

mój indywidualny wkład obejmował udział w opracowaniu metodyki badawczej, walidacji wyników, zapewnieniu zasobów niezbędnych do realizacji eksperymentów oraz redakcji i korekcie końcowej wersji manuskryptu.


Podpis

Warszawa, dn.21.07.2025 r.

Mgr inż. Arkadiusz Michałowski

Laboratorium Nanoonkologii Doświadczalnej i Klinicznej
Katedra Chorób Małych Zwierząt i Klinika
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

arkadiusz_michalowski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównnej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywąg, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na udziale w przeprowadzeniu eksperymentów, opracowaniu i porządkowaniu danych, przygotowaniu części graficznej, współtworzeniu metodologii oraz uczestnictwie w redakcji manuskryptu.


.....
22.07.2025
Podpis

Warszawa, dn.03.07.2025 r.

Mgr inż. Bartosz Smereczyński

Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa
b.smereczyns@student.uw.edu.pl

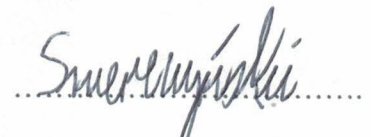
Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoly Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywąg, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu i porządkowaniu danych, przeprowadzaniu badań eksperymentalnych, współtworzeniu metodyki badawczej, przygotowaniu materiałów wizualnych oraz redakcji i korekcie manuskryptu.


.....
Podpis

Warszawa, dn.21.07.2025 r.

Dr hab.Katrzyzna Zabielska-Koczywās

Laboratorium Nanoonkologii Doświadczalnej i Klinicznej
Katedra Chorób Małych Zwierząt i Klinika
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

katarzyna_zabielska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Główniej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Wilk, S. S., Kukier, K. I., Michałowski, A. M., Wojnicki, M., Smereczyński, B., Wójcik, M., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2025). The Anti-Metastatic Properties of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles—A Preliminary Study on Canine Osteosarcoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms26136102>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na koncepcji i projektowaniu badań, nadzorze merytorycznym, interpretacji wyników, redakcji naukowej oraz ostatecznej autoryzacji wersji manuskryptu przed złożeniem do publikacji.



Podpis