



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Centrum Medycyny Translacyjnej

Mgr Inż. Katarzyna Anna Roszkowska

Mutacje genu *TP53* w nowotworach gruczołu mlekowego u suk

TP53 Gene Mutations in Canine Mammary Tumors

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

dr hab. Sylwii Flis, prof. SGGW

Katedra Nauk Przedklinicznych

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa 2025

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 20.10.2025 r.

Czytelny podpis promotora Sybilie Flak

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie 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 20.10.2025

Czytelny podpis autora pracy Witamina Kozłowska

Składam serdeczne podziękowania:

dr hab. Sylwii Flis

za nieocenioną pomoc, poświęcony czas, zaangażowanie
i możliwość współpracy, której wiele zawdzięczam

dr hab. Sławomirowi Gizińskiemu

za współpracę oraz wsparcie merytoryczne od strony klinicznej projektu

Lekarzom weterynarii

bez, których wysiłku i pomocy nie byłoby tej pracy

Chciałam także serdecznie podziękować moim przyjaciółkom
Iwonie, Agnieszce, Oli, Marysi i Karolinie oraz rodzicom,
bez których na pewno bym się nie znalazła w tym miejscu,
w którym teraz jestem, a jest to dobre miejsce.

Spis treści

Summary.....	11
Streszczenie	13
Informacja o finansowaniu badań	15
Wykaz skrótów	16
1 Wstęp i przegląd literatury.....	19
1.1 Prewalencja raka piersi w Polsce i na świecie.....	19
1.2 Białko p53- strażnik genomu, czy strażnik komórki nowotworowej?	20
1.3 Mutacje w genie <i>TP53</i> - manifestacje <i>in vitro</i>	22
1.4 Charakterystyka i klasyfikacja typów raka piersi w świetle badań histopatologicznych oraz molekularnych.....	25
1.5 Biologiczne podstawy wykorzystania psa jako modelu w badaniach nad nowotworami człowieka w porównaniu z modelami gryzoni	29
1.6 Porównanie biologii nowotworów gruczołu mlekowego u psów i ludzi oraz metod ich analizy	31
1.7 Analiza porównawcza genu <i>TP53</i> i białka p53 u ludzi i psów w kontekście nowotworów gruczołu mlekowego.....	34
1.8 Metody diagnostyczne i możliwości terapeutyczne w leczeniu nowotworów gruczołu mlekowego u suk.....	37
1.9 Modele komórkowe jako narzędzie w badaniach nad nowotworami gruczołu mlekowego	40
2 Hipoteza badawcza.....	42
3 Cel pracy	43
4 Materiały i metody	44
4.1 Pozyskanie guzów nowotworowych gruczołu mlekowego	44
4.2 Analiza histopatologiczna	47
4.3 Przygotowanie roztworów i buforów do izolacji komórek z guzów nowotworowych	47
4.4 Izolacja komórek z tkanki oraz ich dalsza propagacja <i>in vitro</i>	48
4.5 Przygotowanie naczyń hodowlanych do badań w modelu 2D	51
4.6 Formowanie sferoidów 3D do analiz chemiooporności i inwazyjności	52
4.7 Analiza inwazyjności	53
4.8 Analiza migracji komórek – test zarastania rysy <i>in vitro</i>	55
4.9 Przygotowanie roztworów chemioterapeutyków	57
4.10 Analiza chemiooporności komórek w modelu 2D	58

4.11	Analiza chemiooporności komórek w modelu 3D.....	59
4.12	Test klonogeniczności	61
4.13	Izolacja RNA z materiału biologicznego	62
4.14	Synteza cDNA i sekwencjonowanie transkryptu <i>TP53</i>	62
4.15	Ilościowa analiza transkryptów metodą qPCR.....	66
4.16	Analiza statystyczna.....	68
5	Wyniki i analiza statystyczna.....	69
5.1	Materiał pozyskany do badań	69
5.1.1	Dane kliniczne dotyczące występowania nowotworów gruczołu mlekowego u suk w populacji warszawskiej	72
5.1.2	Opis wykrytych mutacji w genie <i>TP53</i>	73
5.2	Linie komórkowe wyprowadzone z pozyskanych w ramach pracy guzów nowotworowych gruczołu mlekowego suk.....	76
5.2.1	Ocena inwazyjności.....	81
5.2.2	Ocena migracji	85
5.2.3	Ocena chemiooporności komórek w modelu 2D.....	87
5.2.4	Ocena chemiooporności komórek w modelu 3D.....	89
5.2.5	Ocena zdolności klonogenicznej komórek	92
5.3	Analiza ekspresji genów z panelu PAM50 w guzach nowotworowych gruczołu mlekowego suk - porównanie wartości ΔC_t w guzach o różnym statusie <i>TP53</i> oraz odmiennych cechach klinicznych	92
6	Omówienie wyników i dyskusja	96
6.1	Epidemiologia nowotworów gruczołu mlekowego suk w populacji Warszawy i okolic.....	96
6.2	Indywidualna charakterystyka mutacji genu <i>TP53</i> w kontekście modelu translacyjnego.....	100
6.3	Charakterystyka <i>in vitro</i> badanych guzów w kontekście mutacji w genie <i>TP53</i> oraz potencjału translacyjnego.	105
6.4	Ekspresja wybranych genów w guzach gruczołu mlekowego suk w odniesieniu do mutacji w genie <i>TP53</i> i porównanie z danymi dotyczącymi raka piersi u ludzi	110
6.5	Ocena modelu translacyjnego.....	112
7	Wnioski końcowe.....	114
8	Bibliografia	116
9	Załączniki.....	135

9.1	Załącznik 1 Zestawienie informacji o wyprowadzonych liniach komórkowych CMT w ramach realizacji tej pracy doktorskiej.	135
-----	---	-----

Summary

***TP53* Gene Mutations in Canine Mammary Tumors**

In 2022, breast cancer was diagnosed in 24,418 Polish women, of whom 8,723 died. These data illustrate the scale of the problem and highlight the urgent need for novel therapeutic approaches. The implementation of innovative treatment strategies, however, requires the use of an appropriately selected animal model. Rodents are currently the most commonly employed, yet the origin and course of neoplastic diseases in these species differ significantly from those observed in humans. Increasingly, the dog is being considered as an alternative research model, since it shares the human environment, undergoes routine medical examinations as a companion animal, and develops tumors that require clinical management.

Therefore, the dog is increasingly being considered as an alternative research model, as it shares environmental conditions with humans, undergoes routine veterinary examinations, and the development of tumors in this species necessitates appropriate therapeutic interventions. The p53 protein, referred to as the “guardian of the genome”, plays a crucial role in oncogenesis by protecting cells against neoplastic transformation through the activation of DNA repair pathways or the initiation of apoptosis.

Mutations in the *TP53* gene are present in over 50% of tumors, and in breast cancer, approximately 30% of cases harbor such mutations. These alterations are associated with poorer prognosis, increased chemoresistance, and enhanced metastatic potential. To date, no studies have evaluated the extent to which canine mammary tumors reflect human breast cancer with regard to the presence of *TP53* mutations, nor whether such mutations correlate with clinical manifestations. The research material for this study consisted of 50 mammary gland tumors collected from 37 female dogs during therapeutic mastectomy. Clinical information was additionally obtained for each patient both prior to surgery and during a follow-up period of at least 6 months to one year postoperatively. Tumors were subjected to histopathological and molecular analyses, and from 32 tumors, cell lines were established for *in vitro* studies.

Molecular analyses revealed mutations in 7 of 47 sequenced tumors, accounting for less than 15% of the examined cohort. Each detected mutation was unique. Unfortunately, the heterogeneity of the study population prevented the generation of results with sufficient statistical power. Nevertheless, this study resulted in the development of an extensive database comprising clinical, histopathological, and molecular findings, including gene expression analyses of markers not previously investigated in dogs but associated with breast cancer diagnostics in humans (PAM50 panel), as well as unique, stable cell lines characterized in detail with respect to malignancy parameters. Despite certain limitations, the analyses demonstrated a significant correlation between the presence of *TP53* mutations and the histopathological type of tumor ($p=0,0121$). Furthermore, *in vitro* assays revealed a significant difference in migratory capacity between mixed-type carcinoma and solid carcinoma ($p=0,0378$). Studies of cellular responses to different classes of chemotherapeutics indicated significant differences depending on the specific type of mutation present. Gene expression analyses further revealed significant differences between *TP53*-mutated (*MUTp53*) and wild-type (*WTp53*) tumors for *ESR1* ($p=0,0009$), *MLPH* ($p=0,0028$), and *MYBL2* ($p=0,0267$). Histological grade correlated significantly with the expression of *ESR1*, *FOXA1*, *MLPH*, *MYBL2*, and *CDH3*.

The obtained results underscore the need for expanding the study cohort. In the future, it will also be necessary to broaden the panel of analyzed genes and chemotherapeutic agents. Despite its limitations, the collected research material provides a foundation for further studies on the application of the canine model in breast cancer research as well as in other neoplasms collected during the study that did not originate from the mammary gland. Based on the data obtained, it cannot be definitely stated whether the dog constitutes an adequate model for research on human breast cancer; however, the analyses conducted indicate its potential significant translational value.

Keywords: tumor, breast cancer, p53, cell model, animal model, *TP53*

Streszczenie

Mutacje genu *TP53* w nowotworach gruczołu mlekowego u suk.

W 2022 roku raka piersi zdiagnozowano u 24 418 Polek, z czego 8 723 zmarło z powodu tej choroby. Dane te jednoznacznie obrazują skalę problemu oraz podkreślają konieczność poszukiwania nowych strategii terapeutycznych. Wprowadzanie innowacyjnych metod leczenia wymaga jednak zastosowania odpowiednio dobranych modeli zwierzęcych.

Obecnie w badaniach *in vivo* najczęściej wykorzystuje się gryzonie, jednak zarówno etiologia, jak i przebieg procesów nowotworzenia u tych gatunków różnią się istotnie od obserwowanych u ludzi. Coraz częściej rozważa się zatem psa jako alternatywny model badawczy, ze względu na fakt, iż dzieli on z człowiekiem warunki środowiskowe, podlega regularnym badaniom weterynaryjnym, a rozwój nowotworów u tego gatunku wiąże się z koniecznością wprowadzania adekwatnych terapii.

Istotną rolę w procesach nowotworzenia odgrywa białko p53 określane mianem „strażnika genomu”, które chroni komórki przed transformacją nowotworową poprzez aktywację szlaków naprawy DNA lub inicjację apoptozy.

Mutacje w genie *TP53* są obecne w ponad 50% guzach nowotworowych, a w raku piersi w 30% guzów potwierdza się obecność mutacji, które odpowiadają za gorsze rokowania, większą chemiooporność, czy zdolność do przerzutowania. Dotychczas nie przeprowadzono badań oceniających, w jakim stopniu model nowotworu gruczołu mlekowego u suk odzwierciedla raka piersi u kobiet pod względem obecności mutacji w genie *TP53* oraz czy ich obecność koreluje z występowaniem objawów klinicznych.

Materiałem badawczym w niniejszej pracy było 50 guzów nowotworowych gruczołu mlekowego, pobranych od 37 suk podczas terapeutycznej mastektomii. Dodatkowo, zebrano informacje kliniczne pacjentek zarówno przed zabiegiem, jak i w okresie od co najmniej 6 miesięcy do roku po operacji. Guzy poddano analizie histopatologicznej i molekularnej, a z 32 guzów wyprowadzono linie komórkowe, które wykorzystano w badaniach *in vitro*. Badania molekularne wykazały występowanie mutacji u 7 z 47 zsekwencjonowanych guzów, co stanowi niecałe 15% zebranej populacji. Każda wykryta mutacja była innego typu. Niestety, heterogenność badanej grupy zwierząt uniemożliwiła uzyskanie wyników o odpowiedniej mocy statystycznej. W ramach pracy powstała jednak obszerna baza danych obejmująca wyniki kliniczne, histopatologiczne, molekularne, w tym analizy ekspresji genów dotychczas niebadanych u psów, a związanych z diagnostyką raka piersi u kobiet (panel PAM50) oraz unikalne, stabilne linie komórkowe, szczegółowo scharakteryzowane pod względem parametrów złośliwości. Pomimo pewnych ograniczeń, analiza wykazała, istotną korelację pomiędzy obecnością mutacji w genie *TP53*, a typem histopatologicznym guza ($p=0,0121$). Z kolei analiza *in vitro* wykazała istotną różnicę w zdolności do migracji komórek pomiędzy rakiem o typie mieszanym, a rakiem litym ($p=0,0378$). Badania dotyczące odpowiedzi komórek na różne chemioterapeutyki wykazały istotne różnice w zależności od rodzaju mutacji obecnej w danym guzie. Analizy ekspresji genów ujawniły istotne różnice pomiędzy guzami z mutacją *TP53* (*MUTp53*) a guzami z dzikim typem tego genu (*WTp53*) w przypadku genów: *ESR1* ($p=0,0009$), *MLPH* ($p=0,0028$) oraz *MYBL2* ($p=0,0267$). Stopień złośliwości guzów korelował istotnie z ekspresją genów *ESR1*, *FOXA1*, *MLPH*, *MYBL2* i *CDH3*.

Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę poszerzenia badań o większą grupę badawczą. W przyszłości zasadne będzie również rozszerzenie panelu analizowanych

genów oraz zastosowanych chemioterapeutyków. Pomimo ograniczeń, zgromadzony materiał badawczy stanowi podstawę do dalszych prac nad wykorzystaniem psiego modelu w badaniach nad rakiem piersi u ludzi oraz innymi nowotworami, pozyskanymi w trakcie badań, lecz nie spełniającymi kryterium zmiany wywodzącej się z gruczołu mlekowego. Na podstawie uzyskanych danych, nie można jednoznacznie stwierdzić, czy pies stanowi adekwatny model do badań nad rakiem piersi u człowieka, jednakże uzyskane analizy świadczą o potencjalnej istotnej wartości translacyjnej.

Słowa kluczowe: nowotwór, rak piersi, p53, model komórkowy, model zwierzęcy, *TP53*

Informacja o finansowaniu badań

Oświadczam, że praca została sfinansowana z środków pochodzących z grantu Narodowego Centrum Nauki NCN przyznanego na drodze konkursu PRELUDIUM o numerze 2019/33/N/NZ4/02773 o tytule „Mutacje w genie TP53 w guzie sutka u psów i ich znaczenie kliniczne.” pod kierunkiem Katarzyny Roszkowskiej.



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Wykaz skrótów

Skrót	Rozwinięcie angielskie	Rozwinięcie polskie
3D	three-dimensional space	przestrzeń trójwymiarowa
BAX	Bcl-2-associated X protein	białko BAX związane z Bcl-2
BBC3 (Puma)	Bcl-2 binding component 3	składnik wiążący Bcl-2
BCI	Breast Cancer Index	Indeks Raka Piersi
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	Narzędzie do lokalnego dopasowania sekwencji
BMI	Body Mass Index	Wskaźnik masy ciała
BSA	Bovine Serum Albumin	Bydlęca albumina surowicza
C12orf5 (TIGAR)	TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR)	Fosfataza indukowana przez p53 regulującą glikolizę i apoptozę
CDH3	P-cadherin	P-kadheryna
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	Inhibitor kinazy cyklinozależnej 1A (p21)
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27Kip1)	Inhibitor kinazy cyklinozależnej 1B (p27Kip1)
CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57)	Inhibitor kinazy cyklinozależnej 1C (p57)
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Inhibitor kinazy cyklinozależnej 2A
CMT	Canine Mammary Tumor	Nowotwór gruczołu mlekowego suk
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	Chemokina CXCL2
DAB2IP	Disabled homolog 2-interacting protein	Białko oddziałujące z homologiem Disabled 2
DBD	DNA Binding Domain	Domena wiążąca DNA
DNA	Deoxyribonucleic acid	Kwas deoksyrybonukleinowy
Dnmt1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	Metylotransferaza DNA 1
DR5	Death receptor 5	Receptor śmierci 5
ECM	Extracellular Matrix	Macierz zewnątrzkomórkowa
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition	Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna
ER	Estrogen Receptor	Receptor estrogenowy
et al.	<i>et alia</i>	i inni

FOXA1	Forkhead Box A1	Czynnik transkrypcyjny <i>FOXA1</i>
GEM	Genetically Engineered Mice	Genetycznie zmodyfikowane myszy
GLS2	Glutaminase 2	Glutaminaza 2
GOF	Gain of Function	Nabycie funkcji
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution	Zrównoważony roztwór soli Hanka
HER-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2	Ludzki receptor naskórkowego czynnika wzrostu 2
HGM	Histological Grade of Malignancy	Histologiczny stopień złośliwości
ICDC	Integrated Canine Data Commons	Zintegrowana baza danych psich nowotworów
KLF17	Krüppel-like factor 17	Czynnik podobny do Krüppela 17
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Homolog wirusowego onkogenu mięsaka szczura Ki-ras2 Kirsten
LOF	Loss of Function	Utrata funkcji
m.in.	–	Między innymi
MDM2	Mouse Double Minute 2	-
MUTp53	Mutant TP53 protein	Białko powstałe w wyniku mutacji w genie <i>TP53</i>
NCI	National Cancer Institute	Narodowy Instytut Raka
Noxa (PMAIP1)	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIP1)	-
Pai-1	Plasminogen Activator Inhibitor- 1	Inhibitor aktywatora plazminogenu
PanCanAtlas	Pan Cancer Atlas	Atlas nowotworów
PBS	Phosphate-Buffered Saline	Buforowany roztwór soli fosforanowej
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha	
PDGFRβ	Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta	Receptor β płytkopochodnego czynnika wzrostu
PR	Progesterone Receptor	Receptor progesteronowy
PRR	Proline-Rich Region	Region bogaty w prolinę
RD	Regulatory Domain	Domena regulacyjna

Real-time PCR (qPCR)	Real-time Polymerase Chain Reaction	Reakcja PCR w czasie rzeczywistym
RNA	Ribonucleic Acid	Kwas rybonukleinowy
<i>SERPINE1</i> (Pai1)	Plasminogen Activator Inhibitor-1	Inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI-1)
Snail	Zinc Finger Protein SNAI1	-
Sox4	SRY-Box Transcription Factor 4	Czynnik transkrypcyjny Sox4
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	Przełącznik sygnału i aktywator transkrypcji 3
TAD	Transactivation Domain	Domena transaktywacyjna
TBM	Tumor Mutational Burden	Obciążenie mutacyjne nowotworu
TCGA	The Cancer Genome Atlas	Atlas genomu nowotworów
TET	Tetramerization Domain	Domena tetrameryzacji
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta	Transformujący czynnik wzrostu beta
TIGAR	<i>TP53</i> -Inducible Glycolysis and Apoptosis Regulator	Fosfataza indukowana przez <i>TP53</i> regulująca glikolizę i apoptozę
<i>TP53</i>	Tumor Protein 53	Białko nowotworowe 53
Twist1	Twist-Related Protein 1	Białko związane z Twist1
<i>WTp53</i>	Wild-Type <i>TP53</i>	Dziki typ <i>TP53</i>

1 Wstęp i przegląd literatury

1.1 Prewalencja raka piersi w Polsce i na świecie

Postęp w medycynie, wynikający z rozwoju nowych technologii, umożliwił powrót do zdrowia wielu pacjentom onkologicznym dzięki lepszej diagnostyce oraz precyzyjniej dobranym schematom leczenia.

Nowotwory towarzyszą ludzkości od początku jej istnienia, jednak dopiero w ostatniej dekadzie znacząco poprawiła się wiedza na temat mechanizmów powstawania nowotworów i możliwości ich diagnostyki, tym samym pozwalając na prowadzenie z nimi skutecznej walki. Pod terminem „nowotwór” kryje się cała grupa chorób, z których każda może charakteryzować się zupełnie odmiennymi mechanizmami oporności komórek nowotworowych na stosowaną terapię, a zatem wymagać odmiennych metod leczenia. Z tego względu opracowane standardy postępowania w diagnostyce a przede wszystkim w leczeniu pacjentów onkologicznych nie do końca przynoszą oczekiwane efekty. Dlatego zadaniem badaczy jest opracowanie nowych, dokładniejszych i szybszych metod diagnostycznych, pozwalających na dobranie precyzyjnej a przez to skuteczniejszej terapii, ograniczającej występowanie uciążliwych dla pacjenta skutków ubocznych. Pierwotnie zostały zdefiniowane główne cechy, które są wspólne dla każdego nowotworu w skali komórkowej, a są to: nieograniczona zdolność do podziałów, stymulacja angiogenezy, unikanie apoptozy, unikanie supresorów wzrostu oraz zdolność do inwazyjności (tworzenia przerzutów) (Hanahan i Weinberg 2011).

W ostatnich latach dodano kolejne cechy, takie jak: przeprogramowanie metabolizmu komórkowego oraz unikanie eliminacji przez układ odpornościowy. Wszystkie wymienione właściwości komórek nowotworowych nazwano cechami fundamentalnymi (ang. *core hallmarks*), poza nimi występują jeszcze następujące cechy: utrzymywanie sygnałów pro-podziałowych, niemutacyjne epigenetyczne przeprogramowanie, zapalenie sprzyjające nowotworzeniu, polimorficzne mikrobiomy, starzenie komórkowe (komórki senescentne lub „zombie”), niestabilność genomowa i mutacje, odblokowanie plastyczności fenotypowej. Ostatecznie wszystkie tworzą zbiór 14 cech nowotworów (Hanahan 2022).

W wyniku wciąż trwających badań, poszerza się ogólna wiedza o mechanizmach chemiooporności, przerzutowania, wzrostu i angiogenezy nowotworów, co pozwala na rozwój nowych możliwości diagnostycznych i terapeutycznych. Dzięki temu, w obecnych czasach dysponujemy metodami leczenia skierowanymi przeciwko

konkretnym nowotworem, a nawet konkretnym mutacją. Nowotwór gruczołu mlekowego, zwany rakiem piersi u kobiet jest obiektem wielu badań, ponieważ pomimo zgromadzonej do tej pory wiedzy na temat diagnostyki i dostępnych coraz to bardziej zaawansowanych metod leczenia, jest to najczęściej występujący nowotwór u kobiet, który jednocześnie wykazuje się najwyższym wskaźnikiem śmiertelności (Ciuba *et al.* 2022, Ciuba 2024). W 2018 roku na świecie zdiagnozowano 2 miliony nowych przypadków raka piersi, co przełożyło się na 620 000 zgonów. Według bazy danych Globocan Światowej Organizacji Zdrowia, w tamtym czasie w Polsce było 20 203 przypadków i 6921 zgonów. Według Krajowego Rejestru Nowotworów w 2023 w Polsce zdiagnozowano 21 716 pacjentek, a zmarło 6757. Takie statystyki wskazują na skalę problemu i skłaniają do refleksji. Udoskonalenie terapii oraz lepsza diagnostyka, nie tylko poprawiłyby przeżywalność i komfort pacjentek onkologicznych, ale również odciążąłyby publiczny system opieki zdrowotnej. Postawienie diagnozy na wczesnym etapie rozwoju nowotworu znacząco zwiększa przeżywalność chorych. Zdolność do przeżycia 5 lat od postawienia diagnozy wynosi 97% dla pacjentek z rakiem I stopnia, 88% dla II i 70% dla III, jeżeli nie wystąpiły przerzuty lub wystąpiły tylko w obrębie lokalnych węzłów chłonnych. Przeżywalność pacjentek z rakiem IV stopnia, gdzie wystąpiły przerzuty do odległych tkanek i węzłów chłonnych wynosi już tylko 25% (Macià *et al.* 2012, Gray *et al.* 2020).

Przeżywalność oraz dobór odpowiedniej metody leczenia zależy też od obecności określonych mutacji w komórkach tworzących guz pierwotny. Najczęściej zmutowanym genem we wszystkich chorobach nowotworowych jest gen *TP53* (ang. *Tumor Protein 53*), którego zmutowana forma występuje w ponad 50% nowotworów (Bykov *et al.* 2018). W raku piersi, zgodnie z The Cancer Genome Atlas (TCGA) Pan-Cancer Atlas (PanCanAtlas), mutacje *TP53* potwierdzono w 353 z 1084 przebadanych próbek co stanowi ok. 33%.

1.2 Białko p53- strażnik genomu, czy strażnik komórki nowotworowej?

Białko p53 po raz pierwszy opisano w 1979 roku, kiedy powiązano jego obecność z powstawaniem guzów nowotworowych u szczurów zarażonych wirusem SV40. Zaobserwowana korelacja stanowiła pierwszy dowód na to, że białko p53 może być odpowiedzialne za transformację nowotworową (Chang *et al.* 1979, Alvarado-Ortiz *et al.* 2020). W trakcie identyfikacji białka pod względem fizyko-chemicznym okazało się, że

podczas rozdziału elektroforetycznego SDS-PAGE białko lokalizowało się na wysokości odpowiadającej 53-54 kDa, stąd zostało nazwane p53. Rzeczywista masa cząsteczkowa białka wynosi 43,7 kDa, a obserwowana różnica w lokalizacji na żelu wynika z dużej ilości reszt prolinowych w sekwencji aminokwasowej, które spowalniają jego migrację (Wang *et al.* 2023). Właściwa funkcja białka została poznana dopiero w latach 80-tych ubiegłego stulecia, wtedy też nie bez przyczyny dostało miano „Strażnika Genomu” (Lane 1992). Białko p53 jest kodowane przez gen *TP53* zlokalizowany na 17 chromosomie (*locus* 17p13) i należy do grupy supresorów transformacji nowotworowej.

Fizjologicznie, poziom białka p53 w komórkach jest bardzo niski i zwiększa się w przypadku transformacji nowotworowej. Nieaktywna forma białka zostaje aktywowana poprzez fosforylację oraz konwersję dimeru w tetramer (Kitayner *et al.* 2006). Dzięki temu p53 nabywa zdolność wiązania się z sekwencjami regulatorowymi w DNA i modulowania ekspresji licznych genów docelowych. Białko p53 jako czynnik transkrypcyjny jest odpowiedzialny za regulację procesów komórkowych takich jak cykl komórkowy, apoptoza (programowana śmierć komórki), starzenie komórkowe (senescencja - trwałe zatrzymanie podziału komórkowego), czy zmian w metabolizmie komórki (Tab. 1). Zmiany metaboliczne zachodzą m.in poprzez regulację transkrypcji fosfatazy indukowanej p53 regulującą glikolizę i apoptozę (ang.: *TP53-inducible glycolysis and apoptosis* regulator; TIGAR) oraz glutaminazy 2 (ang.: *Glutaminase 2*; GLS2). Ponadto, p53 zwiększa ekspresję receptora śmierci DR5 (ang.: *Death Receptor 5*), co umożliwia pośredniczenie w procesie apoptozy również za pośrednictwem tego receptora (Sheikh i Fornace 2000, Kastenhuber i Lowe 2017, Simabuco *et al.* 2018, Alvarado-Ortiz *et al.* 2020, Roszkowska, *et al.* 2022). Poziom białka p53 jest negatywnie regulowany przez białko Mdm2 (ang.: *Mouse Double Minute 2*), wykazujące aktywność ligazy ubikwitynowej. Mechanizm ten polega na oznaczeniu p53 do degradacji proteosomalnej (Chao 2015). Rozwój choroby nowotworowej może być związany z obniżoną aktywnością p53, szczególnie w sytuacjach, gdy mutacja zakłóca jego funkcje (Marei *et al.* 2021).

Tabela 1. Geny, których ekspresja jest regulowana przez białko p53 oraz efekt ich regulacji.

Gen	Produkt białkowy	Funkcja białka
CDKN1A	p21 (ang. <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>)	Zatrzymanie cyklu komórkowego
CDKN1C	p57 (ang. <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i>)	Regulacja cyklu komórkowego, różnicowanie
BBC3	Puma (ang. <i>Bcl-2 binding component 3</i>)	Indukcja apoptozy
BAX	Bax (ang. <i>Bcl-2-associated X</i>)	Indukcja apoptozy (szlak mitochondrialny)
PMAIP1	Noxa (ang. <i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>)	Indukcja apoptozy
CDKN1B	p27Kip1 (ang. <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>)	Indukcja starzenia komórkowego (senescencji)
SERPINE1	Pai1 (ang. <i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>)	Regulacja starzenia i inwazji komórek nowotworowych
C12orf5	TIGAR (ang. <i>TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator</i>)	Regulacja zmian metabolicznych (glikoliza, stres oksydacyjny)
GLS2	Glutaminaza 2 (ang.: <i>Glutaminase 2</i>)	Regulacja metabolizmu glutaminianu i równowagi energetycznej

1.3 Mutacje w genie TP53 - manifestacje in vitro

W literaturze, białko, które powstało w wyniku mutacji w genie *TP53*, dostało miano „Strażnika komórki nowotworowej” (ang.: *Guardian of the Cancer Cell*) (Mantovani *et al.* 2019). Nowotwory z potwierdzoną mutacją w genie *TP53* (*MUTp53*) wykazują zwiększoną chemiooporność, odporność na stres oksydacyjny, genotoksyczny, proteotoksyczny, zwiększoną inwazyjność oraz zdolność do tworzenia przerzutów. Miejsce i rodzaj wystąpienia mutacji wpływa na to jakie nowo powstałe białko będzie miało funkcje (Asl *et al.* 2023).

Mutacje *TP53* można podzielić według funkcji, które białko może stracić (LOF-ang. *Loss of Function*) lub nabyć (GOF-ang. *Gain of Function*). Utrata aktywności p53 w wyniku mutacji typu LOF (utrata funkcji) często prowadzi do wzrostu aktywności czynników transkrypcyjnych Snail (ang.: *Zinc finger protein SNAI1*) i Twist1 (ang.: *Twist-related protein 1*), obniżenia ekspresji E-kadheryny oraz indukcji EMT (ang.: *Epithelial-Mesenchymal-Transition*) (Chang *et al.* 2011, Wang *et al.* 2013, Yang *et al.* 2019), co wiąże się ze zwiększoną zdolnością komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów. Dodatkowo wykazano, że utrata p53 aktywuje GTPazy Rho, co sprzyja nasilonej migracji komórek, efekt ten zaobserwowano w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem zarodkowych fibroblastów myszy, jak i ludzkich komórek czerniaka

A375P (Guo and Zheng 2004, Gadea *et al.* 2007). Ponieważ białko jest aktywne jedynie w formie tetrameru, nawet punktowa mutacja w pojedynczym allelu, może powodować, że produkt białka z allelu typu dzikiego traci swoje właściwości transkrypcyjne (Milner and Medcalf 1991, Chan *et al.* 2004, Willis *et al.* 2004).

Jednak sama utrata aktywności p53 (mutacje typu LOF) nie zawsze wystarcza do promowania inwazji komórek nowotworowych i przerzutowania, co wykazano w badaniach *in vivo* na ksenograftach raka wątrobowokomórkowego PVT-1 oraz w transgenicznym modelu mięśniakomięśaka prążkowanego u myszy. Wyniki te wskazują, że mutacje typu GOF (nabycie funkcji) w genie *TP53* stanowią silniejsze aktywatory kaskady przerzutów (Gadea *et al.* 2007, Wang *et al.* 2013, Novikov *et al.* 2021).

Mutacje typu GOF nadają białku p53 nowe, patologiczne funkcje. Opisano różnorodne mechanizmy aktywności *MUTp53*, zależnie od lokalizacji mutacji. Zdecydowana większość zmian występuje w domenie wiążącej DNA (ang. *DNA Binding Domain*; DBD), przy czym około 90% stanowią mutacje zmiany sensu, a blisko 30% występuje w tzw. „aktywnych miejscach mutacji” (ang.: *hotspot*): R175, G245, R248, R249, R273 oraz R282 (Baugh *et al.* 2018). Do najlepiej scharakteryzowanych mutacji punktowych należą: R175H, G245S, R248Q, R248W, R249S, R273C, R273H, oraz R282W.

Mutacje typu „*hotspot*” w genie *TP53*, w zależności od mechanizmu działania zmutowanego białka, można podzielić na dwie główne kategorie: mutacje kontaktowe (R248Q, R248W, R273H, R273C) oraz mutacje konformacyjne (R175H, G245S, R249S, R282H). W obu przypadkach zmiany dotyczą domeny wiążącej DNA (DBD) białka p53.

Mutacje kontaktowe zachowują konformację charakterystyczną dla białka p53 typu dzikiego (*WTp53*) w obrębie szkieletu rusztowania DBD, jednak prowadzą do modyfikacji reszt aminokwasowych istotnych dla bezpośredniego wiązania DNA. Natomiast mutacje konformacyjne powodują istotne zmiany w strukturze trzeciorzędowej białka, w tym zaburzenia jego prawidłowego fałdowania, co skutkuje utratą koordynatów cynkowych (ang.: *zinc coordinates*), a w konsekwencji znacznym ograniczeniem zdolności do wiązania DNA. (Bullock *et al.* 2000, Baugh *et al.* 2018, Alvarado-Ortiz *et al.* 2020).

Poszczególne mutanty p53 opisano zarówno pod względem fenotypu, jak i mechanizmu działania. Wyróżniono fenotypy wpływające na EMT oraz na interakcje białka z chemokunami. (Roszkowska *et al.* 2020, Asl *et al.* 2023). Mechanizmy chemiooporności wywoływane mutacjami w *TP53* mogą różnić się w zależności od

rodzaju mutacji, co uzasadnia intensywne poszukiwania leków ukierunkowane na określone warianty mutacyjne (Duffy *et al.* 2022, Kennedy i Lowe 2022, Wang *et al.* 2022). Szczegółowe mechanizmy zostały przedstawione w Tabeli 2.

Tabela 2. Fenotypy oraz proponowane mechanizmy molekularne związane z EMT regulowane przez zmutowany p53 (Roszkowska et al. 2020; Asl et al. 2023).

Aktywne miejsce mutacji	% mutacji	Fenotyp	Mechanizm molekularny	Źródła
R172H	brak danych	inwazyjność	Zmniejszona ekspresja miR-142 przez hipermetylację DNA za pośrednictwem Dnmt1	Godfrey <i>et al.</i> 2018
R175H	5,6	EMT, migracja, przerzuty,	Nadekspresja <i>TWIST1</i> , tłumienie miR-130b (oś miR-130b– <i>ZEB1</i>); sekwestracja Klf17 (zwiększona migracja, oporność na apoptozę, chemiooporność); selektywne wiązanie, Smad3 i zaburzenie równowagi Smad2/3 (aktywacja szlaków onkogennych); wzrost ekspresji chemokin <i>CXCL5</i> , <i>CXCL8</i> , <i>CXCL12</i> ; aktywacja szlaku PIK3K/AKT poprzez wiązanie się do supresora DAB2IP	Kogan-Sakin <i>et al.</i> 2011 Dong <i>et al.</i> 2013 Ali <i>et al.</i> 2014 Ji <i>et al.</i> 2015 Chiang <i>et al.</i> 2021
G245S	2,11	zwiększona proliferacja, rozwój guza	Formowanie sferoidów oraz regulacja szlaków metabolicznych	Meneghetti <i>et al.</i> 2022
R248W	3,53	proliferaacja, inwazyjność, migracja	Przeprogramowanie makrofagów przez egzosomy z miR-1246; Aktywacja szlaku STAT3	Cooks <i>et al.</i> 2018 Klemke <i>et al.</i> 2021
R248Q	4,37	rozwój guza, zdolność do przerzutowania i inwazyjność	Zakłócanie transaktywacji WTp53; oporność na apoptozę i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 (przerwa pomiędzy podziałem mitotycznym, a fazą wzrostową komórki; ang. <i>Gap 1</i>) sekwestracja p63 (nadekspresja miR-155)	Dearth <i>et al.</i> 2007, Hanel <i>et al.</i> 2013, Boettcher <i>et al.</i> 2019 Neilsen <i>et al.</i> 2013

R249S	2,04	zwiększona proliferacja	Związek z infekcją HBV w raku wątrobowokomórkowym (HCC); zwiększana agresywność nowotworu; oporność na stres siateczki endoplazmatycznej.	Baugh <i>et al.</i> 2018, Wang <i>et al.</i> 2019
R273H	3,95	EMT, przerzuty, chemiooporność, inwazyjność, rozwój guza, migracja, proliferacja	Zwiększona ekspresja <i>PDGFRβ</i> zależna od p73 i NF-Y; przeprogramowanie makrofagów przez egzosomy z miR-1246; spadek ekspresji let-7i; regulacja miR-132 oraz miR-147b; nadekspresja lnc273-31 i lnc273-34 (proliferyacja, migracja, chemiooporność); egzosomy z miR-21 i miR-769 indukujące TGF-β w fibroblastach; aktywacja szlaku AKT (pluripotencjalność, przeżycie i oporność na apoptozę)	Weissmueller <i>et al.</i> 2014 Cooks <i>et al.</i> 2018 Subramanian <i>et al.</i> 2015 Datta <i>et al.</i> 2019 Zhao <i>et al.</i> 2019 Ju <i>et al.</i> 2019 Tan <i>et al.</i> 2015
R273C	3,31	oporność na chemio- i radioterapię	Indukowanie infiltracji makrofagów	Zhang <i>et al.</i> 2022
R280K	brak danych	migracja komórek, inwazyjność i przerzuty	Hamowanie p63 poprzez kompleks <i>MUTp53</i> i Smad2/3, Ras I	Adorno <i>et al.</i> 2009
R282W	2,83	EMT	Hamowanie ekspresji <i>KLF17</i>	Zhang <i>et al.</i> 2016

1.4 Charakterystyka i klasyfikacja typów raka piersi w świetle badań histopatologicznych oraz molekularnych

Z badań histopatologicznych, które wciąż stanowią podstawową metodę diagnostyczną na podstawie której podejmuje się decyzję o sposobie leczenia, wynika, że większość raków piersi wywodzi się z nabłonka i należy do dwóch głównych typów raków; przewodowego lub zrazikowego. W zależności od poziomu ekspresji receptorów estrogenowych (ER), receptorów progesteronowych (PR) oraz receptorów ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER-2) potwierdzonego w badaniach immunohistochemicznych, typ przewodowy, najczęściej występujący (80-85% przypadków), można podzielić na podtypy: luminalny A, luminalny B, HER dodatni oraz potrójnie negatywny (Tabela 3). Trzy pierwsze podtypy są hormonozależne, dobrze reagują na chemioterapię i stanowią o lepszym rokowaniu, natomiast rak potrójnie

negatywny jest hormononiezależny, charakteryzuje się dużą agresywnością i opornością na leczenie (Sorlie *et al.* 2003). Z kolei rak piersi typu zrazikowego stanowi pozostałe 15 - 20%. Wśród tego typu nowotworów można wyróżnić również określone podtypy o sygnaturze receptorowej (ER+, HER-2-) i są one głównie klasyfikowane jako Luminal A, z małym odsetkiem Luminal B (Williams *et al.* 2019).

Tabela 3. Molekularne podtypy raka piersi (Valdivia et al. 2021).

Podtypy molekularne	ER	PR	HER-2	Ki-67	HGM	Sygnatura
Luminal A	+++	+++	-	Niski	Niski	ER+/PR+/HER-2-
Luminal B HER-2 negatywny	+	+/-	-	Wysoki	Średni/wysoki	ER+/PR ±/HER-2-
Luminal B HER-2 pozytywny	+	+/-	+ / ++	Wysoki	Średni/wysoki	ER+/PR ±/HER-2+
Nadekspresja HER-2	-	-	+++	Wysoki	Wysoki	ER-/PR-/HER-2+
Potrójnie negatywny	-	-	-	Wysoki	Wysoki	ER-/PR-/HER-2-

ER- receptor estrogenowy, PR- receptor progesteronowy, HER-2 receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2, Ki-67-antygen jądrowy (wskaźnik proliferacji), HGM-histologiczny stopień złośliwości (ang. *histological grade of malignancy*). Oznaczenia; +++ wysoka ekspresja receptora, ++ średnia ekspresja receptora, + receptor obecny, - brak receptora

Poza badaniami histopatologicznymi, w najnowszej diagnostyce stosuje się również testy pozwalające na identyfikację podtypów molekularnych. Obecnie najpopularniejszy jest test PAM50 pozwalający na ocenę poziomu ekspresji 50 genów związanych z proliferacją, receptorami ER, PR oraz HER-2, cechami mioepitelialnymi i bazalnymi. Na podstawie wyników testu możliwe jest dokonanie nie tylko odpowiedniej klasyfikacji raka piersi na określony podtyp, ale możliwe jest również dokonanie predykcji strategii terapeutycznej oraz ryzyka nawrotu choroby (Liu *et al.* 2016, Ohnstad *et al.* 2017). Należy zaznaczyć, że wartość diagnostyczna dla wyników uzyskanych z testu genetycznego oraz immunohistochemicznego dla podtypów raka luminalnego A i B, z nadekspresją HER-2 oraz potrójnie negatywnego pokrywają się w 80-85% (Sorlie *et al.* 2003). Poza testem PAM50 w diagnostyce klinicznej stosowane są

również inne testy takie jak OncotypeDX 21, który ocenia ryzyko nawrotu choroby (Paik *et al.* 2004); BreastOncPx 14, bazujący na sygnaturze genowej przerzutów odległych (Tutt *et al.* 2008), czy test MammaPrint, opierający się na analizie ekspresji 70 genów w celu prognozowania przebiegu choroby (van de Vijver *et al.* 2002, Beumer *et al.* 2016). Niemniej jednak zastosowanie panelu ekspresji genów PAM50 w diagnostyce raka piersi ma dodatkową zaletę, gdyż zwiększa skuteczność przewidywania nawrotów u pacjentek z podtypem ER+ i zajętymi węzłami chłonnymi, przewyższając panele, które uwzględniają jedynie zmienne kliniczne (Parker *et al.* 2009, Ellis *et al.* 2011, Goncalves and Bose 2013) (Tabela 4). Poza powyższymi funkcjonują jeszcze w diagnostyce testy Endopredict i BCI (ang. *Breast Cancer Index*) (Zeng and Zhang 2022).

Tabela 4. Porównanie wybranych testów wielogenowych
(Goncalves and Bose 2013).

Test Cecha	Oncotype DX	PAM50	MammaPrint
Liczba oznaczanych genów	21	50 (+5 kontrolnych)	70
Wymagania dotyczące próbki	Tkanka utrwalona w formalinie, zatopiona w parafinie	Tkanka utrwalona w formalinie, zatopiona w parafinie	Świeżo zamrożona tkanka
Technika	Ilościowy PCR	Ilościowy PCR oraz technologia nCounter*	Mikromacierze DNA
Populacja pacjentów uwzględniona w opracowaniu testu	Pacjentki z rakiem piersi ER+, z ujemnymi węzłami chłonnymi	Pacjentki z rakiem piersi w stopniu zaawansowania I-III	Kobiety <61 roku życia, z rakiem T1–T2 (stopień zaawansowania raka), z brakiem zajęcia węzłów chłonnych
Cechy testu	- Przewiduje ryzyko nawrotu w ciągu kolejnych 10 lat - Identyfikuje pacjentki niskiego ryzyka, które można uchronić przed chemioterapią uzupełniającą (adjuwantową)	- Zapewnia klasyfikację wewnętrznych podtypów - Przewiduje przeżycie wolne od nawrotu i prawdopodobieństwo nawrotu w ciągu 10 lat u pacjentek z ER+ leczonych tamoksyfenem - Identyfikuje pacjentki, które mogą odnieść korzyść z neoadjuwantowej terapii hormonalnej lub chemioterapii	Klasyfikuje pacjentki jako dobrze i słabo rokujące
Wytyczne	NCCN i ASCO Test CLIA, brak formalnej rejestracji regulacyjnej	Zatwierdzony przez FDA w 2013 roku.	Zatwierdzony przez FDA
Prospektywne badania kliniczne	TAILORx i RxPONDER	Badanie RxPONDER będzie porównywać PAM50 i wyniki Oncotype DX	MINDACT

*nCounter- narzędzie do analizy ekspresji genów, wykrywa do 800 genów w jednej reakcji multipleks.

1.5 Biologiczne podstawy wykorzystania psa jako modelu w badaniach nad nowotworami człowieka w porównaniu z modelami gryzoni

Myszy od wielu lat stanowią podstawowy model zwierzęcy wykorzystywany w badaniach biomedycznych. Pomimo istotnych różnic w funkcjonowaniu organizmów mysiego i ludzkiego, a co za tym idzie w mechanizmach rozwoju chorób nowotworowych, modele mysie pozostają głównym narzędziem badawczym w onkologii eksperymentalnej. Przewaga modelu mysiego uwidoczniła się szczególnie po wprowadzeniu technik inżynierii genetycznej i uzyskaniu genetycznie zmodyfikowanych szczepów (ang. *genetically engineered mice*; GEM), u których rozwój wielu typów nowotworów przebiega w sposób zbliżony, pod względem morfologicznym, histopatologicznym, fenotypowym i genotypowym, do nowotworów obserwowanych u ludzi. Niestety, nowotwory rozwijające się u myszy GEM są jedynie zbliżone do nowotworów ludzkich - nigdy nie są ich wiernym odzwierciedleniem (Balmain 2002, Zhou *et al.* 2023). Powoduje to konieczność opracowywania nowych modeli, umożliwiających lepszą, bardziej szczegółową analizę pod względem patologii i biologii nowotworów. W przypadku raka gruczołu mlekowego stworzono około 100 mysich modeli nowotworów gruczołu mlekowego, z których żaden nie jest idealny (Szymańska 2007). Z tego względu próby wykorzystania innych gatunków zwierząt wydają się w pełni uzasadnione. W tym kontekście na szczególną uwagę, jako model zwierzęcy nowotworu gruczołu mlekowego, zasługują psy.

Model psi raka piersi przewyższa model myszy w kilku kluczowych aspektach. Psy rozwijają nowotwory gruczołu mlekowego spontanicznie, z poprawnie funkcjonującym układem odpornościowym. Choroba u psów często charakteryzuje się podobną etiologią hormonalną, wiekiem zachorowania oraz obecnością zmian śródnapłonkowych jak w przypadku raka piersi u ludzi (Visan *et al.* 2016). Pomimo różnic ewolucyjnych, genom psa i człowieka wykazuje liczne podobieństwa, co podkreśla znaczenie psa jako istotnego modelu zwierzęcego. Na poziomie molekularnym wykazano również, że genom psa jest znacznie bardziej stabilny niż genom gryzoni (Lindblad-Toh *et al.* 2005, Nance *et al.* 2022). Psy dzielą środowisko życia z ludźmi i są narażone na te same czynniki rakotwórcze. W porównaniu z myszami i szczurami wykazują też większe podobieństwo do ludzi pod względem mechanizmów rozwoju nowotworów, biologii guza oraz funkcjonowania mechanizmów obronnych układu odpornościowego (Król and Motyl 2014, Gardner *et al.* 2016). Czynniki sprzyjające powstawaniu nowotworów u ludzi i

psów są również zbliżone i obejmują m.in. wiek, sposób odżywiania, płeć oraz środowisko (Paoloni and Khanna 2008).

Ograniczenia modeli mysich wynikają dodatkowo z innej biologii nowotworów, niewielkiego rozmiaru (przekładającego się m.in. na poziom natlenienia guza) oraz niestabilności genetycznej, co skutkuje łatwiejszą transformacją nowotworową niż u ludzi (Abdelmegeed and Mohammed 2018, Nance *et al.* 2022). Ze względu na powszechne występowanie psów w gospodarstwach domowych możliwa jest ich stała obserwacja, a troskliwa opieka właścicieli pozwala na prowadzenie pełnej diagnostyki. U psów możliwe jest wykonanie biopsji, regularnych pobrań krwi oraz prowadzenie długoletniej obserwacji skutków terapii, co w przypadku gryzoni, z uwagi na ich mały rozmiar i krótszy czas życia, pozostaje znacznie utrudnione (Paoloni and Khanna 2008, Gordon *et al.* 2009, Rowell *et al.* 2011).

Pomimo wielu zalet, model psi nie jest tak powszechnie stosowany jak modele gryzoni, co prawdopodobnie wynika z większej różnorodności genetycznej (brak izogenicznych linii), wyższych kosztów utrzymania i kwestii etycznych. W konsekwencji zalety i ograniczenia psa jako modelu badawczego dla ludzkiego raka piersi nie są tak dobrze zdefiniowane jak w przypadku myszy, a dalsze badania są niezbędne, aby sformułować ostateczne wnioski. Niemniej jednak, w ostatnich latach przeprowadzono wiele badań dotyczących podobieństw i różnic w rozwoju nowotworów, których wyniki są obiecujące.

W kontekście badań onkologicznych coraz większą uwagę zwraca się na rolę mikrobiomu. Mikrobiom psa, wykazujący większe podobieństwo do ludzkiego niż mikrobiom myszy, stanowi bardziej adekwatny model badawczy (Filippo *et al.* 2024). W literaturze podkreśla się również zasadność wykorzystania psów w badaniach nad procesem starzenia się człowieka (Dias-Pereira 2022). Czas i szybkość starzenia się psów oraz ich długość życia, daje możliwość prowadzenia badań nad rozwojem nowotworów w perspektywie lat, a nie dekad, jak ma to miejsce w przypadku ludzi (Parker *et al.* 2010). Nowotwory stanowią poważny problem zdrowotny w populacji psów i są jedną z głównych przyczyn ich zgonów. Badania wykazały, że w ponad 2000 przeanalizowanych przypadków śmierci psów, aż 460 (23%) było spowodowanych chorobą nowotworową. Należy zaznaczyć, że wielu właścicieli psów podejmuje zdecydowane działania mające na celu nie tylko wydłużenie życia, ale przede wszystkim poprawienie komfortu życia zwierząt z chorobą nowotworową (Bronson 1982).

Przeprowadzanie badań klinicznych w weterynarii trwa znacznie krócej niż w przypadku badań klinicznych prowadzonych u ludzi (Fowles *et al.* 2016), co znacząco obniża koszty i przyspiesza wprowadzenie nowych terapii na rynek. Dzięki temu możliwe jest nie tylko poprawienie jakości życia psich pacjentów, ale także wyznaczenie nowych trendów w terapii nowotworów u ludzi. W ten sposób model psi może wypełnić lukę pomiędzy badaniami przedklinicznymi a klinicznymi u człowieka, stając się kluczowym elementem procesu badawczego. W odpowiedzi na ten potencjał, w 2019 roku uruchomiono inicjatywę mającą na celu badanie nowotworów u psów, obejmującą prowadzenie badań klinicznych oraz stworzenie zintegrowanej bazy danych ICDC (ang. *Integrated Canine Data Commons*) wzorowanej na portalu TCGA (ang. *The Cancer Genom Atlas*). Inicjatywa ta została zapoczątkowana przez NCI (ang. *National Cancer Institute*). Równolegle również prywatne instytucje prowadzą badania z wykorzystaniem psów, m.in. w zakresie testowania szczepionek przeciwnowotworowych (Alsaihati *et al.* 2021).

Obecnie w zintegrowanej bazie danych ICDC (prowadzonej przez NCI) (<https://caninecommons.cancer.gov/#/>, październik 2025) znajduje się m.in. badanie dotyczące podobieństw między nowotworami gruczołu mlekowego u suk a rakiem piersi u kobiet (badanie MGT01 ang. „*Molecular Homology and Differences Between Spontaneous Canine Mammary Cancer and Human Breast Cancer*”). W badaniu wykorzystano materiał biologiczny pobrany z 13 nowotworów gruczołu mlekowego psów przed 2010 rokiem. Pokazuje to, że wciąż istnieje wiele braków informacyjnych do uzupełnienia, aby w pełni potwierdzić zasadność wykorzystania psa jako modelu dla ludzkiego raka piersi (Liu *et al.* 2014).

1.6 Porównanie biologii nowotworów gruczołu mlekowego u psów i ludzi oraz metod ich analizy

Nowotwory gruczołu mlekowego u suk są coraz częściej analizowane w kontekście ich przydatności jako modelu translacyjnego raka piersi u ludzi. Pomimo rosnącej liczby dostępnych danych, wiele kwestii nadal pozostaje niewyjaśnionych i wymaga pogłębionych badań (Gray *et al.* 2020, Frenel 2023, Gherman *et al.* 2024). Coraz częściej prowadzone są badania uwzględniające podobieństwa w występowaniu mutacji w genie *TP53* w nowotworach gruczołu mlekowego u ludzi i psów (CMT ang. *Canine Mammary Tumor*). Niestety, dostępne wyniki badań zawierają, albo niekompletne dane, albo dane

z bardzo małej próby. Niemniej jednak stwierdzono istnienie podobieństw m. in. we wskaźniku obciążenia ilością mutacji guza (ang. *Tumor Mutational Burden*; TBM) w różnych nowotworach na wybranych genach u psów i ludzi. Mutacje w *TP53* wykazują podobną zależność u psów i ludzi, co potwierdza przydatność modelu psiego w badaniach nad rakiem piersi w kontekście tego genu. Takiej zależności nie stwierdzono natomiast dla mutacji w genie *PIK3CA* (ang.: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha) (Alsaihati *et al.* 2021).

Nowotwory gruczołu mlekowego u suk są najczęściej diagnozowanymi nowotworami w tej grupie zwierząt. Stanowią od 50% (Moe 2001) do nawet 70% wszystkich przypadków nowotworów, z czego połowa to zmiany złośliwe (Gherman *et al.* 2024). Szacuje się, że roczna zapadalność na CMT wynosi około 198 przypadków na 100 000 suk (Meuten 2016), podczas gdy u ludzi zachorowalność na raka piersi wynosi około 85 przypadków na 100 000 kobiet (Bray *et al.* 2018). Co istotne, wykazano podobieństwa między nowotworami gruczołu mlekowego u suk a rakiem piersi u kobiet w zakresie czynników predysponujących takich jak współczynnik BMI (ang. *Body Mass Index*) czy wiek (Gherman *et al.* 2024). U ludzi nowotwory piersi są diagnozowane między 50 a 58 rokiem życia, natomiast u psów między 8 a 11 rokiem życia. W obu przypadkach nowotwory te rzadko występują przed 25. rokiem życia u człowieka i 5 rokiem życia u psa (Schneider 1970, Dobson *et al.* 2002, Salas *et al.* 2015, Gray *et al.* 2020).

W diagnostyce CMT, podobnie jak w przypadku ludzi, stosowany jest system klasyfikacji oparty na ocenie histopatologicznej guza. Raki, w zależności od rodzaju komórek, z których się wywodzą, dzielą się na dwa główne typy: proste i złożone. Raki proste składają wyłącznie z jednego rodzaju komórek tj. luminalnych epitelialnych lub mioepitelialnych. Natomiast raki złożone zbudowane są z dwóch rodzajów komórek: luminalnych i mioepitelialnych. Poza tymi dwiema głównymi kategoriami, w przypadku raków złośliwych (ang. *malignant*) wyróżnia się dodatkowo takie typy jak: rak lity, rak mieszany, rak przewodowy, rak *in situ*, czy rak anaplastyczny. W diagnostyce weterynaryjnej stosuje się ponadto system stopniowania złośliwości raków od stopnia I (najłagodniejszego; dobrze zróżnicowanego) do stopnia III (wykazującego dużą złośliwość i słabe zróżnicowanie) (Goldschmidt *et al.* 2011, Peña *et al.* 2013, Goldschmidt *et al.* 2016).

Pomimo dostępnych obecnie metod diagnostycznych CMT oraz licznych korelacji i podobieństw pomiędzy nowotworami gruczołu mlekowego u psów a rakiem piersi u kobiet, zasadność stosowania profili sygnaturowych PAM50 do guzów psów nie została jeszcze wystarczająco potwierdzona. Jak dotąd podjęto jedynie kilka prób, które przyniosły częściowo sprzeczne wyniki (Sassi *et al.* 2010, Lee *et al.* 2018). Jedynym kompleksowym badaniem obejmującym sekwencjonowanie całego genomu i profilowanie ekspresji genów u psów pozostaje analiza Liu i wsp., przeprowadzona na zestawie 12 prostych i złożonych raków (Liu *et al.* 2014). Wyniki wykazały, że profile ekspresji genów w prostych i ER– złożonych rakach gruczołu mlekowego u psów grupują się blisko z ludzkimi guzami podtypu bazalnego, podczas gdy ER+ złożone raki nie wykazują podobieństwa molekularnego do żadnych ludzkich nowotworów. Walidacja pełnego panelu ekspresji PAM50 na średniej lub dużej kohorcie psów stanowi istotny projekt badawczy, który powinien zostać zrealizowany.

U psów w rutynowych badaniach histopatologicznych nie dokonuje się klasyfikacji nowotworów gruczołu mlekowego pod względem obecności receptorów ER, PR, czy HER-2, chociaż wiele badań wskazuje na zasadność wprowadzenia takiej praktyki (Tabela 5). Wykazano, że w przypadku CMT można wyróżnić podtypy molekularne odpowiadające luminalnemu B, HER-2– i potrójnie negatywnemu. W praktyce klinicznej taka informacja ma niebagatelne znaczenie ze względu na podjęcie odpowiedniej strategii terapeutycznej oraz określenia rokowania (Abadie *et al.* 2018). Zastosowanie terapii dostosowanej do podtypu molekularnego może znacząco poprawić wyniki leczenia, a tym samym przeżywalność pacjentów (Frenel and Nguyen 2023). Profilowanie CMT jako modelu dla ludzkiego raka piersi stanowi obecnie intensywnie eksplorowany obszar badań. Najnowsze prace przeglądowe podkreślają konieczność prowadzenia analiz na większych kohortach oraz w obrębie konkretnych ras, aby jak najdokładniej określić możliwości i ograniczenia tego modelu. (Gherman *et al.* 2023, Gherman *et al.* 2024).

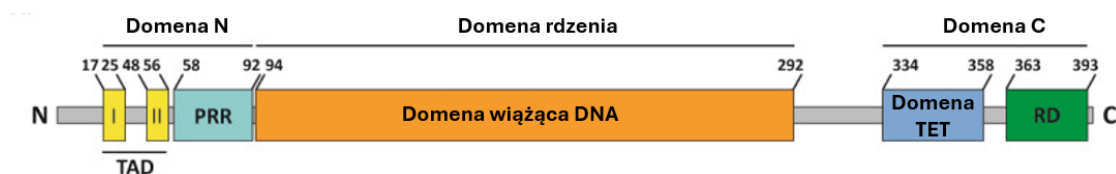
Tabela 5. Klasyfikacja molekularnych podtypów raka gruczołu mlekowego (wg analogii do ludzkiego raka piersi) (Goldschmidt, Peña et al. 2016).

Podtyp molekularny	Luminalne markery (ER i/lub PR)	HER-2	Bazalne markery (CK5/6, EGFR)	Charakterystyka
Luminal A	Tak	Nie	Zwykle nie	ER+/PR+, HER-2-, niski Ki-67, najlepsze rokowanie
Luminal B (HER-2-)	Tak	Nie	Czasem tak	ER+/PR+, HER-2-, wysoki Ki-67, gorsze rokowanie niż A
Luminal B (HER-2+)	Tak	Tak	Czasem tak	ER+/PR+, HER-2+, wyższa proliferacja
HER-2-enriched	Nie (lub słabo)	Tak	Zwykle nie	ER-/PR-, HER-2+, agresywny
Basal-like	Nie	Nie	Tak	ER-/PR-/HER-2-, CK5/6+, EGFR+, odpowiada TNBC
Normal-like *	Zmiennie	Nie	Zmiennie	Podtyp dyskusyjny, nie zawsze uznawany w praktyce

*Normal-like uważany jest przez część autorów za artefakt techniczny, a nie odrębny podtyp.

1.7 Analiza porównawcza genu *TP53* i białka *p53* u ludzi i psów w kontekście nowotworów gruczołu mlekowego

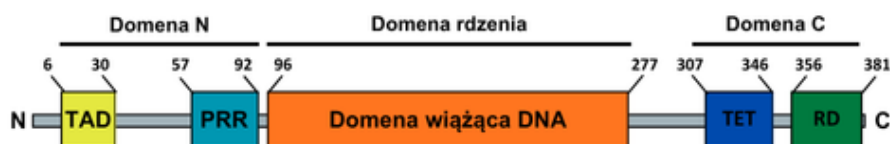
Ludzki gen *TP53* znajduje się na 17 chromosomie (*locus* 17p13) i składa się z 11 eksonów, z których pierwszy jest niekodujący. Produkt białkowy genu *TP53*, białko *p53*, obejmuje 393 aminokwasy i pełni rolę czynnika transkrypcyjnego. Pełnej długości białko składa się z pięciu głównych domen oraz elastycznego regionu łączącego domenę wiążącą DNA z domeną tetrameryzacyjną (TET) (Rycina. 1).



Rycina 1. Struktura ludzkiego białka p53 (Roszkowska *et al.* 2022).

TAD - domena transaktywacyjna (ang.: *transactivation domain*), PRR – domena bogata w sekwencje prolinowe (ang.: *proline-rich region*); DBD - domena rdzeniowa wiążąca DNA (ang.: *DNA binding domain*); TET- domena tetrameryzacji (ang.: *tetramerization domain*), RD- domena regulacyjna (ang.: *regulatory domain*).

U psów gen *TP53* zlokalizowany jest na chromosomie 5 i, podobnie jak u człowieka, składa się z 11 eksonów, z czego 10 jest kodujących. Białko p53 u psów zbudowane jest z 381 aminokwasów. Przewidywaną strukturę psiego p53 przedstawiono na Rycinie 2



Rycina 2. Przewidywana struktura psiego białka p53.

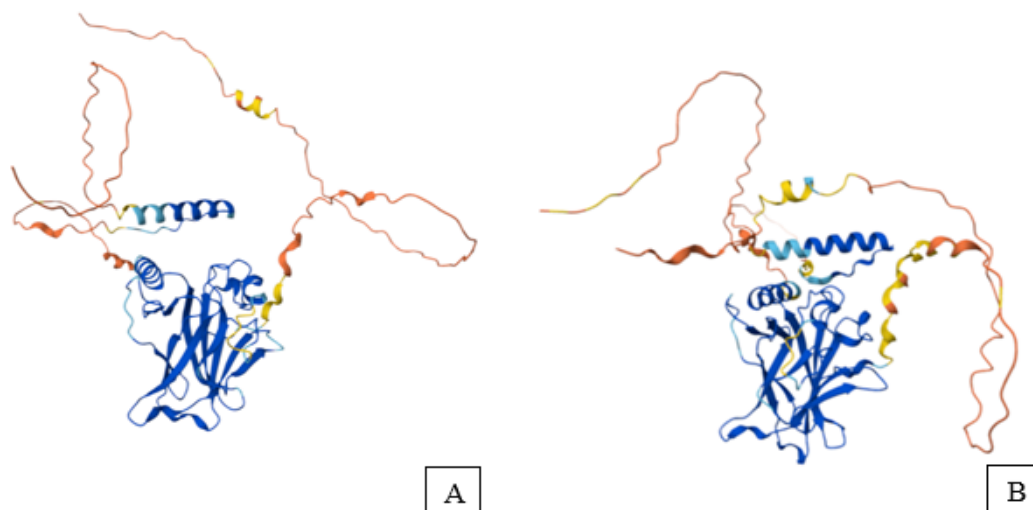
TAD - domena transaktywacyjna (ang.: *transactivation domain*), PRR – domena bogata w sekwencje prolinowe (ang.: *proline-rich region*); DBD - domena rdzeniowa wiążąca DNA (ang.: *DNA binding domain*); TET- domena tetrameryzacji (ang.: *tetramerization domain*), RD- domena regulacyjna (ang.: *regulatory domain*).

Porównanie sekwencji białka p53 ludzkiego (AAC12971.1) i psiego (AHZ62767.1) za pomocą narzędzia BLAST (ang.: *Basic Local Alignment Search Tool*), (Camacho, Coulouris *et al.* 2009), wykazało 81% podobieństwo, z czego 86% stanowiły konserwatywne podstawienia aminokwasów. W Tabeli 6 zestawiono kodony w których najczęściej występują mutacje (*hotspot*) u człowieka i psa.

Tabela 6. Porównanie kodonów w których najczęściej dochodzi do mutacji (*hotspot*) w genie *TP53* u człowieka z odpowiadającymi im kodonami u psa.

Gatunek	Najczęstsze miejsca <i>hotspot</i> w genie <i>TP53</i>					
Człowiek	R175	R213	G245	R248	R273	R282
Pies	R162	R201	G233	R236	R261	R270

Psie białko p53 jest stosunkowo dobrze poznane (Veldhoen and Milner 1998), a jego ekspresja w raku sutka była badana w wielu kohortach (Lee *et al.* 2004, Zacchetti, van Garderen *et al.* 2007, Rodo and Malicka 2008, Lüder Ripoli *et al.* 2016, Oliveira *et al.* 2017). Co więcej mutacje w genie *TP53* w nowotworach gruczołu mlekowego u psów wykazano już w latach 90 ubiegłego stulecia (Rungsipipat *et al.* 1999).



Rycina 3. Porównanie struktury przestrzennej białka p53 u psa (A) i człowieka (B).

Grafiki wygenerowane w Ensembl z użyciem funkcji *AlphaFold predicted model* (Harrison, Amode *et al.* 2023, wersja 112 – maj 2024). Kolory oznaczają poziom pewności przewidywanych fragmentów (pLDDT): granatowy – wysoka pewność >90, turkusowy 70–90, żółty 50–70, pomarańczowy <50.

W wielu pracach analizowano częstość występowania mutacji w genie *TP53* w nowotworach gruczołu mlekowego u psów. Wyniki wskazują, że podobnie jak i u ludzi, częstotliwość występowania mutacji w genie *TP53* w nowotworach gruczołu mlekowego wynosi ok. 20% (Chu *et al.* 1998, Muto *et al.* 2000, Lee *et al.* 2004, Queiroga *et al.* 2011). W badaniu Chu *et al.* mutacje wykryto w 6 z 20 badanych guzów, natomiast Sakthikumar i wsp. (2024) potwierdzili występowanie mutacji w 7 z 12 guzów wykazywało mutacje w genie *TP53*. Co ciekawe w tym ostatnim badaniu 4 zdiagnozowane przypadki CMT dotyczyły samców (Chu *et al.* 1998). Z kolei badanie porównawcze Alsaihati i wsp. wykazało, że mutacje w genie *TP53* występowały w 33% raków piersi u kobiet, podczas gdy u psów odsetek ten nie przekraczał 5%. Co więcej, niemal wszystkie ludzkie raki piersi w tej analizie zakwalifikowano jako złośliwe, podczas gdy u psów tylko połowa guzów wykazywała charakter złośliwy (Alsaihati *et al.* 2021).

Veldhoen *et al.* (1999) opisali mutacje w eksonach 2, 4 i 5 psiego *TP53*, w tym punktową mutację A125V, odpowiadającą znanej mutacji A138V w ludzkim genie *TP53*, której obecność koreluje ze złośliwością nowotworu.

W niektórych badaniach rozważano także obecność polimorfizmów w genie *TP53* u psów. Zespół Borge'a i wsp. zsekwencjonował materiał genetyczny pobrany od 32 psów i nie wykazał polimorfizmów w tym genie, natomiast potwierdzono je w genie *HER-2* (Borge *et al.* 2011).

1.8 Metody diagnostyczne i możliwości terapeutyczne w leczeniu nowotworów gruczołu mlekowego u suk

Szanse na wyleczenie nowotworu znacząco wzrastają, przy wczesnej diagnozie. W przypadku diagnostyki psów w kierunku chorób nowotworowych, w tym raka gruczołu mlekowego, powszechnie wykorzystywane są badania histopatologiczne i na ich podstawie podejmowana jest decyzja o metodzie leczenia. Najnowsza klasyfikacja nowotworów została zaproponowana w 2011 roku (Goldschmidt *et al.* 2011), a w 2013 roku została uzupełniona o system określania stopnia złośliwości dla guzów mioepitelialnych (złożonych i o typie mieszanym) (Peña *et al.* 2013). System klasyfikacji jak i samej diagnostyki zmienia się dość dynamicznie ze względu na wyniki nowych badań, które dostarczają co raz więcej informacji na temat rokowania. Ma to znaczenie, ponieważ w zależności od typu, stopnia zaawansowania, umiejscowienia czy wielkości zdiagnozowanego nowotworu zmienia się ryzyko przerzutowania oraz szanse na przeżycie. Przykładowo, przy rozpoznaniu raka gruczołowo-płaskonabłonkowego (ang.: *adenosquamous carcinoma*) spodziewana długość życia wynosi 18 miesięcy, podczas gdy raka anaplastycznego (ang.: *anaplastic carcinoma*) są to tylko 3 miesiące (Rasotto *et al.* 2017). Rasy psów takie jak cocker spaniel, pudel, jamnik, bokser, owczarek niemiecki, labrador retriever, angielski springer spaniel, doberman, a także cavalier king charles spaniel, yorkshire terrier, szpic miniaturowy, maltańczyk, czy papillon są bardziej podatne na CMT niż pozostałe rasy (Salas *et al.* 2015, Kwon *et al.* 2023). Dodatkowo wykazano, że psy rasowe częściej zapadają na raka sutka (62%) w porównaniu do psów mieszańców (38%) (Kwon *et al.* 2023). Co więcej obecność pojedynczego guza, gwarantuje wystąpienie kolejnych (Kuruoglu *et al.* 2024).

Badano również zależność pomiędzy poziomem białka p53, obecnością receptorów estrogenowych oraz markerem proliferacji Ki-67, a charakterystyką histopatologiczną guza i rokowaniem. (Brunetti *et al.* 2020). Guil-Luna i wsp. wykazali podwyższoną ekspresję *TP53* w surowicy u psów z nowotworami złośliwymi, jednak nie stwierdzono mutacji tego genu (Guil-Luna *et al.* 2023).

W odrębnym badaniu określono profile ekspresji genów związanych z przerzutami do węzłów chłonnych w CMT i wykazano podobieństwa do profili genetycznych ludzkiego raka piersi. Ponadto poziomy ekspresji niektórych genów różniły się w zależności od obecności lub braku zdolności guza do tworzenia przerzutów. W badaniu wykazano również, że spośród 27 guzów żaden nie był ER pozytywny (ER+), natomiast większość wykazywała ekspresję *HER-2* (*HER-2+*), niezależnie od statusu zajęcia węzłów chłonnych (Klopfleisch *et al.* 2010).

Jedno z nowszych badań, w którym przeanalizowano próbki pobrane od 1447 psów, wykazało, że większość nowotworów gruczołu mlekowego (83,3%) stanowiły guzy złośliwe. Wśród typów histopatologicznych najczęściej rozpoznawano raki proste (ang.: *simple carcinoma*, 35,3%), a kolejne pod względem częstości występowania były raki złożone (ang.: *complex carcinomas*, 13,3%). U wielu psów diagnozowano więcej niż jeden typ raka (Dolka *et al.* 2024). W badaniach wykazano, że przypadku nowotworów hormonozależnych, dominował typ potrójnie negatywny (76,3%), a hormononiezależnych podtyp luminalny A stanowił 14,3%, luminały B 9,4%, natomiast nie wykryto guzów HER-2 dodatnich (Abadie *et al.* 2018). Z kolei w innym badaniu obejmującym sześć suk, cztery przypadki stanowiły podtyp potrójnie negatywny a dwa podtyp luminalny (hormonozależny) (Raffo-Romero *et al.* 2023). Wynika z tego, że większość guzów u psów wykazuje cechy hormononiezależne, co odróżnia je od nowotworów piersi u ludzi, z których większość stanowi nowotwory hormonozależne (Pandit *et al.* 2020). Należy jednak podkreślić, że ze względu na ograniczoną liczebność badanych grup zwierząt, wnioski te mają charakter wstępny. Niemniej jednak, zarówno u psów jak i u ludzi rak potrójnie negatywny wiąże się z większą złośliwością i krótszym przeżyciem w porównaniu do innych podtypów (Gray *et al.* 2020). Jedno z najnowszych badań, przeprowadzone na większej grupie bo liczącej 30 osobników, wskazało, że najczęściej występowały guzy podtypu luminalnego A (59,25%) oraz potrójnie negatywnego (25,92%), podczas gdy podtypy luminalny B i HER-2+ stanowiły ok. 7 % (Kuruoglu *et al.* 2024).

W kontekście badań nad obecnością mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* w nowotworach gruczołu mlekowego u psów wykazano, że mogą one odgrywać istotną rolę, chociaż dotychczasowe wyniki nie są jednoznaczne, co wskazuje na konieczność dalszej weryfikacji tego zagadnienia. Niemniej jednak na podstawie dostępnych danych można stwierdzić, że pies jako gatunek, stanowi obiecujący model zwierzęcy w badaniach nad ludzkim rakiem piersi (Nosalova *et al.* 2024).

Jeżeli chodzi o terapię nowotworów gruczołu mlekowego u psów, podobnie jak u ludzi, leczeniem pierwszego rzutu jest leczenie chirurgiczne, a rozległość zabiegu zależy od stopnia zaawansowania choroby. W zaawansowanych przypadkach wykonuje się mastektomię, obejmującą usunięcie całej listwy mlecznej, w której wystąpiła zmiana nowotworowa. Rozległość zabiegu chirurgicznego, podobnie jak u ludzi, zależy od wielkości, umiejscowienia oraz liczby guzów i może obejmować prostą, regionalną lub radykalną mastektomię bądź kombinację tych procedur. U pacjentów z dużymi guzami, przerzutami do węzłów chłonnych lub niekorzystnymi cechami histopatologicznymi, miejscowa terapia zwykle nie jest skuteczna co wymaga zastosowania leczenia systemowego, obejmującego chemioterapię, radioterapię lub terapię hormonalną. Po zabiegu chirurgicznym opcjonalnie wdraża się leczenie uzupełniające w celu obniżenia ryzyka wznowy. W przypadku guzów nieoperacyjnych chemioterapia i radioterapia mogą stanowić jedyną opcję terapeutyczną (Valdivia *et al.* 2021). W przeciwieństwie do medycyny ludzkiej, rodzaj i zakres zabiegów chirurgicznych oraz rodzaj leczenia systemowego w nowotworach gruczołu mlekowego u psów nie zostały jak dotąd wystandaryzowane. Co więcej, nie wszystkie metody terapeutyczne stosowane u ludzi sprawdzają się w terapii CMT, dobrym tego przykładem jest tamoksifen, którego podawanie psom wiąże się z ciężkimi działaniami niepożądanymi (Tavares *et al.* 2010). Do leków najczęściej stosowanych w chemioterapii CMT należą: doksorubicyna (Ogilvie *et al.* 1989, Zambrano-Estrada *et al.* 2018), karboplatyna (Lavalle *et al.* 2012), mitoksantron (Arenas *et al.* 2016, Tran *et al.* 2016), paklitaksel (Poirier *et al.* 2004, von Euler *et al.* 2013), gemcytabina oraz 5-florouracyl. Leki te stosuje się najczęściej w określonych kombinacjach (Nosalova *et al.* 2024). Podejmuje się również próby stosowania odpowiedniej terapii hormonalnej oraz immunoterapii, jednak dotychczasowe wyniki badań dotyczą małych grup, lub są to opisy pojedynczych przypadków, co ogranicza możliwość wyciągania jednoznacznych wniosków (Finocchiaro and Glikin 2017). Z tego względu, potrzebne są randomizowane badania kliniczne obejmujące znacznie większe grupy psów, co umożliwiłoby pełniejsze zrozumienie mechanizmów rozwoju CMT i ocenę skuteczności stosowanych terapii.

Psy, u których nowotwory rozwijają się spontanicznie, stanowią obiecujący model zwierzęcy w badaniach nad nowotworami człowieka. CMT jest jednym z głównych problemów onkologicznych u psów i ze względu na swoje cechy takie jak podobna wielkości, szybki wzrost i porównywalne stadia kliniczne oraz zachowany sprawny układ immunologiczny uznawane są za interesującą alternatywę dla modeli gryzoni, w których

wiele aspektów biologii guza nie znajduje odzwierciedlenia w warunkach klinicznych u ludzi (Ke *et al.* 2024).

1.9 Modele komórkowe jako narzędzie w badaniach nad nowotworami gruczołu mlekowego

Badania *in vitro* w pewnym stopniu w uproszczony sposób odwzorowują fizjologię określonych komórek i tkanek, co pozwala ograniczyć wykorzystanie zwierząt do celów naukowych. Poza prostymi modelami 2D z wykorzystaniem linii komórkowych, możliwe jest tworzenie rozległych struktur, zróżnicowanych komórek oraz tzw. organoidów. Hodowla komórek w układzie 2D niesie ze sobą wiele ograniczeń w porównaniu do badań na złożonych organizmach. Część tych ograniczeń można jednak zminimalizować, wykorzystując przestrzenne modele komórkowe tzw. modele 3D, które w większym stopniu odtwarzają mikrośrodowisko guza, choć wciąż nie odwzorowują w pełni układu tkanek, nie posiadają unaczynienia i komponentu immunologicznego (Reynolds *et al.* 2017).

W ostatnich latach coraz częściej wykorzystuje się tumoroidy (organoidy nowotworowe, które odzwierciedlają architekturę guza pierwotnego) oraz sferoidy (agregaty komórek, zazwyczaj wyprowadzane z linii komórkowych) jako bardziej adekwatne narzędzia do badań podstawowych. Umożliwiają one poznanie cech biologicznych danego nowotworu, a także ocenę potencjalnych związków przeciwnowotworowych (ang.: *drug screening*) jeszcze przed rozpoczęciem badań z udziałem zwierząt.

Poza eksperymentami prowadzonymi na wyprowadzonych i dobrze scharakteryzowanych liniach komórkowych, coraz większe znaczenie zyskują badania z wykorzystaniem komórek wyprowadzonych z eksplantów pobranych od pacjentów. Takie podejście zbliża badania do koncepcji medycyny spersonalizowanej, umożliwiając dobór odpowiedniego leku lub ich kombinacji do konkretnego nowotworu rozwijającego się u danego pacjenta. Ponadto bankowanie komórek pochodzących z eksplantów pozwala na tworzenie bibliotek linii pierwotnych, które mogą stanowić cenne źródło do prowadzenia dalszych badań nad opracowaniem nowych terapii.

Nowotwory nie stanowią jednej jednostki chorobowej, lecz obejmują szeroką grupę schorzeń o wspólnych cechach, takich jak niekontrolowany podział komórek, czy unikanie apoptozy (Hanahan 2022). Każdy guz może zawierać subpopulacje komórek,

powstałe w wyniku odmiennych mutacji, charakteryzujące się różnym fenotypem. To dodatkowo komplikuje charakterystykę guza, a w konsekwencji utrudnia leczenie.

Badania z wykorzystaniem modeli 2 i 3D mają swoje ograniczenia (m.in. brak układu krwionośnego, zrębu (tkanek otaczających) i pełnej aktywności układu odpornościowego), niemniej należy uznać hodowle komórkowe za bardzo przydatne narzędzie, które znacząco wpływa na rozwój medycyny ludzkiej, jak i weterynaryjnej. Szczególnie istotne jest precyzyjne określenie nie tylko typu nowotworu, co ma znaczenie przy doborze odpowiedniego chemioterapeutyku, ale też dawki, co przekłada się na skuteczność terapii. Pogłębienie badań o analizę mechanizmów molekularnych może istotnie poprawić jakość leczenia.

Poznanie tych aspektów w badaniach *in vitro* pozwala nie tylko na pogłębienie wiedzy w zakresie biologii nowotworów, ale także na dalsze doskonalenie modelu psiego jako reprezentatywnego dla człowieka. Dzięki temu możliwe będzie wykorzystanie terapii opracowanych w medycynie ludzkiej w leczeniu psów, jak również wzbogacenie medycyny ludzkiej o dane uzyskane w oparciu o badania prowadzone na modelu psim. Warto podkreślić, że rozwój tej wiedzy nie musi bezpośrednio oznaczać konieczności prowadzenia badań klinicznych, ponieważ wiele cennych informacji można uzyskać już na etapie przedklinicznym, w szczególności w badaniach *in vitro*. (Breslin and O'Driscoll 2016, Visan *et al.* 2016, Tevis, *et al.* 2017, Osaki *et al.* 2023).

Inglebert i wsp., prowadząc badania nad rakiem gruczołu mlekowego u suk, wykorzystywali modele komórkowe oparte na organoidach. Odwołując się do większego podobieństwa w biologii nowotworów psów i ludzi w porównaniu do modeli gryzoni, autorzy stworzyli pierwszy biobank organoidów tego typu. Autorzy uważają, że takie organoidy zachowują cechy morfologiczne guza i ekspresję biomarkerów, takich jak receptory ER, PR i HER-2, a także inne cechy molekularne. Dodatkowo, wyprowadzili organoidy z prawidłowej tkanki gruczołu mlekowego tego samego psa, od którego pobrano próbki guza. Jest to podejście niezwykle trudne, a wręcz niemożliwe w przypadku badań z wykorzystaniem tkanek ludzkich, gdzie prawidłową tkankę gruczołu piersiowego uzyskuje od innych pacjentów poddawanych zabiegom profilaktycznym, co ogranicza możliwości badań porównawczych. Wyniki te wskazują, że wyprowadzanie linii komórkowych z nowotworów gruczołu mlekowego suk w celu opracowania jak najlepszego modelu badawczego, służącego do badań nad mechanizmami chemiooporności, inwazyjności, migracji oraz odpowiedzi na nowe leki, jest w pełni zasadne (Inglebert *et al.* 2022).

2 Hipoteza badawcza

Nowotwory gruczołu mlekowego stanowią jedno z najczęstszych schorzeń onkologicznych zarówno u kobiet, jak i u suk, wykazując liczne podobieństwa na poziomie histopatologicznym, molekularnym oraz klinicznym. Wśród czynników kluczowych dla patogenezы i progresji tych nowotworów szczególną rolę przypisuje się mutacjom w genie *TP53*, kodującym białko p53. W raku piersi u ludzi mutacje w genie *TP53* są powszechnie opisywane i związane z agresywnym fenotypem guza, opornością na leczenie oraz gorszym rokowaniem.

Chociaż pies nie jest w pełni uznanym modelem zwierzęcym w badaniach nad nowotworami, coraz więcej danych wskazuje na jego istotny potencjał translacyjny. W szczególności guzy gruczołu mlekowego u suk rozwijają się spontanicznie, w naturalnym środowisku immunologicznym, a ich przebieg kliniczny i odpowiedź na leczenie przypominają przebieg obserwowany u ludzi. Ponadto coraz częściej opisywane są u psów zmiany molekularne analogiczne do tych identyfikowanych w nowotworach ludzkich.

W związku z powyższym postawiono hipotezę, że **mutacje w genie *TP53* występujące w nowotworach gruczołu mlekowego suk wpływają zarówno na właściwości biologiczne komórek nowotworowych *in vitro*, jak i na wybrane parametry kliniczne obserwowane u badanych zwierząt.** Weryfikacja tej hipotezy może nie tylko pogłębić wiedzę na temat biologii guzów gruczołu mlekowego u suk, lecz także dostarczyć przesłanek przemawiających za wykorzystaniem tego gatunku jako wiarygodnego modelu w badaniach nad nowotworami piersi u ludzi.

3 Cel pracy

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest ocena, czy spektrum mutacji w genie *TP53* w nowotworach gruczołu mlekowego u suk wykazuje podobieństwo do tego obserwowanego w raku piersi u kobiet, a także czy obecność tych mutacji koreluje z parametrami klinicznymi i molekularnymi, takimi jak typ histologiczny nowotworu, stopień złośliwości, inwazyjność, zdolność migracji komórek, chemiooporność (oceniane w modelu *in vitro*), oraz z poziomem ekspresji wybranych genów z panelu PAM50: *MYBL2*, *CCNE1*, *PHGDH*, *CDC20*, *CDH3*, *ESR1*, *MAPT*, *FOXA1*, *MLPH*, *SLC39A6*, a dodatkowo także *TP53* oraz jego negatywnego regulatora *MDM2*.

Praca koncentruje się na genie *TP53* jako kluczowym antyonkogenie, którego mutacje mogą przyczyniać się do transformacji nowotworowej, zwiększenia oporności komórek na chemioterapię oraz zwiększenia ich potencjału przerzutowego. Zestawienie danych klinicznych z wynikami eksperymentów *in vitro* może umożliwić ocenę przydatności nowotworów gruczołu mlekowego suk jako modelu zwierzęcego dla ludzkiego raka piersi, a także pozwoli na jego dalszą optymalizację.

Szczegółowe zadania badawcze obejmowały:

- opracowanie kryteriów kwalifikacji pacjentek oraz pobieranych guzów do badań;
- identyfikację i charakterystykę mutacji genu *TP53* w uzyskanych próbkach nowotworowych;
- opracowanie procedur izolacji i hodowli komórek przy zachowaniu możliwie najwyższej zgodności z cechami guza pierwotnego;
- opracowanie i standaryzację protokołów *in vitro* umożliwiających ocenę parametrów biologicznych związanych ze złośliwością nowotworu oraz ich korelację z danymi klinicznymi i molekularnymi;
- określenie profilu ekspresji wybranych genów i jego zestawienie z pozostałymi wynikami badań w celu identyfikacji potencjalnych markerów prognostycznych i predykcyjnych.

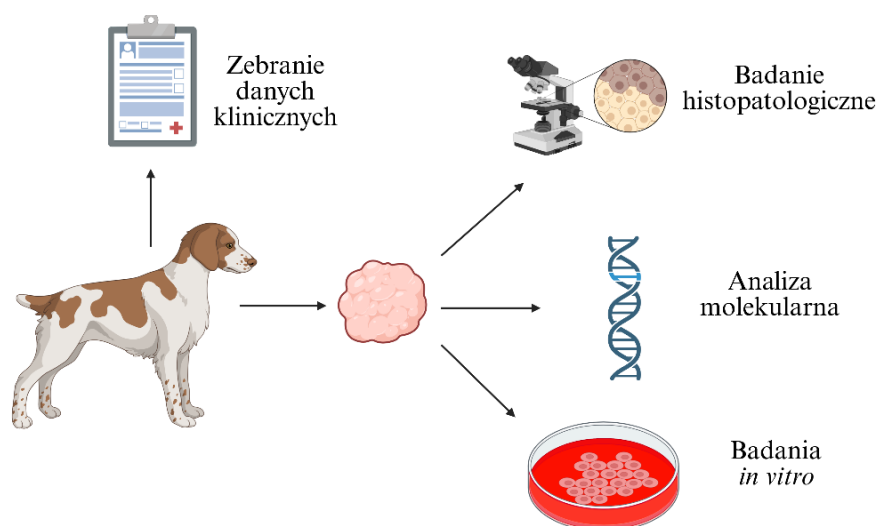
Oczekuje się, że uzyskane wyniki przyczynią się do opracowania lepszego zwierzęcego modelu raka piersi, ale również do poprawy doboru terapii u pacjentek klinik weterynaryjnych.

4 Materiały i metody

4.1 Pozyskanie guzów nowotworowych gruczołu mlekowego

Materiał do badań stanowiły guzy listwy mlekowej pobrane przez lekarza weterynarii w trakcie terapeutycznej mastektomii. W większości przypadków usuwano całą listwę mleczną, z której następnie, w warunkach laboratoryjnych, wycinano poszczególne guzy i odpowiednio je dzielono. W pojedynczych przypadkach do badań przekazywano jedynie część listwy lub wstępnie oczyszczony guz. Guzy dzielono na odpowiednie fragmenty, przeznaczone do badań *in vitro*, analiz molekularnych oraz oceny histopatologicznej. Dodatkowo, tam gdzie było to możliwe, pobierano również fragmenty tkanek kontrolnych (bez zmian nowotworowych), w celu dalszych analiz porównawczych. Zbierano także szczegółowy wywiad kliniczny.

W celu zgromadzenia odpowiedniej ilości materiału badawczego, nawiązano współpracę z dr hab. Sławomirem Gizińskim adiunktem Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW. Dzięki tej współpracy możliwe było systematyczne pozyskiwanie zarówno materiału biologicznego z klinik weterynaryjnych zajmujących się leczeniem małych zwierząt na terenie Warszawy i okolic, jak i danych klinicznych pacjentów, obejmujących informacje dotyczące przebiegu choroby w okresie od roku do dwóch lat po zabiegu. Uproszczony, ogólny schemat doświadczenia przedstawiono na Rycinie 4.



Rycina 4. Uproszczony schemat planowanego badania.

Podczas zabiegów mastektomii gromadzono dane kliniczne w formie ankiety, a pobrany materiał dzielono na trzy części i zabezpieczano do dalszych analiz: histopatologicznych, molekularnych oraz *in vitro*.

Grafikę wykonano w programie Biorender <https://BioRender.com>

Badania nie wymagały zgody Lokalnej Komisji Etycznej, ponieważ nie obejmowały procedur eksperymentalnych wykonywanych na zwierzętach, a materiałem badawczym były guzy stanowiące odpad po terapeutycznej mastektomii. Właściciele zwierząt oraz lekarze weterynarii sprawujący opieką nad pacjentami wyrażali ustną zgodę na wykorzystanie materiału, a w ramach współpracy otrzymywali wyniki badania histopatologicznego. W celu ujednolicenia zbieranych danych klinicznych, opracowano ankietę, która była wypełniania przez lekarza weterynarii lub technika weterynarii po każdym zabiegu. Na podstawie tych danych uzyskiwano informacje, które przedstawiono w ankiecie zaprezentowanej na Rycinie 5.

Ankieta: Nowotwory gruczołu sutkowego data: nr.....

Imię suki	Wiek	Rasa

Sterylizacja T/N data: jeżeli nie - data ostatniej ciecarki

Czy suka rodziła T/N data:

Czy było podjęte wcześniejsze leczenie hormonalne progestynami T/N

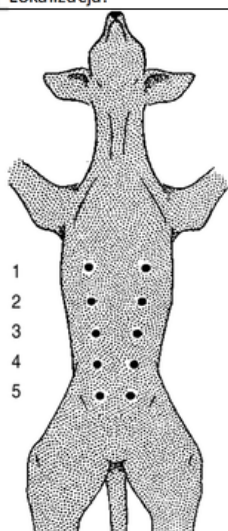
Inne leczenie T/N jakie:

Dodatkowe badania: krew, RTG, USG, CT, MRI inne:

Przerzuty do węzłów T/N pachwinowy/pachowy

Dane guza:

Lokalizacja:	Wielkość	Konsystencja



Uwagi:

Rycina 5. Ankieta dla lekarza/technika weterynaryjnego, do zbierania danych klinicznych w trakcie zabiegu mastektomii.

Grafika zaadaptowana z pracy (Rutteman and Teske 2009).

Z listwy mleczej, po jej chirurgicznej resekcji, w warunkach laboratoryjnych pobierano wszystkie guzy oraz, o ile było to możliwe, fragment tkanki zdrowej. W przypadku obecności kilku guzów w jednej listwie, każdy z nich analizowano oddzielnie, co wynikało z braku jednoznacznych informacji lub przewidywań dotyczących kolejności ich występowania, a tym samym wskazania z całą pewnością guza pierwotnego. Uwzględniono również hipotezę, że komórki, wywodzące się z guza pierwotnego, nie nabyły wtórnych mutacji. Z tego względu każdą próbkę analizowano osobno.

W laboratorium prowadzono stosowną dokumentację pobieranego materiału. Każdy guz opisywano pod względem wielkości, lokalizacji na listwie (oznaczenie nanoszono na ankiecie) oraz dokumentowano fotograficznie. Każdy guz dzielono na co najmniej dwie do trzech części w zależności od jego rozmiaru. Obowiązkowo wydzielano fragmenty przeznaczone do analizy histopatologicznej oraz molekularnej. Do tych analiz wybierano guzy o masie co najmniej 100 mg. W przypadku guzów o średnicy przekraczającej 1 cm, część materiału przeznaczano również do badań *in vitro*.

Fragmenty guzów natychmiast po pobraniu umieszczano w odpowiednich roztworach. Próbkę o masie 50 – 100 mg, przeznaczane do badań histopatologicznych umieszczano w 10% roztworze formaliny (4% formaldehyd). Natomiast fragmenty o masie 30 – 50 mg, dedykowane analizie molekularnej (izolacja RNA), umieszczano w roztworze fixRNA (EURx, E0280). Próbkę o masie >100 - 200 mg, przeznaczane na hodowlę komórkową umieszczano w buforze fosforanowym (ang.: *phosphate-buffered saline*; PBS, Sigma Aldrich, P4417), a następnie przechowywano w lodzie do czasu wstępnej obróbki w warunkach sterylnych.

Podane wartości masy tkanek stanowią wartości minimalne, z których uzyskiwano wiarygodne i powtarzalne wyniki. W przypadku guzów o średnicy przekraczającej 5 cm dodatkowo pobierano wycinki z centralnej części (rdzenia) oraz z obwodowych obszarów guza.

4.2 Analiza histopatologiczna

Fragmenty guza umieszczano w 10% roztworze formaliny i transportowano w warunkach chłodniczych (temp. około 4°C) do laboratorium LAB-WET (ul. Wita Stwosza 30, 02-661 Warszawa) gdzie przygotowywano preparaty histologiczne zgodnie z wewnętrzną procedurą obowiązującą w placówce.

Opis histopatologiczny preparatów zawierał m.in.: typ histologiczny nowotworu, stopień złośliwości, liczbę figur podziału mitotycznego w polu widzenia (współczynnik mitoz) oraz komentarz dotyczący prawdopodobieństwa wystąpienia przerzutów. Klasyfikację histologiczną nowotworów przeprowadzano na podstawie kryteriów zaproponowanych przez Goldschmidta i wsp. (Goldschmidt *et al.* 2011), natomiast stopień złośliwości określano zgodnie z wytycznymi Peña i wsp. (Peña *et al.* 2013).

Po potwierdzeniu, że zmiana wywodzi się z gruczołu mlekowego i posiada charakter nowotworowy, materiał tkankowy wykorzystywano w kolejnych etapach badań. Należy zaznaczyć, że niezależnie od potwierdzenia statusu histopatologicznego, fragmenty każdego guza zabezpieczano również do analiz molekularnych oraz izolacji komórek, aby umożliwić ich wykorzystanie w przyszłych, rozszerzonych badaniach.

4.3 Przygotowanie roztworów i buforów do izolacji komórek z guzów nowotworowych

Roztwór kolagenazy I (Thermofisher Scientific, 17100-017) przygotowywano w zrównoważonym roztworze soli Hanka (ang.: *Hanks' Balanced Salt Solution*; HBSS; Biowest, X0510), tak aby uzyskać stężenie 100 000 U/ml. Roztwór hialuronidazy (Sigma Aldrich, H3506) przygotowywano w 0,01% roztworze albuminy bydlęcej (ang.: *Bovine Serum Albumin*; BSA; Sigma Aldrich, A9418) w PBS, tak aby uzyskać stężenie 563 U/ml. Oba roztwory przepuszczano przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 µm. Roztwory enzymów porocjowano do probówek wirowniczych o poj. 1,5 ml i przetrzymywano w temperaturze - 20°C. Z kolei 1M roztwór CaCl₂ (chlorek wapnia, Sigma Aldrich, C5670) przygotowywano w wodzie Milli-Q po czym przepuszczano przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 µm. Pożywkę hodowlaną pełną stanowiła: pożywka DMEM F12 zawierająca: stabilną glutaminę 542 mg/l, 15 mM HEPES (Biowest, L0092), płodową surowicę bydlęcą (ang.: *Fetal Bovine Serum*; FBS) w końcowym stężeniu 5% oraz mieszaninę antybiotyków przeciw bakteriom i grzybom

(ang.: *Antibiotic Antimycotic*; AA; Biowest, L0010) o końcowym stężeniu 1%. Pożywkę pełną DMEM F12 stosowano na wszystkich etapach izolacji oraz hodowli komórek.

4.4 Izolacja komórek z tkanki oraz ich dalsza propagacja *in vitro*

Do izolacji komórek z tkanek nowotworowych zastosowano zmodyfikowany protokół opracowany przez Piscitelli i wsp., dostosowany do warunków dostępnego laboratorium (Piscitelli *et al.* 2015). Komórki izolowano z uprzednio zamrożonego materiału biologicznego. Takie podejście umożliwiło: rozpoczęcie procesu izolacji dopiero po uzyskaniu pozytywnego wyniku z badania histopatologicznego, jednocześnie przeprowadzenie izolacji komórek z guzów pozyskanych w różnych terminach, a także zapewnienie porównywalnych warunków izolacji i hodowli komórek pochodzących z różnych nowotworów.

Tkankę nowotworową pozyskaną podczas zabiegu mastektomii umieszczano w zimnym buforze PBS (ang.: *Phosphate-buffered saline*) i transportowano w warunkach chłodniczych do laboratorium. Wszystkie czynności przeprowadzano w warunkach aseptycznych, pod komorą laminarną klasy BSL II, w celu uniknięcia kontaminacji mikrobiologicznych.

Po kilkukrotnym przepłukaniu buforem PBS, fragment guza umieszczano na kilka sekund w 80% etanolu w celu wstępnej dezynfekcji, a następnie ponownie płukano w buforze PBS (odpłukanie pozostałości etanolu). Tkankę rozdrabniano przy użyciu skalpela i nożyczek na szalce Petriego na fragmenty o objętości kilku milimetrów sześciennych. Poszczególne fragmenty tkanek ważono i grupowano według masy w zakresie od 100 mg do 600 mg, po czym umieszczano je w pożywce mrożeniowej, 10% roztwór dimetylosulfotlenku (ang.: *dimethyl sulfoxide*; DMSO; Sigma Aldrich Aldrich, D2438) w inaktywowanej surowicy FBS (Biowest, S181H), w probówkach mrożeniowych. Probówki z tkankami przenoszono do zamrażarki niskotemperaturowej (-80°C) w specjalnie do tego celu przeznaczonych pojemnikach zapewniających stopniowe zamrażanie tkanek (obniżanie temperatury co 1°C/min). W celu długoterminowego przechowania, probówki przenoszono do pojemników z ciekłym azotem (Piscitelli *et al.* 2015). Po zebraniu grupy 4-6 guzów, przystępowano do izolacji komórek z tkanki. Przed rozpoczęciem procedury przygotowywano odpowiednie roztwory (pkt. 4.3.).

Po przygotowaniu odczynników przystępowano do izolacji komórek (Rycina 7). Próbkę tkanek rozmrażano w łaźni wodnej (37°C). Rozmrożone tkanki guzów przenoszono sterylną pęsetą do probówek o obj. 15 ml, dodawano 10 ml pożywki pełnej (etap płukania), wirowano (200 x g / 5 min) i usuwano supernatant. Następnie tkanki umieszczano w świeżej pożywce pełnej, inkubowano na wytrząsarce przy prędkości 90 rpm, w temperaturze 37°C przez 15 min w celu odpłukania z tkanki pozostałości pożywki do mrożenia. Próbkę ponownie wirowano (200 x g / 5 min), supernatant usuwano i dodawano roztwór z enzymami trawiącymi tkanki (roztwór trawiący). Objętość roztworu trawiącego zależała od masy zamrożonej tkanki. Standardowo przygotowano 1 ml roztworu trawiącego na 100 mg tkanki, ale nie mniej niż 2 ml. Roztwór trawiący do dyspersji tkanek przygotowywano w pożywce zawierającej dodatkowo: 3 mmol CaCl₂, kolagenazę I (1000 U/ml) oraz hialuronidazę (100 U/ml). Tkanki, w roztworze trawiącym, inkubowano na wytrząsarce (90 rpm) w temperaturze 37°C przez 2-3 godziny. Czas inkubacji, a tym samym wydajność trawienia, zależały od struktury tkanki. Proces trawienia tkanek cały czas monitorowano. Po osiągnięciu całkowitej dyspersji tkanki, próbkę przepuszczano przez sito komórkowe o wielkości porów 70 µm. Zawartość sita kilkakrotnie przemywano pożywką pełną. Następnie próbkę wirowano (200 x g / 5 min) a uzyskany osad komórkowy zawieszano w 25 ml świeżej pożywki pełnej zawierającej dodatkowe antybiotyki: kanamycyna (PanReac, A1493,0005) i gentamycynyna (Biowest, P4020) o stężeniach końcowych 100 µg/ml i 50 µg/ml, odpowiednio (pożywka selekcyjna). Całość przenoszono na szalkę hodowlaną o średnicy 15 cm (ang. *Tissue Culture Treated Plate*; TC) i umieszczono na 24 godz. w inkubatorze w 37°C w atmosferze 5% CO₂.

etapie pasażowania, po drugie, pozwalało na utrzymanie możliwie niskiej liczby pasażów w trakcie prowadzenia doświadczeń, co było kluczowe dla opracowania modelu jak najwierniej odzwierciedlającego guz pierwotny.

Mrożenie komórek wykonywano po ich uprzedniej trypsynizacji (jak opisano wcześniej). Pożywkę mrożeniową stanowiła pełna pożywka hodowlana DMEM F12 zawierająca 10% DMSO. Komórki zamrażano w probówkach mrożeniowych (krioprobówki) w gęstości $0.5-1 \times 10^6$ komórek na 1ml i przenoszono do zamrażarki niskotemperaturowej (-80°C), a w celu dłuższego przechowania do pojemnika z ciekłym azotem.

Do realizacji kolejnych etapów pracy komórki rozmrażano najpóźniej na trzy dni przed rozpoczęciem eksperymentów, tak aby w momencie ich przeprowadzania znajdowały się w wykładniczej fazie wzrostu. Proces rozmrażania przebiegał analogicznie jak w trakcie izolacji, z tą różnicą, że po rozcieńczeniu pożywki mrożeniowej, odwirowaniu komórek i usunięciu supernatantu, powstały osad komórkowy zawieszano w świeżej pożywce pełnej, po czym komórki przenoszono do odpowiedniego naczynia hodowlanego.

4.5 Przygotowanie naczyń hodowlanych do badań w modelu 2D

W ramach optymalizacji badań komórek w hodowli adherentnej (2D), zauważono, że nie wszystkie komórki ulegają adhezji do powierzchni wzrostu, co utrudniało analizy m.in. przy wykorzystaniu barwień fluorescencyjnych. W trakcie procedury barwienia wiele komórek ulegało odpłukaniu. Dlatego w celu zwiększenia adhezji komórek naczynia hodowlane wykorzystywane do badań chemiooporności, migracji, czy testu zarastania rasy, pokrywano kolagenem (Corning, 354236) zgodnie z protokołem zamieszczonym w ulotce producenta (firma Corning). Kolagen rozcieńczano do stężenia $60 \mu\text{g/ml}$ w $0,02\text{M}$ kwasie octowym. W zależności od zastosowanego naczynia hodowlanego dodawano taką objętość roztworu, która odpowiadała $6 \mu\text{g/cm}^2$ kolagenu. Pokryte kolagenem naczynia inkubowano przez godzinę pod komorą laminarną w temperaturze pokojowej, po czym powierzchnię wzrostu naczyń dwukrotnie przemywano buforem PBS. Jeżeli naczynie nie było wykorzystane od razu po przygotowaniu, zalane buforem PBS przechowywano do kilku dni w warunkach chłodniczych, zabezpieczone przed kontaminacją.

4.6 Formowanie sferoidów 3D do analiz chemiooporności i inwazyjności

W ramach niniejszej pracy opracowano protokół formowania trójwymiarowych sferoidów (3D) z wyprowadzonych linii komórek nowotworowych. Na podstawie serii eksperymentów określono optymalną wyjściową liczbę komórek (5×10^3) zdolną do utworzenia pojedynczego, jednorodnego sferoidu o średnicy ok. 300 μm , odpowiedniego do prowadzenia dalszych analiz biologicznych (np. chemiooporność, inwazyjność).

Przygotowanie hodowli 3D wymagało zastosowania technik ograniczających przyleganie komórek do powierzchni naczynia hodowlanego, co sprzyjało spontanicznemu tworzeniu się sfer. W tym celu zastosowano płytki 96-dółkowe z zaokrąglonym dnem (tzw. U-bottom, VWR, 734-2782), które uprzednio pokryto roztworem Poly-HEMA (Sigma Aldrich, P3932), zgodnie z procedurą opisaną przez Phung i wsp. (Phung *et al.* 2011).

Roztwór Poly-HEMA o stężeniu 120 mg/ml sporządzono w 95% etanolu (roztwór wyjściowy) i pozostawiono na noc na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej do całkowitego rozpuszczenia polimeru. Roztwór roboczy przygotowywano przez 24-krotne rozcieńczenie 95% etanolem roztworu wyjściowego. Do każdego dołka płytki dodawano po 60 μl roztworu roboczego, płytki pozostawiano do całkowitego wyschnięcia w warunkach jałowych pod komorą laminarną. Bezpośrednio przed wysiewem komórek, płytki poddawano naświetlaniu promieniowaniem UV przez 30 minut (sterylizacja).

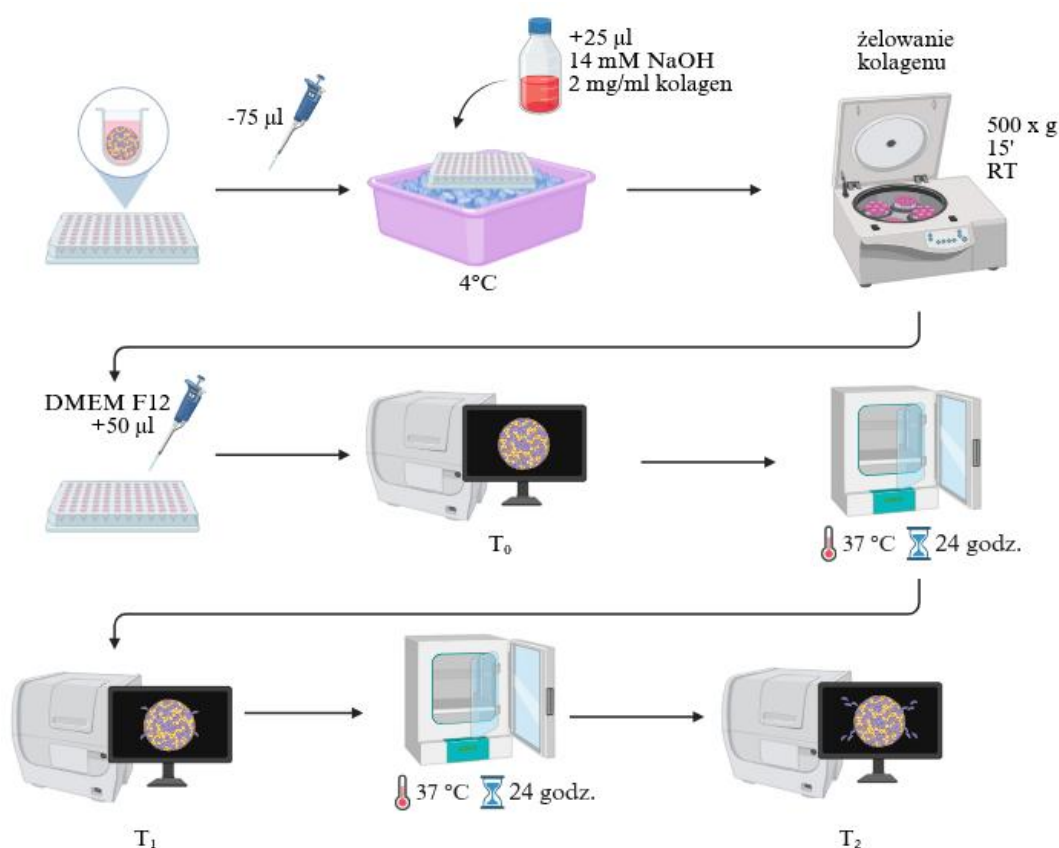
W trakcie wysiewania komórek do pożywki pełnej dodawano roztwór kolagenu, który wspomagał agregację komórek i stabilizację formujących się sferoidów. Końcowe stężenie kolagenu w każdej studzience wynosiło 12 $\mu\text{g/ml}$. Na płytki przenoszono zawiesinę komórkową, o obj. 100 μl na dołek i gęstości 5×10^3 , w czterech powtórzeniach technicznych. Następnie płytki wirowano przez 10 minut przy prędkości 500 x g, co sprzyjało skupieniu się komórek na dnie studzienki i inicjalizację procesu formowania jednej, dobrze zdefiniowanej sfery.

Po 24 godzinach inkubacji obserwowano wyraźnie uformowane sferoidy, które były gotowe do dalszych analiz biologicznych.

4.7 Analiza inwazyjności

Sferoidy, do analiz inwazyjności, przygotowywano jak opisano w punkcie 4.6. W pierwszym etapie, po 24 godzinach, gdy sfery były uformowane, usuwano 75 μ l pożywki z każdego dołka, tak aby nie naruszyć znajdującej się na dnie sfery. Następnie dodawano 25 μ l pożywki zawierającej dodatkowo 14 mM NaOH oraz kolagen w stężeniu 2 mg/ml. Procedurę wykonywano na lodzie, aby opóźnić żelowanie kolagenu, które ostatecznie odbywało się jednocześnie dla wszystkich sferoidów na danej płytce podczas wirowania (500 x g/15 min) w temperaturze pokojowej (RT). Po wirowaniu do każdego dołka dodawano 50 μ L pożywki i obrazowano (czas T_0) przy zastosowaniu urządzenia Cytation 5 (Bio-Tek, USA). Kolejne obrazowania wykonywano po 24 (T_1) oraz 48 (T_2) godzinach od zatopienia. Schemat doświadczenia został przedstawiony na Rycinie 8. Po ostatnim obrazowaniu sferoidy utrwalano dodając po 10 μ l formaliny (formaldehyd 38%) do każdego dołka, tak aby jej końcowe stężenie w dołku wynosiło 10%. Następnie sferoidy barwiono roztworem Gel Green (Biotium, #41005). W tym celu do dołków dodawano po 40 μ l roztworu barwiącego 1x Gel Green (roztwór wyjściowy 100X w wodzie Mili-Q) w 2% roztworze Triton X-100 (Sigma Aldrich, X100) w PBS) w ten sposób uzyskano końcowe stężenie poszczególnych składników: Triton X-100 0,5%, Gel Green 10 000 razy rozcieńczony w każdym dołku. Płytkę inkubowano w ciemności przez 15 min po czym, bez odpłukiwania roztworu barwiącego, wykonywano zdjęcia przy użyciu mikroskopu konfokalnego SpinSR10 (OLYMPUS, Japonia). Obrazowanie prowadzono na obu urządzeniach w trybie *Z-stack* (rzut w osi Z), polegającym na rejestracji serii obrazów kolejnych warstw sfery wzdłuż osi Z, a następnie wygenerowaniu projekcji maksymalnej w tej osi.

Stopień inwazyjności oceniano w momencie pojawienia się pierwszych oznak migracji komórek poza obręb sfery, obserwowanych na zdjęciach wykonanych w świetle przechodzącym w ciągu 48 godzin od momentu zatopienia sferoidu w macierzy kolagenowej. Komórki, wykazujące migrację już po 24 godzinach, klasyfikowano jako bardzo inwazyjne; komórki migrujące poza sferoid po 48 godzinach, jako inwazyjne; natomiast brak jakichkolwiek oznak migracji komórek po 48 godzinach kwalifikowano jako nieinwazyjne.

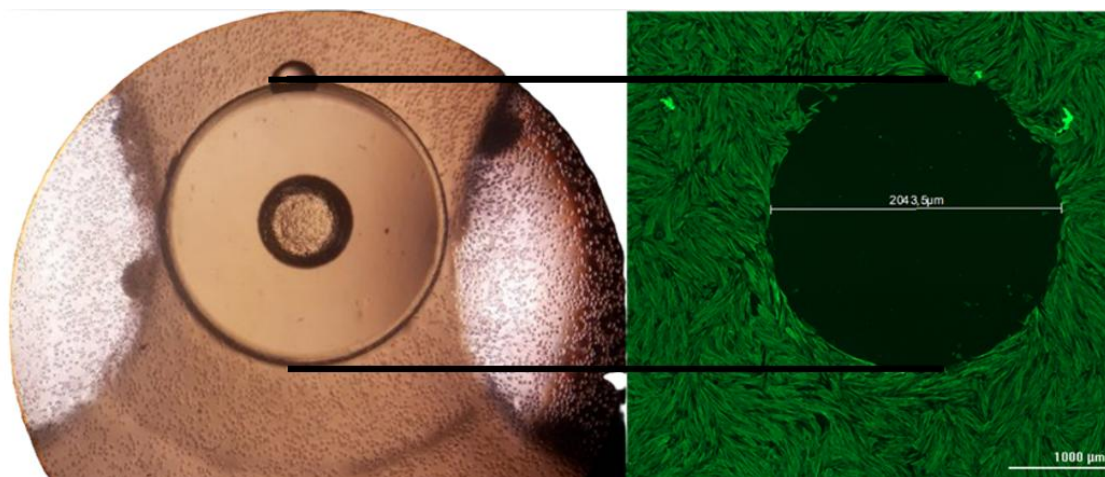


Rycina 8. Schemat przedstawiający proces zatapiania sferoidów w matrycy kolagenowej oraz sekwencję etapów obrazowania wykorzystywaną do analizy inwazyjności komórek.

Grafikę wykonano w programie Biorender <https://BioRender.com>

4.8 Analiza migracji komórek – test zarastania rysy *in vitro*

Do badań migracji, wykorzystywano płytki 96 dołkowe NUNC (Thermo Scientific, 165305), które uprzednio pokrywano kolagenem ($6\mu\text{g}/\text{cm}^2$) według protokołu opisanego w rozdziale 4.5. Do dołków płytki dopasowane były specjalne silikonowe korki ORIS (Platypus Technologies, LLC, CMAU505), pozwalające na przygotowanie, podczas wysiewu komórek, równej strefy migracji. Badanie wykonywano zgodnie z protokołem producenta. Metodę działania korków przedstawiono na Rycinie 9.

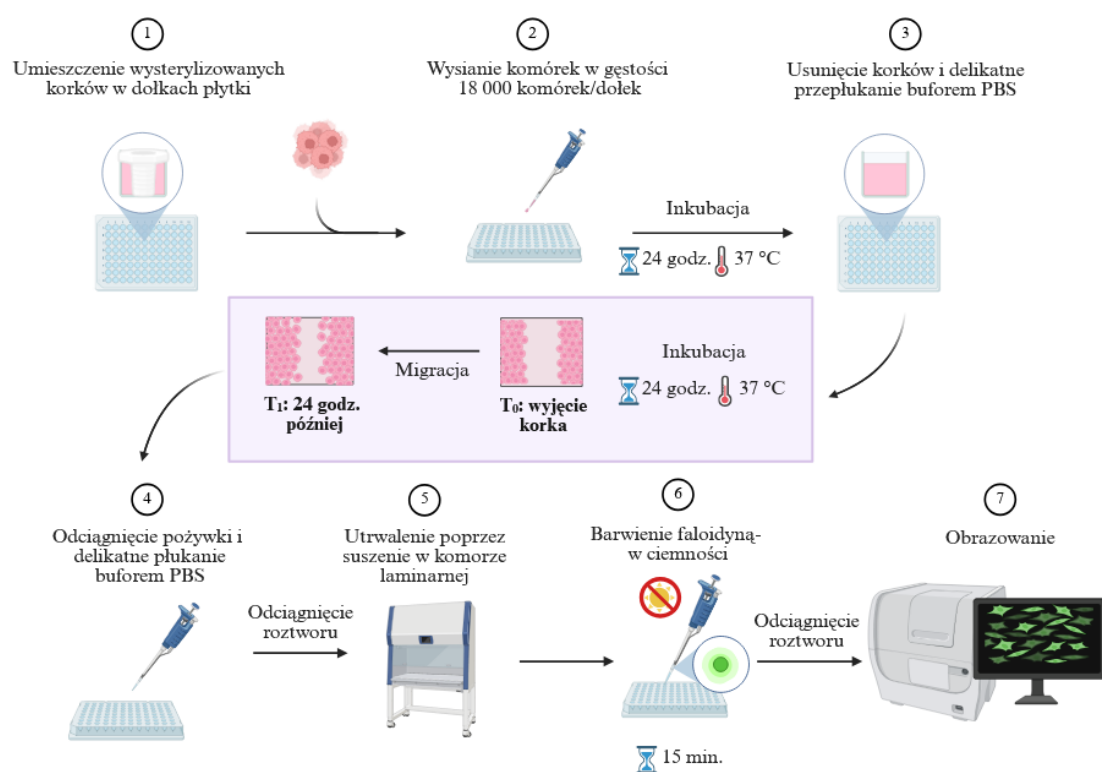


Rycina 9. Schemat przedstawiający zasadę działania testu zarastania rysy z wykorzystaniem korków ORIS.

Obraz po lewej stronie przedstawia korek ORIS umieszczony w dołku hodowanym wraz ze świeżo wysianymi komórkami. Zdjęcie wykonano przy użyciu mikroskopu Leica DM IL LED (obiektyw $5\times$). Obraz po prawej stronie ukazuje komórki w punkcie czasowym T_0 , po usunięciu korka ORIS, utrwaleniu oraz wybarwieniu cytoszkieletu aktynowego barwnikiem Actin Green (zdjęcie wykonano przy użyciu urządzenia Cytation 5). Oba obrazy zostały odpowiednio przeskalowane, aby umożliwić porównanie wielkości korka z obszarem pozbawionym komórek powstałym po jego usunięciu, skala - $1000\mu\text{m}$

Gęstość komórek do badań migracji została zoptymalizowana. Ostatecznie, do doświadczenia wykorzystywano 6×10^4 komórek/ cm^2 czyli 1.8×10^4 komórek na dołek. Po 24 godzinach od wysiania komórek usuwano silikonowy korek, komórki delikatnie przemywano buforem PBS, dodawano $100\mu\text{l}$ pożywki pełnej i inkubowano przez 24 godz. ($5\%\text{ CO}_2$, 37°C). Po zakończonej inkubacji odciągano pożywkę, przemywano komórki delikatnie roztworem PBS i pozostawiano płytkę do wyschnięcia pod komorą laminarną. Następnego dnia, komórki barwiono wykorzystując odczynnik na bazie faloidyny Actin Green (Thermofisher Scientific, R37110). Do każdego dołka dodawano $40\mu\text{l}$ roztworu Actin Green 20-krotnie rozcieńczonego w $0,5\%$ roztworze Triton X-100

w PBS i pozostawiano na 15 min w temperaturze pokojowej w ciemności. Po tym czasie roztwór odciągano. Nie wykonywano płukania, ponieważ warstwa utrwalonych komórek była bardzo podatna na odklejanie i mogła zostać odpłukana. Komórki obrazowano przy użyciu urządzenia Cytation 5 (Bio-Tek, USA). Schemat całego doświadczenia przedstawiono na Rycinie 10. Analizę obrazu przeprowadzano w programie Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Mental Health, USA).



Rycina 10. Schemat przeprowadzania analizy migracji komórek.

Grafikę wykonano w programie Biorender <https://BioRender.com>

Szybkość migracji komórek określano na podstawie zmiany promienia obszaru niezajętego przez komórki między czasem T₀ a 24 godzinami po usunięciu korka blokującego migrację. Założono, że średnica obszaru początkowego w czasie T₀ jest stała i wynosi 2 mm ($\pm$ 50 μ m), co potwierdzono w trakcie opracowywania protokołu eksperymentalnego.

Szybkość migracji (v) wyrażono w mikrometrach na godzinę ($\mu\text{m/h}$) i obliczono zgodnie ze wzorem:

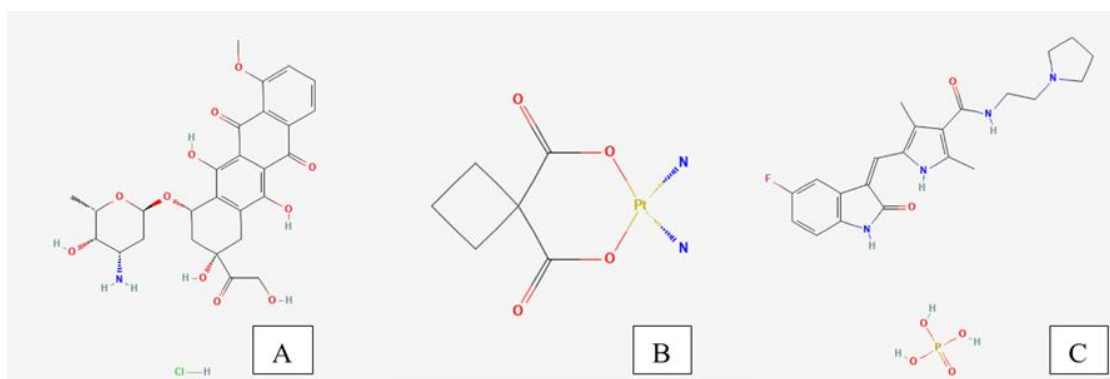
$$v = \frac{R_0 - R_1}{t}$$

Gdzie:

- $R_0 = \sqrt{\frac{S_0}{\pi}}$ - promień obszaru niezajętego przez komórki w czasie T_0
- $R_1 = \sqrt{\frac{S_1}{\pi}}$ - promień obszaru niezajętego przez komórki w czasie T_1 (po 24 godzinach),
- S_0 - pole powierzchni niezajętej przez komórki w czasie T_0 , obliczone w programie ImageJ.
- S_1 - pole powierzchni niezajętej przez komórki w czasie T_1 , obliczone w programie ImageJ,
- t - czas inkubacji po usunięciu korka, wynoszący 24 godziny.

4.9 Przygotowanie roztworów chemioterapeutyków

Do badań, na podstawie dostępnej literatury, zostały wybrane chemioterapeutyki o różnym mechanizmie działania (Valdivia *et al.* 2021). Wzory strukturalne wybranych związków przedstawiono na Rycinie 11, a schemat przygotowania roztworów wyjściowych zawarto w Tabeli 7.



Rycina 11. Wzory strukturalne chemioterapeutyków wykorzystanych w badaniach.

A- doksorubicyna, B- kabroplatyna, C- fosforan toceranibu
Wzory zaczerpnięto z bazy PubChem NCI [108-110]

Tabela 7. Związki wykorzystywane w badaniu oraz sposób ich przygotowania.

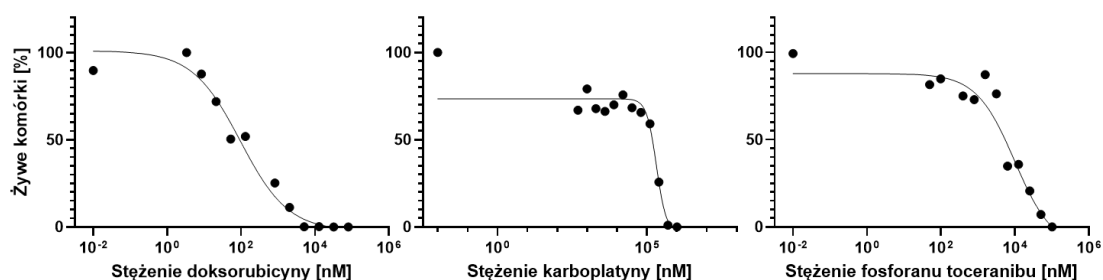
Związek	Doksorubicyna	Karboplatyna	Fosforan Toceranibu
Producent	MCE	MCE	Adooq
Nr kat.	HY-15142	HY-17393	A15263
Masa molowa	579,98 g/mol	371,25 g/mol	494,45 g/mol
Stężenie roztworu wyjściowego	30 mM	10 mM	2 mM
Rozpuszczalnik	DMSO	dH ₂ O	DMSO
Warunki przechowywania	-80°C.	-80°C	-20°C

Roztwory cytostatyków rozporcjowano w małych objętościach i przetrzymywano w odpowiednich temperaturach wskazanych przez producenta. Do analiz substancje były każdorazowo rozmrażane w temperaturze pokojowej i wykorzystywane tego samego dnia.

4.10 Analiza chemiooporności komórek w modelu 2D

Badania nad chemioopornością prowadzono w płytkach 96-dołkowych pokrytych kolagenem (punkt 4.5). Komórki wysiewano w gęstości 3×10^3 komórek/dołek ($1 \times 10^4/\text{cm}^2$) w pożywce pełnej. Po 24 godzinach pożywkę wymieniano na świeżą, zawierającą odpowiedni cytostatyk. Każdy związek testowano w trzech stężeniach, w czterech powtórzeniach technicznych. W każdej serii doświadczeń kontrolę stanowiły komórki nietraktowane, którym w dniu eksperymentu wymieniano jedynie pożywkę. Inkubacja komórek z cytostatykiem trwała 48 godz., po tym czasie komórki utrwalano i wykonywano odczyt. Ze względu na fakt, że końcowym wynikiem była liczba wybarwionych jąder komórkowych, nie stosowano kontroli typu blank.

W ramach opracowywania protokołu, dla linii komórkowej CMT_026_1 wyznaczono krzywe zależności dawka-efekt dla każdego chemioterapeutyku. Następnie do pozostałych doświadczeń dobrano 3 stężenia, które znajdowały się na przegięciu krzywej (Rycina 12). Wybrane stężenia oznaczono odpowiednio zaczynając od najniższego: C₁, C₂ oraz C₃ dla każdego stosowanego cytostatyku, osobno dla hodowli 2D i 3D (Tabela 8). Uzyskane wartości umożliwiły określenie warunków dalszych analiz.



Rycina 12. Krzywe zależności dawka-efekt dla komórek CMT_026_1 po 48 godzinnej inkubacji z wybranymi cytostatykami.

Do oceny przeżywalności komórek wykorzystano metodę barwienia jąder komórkowych roztworem barwinka DAPI. Na podstawie zliczonej liczby jąder opracowano znormalizowane krzywe odpowiedzi komórek na zastosowane cytostatyki w dawkach: doksorubicyna: 3,35 nM-80 μ M; karboplatyna: 488 nM-1 mM; fosforan toceranibu: 48 nM-100 nM.

Tabela 8. Wartości C dla każdego stosowanego cytostatyku w hodowli 2D.

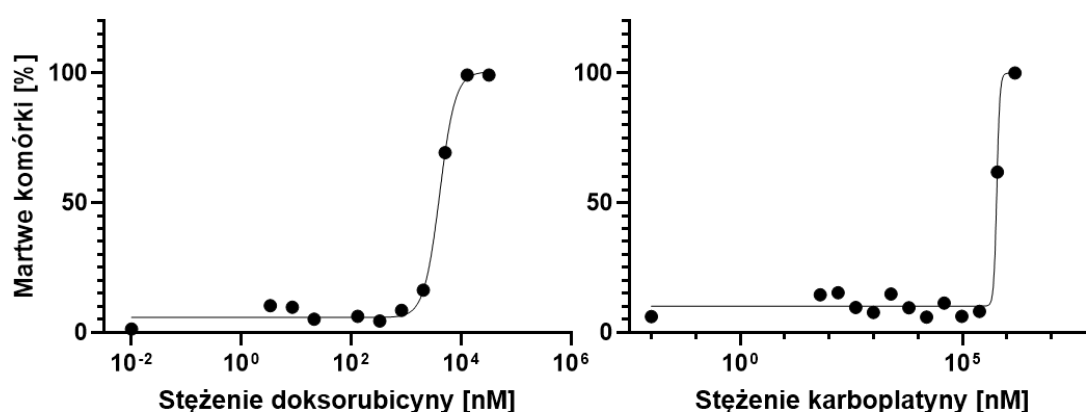
Cytostatyki Stężenie	Doksorubicyna	Karboplatyna	Fosforan Toceranibu
C ₁	0,3 μ M	100 μ M	2,5 μ M
C ₂	1 μ M	250 μ M	5 μ M
C ₃	4 μ M	500 μ M	15 μ M

Inkubację komórek z cytostatykami prowadzono przez 48 godzin w objętości 100 μ l pożywki na dołek. Po zakończeniu inkubacji komórki płukano buforem PBS, utrwalano w 10% roztworze formaliny przez 15 minut, ponownie płukano buforem PBS, a następnie barwiono roztworem 4',6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI) (PanReac, cA1001,0010) w stężeniu 2 μ g/ml DAPI w 0,5% roztworze Triton X-100 w PBS przez 15 minut w ciemności. Po tym czasie roztwór z barwnikiem odciągano, dodawano 0,5% roztwór Triton X-100 w PBS, zostawiano na 5 min, a następnie 2-krotnie płukano dołki buforem PBS. Następnie, bufor odciągano i dodawano do każdego dołka 100 μ l wody Milli-Q. Do czasu obrazowania płytkę przechowywano w ciemności w warunkach chłodniczych. Wybarwione jądra komórkowe obrazowano za pomocą urządzenia Cytation 5, a analizę ilościową przeprowadzono z wykorzystaniem programu ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Mental Health, USA).

4.11 Analiza chemiooporności komórek w modelu 3D

Sferoidy wysiewano w czterech powtórzeniach technicznych dla każdego stężenia badanego związku, z zastosowaniem dwóch kontroli, pozytywnej i negatywnej, na

plytkach pokrytych Poly-HEMA (patrz pkt.4.6). Dla hodowli 3D wyznaczono wartości C_{1-3} Tabela 9 dla doksorubicyny i karboplatyny dla linii CMT_026_1 analogicznie jak w analizie chemiooporności 2D opisanej w podrozdziale 4.10. Dla fosforanu toceranibu w związku z utrudnionym oznaczeniem (autofluorescencja) wykorzystano dawki dwukrotnie wyższe dla C_1 i C_2 (Rycina 13) niż dla analizy 2D. Dla dawki C_3 ustalono maksymalną ilość roztworu jaką można było dodać, gdzie rozpuszczalnik (DMSO) nie wpływał negatywnie na żywotność komórek.



Rycina 13. Krzywe zależności dawka-efekt dla komórek CMT_026_1 po 48 godzinnej inkubacji z wybranymi cytostatykami.

W teście wykorzystano metodę barwienia jąder komórkowych roztworem barwnika Gel Green. Całkowitą fluorescencję, odpowiadającą liczbie komórek martwych, zarejestrowano i wykorzystano do opracowania znormalizowanych krzywych zależności dawka–efekt. W badaniu zastosowano cytostatyki w stężeniach: doksorubicyna: 3,35 nM - 80 μ M; karboplatyna: 63 nM - 1,5 mM.

Tabela 9. Wartości C_{1-3} dla poszczególnych cytostatyków stosowanych w hodowli 3D.

Cytostatyk Stężenie	Doksorubicyna	Karboplatyna	Fosforan Toceranibu
C_1	1 μ M	380 μ M	5 μ M
C_2	2,5 μ M	750 μ M	10 μ M
C_3	5 μ M	1500 μ M	20 μ M

Do powyższej analizy, jak i reszty doświadczenia komórki wysiewano w gęstości 5×10^3 na dołek w objętości 100 μ l pożywki pełnej z dodatkiem kolagenu w stężeniu 12 μ g/ml. Po 24 godzinach od uformowania się sferoidów (opisane w podrozdziale 4.6), dodawano cytostatyki w objętości 50 μ l w takim stężeniu aby osiągnąć odpowiednie stężenia końcowe. Do kontroli dodawano 50 μ l pożywki pełnej. Związki

przygotowywano w pożywce pełnej z dodatkiem kolagenu, (12 µg/ml). Inkubację z cytostatykami prowadzono przez 48 godzin, po czym do każdego dołka dodawano 50 µl roztworu barwnika Gel Green (Biotium, BTIU41005) rozcieńczonego w pożywce pełnej (rozcieńczenie wyjściowe 1:2500, rozcieńczenie końcowe 1:10 000). Do kolumny z kontrolą pozytywną dodawano 50 µl mieszaniny Gel Green w pożywce pełnej z Triton X-100 (końcowe stężenie 2%). Tak przygotowany układ umożliwiał ocenę intensywności fluorescencji proporcjonalnej do liczby martwych komórek, przy czym najwyższy sygnał fluorescencji pochodził z dołków zawierających największą liczbę komórek martwych. Kontrola pozytywna zawierająca detergent umożliwiła wyznaczenie maksymalnej intensywności fluorescencji, dla próbki reprezentującej 100% martwych komórek. Wyniki odczytywano na czytniku płytek Spark (TECAN, Szwajcaria). Wykonywano również dokumentację fotograficzną przy wykorzystaniu urządzenia Cytation 5. Do analizy statystycznej wykorzystano dane ilościowe uzyskane z czytnika płytek.

4.12 Test klonogeniczności

Test klonogeniczności przeprowadzano na płytkach 6-dołkowych. Komórki wysiewano w gęstości 5×10^2 na dołek i pozostawiano przez noc w inkubatorze w standardowych warunkach hodowlanych. Schemat doświadczenia obejmował dwie grupy: w trzech dołkach komórki traktowano cytostatykiem, natomiast komórki w pozostałych trzech dołkach stanowiły kontrolę. W dołkach eksperymentalnych stosowano doksorubicynę w stężeniu 500 nM przez okres 2 tygodni. W tym czasie pożywkę wymieniało się raz w tygodniu (w grupie kontrolnej stosowano pożywkę pełną, w grupie badanej pożywkę zawierającą cytostatyk). Po upływie dwóch tygodni, wymieniono pożywkę we wszystkich dołkach na świeżą pożywkę pełną. Inkubację kontynuowano przez kolejny tydzień. Po tym czasie komórki utrwalano w formalinie i barwiono roztworem Gel Green, analogicznie do procedury barwienia DAPI opisanej w punkcie 4.10, zachowując zgodność końcowego stężenia barwnika (1:10 000). Intensywność fluorescencji rejestrowano z całej powierzchni dołków przy użyciu wielofunkcyjnego czytnika płytek SPARK 10 (TECAN, Szwajcaria).

4.13 Izolacja RNA z materiału biologicznego

RNA izolowano z tkanki o masie minimalnej 25-50 mg, której sposób pobrania opisano w podrozdziale 4.1. Pobraną tkankę, w przypadku większej ilości materiału porcjowano, ważono i zamrażano w ciekłym azocie. Materiał biologiczny mrożono w taki sposób, aby masa tkanki nie przekroczyła 100 mg.

Po rozmrożeniu, tkankę umieszczano na sterylnej szalce i w warunkach chłodniczych rozdrabniano skalpelem. Do izolacji RNA wykorzystano komercyjny zestaw Universal RNA/miRNA Purification Kit (EURx, E3599-01). Procedurę izolacji prowadzono zgodnie z protokołem producenta.

Rozdrobniony materiał umieszczano w probówkach z kulkami LYSING MATRIX D (ABO, 116913050), dodawano 300 µl buforu RL i homogenizowano mechanicznie (Bertin Precellys Evolution Touch Homogenizer, Francja). Do homogenizacji tkanek stosowano program dopasowany do tkanek twardych (6800 rpm, 3 razy przez 20 s, z przerwami 30 s). Następnie dodawano 200 µl buforu LyseAll i postępowano dokładnie z protokołem producenta. Ilość oraz czystość otrzymanego RNA określano poprzez pomiar absorbancji na spektrofotometrze (DeNovix DS-11, USA) przy długości fal 230, 260 oraz 280 nm. Czystość wyizolowanego materiału określano poprzez wartość stosunku absorbancji przy długościach 260/230 nm (zanieczyszczenia solami) i 260/280 nm (zanieczyszczenia białkami). Materiał uznawano za wystarczająco czysty dla obu wartości większych od 1,8. RNA do czasu dalszych analiz przechowywano w temperaturze -80°C.

4.14 Synteza cDNA i sekwencjonowanie transkryptu TP53

Reakcję odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) wykonano przy zastosowaniu zestawu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, K1622), zgodnie z protokołem producenta. Do każdej reakcji użyto 1 µg wyizolowanego RNA. Po przygotowaniu mieszaniny reakcyjnej przeprowadzano reakcję syntezy cDNA w termocyklerze PeqSTAR (PeqLab, Niemcy) (Tabela 10) poprzez inkubację mieszaniny w 42°C przez okres 1 godziny, a następnie zakończenie reakcji poprzez podgrzanie do 70°C przez 5 min.

Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej do RT-PCR

	Odczynnik	Objętość (μl)	Inkubacja
Etap I	Matryca RNA(1μg)	X	65°C /5'
	dH ₂ O	11 - X	
	Oligo dT	1	
	Razem	12	
Etap II	5X reaction buffer	4	42°C /60'
	RiboLock	1	
	dNTP 10 mM	2	
	RevertAid	1	
	Razem	20	
Etap III			70°C /5'

Otrzymaną matrycę cDNA wykorzystywano bezpośrednio do namnożenia transkryptu *TP53* w reakcji PCR jak i do określenia ilości transkryptów badanych genów w reakcji qPCR. Pozostały materiał przechowywano do czasu dalszych analiz w temp. - 80°C.

Namnażanie materiału do sekwencjonowania genu *TP53* odbywało się w ramach standardowej reakcji PCR, w tym celu zaprojektowano odpowiednie sekwencje nukleotydowe starterów zsyntezowanych przez firmę Genomed SA (Warszawa, Polska). Do reakcji PCR wykorzystywano startery cf-p53-ORF-F oraz cf-p53-ORF-R, w przypadku sekwencjonowania wykorzystywano dodatkowy starter cf-p53-449-F (Tabela 11).

Tabela 11. Startery do reakcji PCR oraz sekwencjonowania.

Starter	Rodzaj	Sekwencja	T _m (°C)	Stężenie	Długość
cf-p53-ORF-F	Forward	CGCTCCCCTGAGGTTTCG	54,3	100uM	17 nt
cf-p53-ORF-R	Reverse	GAGGGTGTGCGTGTTGGG	54,9	100uM	18 nt
cf-p53-449-F	Forward	CCATCTATAAGAAGTCGGAGTTCG	55,7	100uM	24 nt

Oczekiwana długość produktu PCR 1163 bp; T_m – temperatura przyłączania się starterów

Do reakcji PCR wykorzystano zestaw Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermofisher Scientific, MAN0012397). Mieszaninę reakcyjną przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta (Tabela 12) a następnie przeprowadzano reakcję PCR w termocyklerze peqSTAR (Tabela 13).

Tabela 12. Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR.

Odczynnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie robocze	Objętość [μl]/próbkę
Bufor	5X	1X	5
dNTP	10 mM	0,3 mM	0,8
cf-p53-ORF-F	10 μM	0,3 μM	0,8
cf-p53-ORF-R	10 μM	0,3 μM	0,8
Polimeraza	2 U/μl	0,5 U/μl	0,3
Matryca			2
ddH₂O		-	15,3
SUMA			25

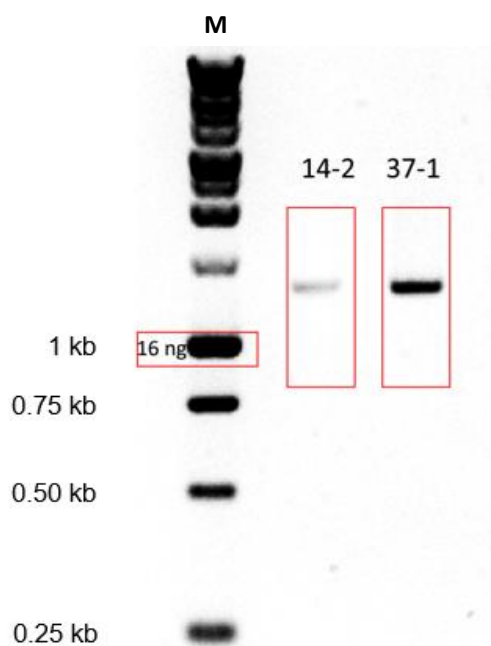
Tabela 13. Warunki reakcji namnażania materiału do sekwencjonowania.

ETAP	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Denaturacja	98°C	30''	1
Denaturacja	98°C	10''	25
Przylączenie starterów	60°C	45''	
Elongacja	72°C	45''	
Końcowa elongacja	72°C	5'	1
Zakończenie reakcji	4°C	∞	1

Obecność produktu reakcji potwierdzano rozdziałem elektroforetycznym w żelu agarozowym (1%) w buforze TAE (Tris-octan-EDTA, pH 8,3) z wykorzystaniem wzorca wielkości DNA (E3131-01, EURx) oraz znacznika DNA Gel Green. Elektroforezę przeprowadzano przy napięciu 150 V przez 30 minut. Wynik rozdziału archiwizowano wykorzystując urządzenie ChemiDoc (Bio-Rad, USA).

Próbki o potwierdzonej długości, widoczne w postaci pojedynczego prążka oczyszczano bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej za pomocą zestawu PCR Clean Up (Omegabiotek, D6492-02 E.Z.N.A.®) wg protokołu producenta. Ilość oczyszczonego materiału oraz jego czystość (obecność pojedynczego prążka na określonej wysokości) określano poprzez barwienie żelu agarozowego barwnikiem Gel Green, po czym przeprowadzano ocenę intensywności fluorescencji uwidocznionych prążków DNA w

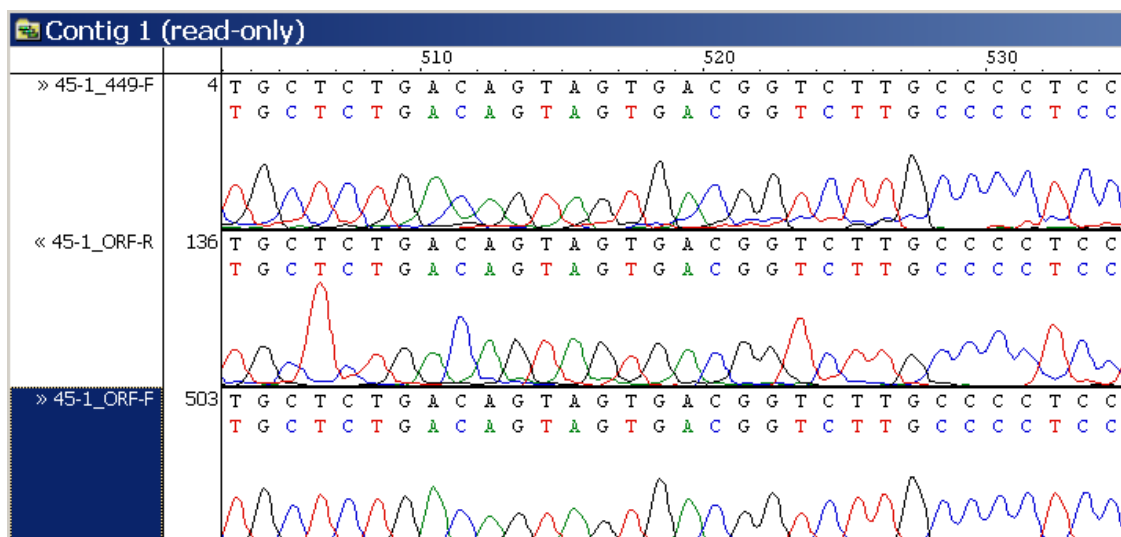
odniesieniu do wzorca wielkości DNA jako wskaźnika nie tylko wielkości fragmentów DNA ale również jego stężenia. Do laboratorium Genomed wraz z próbkami i starterami do sekwencjonowania metodą Sanger, dostarczano zdjęcia prążków, wzorca wielkości oraz próbek z odpowiednimi informacjami (Rycina. 14).



Rycina 14. Rozdział elektroforetyczny próbek DNA na żelu agarozowym (1%) z wykorzystaniem wzorca wielkości DNA (E3131-01, EURx).

Reprezentatywne zdjęcie przedstawia rozdział elektroforetyczny próbek 14-2 oraz 37-1. Na podstawie półilościowej oceny stężenia DNA w poszczególnych próbkach do sekwencjonowania zaakceptowano próbkę 37-1, natomiast dla próbki 14-2 powtórzono reakcję w celu uzyskania odpowiedniej ilości materiału, M - wzorzec wielkości

Otrzymane wyniki w postaci chromatogramów analizowano w programie *Vector NTI*. Version 1.6.0 (Invitrogen Corporation, USA) w poszukiwaniu mutacji w transkrypcie genu *TP53*. Przykładowe chromatogramy z sekwencjonowania przedstawiono na Rycinie 15.



Rycina 15. Chromatogramy próbki CMT_045_1 uzyskane w reakcji sekwencjonowania metodą Sanger.

Dla każdej próbki uzyskiwano trzy chromatogramy (po jednym dla każdego startera), które następnie składano w jeden contig i porównywano z sekwencją referencyjną NM_001389218.1 (NCBI).

Na rycinie przedstawiono chromatogramy uzyskane kolejno dla starterów (od góry): 449-F, ORF-R oraz ORF-F. W przypadku dostępności kilku chromatogramów do analizy wybierano najbardziej reprezentatywny. Dla przedstawionego fragmentu najlepszą jakość uzyskano dla chromatogramu pochodzącego ze startera ORF-F.

4.15 Ilościowa analiza transkryptów metodą qPCR

Do oceny ekspresji genów zastosowano uprzednio otrzymane cDNA (pkt.4.14), które posłużyło jako matryca w reakcji qPCR. Ilość transkryptów poszczególnych genów oznaczano metodą TaqMan, wykorzystując dostępne komercyjnie sondy dla następujących genów: *TP53*, *ESR1*, *MAPT*, *FOXA1*, *MLPH*, *SLC39A6*, *MYBL2*, *CCNE1*, *CDC20*, *CDH3*, *MDM2*.

Dla genu *PHGDH*, w przypadku którego nie była dostępna gotowa sonda komercyjna, zaprojektowano autorską sondę TaqMan oraz odpowiednie startery. wykorzystując program GenScript (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-taqman-primer-design-tool>). Jako gen referencyjny wykorzystano 18S rRNA, dla którego zastosowano dedykowaną sondę referencyjną. Szczegółowe informacje dotyczące zastosowanych sond, wraz z numerami katalogowymi zestawiono w Tabeli 14.

Reakcję qPCR przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu HS-RT-PCR (A&A Biotechnology, 2017-2000P) zgodnie z protokołem producenta. Analizy wykonano przy użyciu aparatu QuantStudio 6 Flex (Thermo Scientific, USA). Warunki przeprowadzania reakcji qPCR przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 14. Zestawienie sond TaqMan wykorzystanych w reakcji qPCR.

nr	nazwa	nr kat	Symbol	kolor
1	TP53	4331182	Cf02623148_m1	FAM-MGB
2	ESR1	4351372	Cf02741588_m1	FAM-MGB
3	MAPT	4331182	Cf02667486_m1	FAM-MGB
4	FOXA1	4351372	Cf02703138_m1	FAM-MGB
5	MLPH	4351372	Cf02625501_m1	FAM-MGB
6	SLC39A6	4351372	Cf02644701_m1	FAM-MGB
7	MYBL2	4351372	Cf02697063_m1	FAM-MGB
8	CCNE1	4351372	Cf02647505_m1	FAM-MGB
9	CDC20	4331182	Cf02648956_g1	FAM-MGB
10	CDH3	4351372	Cf02662016_m1	FAM-MGB
11	MDM2	4351372	Cf02675926_m1	FAM-MGB
12	PHGDH-CANIS2	4331348 Zaprojektowana sonda	APPR3T	FAM-MGB
	Starter forward			
	CTTCCATGAAGGACGGCAAG			
	Starter reverse			
13	ACGGTCTTCATCCCAAAGGA	4319413E	Hs99999901_s1	VIC-MGB
	Sekwencja sondy CGAGTGGCCACCTCTCTCCCA			

Tabela 15. Warunki reakcji qPCR.

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Denaturacja	95°C	15'20"	1
Denaturacja	95°C	15"	40
Przyłączenie starterów i elongacja	60°C	30"	

4.16 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism 10.0.0 wersja Windows (Dotmatics, GraphPad Software, USA).

Dystrybucję zmiennych dyskretnych, takich jak typ mutacji, typ histopatologiczny, stopień złośliwości oraz inwazyjność nowotworów, analizowano za pomocą testu chi-kwadrat (χ^2).

Dla danych liczbowych, obejmujących m.in. szybkość migracji komórek, poziomy ekspresji transkryptów oraz wartości parametrów chemiooporności, dobór metod statystycznych uzależniono od spełnienia założeń dotyczących rozkładu normalnego.

Rozkład normalny, oceniono testem Shapiro-Wilk. W przypadku danych o rozkładzie normalnym stosowano dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test post-hoc Tukeya. W sytuacjach, gdy dane nie spełniały założeń rozkładu normalnego, wykorzystywano test nieparametryczny Kruskala-Wallisa.

We wszystkich analizach statystycznych przyjęto poziom istotności $p < 0,05$ oraz przedział ufności na poziomie 95%

5 Wyniki i analiza statystyczna

5.1 Materiał pozyskany do badań

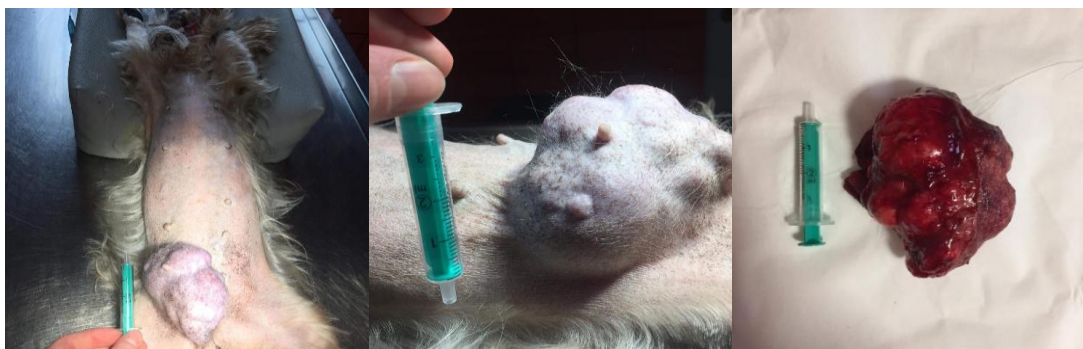
Pozyskane guzy zostały poddane badaniu histopatologicznemu, na podstawie którego określono ich typ oraz stopień złośliwości. Uzyskane informacje stanowiły podstawę do kwalifikacji materiału do dalszych analiz. Zmiany nienowotworowe, rozrosty oraz nowotwory niewywodzące się z gruczołu mlekowego, takie jak mastocytoma czy nabłoniak włosowy, wykluczono z dalszych badań.

W trakcie realizacji projektu pozyskano łącznie 80 guzów od 48 zwierząt. Materiał zbierano od 4 marca 2020 do 29 listopada 2021 roku. Część guzów, po oczyszczeniu, okazała się niewystarczająca do przeprowadzenia niezbędnych analiz, dlatego do badań histopatologicznych wybrano najbardziej reprezentatywne okazy (Ryc. 1). Ostatecznie określono typ histopatologiczny dla 60 guzów, z czego 52 guzy zakwalifikowano do dalszych analiz jako nowotwory gruczołu mlekowego, które pochodziły od 37 zwierząt. W tym, jedna suka była pacjentką dwukrotnie, dlatego zabezpieczono materiał z 2 guzów pierwotnych oraz 1 wznowy z drugiej listwy. Należy zaznaczyć, że u wspomnianej pacjentki każdy guz charakteryzował się odmiennym typem histopatologicznym.

Tabela 16 zawiera zestawienie zgromadzonego materiału badawczego oraz wyników analiz przeprowadzonych dla poszczególnych zmian nowotworowych.

Tabela 16. Liczba guzów i materiału biologicznego pobranych od psów, wykorzystanych w kolejnych etapach badań.

Rodzaj badania	Liczba próbek/ pacjentek
Analiza histopatologiczna	60 guzów
Sekwencjonowanie <i>TP53</i>	47 guzów
Analiza transkryptów metodą qPCR	52 guzów
Wyizolowane linie komórkowe	32 guzów
Całkowita liczba pacjentek w badaniu	47
Pacjentki, których materiał zakwalifikowano do badań	37



Rycina 16. Przykładowe zdjęcie z pobrania materiału biologicznego.

Guz usunięty w Klinice Bemowo dnia 4.01.2021; rak prosty cewkowo-brodawkowaty (Autor: lek. wet. Magdalena Nowak).

Priorytetem było pozyskanie materiału biologicznego do przeprowadzenia podstawowych badań histopatologicznych oraz analiz molekularnych. Badania *in vitro* stanowiły element uzupełniający, przeprowadzany wyłącznie w przypadku guzów o odpowiednio dużej masie umożliwiającej uzyskanie wystarczającej ilości materiału do wszystkich zaplanowanych procedur, w tym izolacji komórek. Średnica pozyskanych zmian nowotworowych mieściła się w przedziale od 0,5 cm do 16 cm. Każdy pozyskany guz mierzono oraz, w miarę możliwości, dokonywano dokumentacji fotograficznej. Minimalna ilość materiału umożliwiająca wykonanie pełnego zakresu analiz wynosiła 250 mg. Szczególne trudności stwarzały guzy o średnicy przekraczającej 5 cm, ze względu na wyraźną heterogenność strukturalną oraz problemy z uzyskaniem reprezentatywności próbek. W takich przypadkach osobno pobierano fragmenty z części peryferyjnej oraz centralnej (rdzeniowej) zmiany. Z uwagi na fakt, że w materiale z części centralnej częściej występowały obszary martwiczce, do dalszych analiz wykorzystywano głównie obwodowe fragmenty guza. Niewykorzystany materiał zabezpieczono w warunkach umożliwiających jego użycie w przyszłości.

W celu ograniczenia zmienności biologicznej oraz zapewnienia jednoznacznej interpretacji wyników, zdecydowano o pobieraniu jednego guza od każdego osobnika ze względu na fakt iż u suk mogą jednocześnie występować guzy o zróżnicowanym typie histopatologicznym oraz zmiany nienowotworowe, co uniemożliwia jednoznaczne określenie kolejności ich powstawania. Przykładem takiej sytuacji była suka CMT_014 od której pozyskano trzy zmiany: CMT_014_1 (rak złożony), CMT_014_2 (rak przewodowy) oraz CMT_014_3 (mioepithelioma złośliwa). W Tabeli 17 przedstawiono zestawienie liczby uzyskanych guzów z podziałem na typ histopatologiczny oraz ich kwalifikację do dalszych analiz.

Tabela 17. Zestawienie typów histopatologicznych pobranych guzów oraz ich kwalifikację do dalszych analiz.

Typ histopatologiczny	Liczba guzów	Kwalifikacja do dalszych badań
Rak	46	TAK
Guz mieszany	1	TAK
Gruzołak	2	TAK
Mioepitelioma	3	TAK
Mastocytoma	2	NIE
Nabłoniak włosowy	1	NIE
Rozrost	5	NIE
Suma	60	52

Istotnym spostrzeżeniem wynikającym z przeprowadzonych analiz histopatologicznych, było stwierdzenie, że obecność zmian w obrębie listwy mlecznej nie jest równoznaczna z obecnością nowotworu. Jednocześnie nie każda zmiana nowotworowa wykazywała związek z gruczołem mlecznym. Zmiany takie jak mastocytoma, nabłoniak włosowy, czy nienowotworowe rozrosty stanowiły około 13% wszystkich przypadków:-

Spośród guzów zakwalifikowanych do dalszych analiz, dominującą grupę stanowiły raki (łac.: *Carcinoma*). Szczegółowy podział na typy histopatologiczne wraz z liczbą przypadków przedstawiono w Tabeli 18. Większość stanowiły guzy o I stopniu złośliwości (n = 27), następnie II stopnia (n = 12) oraz III stopnia (n = 9).

Tabela 18. Typy histopatologiczne zebranych guzów gruczołu mlekowego suk.

Nazwa polska	Nazwa łacińska	Liczba guzów
Rak prosty	<i>Carcinoma simplex</i>	17
Rak złożony	<i>Carcinoma complexum</i>	9
Rak w guzie mieszanym	<i>Carcinoma mixtum</i>	8
Rak lity	<i>Carcinoma solidum</i>	6

5.1.1 Dane kliniczne dotyczące występowania nowotworów gruczołu mlekowego u suk w populacji warszawskiej

Zebrane dane kliniczne od pacjentek warszawskich klinik weterynaryjnych, wykazały, że do rozwoju choroby dochodzi w wieku 5-9 lat dla ras dużych (6/9 guzów dużych psów) oraz 10-15 lat dla ras małych (22/28 guzów małych psów).

Materiał do badań pobrano od suk należących do różnych ras. Najliczniejszą grupę stanowiły mieszance, jednak z uwagi na ich wewnętrzne zróżnicowanie, grupa ta nie została potraktowana jako jednorodna kategoria analityczna. Drugą pod względem liczebności grupę stanowiły suki rasy yorkshire terrier. Pozostałe rasy, od których pozyskano materiał do badań, obejmowały: jamniki, beagle, cane corso, chihuahua, buldoga francuskiego, gończego polskiego, doga niemieckiego, husky, labradora, mopsa, owczarka niemieckiego, pinczera miniaturowego, polskiego owczarka nizinnego, shih - tzu, spaniela myśliwskiego polskiego oraz sznauclera olbrzymiego. Wiek suk, od których pobrano materiał do badań, mieścił się w przedziale od 5 do 15 lat.

W dniu 24.07.2022 podjęto próbę uzyskania informacji o dalszych losach klinicznych pacjentek, od których pobrano guzy. Spośród 37 suk objętych badaniem, od 27 uzyskano dane kliniczne, z czego: 19 suk przeżyło ponad 6 miesięcy od wykonanej mastektomii bez wznowy, 3 suki wykazały nawrót choroby, jedna suka została uśpiona z powodu przerzutów a 3 padły z przyczyn niezwiązanych z rakiem gruczołu mlekowego.

W kilku przypadkach zaobserwowano rozwój nowotworów w późniejszym okresie. U dwóch suk stwierdzono guzy nadnercza, natomiast u pozostałych zidentyfikowano mastocytomę oraz łagodny guz śledziony.

Brak wznowy nowotworowej w okresie jednego roku od operacji stwierdzono u 11 pacjentek.

Znakomita większość suk, od których pobrano materiał do badań, nie została wcześniej poddana sterylizacji (29/36). Odnotowano jedynie pojedyncze przypadki nowotworów u suk sterylizowanych (7/36), dla jednej suki nie pozyskano danych o sterylizacji. W części przypadków nie uzyskano informacji klinicznych, ponieważ właściciele przestali się zgłaszać na wizyty kontrolne w klinikach, w których przeprowadzono operacje. Nie było możliwe ustalenie, czy przyczyną było padnięcie zwierzęcia, czy zmiana placówki weterynaryjnej i lekarza prowadzącego.

5.1.2 Opis wykrytych mutacji w genie *TP53*

Wynik sekwencjonowania uzyskano dla 47 guzów. W przypadku 5 próbek guzów nie otrzymano dostatecznej ilości produktu w reakcji PCR, aby możliwe było przeprowadzenie sekwencjonowania. Dlatego, z wyprowadzonych dla tych próbek linii komórkowych wykonano dodatkowe izolacje RNA, przeprowadzono reakcję syntezy cDNA (metoda RT – PCR), a następnie wykonano reakcję PCR. Dzięki temu udało się wykonać sekwencjonowanie dla próbek z guzów: CMT_014_2, CMT_016_1, CMT_020_1, CMT_036_1, CMT_037_1.

Mutacje w genie *TP53* wykryto w 7 spośród 47 zsekwencjonowanych próbek co stanowi około 15% analizowanego materiału. Analiza statystyczna wykonana metodą chi-kwadrat wykazała, istotną korelację pomiędzy obecnością mutacji a typem histopatologicznym guza (Tabela 19, $p=0,0121$) oraz stopniem złośliwości nowotworu (Tabela 20, $p=0,0015$).

Tabela 19. Zestawienie typów histopatologicznych zebranych guzów w zależności od statusu TP53.

Typ histopatologiczny	Status <i>TP53</i>	
	<i>WTp53</i>	<i>MUTp53</i>
Rak złożony	9	0
Rak prosty	15	2
Rak w guzie mieszanym	8	0
Rak lity	3	3
Mioepitelioma złośliwa	2	1
Rak mikrobrodawkowaty inwazyjny o cechach raka zapalnego	0	1

MUTp53-obecna mutacja, WTp53- typ dziki

Tabela 20. Zestawienie guzów pod względem stopnia złośliwości w zależności od statusu TP53.

Stopień złośliwości	Status <i>TP53</i>	
	<i>WTp53</i>	<i>MUTp53</i>
III	3	4
II	11	0
I	22	2

MUTp53-obecna mutacja, WTp53- typ dziki

Każda z wykrytych mutacji należała do innego typu zmian genetycznych, co wymagało zastosowania zróżnicowanej metodyki ich dalszej analizy. Zidentyfikowano zarówno mutacje missens, jak i delecje trzech kolejnych nukleotydów skutkujące utratą całego aminokwasu, a także insercje pojedynczych nukleotydów prowadzące do przesunięcia ramki odczytu i w konsekwencji do całkowitej zmiany sekwencji białka. Powstałe w ten sposób białko może charakteryzować się całkowicie odmienną sekwencją i właściwościami. W związku z powyższym w dalszych analizach zdecydowano się na podział mutacji ze względu na ich typ, co umożliwiło przeprowadzenie bardziej miarodajnej interpretacji wyników (Tabela 21).

Tabela 21. Charakterystyka wykrytych mutacji w genie TP53.

Nazwa guza	Typ mutacji	Zmiana	Typ histopatologiczny	Stopień złośliwości
CMT_005_1	Insercja	Zmieniona ramka odczytu	Rak prosty cewkowo-brodawkowaty	I
CMT_009_1	Zmiana sensu	Y222S	Rak mikrobrodawkowaty inwazyjny o cechach raka zapalnego	III
CMT_015_1*	Zmiana sensu	T241P, R261C	Mioepitelioma złośliwa	
CMT_016_1*	Insercja	Zmieniona ramka odczytu	Rak prosty cewkowo-brodawkowaty	I
CMT_020_1*	Delecja	N118del	Rak lity	III
CMT_020_2*	Delecja	N118del	Rak lity	III
CMT_046_1*	Insercja	Zmieniona ramka odczytu	Rak lity	III

* guzy dla których wyprowadzono linie komórkowe

Fragmenty chromatogramów z zaznaczonymi miejscami mutacji oraz chromatogramem referencyjnym bez mutacji, przedstawiono w Tabeli 22.

Dwa guzy wykazały obecność kilku mutacji. W przypadku próbki CMT_005_1 chromatogram zawierał dwa nakładające się piki odpowiadające adeninie i cytozynie (A i C, 175 nt) przed guaniną. Stąd opisano insercje i zmienioną ramkę odczytu.

W próbce CMT_009_1 zidentyfikowano pojedynczą mutację, gdzie w 665 nukleotydzie występują dwa piki dla adeniny i cytozyny (A i C). W tej próbce mogą występować 2 allele, z czego w jednym wystąpiła mutacja, w wyniku której w sekwencji aminokwasowej tyrozyna została zastąpiona seryną (Y222S). Próbką CMT_015_1 zawierała 2 mutacje (721 nt A→C), w wyniku których doszło do substytucji aminokwasowej treoniny na prolinę (T241P) oraz (781 nt A→C) argininy na cysteinę

(R261C). Próbkę CMT_020_1 oraz CMT_020_2 pochodzących od tej samej suki charakteryzowały się taką samą mutacją. Delecja trzech nukleotydów (351 nt, 352 nt, 353 nt), w tym przypadku adeniny, adeniny i cytozyny (kodon kwasu asparaginowego; AAC) N118del skutkowałą usunięciem kwasu asparaginowego z sekwencji aminokwasowej białka. W przypadku pierwszego guza do sekwencjonowania wykorzystano materiał komórkowy, w drugim tkankowy. Próbkę CMT_005_1 (174 - 175 nt) CMT_016_1 (54 – 55 nt) oraz CMT_046_1 (1110 – 1111 nt) charakteryzowały się insercjami, prowadzącymi do całkowitej zmiany ramki odczytu, a tym samym do pełnej zmiany sekwencji aminokwasowej p53.

Tabela 22. Chromatogramy z zaznaczonymi miejscami mutacji.

Guz	MUTp53	WTp53
CMT_005_1 Dwa piki dla A i C-insercja (174-175 nt)		
CMT_009_1 Dwa piki dla A i C (665 nt)		
CMT_015_1 Dwa piki dla A i C (721 nt)		
CMT_015_1 Dwa piki dla C i T (781 nt)		
CMT_016_1 Insercja T (54-55 nt)*		
CMT_020_1 Delecja CAA (351, 352, 353 nt)		
CMT_020_2 Delecja CAA (351, 352, 353 nt)		
CMT_046_1 Insercja A (1110 a 1111 nt)		

Chromatogramy odczytano za pomocą programu *Vector NTI*; *potencjalna insercja T

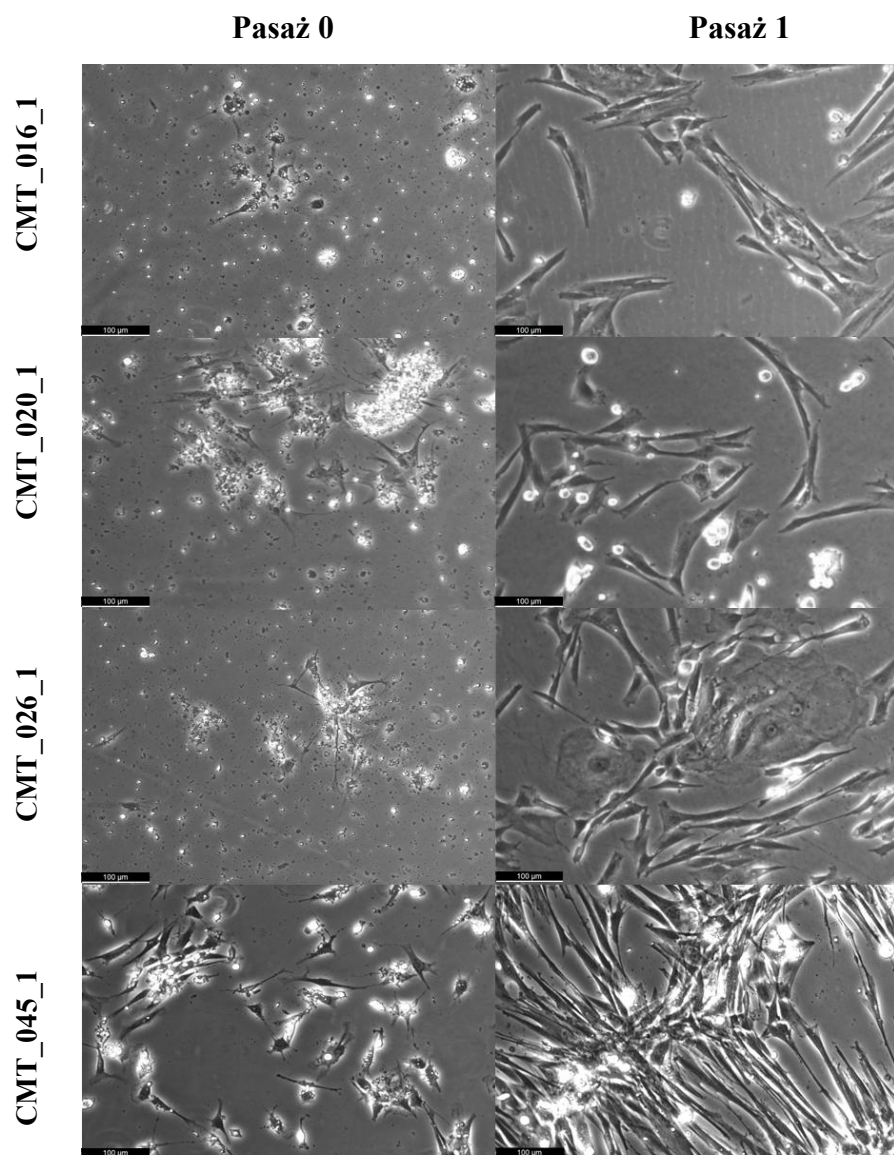
5.2 Linie komórkowe wyprowadzone z pozyskanych w ramach pracy guzów nowotworowych gruczołu mlekowego suk

W ramach pracy doktorskiej wyizolowano 32 populacje komórek z guzów gruczołu mlekowego suk. Otrzymane linie wykorzystano do przeprowadzenia analiz migracji, inwazyjności, klonogeniczności i chemiooporności w modelach 2D i 3D. Wszystkie analizy wykonywano na jak najniższych pasażach (2 lub 3), aby jak najwierniej odwzorować właściwości komórek guza pierwotnego (pkt. 4.4).

Każdą otrzymaną populację opisano pod względem liczby uzyskanych komórek w odniesieniu do masy guza oraz szybkości proliferacji na wczesnych pasażach. Wykonano również dokumentację fotograficzną wyprowadzonych linii w celu scharakteryzowania morfologii komórek. Przykładowe obrazy zaprezentowano na Rycinie 17. Dokumentację fotograficzną wykonywano na pasażu 0 (dzień po izolacji) oraz na kolejnych pasażach, aby uwidocznić ewentualne zmiany zachodzące w morfologii komórek w czasie trwania hodowli. Dzień po izolacji były widoczne zazwyczaj nieliczne kolonie, które w ciągu dwóch kolejnych dni zaczynały się intensywnie namnażać. Na późniejszych pasażach większość wyizolowanych komórek wykazywała morfologię typową dla komórek mezenchymalnych (kształt wrzecionowaty lub fibroblastoidalny, płaski z wypustkami, o wielkości $\sim 200\ \mu\text{m}$). Miejscami obserwowano obecność kilku subpopulacji komórek, z których w wyniku dłuższej hodowli jedna z nich zaczynała dominować. Zjawisko to było szczególnie widoczne dla populacji wywodzącej się z guza CMT_020_1.

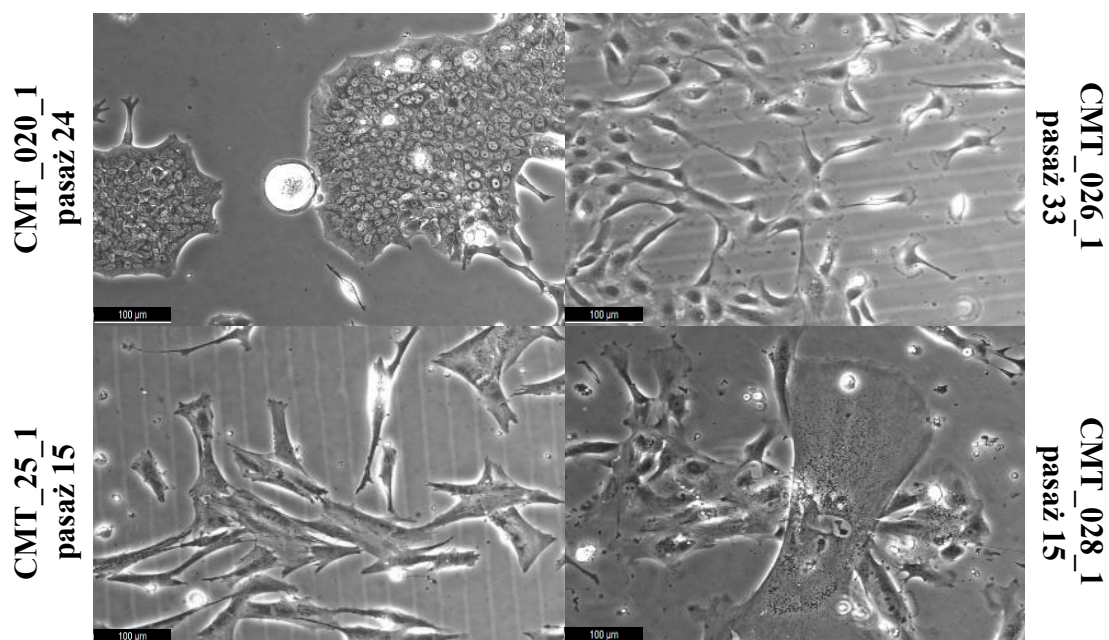
Opracowanie i optymalizacja protokołów do oceny migracji, inwazyjności, klonogeniczności oraz chemiooporności wymagała utrzymywania wybranych populacji w długotrwałej hodowli. Do dalszych badań wybrano komórki pochodzące z guzów CMT_020_1, CMT_025_1, CMT_026_1 i CMT_028_1. Wyboru dokonano ze względu na dużą liczbę uzyskanych komórek umożliwiającą zbankowanie materiału na niskim pasażu i zapewnienie ciągłości hodowli, co umożliwiało ich wykorzystanie w późniejszych badaniach. Komórki tych linii cechowały się wysoką aktywnością proliferacyjną i stabilnością wzrostu w czasie. Morfologię czterech wybranych linii komórkowych na późnym pasażu przedstawiono na Rycinie 18. Komórki z populacji CMT_020_1 oraz CMT_026_1 charakteryzowały się najszybszym tempem wzrostu, a ich morfologia ulegała wyraźnym zmianom w miarę upływu czasu. Porównanie obrazów wczesnego pasażu (Ryc. 17) z obrazami późnego pasażu (Ryc. 18) wskazuje na

zauważalną transformację kształtu i organizacji komórek. W późniejszych pasażach obserwowano zwiększoną nieregularność kształtu, wydłużenie komórek oraz zmiany w rozmieszczeniu hodowli, co może świadczyć o zmianach w adhezji międzykomórkowej i rosnącej heterogenności populacji. Podczas, gdy linie CMT_020_1 oraz CMT_026_1 w miarę wzrostu liczby pasaży, wykazywały coraz większą homogenność, tak CMT_025_1 oraz CMT_028_1 zachowywały heterogenność.



Rycina 17. Mikroskopowy obraz morfologii komórek wyizolowanych z guzów CMT.

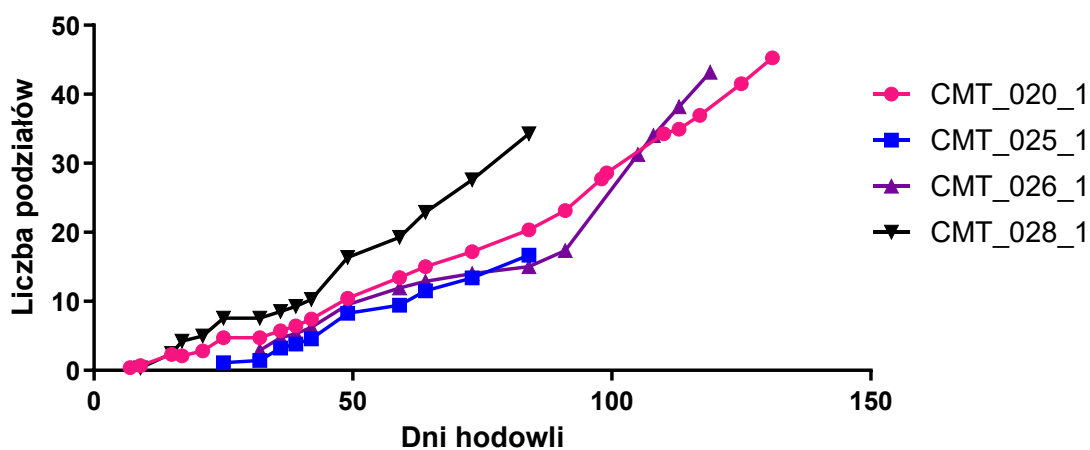
Zdjęcia wykonano mikroskopem Leica DM IL LED, kontrast fazowy, powiększenie 200X, skala-100 µm



Rycina 18. Mikroskopowy obraz morfologii komórek czterech wybranych linii CMT po 90 dniach ciągłej hodowli.

Zdjęcia wykonano mikroskopem Leica DM IL LED, kontrast fazowy, powiększenie 200X, skala-100 µm

Rycina 19 przedstawia tempo wzrostu poszczególnych linii, natomiast Tabela 23 zawiera zestawienie liczby podziałów komórkowych, pasaży oraz czasu hodowli wybranych linii.



Rycina 19. Długoterminowa obserwacja wzrostu komórek CMT.

Wykres przedstawia zależność liczby podziałów komórkowych od czasu hodowli dla wybranych linii: CMT_020_1, CMT_025_1, CMT_026_1 oraz CMT_028_1

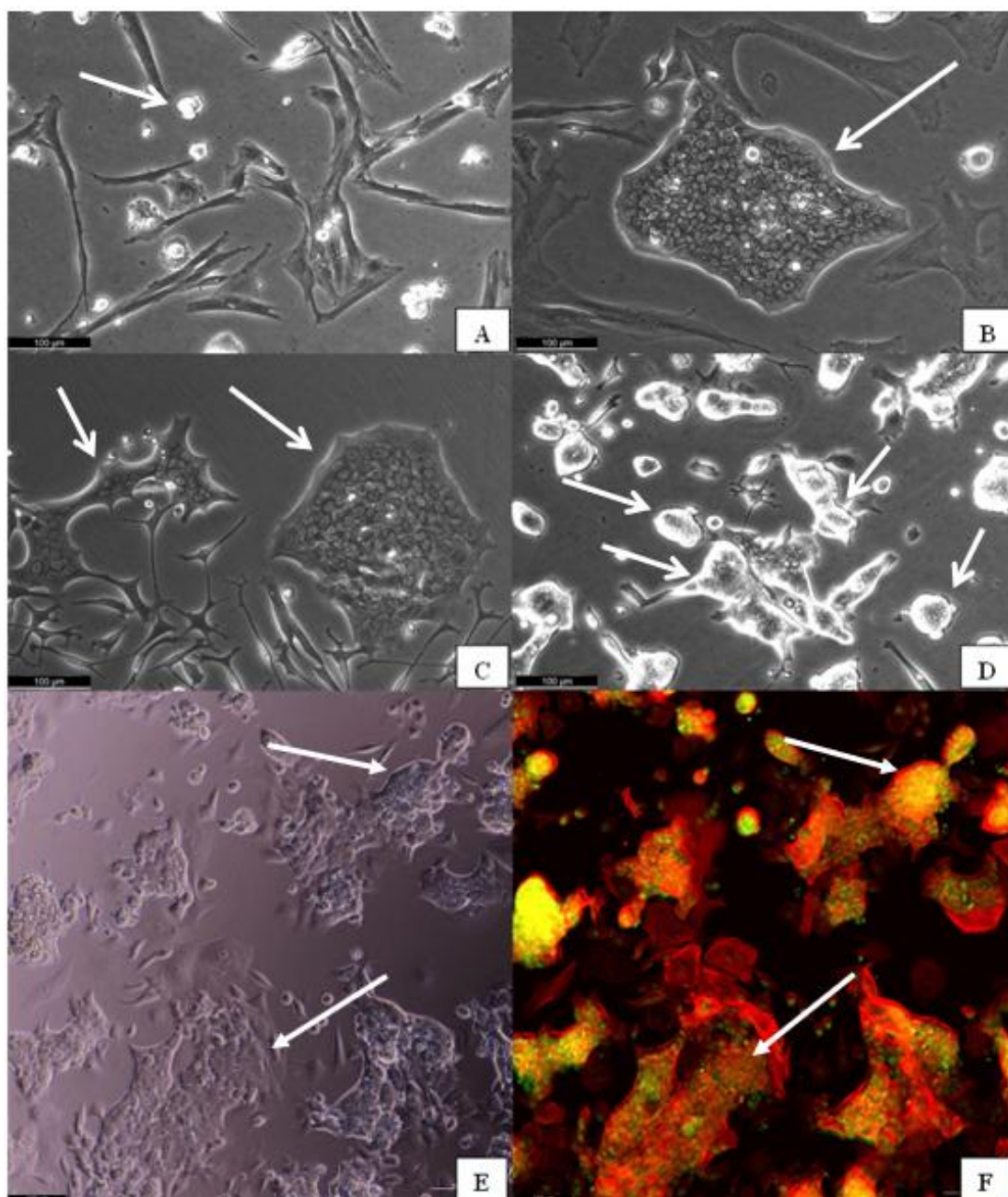
Tabela 23. Liczba podziałów komórkowych oraz końcowy pasaż monitorowane w trakcie prowadzenia hodowli.

Guz	Dni w hodowli	Ilość uzyskanych podziałów	Końcowy pasaż
CMT_020_1	131	45,3	24
CMT_025_1	98	21,0	15
CMT_026_1	119	43,2	33
CMT_028_1	93	22,1	15

W populacji komórek CMT_020_1 po 5 pasażu zaobserwowano pojawienie się subpopulacji komórek o morfologii przypominającej komórki epitelialne (małe, okrągłe, zdolne do wzrostu w zawieszynie). Komórki te wykazywały tendencję do tworzenia agregatów i wspólnej migracji, zachowując jednocześnie zdolność do wzrostu zarówno w postaci adherentnej, jak i zawieszinowej.

Proces migracji udokumentowano wykonując serię zdjęć w świetle przechodzącym w odstępach co 30 min ciągu 24 godzin (mikroskop OLYMPUS IX73, powiększenie 100X, materiały wideo dostępne pod adresami: <https://youtu.be/EapGkiJCALg> i <https://youtu.be/JzP6zki5RpY>. Dodatkowo badania uzupełniono o mikrofotografie komórek wybarwionych barwnikami fluorescencyjnymi, co umożliwiło dokładniejszą wizualizację ich struktury (Ryc. 20).

Dla porównania, w celu oceny odmienności morfologicznej linii CMT_020_1, wykonano analogiczne barwienia komórek linii CMT_024_2, która prezentowała strukturę komórek o typie mezenchymalnym (Ryc. 21).

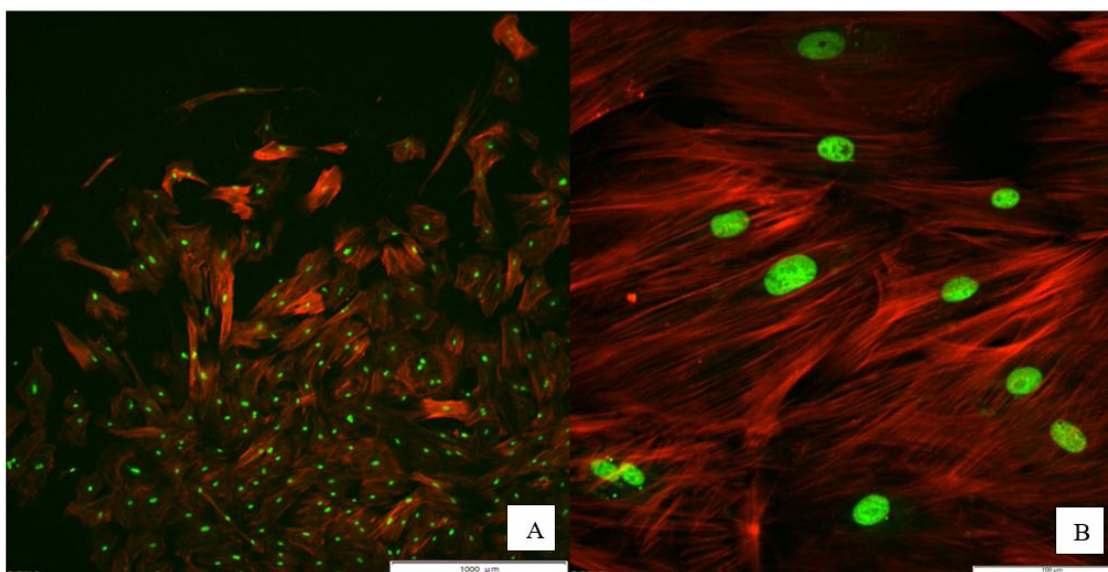


Rycina 20. Reprezentatywne zdjęcia komórek linii CMT_020_1 po 33. pasażu.

Panele A–D: mikrofotografie wykonane w kontraście fazowym przy użyciu mikroskopu Leica, powiększenie 200×; strzałkami zaznaczono widoczną tendencję komórek do tworzenia agregatów.

Panel E: mikrofotografia wykonana w świetle przechodzącym, powiększenie 40X mikroskop Nikon ECLIPSE Ti2; przedstawia to samo pole widzenia, co panel F.

Panel F: obraz we fluorescencji, powiększenie 40X, mikroskopu Nikon ECLIPSE Ti2. Zielona fluorescencja (barwnik Gel Green) – jądra komórkowe; czerwona fluorescencja (barwnik ActinRed) – cytoszkielet komórek. Skala-100 µm



Rycina 21. Reprezentatywna mikrofotografia fluorescencyjna komórek CMT_024_2.

A. powiększenie 40× (skala 1000 µm), **B.** powiększenie 320× (skala 100 µm). Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus.

Zielona fluorescencja (barwnik Gel Green) – jądra komórkowe; czerwona fluorescencja (barwnik ActinRed) – cytoszkielet komórek.

Wszystkie 32 linie komórkowe zostały zabezpieczone w kriobanku i przechowywane są w ciekłym azocie. W Załączniku 1 przedstawiono szczegółową charakterystykę każdej z linii obejmującą: typ histopatologiczny, stopień złośliwości, wielkość guza, obecność mutacji oraz parametry inwazyjności i migracji.

5.2.1 Ocena inwazyjności

Analizę zdolności sferoidów komórkowych do inwazji przeprowadzono w oparciu o serię zdjęć wykonanych w świetle przechodzącym oraz ich projekcję w osi Z (ang. *Z-projection*), umożliwiającą ocenę, w trójwymiarze, zachowanie komórek w macierzy. Badania inwazyjności stanowiły istotny element charakterystyki uzyskanych linii komórkowych, gdyż odzwierciedlają one zdolność komórek nowotworowych do przerzutowania i infiltracji otaczających tkanek, czyli kluczowy etap progresji raka.

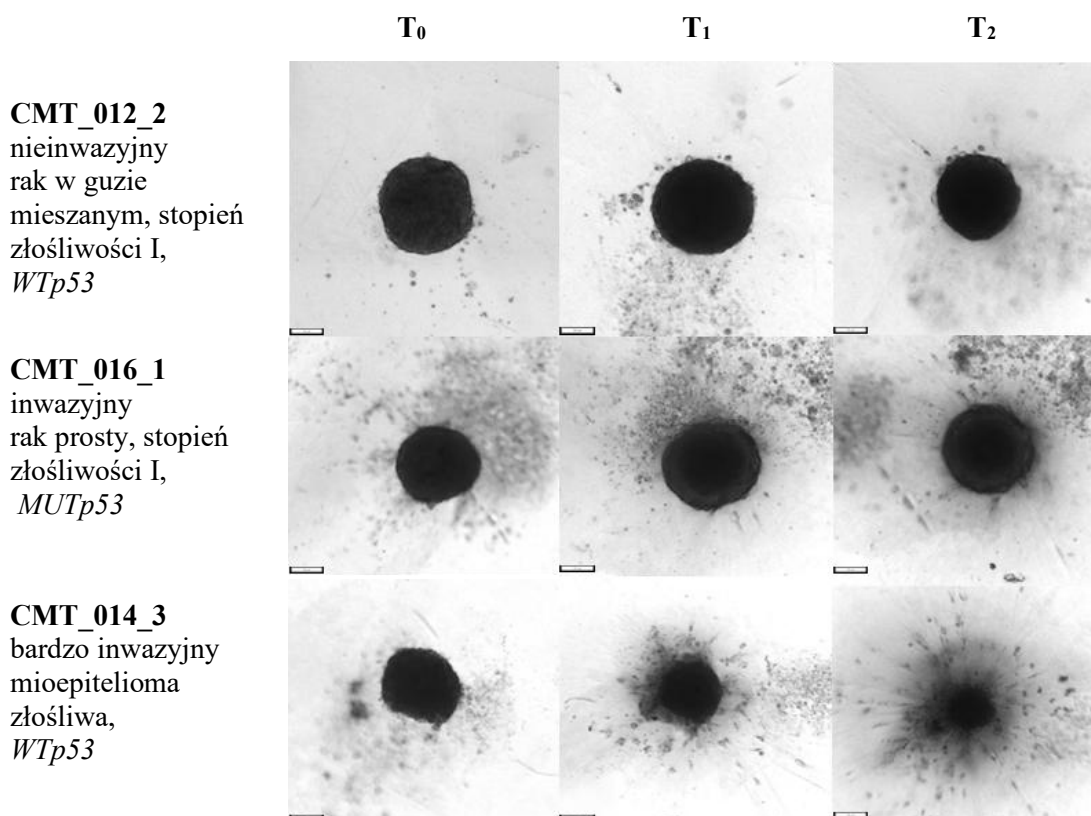
Uzyskane obrazy pozwoliły na jakościową klasyfikację poszczególnych sferoidów, a tym samym guzów z których wywodził się materiał komórkowy, do trzech kategorii: bardzo inwazyjne, inwazyjne oraz nieinwazyjne. Przykładowe sferoidy reprezentujące każdą z kategorii przedstawiono na Rycinie 22.

Brak inwazyjności stwierdzono w przypadku 10 sferoidów uformowanych z komórek wyizolowanych z różnych guzów. W tej grupie znajdowało się 5 raków

złożonych, 2 raki proste, 1 rak mieszany, 1 adenoma złożona, 1 guz złożony. W tym 4 zmiany miały II stopień złośliwości, 4 - I stopień, a 2 nie miały określonego stopnia. W grupie sferoidów nieinwazyjnych nie zidentyfikowano żadnego przypadku z mutacją w genie *TP53*.

Grupę sferoidów inwazyjnych stanowiło 13 próbek, w tym 3 z mutacją w genie *TP53*. Wśród nich znalazło się 5 guzów o typie histopatologicznym raka prostego, 3 raki mieszane, 2 raki lite, mioepitelioma złośliwa, adenoma oraz 1 rak wewnątrzprzewodowy. Z tej grupy 8 zmian miało I stopień złośliwości, 2 zmiany II stopień, 1 zmiana III stopień i 2 zmiany nie miały określonego stopnia złośliwości.

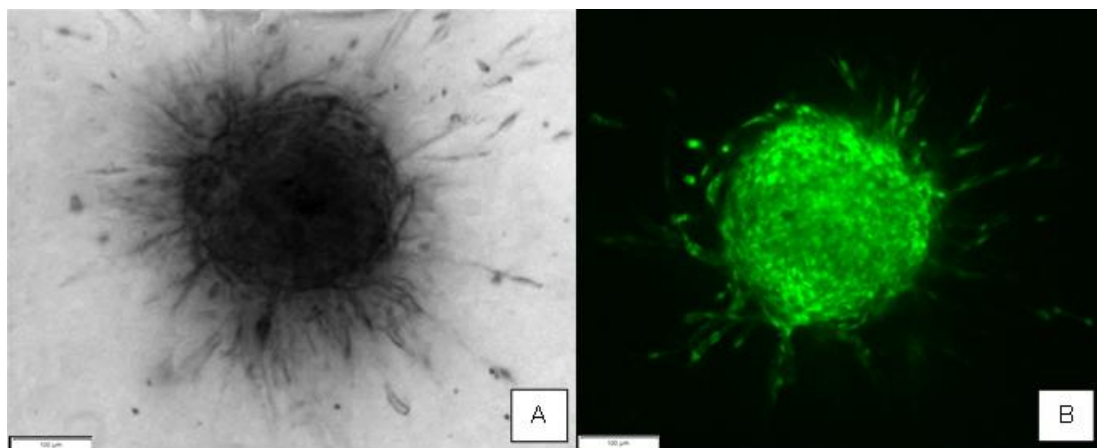
Do kategorii bardzo inwazyjnych zakwalifikowano 10 sferoidów, spośród których 2 wykazywały mutację w genie *TP53*. Pod względem histopatologicznym grupa ta obejmowała 3 raki lite, 1 rak przewodowy, 3 mioepiteliomy złośliwe, 2 raki proste oraz 1 rak/mioepitelioma. W tej grupie stwierdzono przewagę guzów o III stopniu złośliwości (n=4), poza tym odnotowano po 2 guzy II stopnia i I stopnia oraz 2 guzy bez określonego stopnia złośliwości.



Rycina 22. Zestawienie sferoidów z komórek wyizolowanych z guzów o różnym stopniu inwazyjności.

Skala - 100 μ m; wielkość sfer - około 300 μ m w T₀.

Zestawienie zdjęć tego samego bardzo inwazyjnego sferoidu w świetle przechodzącym oraz fluorescencji przedstawiono na Rycinie 23, natomiast przykłady inwazyjnych sferoidów CMT_020-1 i CMT_026_1 przedstawiono na Rycinie 24.

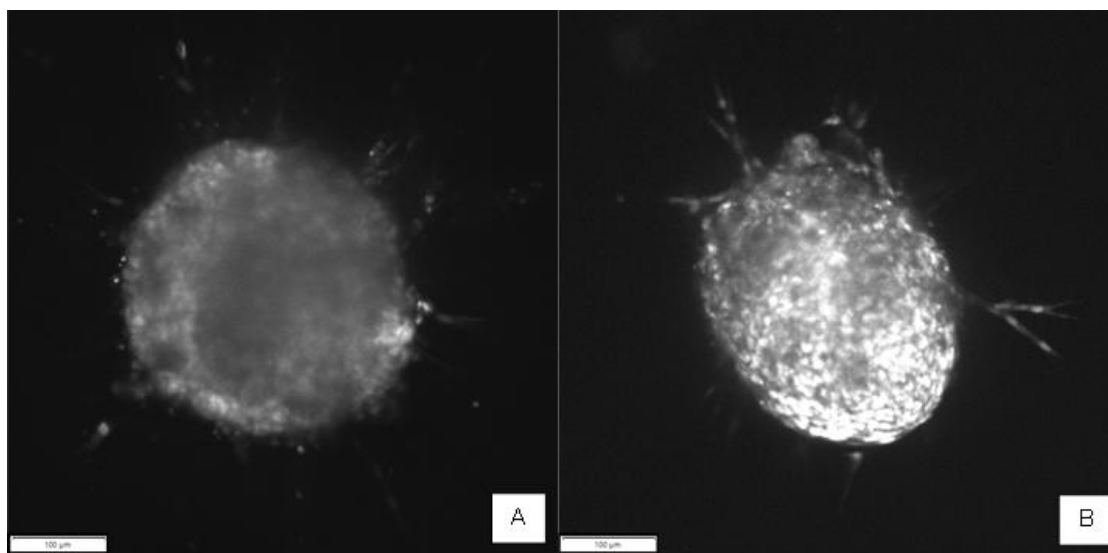


Rycina 23. Sferoid z komórek CMT_045_1, zakwalifikowany jako guz bardzo inwazyjny.

Mioepitelioma złośliwa, II stopień, *WTp53*.

A. zdjęcie wykonane Cytation 5, światło przechodzące, rzut w osi Z, powiększenie 100X, **B.**- zdjęcie we fluorescencji wykonane mikroskopem OLYMPUS, powiększenie 100X, skala – 100 µm.

Zielona fluorescencja (barwnik Gel Green) – jądra komórkowe.



Rycina 24. Przykład sferoidów inwazyjnych z widocznymi komórkami migrującymi.

A. sferoid z komórek CMT_20_1; **B.** sferoid z komórek CMT_026_1.

Zdjęcie wykonane mikroskopem OLYMPUS, powiększenie 100X, skala - 100 µm.

Widoczny sygnał fluorescencji (barwnik Gel Green) – jądra komórkowe.

W kolejnym etapie oceniano zależność pomiędzy cechami inwazyjności a trzema parametrami: typem histopatologicznym, stopniem złośliwości oraz obecnością mutacji w genie *TP53*. Ze względu na ograniczoną liczbę próbek, do analizy statystycznej połączono kategorie sferoidów „inwazyjne” i „bardzo inwazyjne” w jedną grupę sferoidów „inwazyjnych”. Analiza przy zastosowaniu testu chi-kwadrat wykazała istotną korelację ($p=0,005$) pomiędzy zdolnością komórek do inwazji a typem histopatologicznym (Tab. 24 oraz Ryc. 25), czego nie potwierdzono dla zależności pomiędzy inwazyjnością a stopniem złośliwości (Tab. 25).

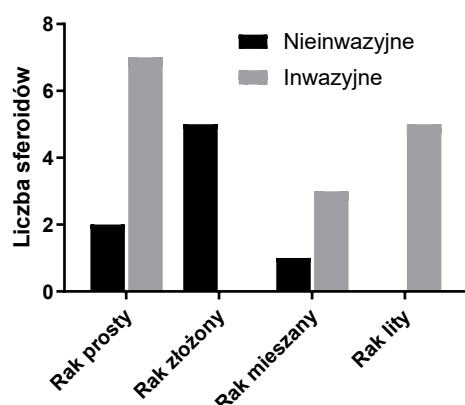


Tabela 24. Inwazyjność sferoidów a typ histopatologiczny.

Typ histopatologiczny	Nieinwazyjne	Inwazyjne
Rak prosty	2	7
Rak złożony	5	0
Rak mieszany	1	3
Rak lity	0	5

Rycina 25. Graficzne przedstawienie liczby sferoidów inwazyjnych i nieinwazyjnych w zależności od typu histopatologicznego.

Tabela 25. Zależność zdolności do inwazji od stopnia złośliwości.

Stopień złośliwości	Nieinwazyjne	Inwazyjne
I	4	10
II	4	4
III	0	5

W ocenie zdolności do inwazji, w zależności od statusu genu *TP53* nie uzyskano istotności statystycznej (Tab. 26). Należy jednakże zaznaczyć, że wszystkie sferoidy utworzone z komórek wywodzących się z guzów obciążonych mutacją *TP53* wykazywały cechy inwazyjności, co może sugerować potencjalny wpływ tego genu na zdolność komórek do inwazji.

Tabela 26. Status TP53 a zdolność do inwazji.

Status TP53	Nieinwazyjne	Inwazyjne
WTp53	8	16
MUTp53	0	5

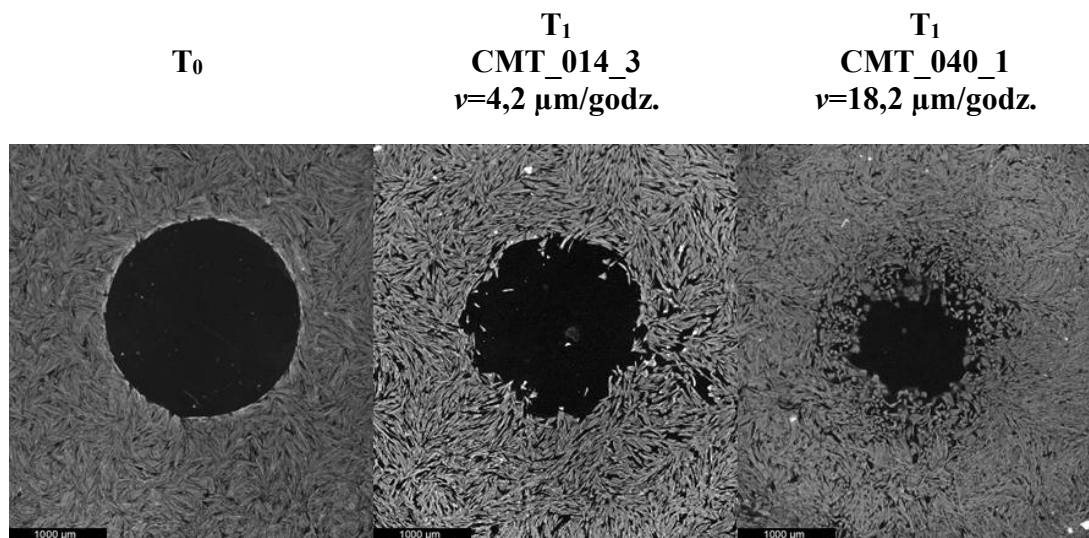
MUTp53-obecna mutacja, WTP53- typ dziki

5.2.2 Ocena migracji

Analiza zdolności migracyjnych komórek nowotworowych, oparta na pomiarze szybkości przemieszczania się komórek w hodowli 2D, umożliwiła porównanie ich potencjału ruchowego z wynikami testów oceniających właściwości inwazyjne.

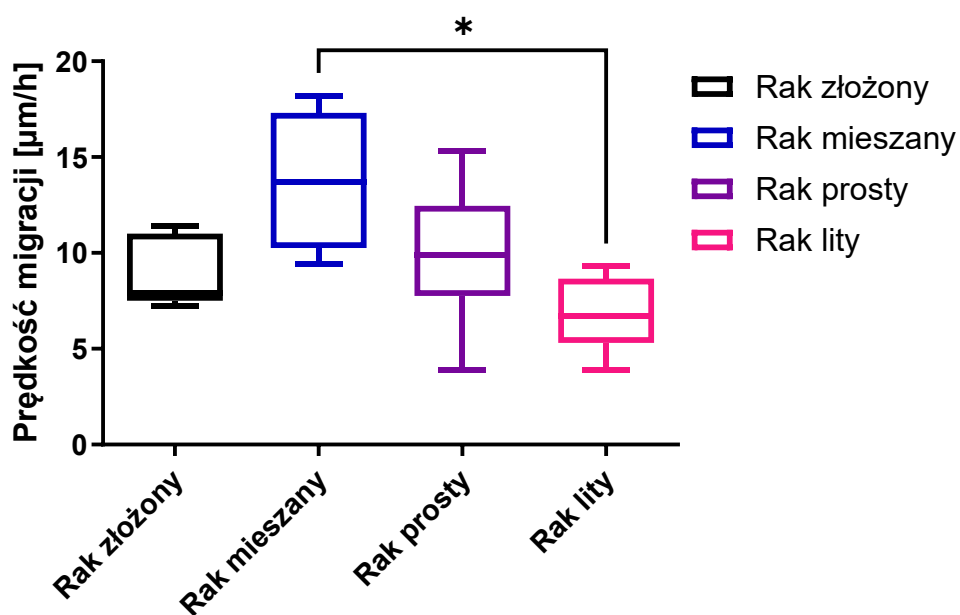
Ze względu na prędkość migracji, komórki nowotworowe podzielono na 3 grupy: grupa 1 obejmowała komórki migrujące z prędkością 0–7,7 $\mu\text{m/h}$, grupa 2: 7,8–10,6 $\mu\text{m/h}$ i grupa 3: 10,9–23 $\mu\text{m/h}$. Uzyskane wartości skorelowano z wynikami testu inwazyjności, jednak nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy prędkością migracji a zdolnością inwazyjną. Co ciekawe, zaobserwowano, że linie komórkowe o wysokim potencjale inwazyjnym nie zawsze charakteryzowały się największą szybkością migracji w hodowli 2D, tak jak komórki o dużej prędkości przemieszczania się tworzyły sferoidy o nieinwazyjnym fenotypie.

Przeprowadzono również analizę prędkości migracji w zależności od typu histopatologicznego. Istotną różnicę obserwowano pomiędzy komórkami wyizolowanymi z guzów raka mieszanego a raka litego ($p=0,0378$). Komórki wyizolowane z guza raka mieszanego migrowały najszybciej spośród badanych typów, natomiast najwolniejszy ruch obserwowano w przypadku komórek wyizolowanych z raka litego. Powyższą analizę wykonano przy zastosowaniu testu nieparametrycznego wielokrotnych porównań Kruskala - Wallisa (odpowiednik jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA)). Dla pozostałych badanych parametrów nie stwierdzono zależności istotnych statystycznie. Obecność lub brak mutacji w genie *TP53* również nie miała wpływu na prędkość migracji komórek. Wyniki analizy prędkości migracji w zależności od typu histopatologicznego przedstawiono na Rycinie 27.



Rycina 26. Reprezentatywny obraz mikroskopowy komórek linii CMT_014_3 oraz CMT_040_1 z testu migracji.

Zdjęcia wykonano po utrwaleniu i wybarwieniu komórek barwnikiem Actin Green. Powiększenie 40X, zdjęcia wykonano wykorzystując urządzenie obrazujące Cytation 5, skala- 1000 μm



Rycina 27. Porównanie średniej prędkości migracji komórek nowotworowych o różnym typie histopatologicznym.

Analizę statystyczną wykonano przy zastosowaniu testu nieparametrycznego wielokrotnych porównań Kruskala-Wallisa. Prędkość migracji obliczono w $\mu\text{m/godz.}$ * - istotność statystyczna dla $p < 0,05$.

5.2.3 Ocena chemiooporności komórek w modelu 2D

Analizę chemiooporności przeprowadzano w celu określenia różnic w odpowiedzi komórek nowotworowych na działanie wybranych chemioterapeutyków o odmiennych mechanizmach działania, a badane parametry obejmowały obecność i rodzaj mutacji w genie *TP53*, typ histopatologiczny guza oraz jego stopień złośliwości.

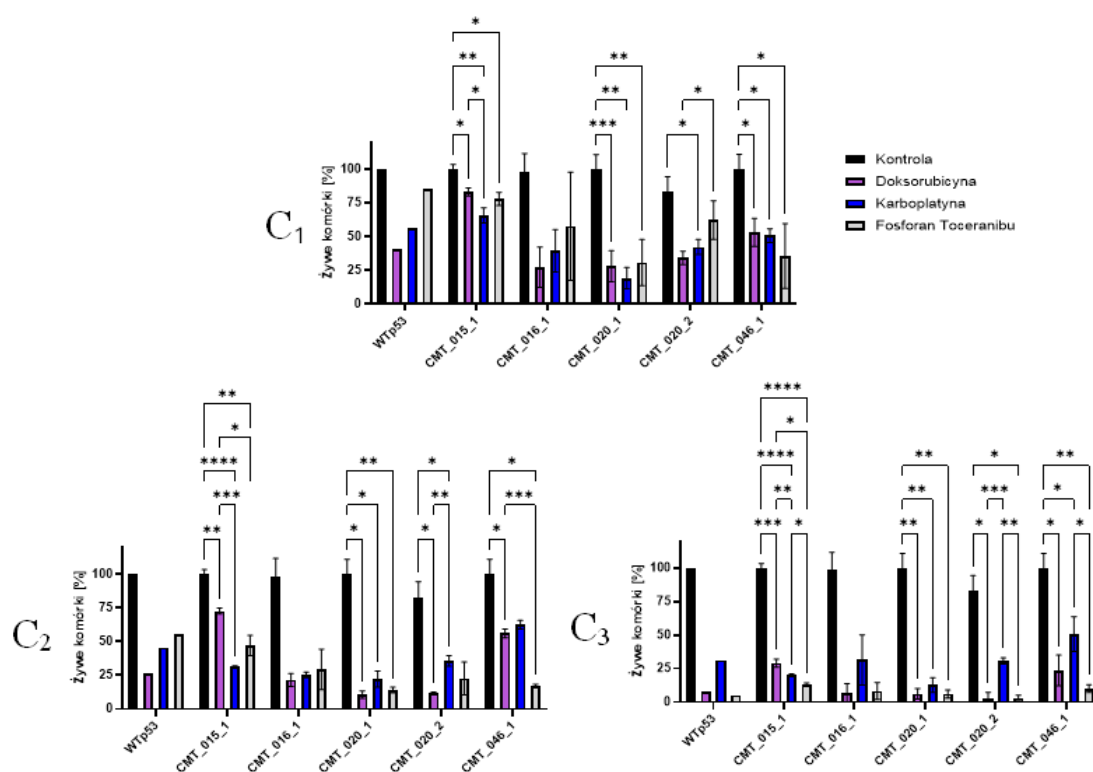
Przetestowane chemioterapeutyki (doksorubicyna, karboplatyna i fosforan toceranibu) wykazały zróżnicowaną skuteczność w zależności od badanej linii komórkowej. Po przeprowadzeniu analizy całej badanej grupy nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy stopniem lub typem histopatologicznym guza, statusem genu *TP53* a opornością komórek na chemioterapeutyki. Ze względu jednak na unikatowość badania oraz dużą zmienność odpowiedzi poszczególnych linii, uznano za zasadne przedstawienie charakterystyki reakcji na chemioterapeutyki komórek z mutacjami w *TP53* oraz porównanie ich do grupy odniesienia z dzikim typem genu (*WT*).

Zastosowanie różnych chemioterapeutyków pozwoliło zaobserwować wyraźne różnice w skuteczności ich działania w zależności od obecności lub braku mutacji w genie *TP53*. Grupa z dzikim typem genu (*WTp53*) była jednak na tyle heterogenna, że nie wykazywała rozkładu normalnego, co uniemożliwiło przeprowadzenie pełnej analizy statystycznej. Dla celów porównawczych wartości z grupy *WTp53* uśredniono, a uzyskane dane odniesiono do wyników linii komórkowych z mutacją *MUTp53*.

W grupie *WTp53* najwyższą skuteczność wykazywała doksorubicyna, następnie fosforan toceranibu, a najslabsze działanie obserwowano dla karboplatyny. Trend ten był utrzymany przy dawkach C_1 i C_2 . Przy wyższych dawkach (C_3) najskuteczniejszy był fosforan toceranibu, natomiast karboplatyna w niektórych przypadkach nie wywierała działania hamującego na proliferację. Pozostałe dane miały rozkład normalny, co umożliwiło wykonanie dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Tukeya dla dawek C_1 , C_2 i C_3 . Uzyskane wyniki, przedstawione na Rycinie 28, wskazują, że guzy z mutacjami w genie *TP53* różniły się istotnie wrażliwością na poszczególne cytostatyki.

Jak przedstawiono na Rycinie 28 dla stężeń C_{1-3} , skuteczności zahamowania wzrostu komórek zależała zarówno od rodzaju zastosowanego cytostatyku, jak i od indywidualnej wrażliwości danej linii komórkowej. Dla dawki C_1 (Ryc. 28 C_1) linia CMT_015_1 okazała się najbardziej oporna spośród wszystkich testowanych związków. W tym przypadku obserwowano spadek żywotności po karboplatynie o ~34 punkty

procentowe, gdy po doksorubicynie spadek ten wyniósł ~17 pkt procentowych, karboplatyna wykazała większą skuteczność niż doksorubicyna ($p=0,0239$). Podobny trend zaobserwowano w liniach CMT_016_1 i CMT_020_2, gdzie fosforan toceranibu był najmniej skuteczny, spadek przeżywalności o ok. 50% i 17% odpowiednio, podczas gdy doksorubicyna wywierała najsilniejszy efekt prowadząc do spadku przeżywalności o ok. 77% i 47%, dla linii CMT_016_1 oraz CMT_020_2 odpowiednio. Dla linii CMT_020_2 różnica między odpowiedzią na fosforan toceranibu, a doksorubicynę była istotna statystycznie ($p=0,0301$) i wynosiła 28 pkt. procentowych.



Rycina 28. Porównanie żywotności komórek z obecną mutacją TP53 (MUT) do populacji linii bez mutacji (WT) po ekspozycji 48 godz. na cytostatyki w dawce C₁-C₃.

Analizę statystyczną wykonano przy zastosowaniu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Tukeya. * wartości istotne statystycznie dla $p<0,05$, ** wartości istotne statystycznie dla $p<0,01$, *** wartości istotne statystycznie dla $p<0,001$, **** wartości istotne statystycznie dla $p<0,0001$.

Przy zastosowaniu dawki C₂ utrzymał się ogólny trend skuteczności testowanych związków (Ryc. 28 C₂). Istotną obserwacją jest wyraźne ograniczenie wzrostu linii CMT_015_1 po zastosowaniu wyższej dawki fosforanu toceranibu, który wykazał znacznie silniejsze działanie cytotoksyczne niż doksorubicyna ($p=0,0167$), z różnicą na poziomie ok. 26 pkt procentowych. W przypadku tej samej linii karboplatyna okazała się

bardziej skuteczna niż doksorubicyna ($p=0,0003$), prowadząc do obniżenia przeżywalności o kolejne 41 pkt. procentowych.

W linii CMT_020_2 zaobserwowano istotną poprawę odpowiedzi na doksorubicynę, której efekt działania był znamienne lepszy w stosunku do karboplatyny ($p=0,0048$), różnica wyniosła ok. 24 pkt. procentowych. Dla linii CMT_046_1 zwiększenie dawki fosforanu toceranibu również prowadziło do istotnego spadku przeżywalności w porównaniu z doksorubicyną ($p=0,0001$), z różnicą wynoszącą ok. 38 pkt. procentowych, przy całkowitym spadku przeżywalności o ok. 83%.

Przy dawkach C_3 prawie we wszystkich przypadkach karboplatyna wykazywała najslabszą aktywność z wyjątkiem linii CMT_015_1, gdzie najslabsze działanie wykazywała doksorubicyna (Ryc. 28 C_3). Zmiana trendu była widoczna w przypadku linii CMT_015_1, dla której fosforan toceranibu okazał się skuteczniejszy od karboplatyny o niecałe 7 pkt. procentowych ($p=0,0152$), a od doksorubicyny o prawie 16 pkt. procentowych ($p=0,0114$). Warto zaznaczyć, że dla tej samej linii doksorubicyna działała słabiej niż karboplatyna ($p=0,0093$), z różnicą 9 pkt. procentowych.

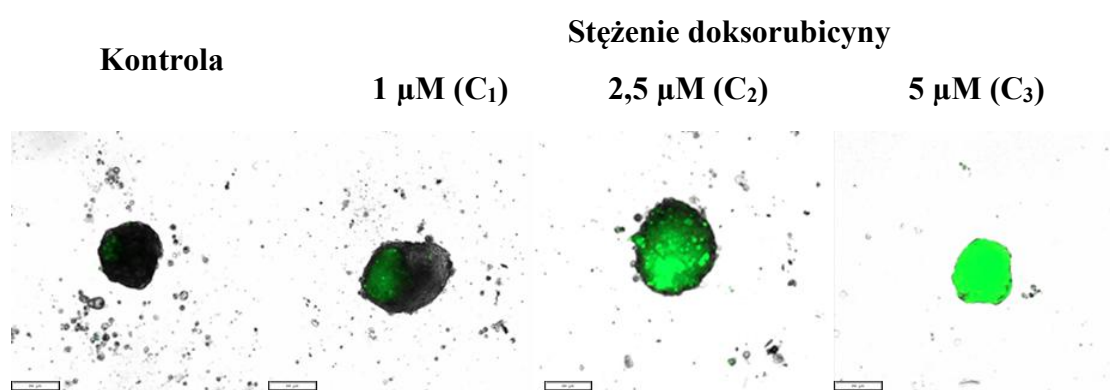
W przypadku linii CMT_020_1 i CMT_20_2 uzyskano zbliżoną odpowiedź przy dawkach C_3 . Dla linii CMT_020_2 stwierdzono istotnie wyższą skuteczność doksorubicyny w porównaniu z karboplatyną ($p=0,0008$, różnica o ok. 28 pkt. procentowych) oraz fosforanu toceranibu ($p=0,0013$ różnica o ok. 28 pkt. procentowych). Z kolei dla linii CMT_046_1 najwyższą skuteczność we wszystkich analizowanych warunkach wykazywał fosforan toceranibu, którego aktywność istotnie przewyższała działanie karboplatyny aż o ~ 41 pkt. procentowych ($p=0,0367$).

5.2.4 Ocena chemiooporności komórek w modelu 3D

Analiza chemiooporności w trójwymiarowych hodowlach (3D) została przeprowadzona z wykorzystaniem kilku komplementarnych metod pomiarowych, umożliwiających ocenę żywych i martwych komórek w sferoidach nowotworowych. Poza odczytem fluorescencji na czytniku płytek, zastosowano również obrazowanie mikroskopowe w świetle przechodzącym oraz we fluorescencji, co pozwoliło na zobrazowanie martwych komórek w strukturze sferoidu (Ryc. 29).

Wysoko przepustowa analiza była możliwa dzięki zastosowaniu czytnika płytek TECAN, natomiast wszystkie obrazy mikroskopowe poszczególnych próbek zostały zarchiwizowane i mogą zostać wykorzystane w przyszłych analizach porównawczych.

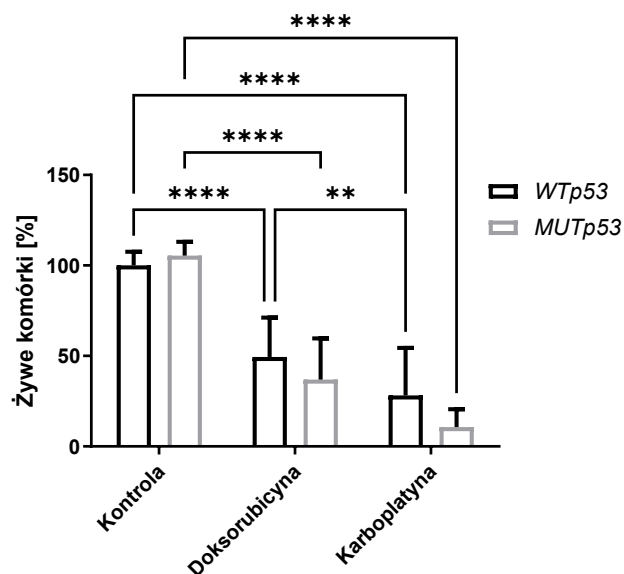
W trakcie badań zaobserwowano, że fosforan toceranibu wykazuje fluorescencję charakterystyczną dla kanału GFP, w którym rejestrowano sygnał po barwieniu Gel Green. Pomimo tego ograniczenia, zdecydowano się kontynuować pomiary w tym układzie, z uwagi na brak alternatywnej metody na danym etapie badań. Podjęto próby zastąpienia barwnika Gel Green barwnikiem DAPI, które nie przyniosły satysfakcjonujących wyników ze względu na niską czułość odczytu, natomiast standardowy test przeżywalności z użyciem roztworu resazuryny okazał się również niewłaściwy, gdyż doksorubicyna wykazywała autofluorescencję w tym samym kanale.



Rycina 29. Reprezentatywne zdjęcia sferoidów nowotworowych traktowanych przez 48 godz. różnymi stężeniami doksorubicyny, z wyznakowanymi fluorescencyjnie martwymi komórkami.

Nałożono na siebie projekcje w osi Z uzyskane w dwóch kanałach, świetle przechodzącym i fluorescencji (GFP). Obrazowanie wykonano przy użyciu oprogramowania Gen5 zintegrowanego z urządzeniem Cytation 5, powiększenie 40X, skala - 200 μm .

Niemniej ten typ analizy powinien dawać miarodajne wyniki dla doksorubicyny oraz karboplatyny. Wynik odczytu fluorescencji na czytniku płytek TECAN zaprezentowano na Rycinie 30.



Rycina 30. Porównanie żywotności komórek, z różnym statusem genu *TP53* (WT vs MUT), w hodowli 3D po ekspozycji trwającej 48 godz. na cytostatyki w dawce C₂.

Analizę statystyczną wykonano przy zastosowaniu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Tukeya. ** wartości istotne statystycznie dla $p < 0,01$, **** wartości istotne statystycznie dla $p < 0,001$.

W analizie odpowiedzi sferoidów na związki w dawce C₂ zaobserwowano liczne zależności, choć większość nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej. Istotne efekty względem kontroli wykazano dla doksorubicyny, która prowadziła do spadku przeżywalności komórek o ok. 51 i 63 punktów procentowych dla *WTp53* ($p < 0,0001$) i *MUTp53* ($p < 0,0001$), odpowiednio. W przypadku karboplatyny efekt był nieco mocniej widoczny, gdyż obserwowano spadek przeżywalności o 72 i 89 punktów procentowych dla *WTp53* ($p < 0,0001$) i *MUTp53* ($p < 0,0001$), odpowiednio. Generalnie karboplatyna, w porównaniu z doksorubicyną, wykazywała silniejsze działanie w przypadku sferoidów nowotworowych, szczególnie w tych z mutacją w genie *TP53*. Należy zaznaczyć, że obserwowana wrażliwość komórek, w badaniu chemiooporności, w hodowli 2D i 3D była odwrotna. W hodowli 3D to karboplatyna w dawce C₂ wykazywała silniejsze działanie w porównaniu do doksorubicyny.

Pozostałe analizy porównawcze nie wykazały istotnych różnic statystycznych, co prawdopodobnie wynika z dużego zróżnicowania danych między próbkami i/lub zbyt małej reprezentacji badanych prób. Niemniej jednak zaobserwowano wyraźną tendencję, że sferoidy pochodzące z komórek posiadających mutację w genie *TP53* były mniej odporne na stosowane cytostatyki, w porównaniu ze sferoidami z komórek nowotworowych z genem typu dzikiego. Jednak, aby potwierdzić tę obserwację

konieczne będzie przeprowadzenie badań na większej liczbie próbek, pozwalających uzyskać istotność statystyczną

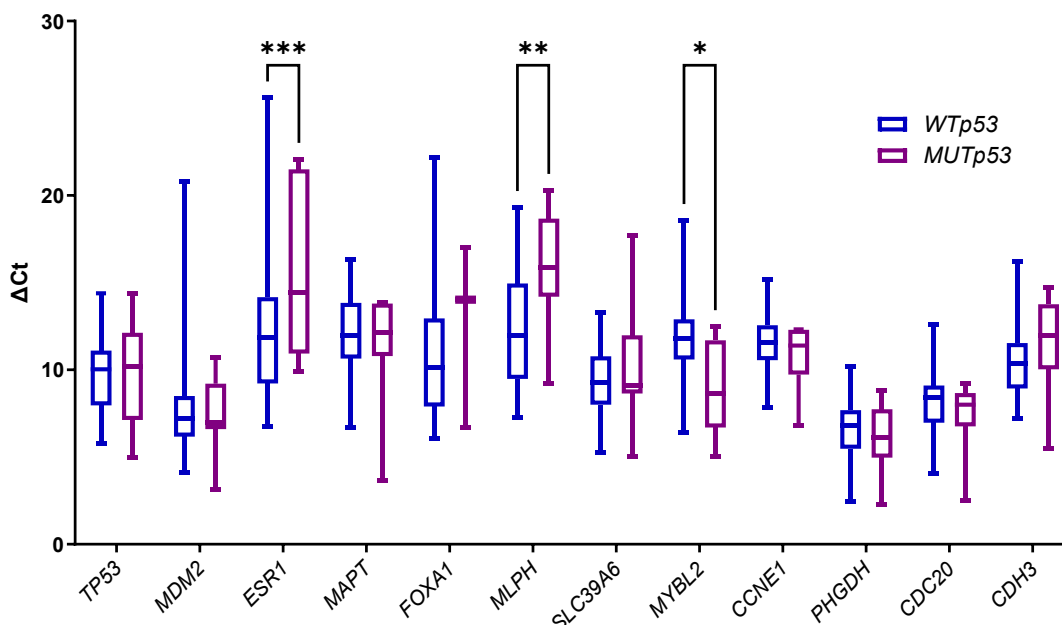
5.2.5 Ocena zdolności klonogenicznej komórek

W badaniach oceniających zdolność komórek do tworzenia kolonii nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy zdolnością tworzenia kolonii, czyli zdolnością komórek traktowanych chemioterapeutykami do wznowy proliferacyjnej, a typem histopatologicznym guza, stopniem jego złośliwości ani obecnością mutacji w genie *TP53*.

Uzyskane wyniki wskazują, że zdolność do tworzenia kolonii może być cechą niezależną od podstawowych parametrów kliniczno-patologicznych. Może ona wynikać z różnic w wewnętrznej heterogenności populacji komórek nowotworowych, a także ze zmiennego udziału komórek macierzystych raka (ang.: *cancer stem cells*; CSC) w poszczególnych liniach.

5.3 Analiza ekspresji genów z panelu PAM50 w guzach nowotworowych gruczołu mlekowego suk - porównanie wartości ΔCt w guzach o różnym statusie *TP53* oraz odmiennych cechach klinicznych

Analiza ekspresji genów z panelu PAM50 została przeprowadzona w oparciu o wyniki reakcji qPCR. Dla każdego genu obliczono ΔCt względem transkryptu referencyjnego 18S rRNA. Początkowo planowano analizę porównawczą typu $\Delta\Delta Ct$, jednak duża zmienność ekspresji pomiędzy guzami uniemożliwiła uzyskanie wiarygodnych wartości odniesienia. Dlatego przeprowadzono analizę różnic w średnich wartościach ΔCt między grupami o różnym statusie genu *TP53* oraz stopniu złośliwości histologicznej (Ryc. 31 i 32).

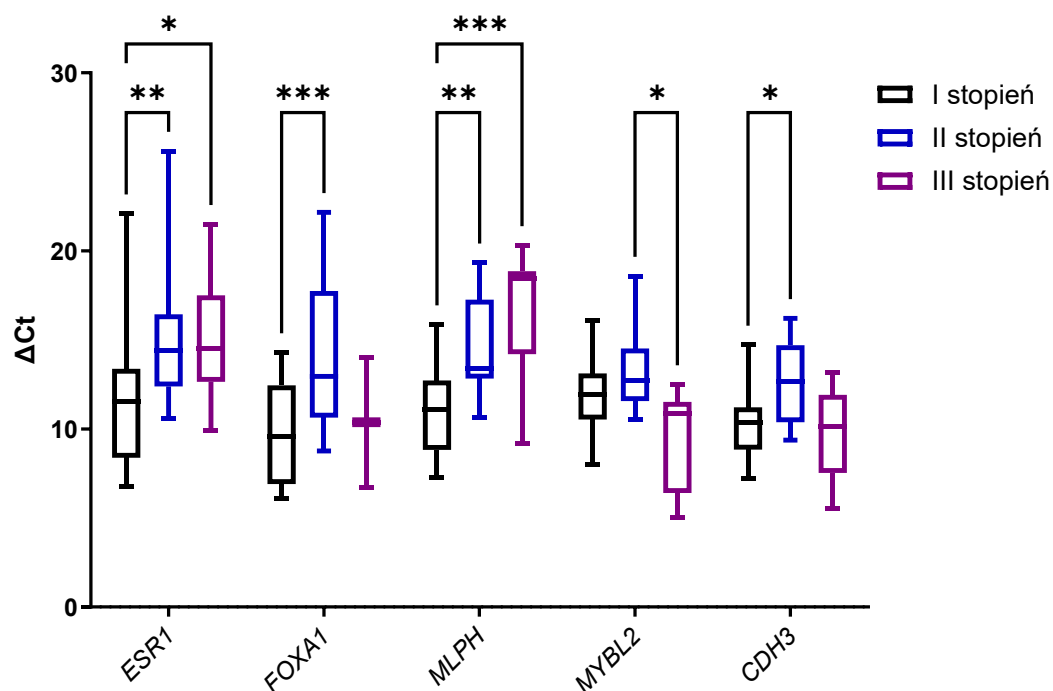


Rycina 31. Poziomy transkryptów genów panelu PAM50 w nowotworach gruczołu mlekowego suk w zależności od statusu genu TP53.

Analizę statystyczną wykonano przy zastosowaniu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Tukeya. * wartości istotne statystycznie dla $p < 0,05$, ** wartości istotne statystycznie dla $p < 0,01$, *** wartości istotne statystycznie dla $p < 0,001$.

Porównując poziomy transkryptów dla poszczególnych genów panelu PAM50 pomiędzy nowotworami CMT zawierającymi mutację w genie *TP53* (*MUTp53*) a guzami z genem *TP53* typu dzikiego (*WTp53*), pomimo dość dużej heterogenności badanej grupy, wykazało istotne różnice w ekspresji trzech genów: *ESR1* ($p=0,0009$), *MLPH* ($p=0,0028$) oraz *MYBL2* ($p=0,0267$). Ekspresja genów *ESR1* i *MLPH* była istotnie wyższa w nowotworach *WTp53* w porównaniu z guzami zawierającymi mutację *TP53* (*MUTp53*). Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku genu *MYBL2*, którego poziom transkryptu był wyższy w guzach *MUTp53*.

W wielu próbkach nie stwierdzono ekspresji genu *FOXA1*, w związku z czym marker ten pominięto w części analiz. Dla pozostałych genów panelu PAM50 nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy porównywanymi grupami. Dotyczyło to również genu *TP53*, dla którego próg detekcji amplifikacji (Ct) był zbliżony we wszystkich badanych próbkach.



Rycina 32. Poziomy transkryptów genów panelu PAM50, dla których stwierdzono istotne różnice ekspresji w zależności od stopnia złośliwości histopatologicznej guza (I, II i III).

Analizę statystyczną wykonano przy zastosowaniu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Tukeya. * wartości istotne statystycznie dla $p < 0,05$, ** wartości istotne statystycznie dla $p < 0,01$, *** wartości istotne statystycznie dla $p < 0,001$.

Porównanie poziomu transkryptów badanych genów pomiędzy guzami o różnym stopniu złośliwości histopatologicznej (I-III) wykazało statystycznie istotne różnice w ekspresji kilku genów (Ryc. 32). Największe zmiany zaobserwowano dla genu *ESR1*, poziom jego transkryptu był istotnie niższy w guzach drugiego stopnia złośliwości (II) w porównaniu do guzów z pierwszym stopniem (I) ($p=0,0010$), a także w guzach III stopnia w porównaniu z guzami I ($p=0,0120$). Obniżony poziom ekspresji w nowotworach o stopniu złośliwości II względem I potwierdzono również dla genów *FOXA1* ($p=0,0007$) oraz *MLPH* ($p=0,0038$). Dodatkowo dla genu *MLPH* zaobserwowano istotny spadek poziomu transkryptu w guzach III stopnia w porównaniu z guzami w stopniu I ($p=0,0001$). Stwierdzono również istotną statystycznie różnicę w ekspresji genu *CDH3* ($p=0,0425$) między guzami w stopniu złośliwości I i II.

Na Rycinie 32 przedstawiono jedynie te geny, dla których wykazano istotne statystyczne różnice poziomu transkryptu w zależności od stopnia złośliwości. Guzy w najwyższym III stopniu złośliwości charakteryzowały się obniżonym poziomem

transkryptów dla genów *ESR1* oraz *MLPH*, przy jednoczesnym podwyższonym poziomie ekspresji genu *MYBL2*. W nowotworach w stopniu złośliwości II wykazano niższą ekspresję genów *ESR1*, *FOXA1*, *MLPH* oraz *CDH3* w porównaniu z guzami w stopniu I. Z kolei poziom transkryptu genu *MYBL2* w guzach II był istotnie niższy niż w guzach w stopniu III ($p=0,0144$). Ekspresja genu *MYBL2* narastała wraz ze stopniem złośliwości, gdyż poziom *MYBL2* w guzach III był istotnie wyższy niż w guzach w stopniu I, jednak różnica między nowotworami w stopniach III i I nie osiągnęła istotności statystycznej.

6 Omówienie wyników i dyskusja

6.1 Epidemiologia nowotworów gruczołu mlekowego suk w populacji Warszawy i okolic

W pierwszej kolejności należy podkreślić, że nowotwory gruczołu mlekowego stanowią jedną z najczęściej diagnozowanych chorób onkologicznych u suk, a ich epidemiologia w dużym stopniu zależy od struktury populacji psów w danym regionie.

Badania prowadzone w populacji warszawskiej i okolicznej pozwoliły na ocenę częstości występowania, typów histopatologicznych i stopnia złośliwości guzów w odniesieniu do danych literaturowych.

Zgromadzony materiał obejmował guzy wraz z pełnymi lub częściowymi danymi klinicznymi, co umożliwiło ich klasyfikację i porównanie z wcześniejszymi badaniami. Opracowany system kwalifikacji pacjentek i klasyfikacji guzów może stanowić punkt wyjścia do planowania dalszych analiz oraz może być podstawą do projektowania przyszłych badań epidemiologicznych i translacyjnych.

Zróżnicowanie badanej populacji wskazuje jednak na konieczność jej poszerzenia w kolejnych latach, aby możliwe było wyciąganie bardziej jednoznacznych wniosków. W szczególności należy określić minimalną liczebność prób w poszczególnych podgrupach (np. u suk ras małych), co umożliwiłoby lepsze uogólnienia statystyczne. Wprowadzenie dodatkowych kryteriów, takich jak wielkość guza czy zakres dostępnych danych klinicznych, mogłoby zwiększyć jakość materiału badawczego i umożliwić jego bardziej pogłębioną analizę.

Istotnym spostrzeżeniem jest fakt, że nie każda zmiana zlokalizowana w obrębie listwy mleczej wywodzi się z gruczołu mlekowego. W niniejszym badaniu, w zebranych materiale, oprócz guzów gruczołu mlekowego, stwierdzono również obecność innych nowotworów takich jak mastocytoma, czy nabłoniak włosowy oraz zmian nienowotworowych. Wyniki te są zgodne z obserwacjami Dolki i wsp. (2024), którzy w szerokiej analizie obejmującej 1447 przypadków wykazali, że nienowotworowe rozrosty stanowiły około 5% wszystkich zmian. W niniejszej pracy odsetek ten był nieco wyższy i wynosił 8,3% (5/60). Różnice te mogą wynikać z odmiennej wielkości badanych populacji oraz kryteriów kwalifikacji do badań histopatologicznych. Niezależnie od tego, uzyskane wyniki potwierdzają zasadność przeprowadzania badań histopatologicznych każdej zmiany, nawet jeśli występuje ona w obrębie jednej listwy mleczej, gdyż

poszczególne guzy mogą wykazywać inny typ histopatologiczny, a w konsekwencji odmienny fenotyp i odpowiedź na leczenie.

W analizowanej grupie nowotworów gruczołu mlekowego najczęściej stwierdzano raka prostego (32,7%; 17/52 guzów gruczołu mlekowego), raka złożonego (17,3%; 9/52), guza mieszanego (15,4%; 8/52) oraz raka litego (11,5%; 6/52). Łącznie raki stanowiły 88,5% wszystkich zmian nowotworowych gruczołu mlekowego, co jest zgodne z wynikami Dolki i wsp. (83,3%). Odmienny udział poszczególnych typów histopatologicznych obserwowano natomiast w innych regionach świata. Przykładowo, w badaniu przeprowadzonym w Tajlandii (Jurutha *et al.* 2025) raki stanowiły 16/31 (51,6%) pobranych guzów, w tym jedynie trzy przypadki raka prostego.

Warto zauważyć, że rozkład stopni złośliwości guzów przedstawiony w niniejszej pracy doktorskiej różnił się od wyników opublikowanych przez Dolkę i wsp. W analizowanej grupie dominowały guzy w I stopniu złośliwości (56,25%; 27/48), natomiast u Dolki i wsp. najczęściej obserwowano guzy w II stopniu złośliwości (38,2%). Może to wynikać z różnic w charakterystyce badanych populacji, ale wymaga to dalszej analizy. Na stopień złośliwości wpływa przede wszystkim moment wykrycia nowotworu, wcześniejsza diagnostyka zwiększa szansę na rozpoznanie zmian w mniej zaawansowanym stadium. W prezentowanej pracy doktorskiej większość pacjentek stanowiły mieszańce bez udokumentowanej historii leczenia, często pochodzące z adopcji, co mogło sprzyjać późnemu rozpoznaniu nowotworu o wyższym stopniu zaawansowania/złośliwości w momencie diagnozy.

W innym badaniu, przeprowadzonym w Wielkiej Brytanii (Varney *et al.* 2023), raki stanowiły 21,3%, natomiast zdecydowaną większość (78,8%) klasyfikowano jako gruczolaki. Tymczasem, w niniejszej pracy liczebność guzów zaklasyfikowanych jako gruczolaki to tylko 2/52, co stanowiło niespełna 4%. Różnice te mogą wynikać z odmiennych kryteriów klasyfikacji populacji psów objętej analizą oraz postępu diagnostycznego w ostatnich latach, wyniki cytowanej pracy dotyczą 2016 roku.

Z kolei w badaniu przeprowadzonym w Brazylii, podobnie jak w niniejszej analizie, najczęściej występowały raki proste (36,51%), raki w guzie mieszanym (24%) oraz raki złożone (16,72%) (da Silva *et al.* 2023). Wyniki uzyskane przez zespół da Silvy pozostają stosunkowo zbieżne z wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy.

Powyższe analizy pokazują, że tego typu badania powinno się prowadzić w ujęciu regionalnym, ponieważ struktura populacji, warunki utrzymania oraz moment pierwszej interwencji weterynaryjnej mogą istotnie wpływać na rodzaj diagnozowanych

nowotworów oraz ich stopień złośliwości w momencie wykrycia. Uwzględnienie tych czynników w kolejnych projektach badawczych pozwoli na uzyskanie bardziej reprezentatywnego obrazu epidemiologii CMT oraz na formułowanie wiarygodnych wniosków dotyczących zastosowania tego modelu w badaniach translacyjnych.

Analizując uzyskane wyniki pod kątem przydatności psa jako modelu zwierzęcego w badaniach translacyjnych nad ludzkim rakiem piersi, należy uwzględnić, że w ostatnich latach diagnostyka raka piersi u kobiet uległa znaczącej poprawie, co przełożyło się na wcześniejsze wykrywanie zmian nowotworowych. W praktyce klinicznej u psów brak jest badań przesiewowych, dlatego pacjentki do lekarza weterynarii trafiają zazwyczaj z dość zaawansowanym guzem, znacznie większym, o heterogennej budowie, nierzadko z martwiczym rdzeniem. Dla rzetelnej oceny zasadności wykorzystania psa jako modelu translacyjnego, wskazane byłoby zestawienie wyników niniejszego badania z danymi epidemiologicznymi populacji kobiet zgromadzonymi sprzed kilkudziesięciu lat, gdy metody diagnostyczne były mniej dostępne.

Kolejnym istotnym aspektem badań była analiza wieku i rasy pacjentek. Mediana wieku w badanej populacji wynosiła 11 lat, przy czym dla suk ras małych i średnich 12 lat, a dla dużych ras 7,5 roku. W grupie młodszych suk (5–9 lat) odsetek ras dużych wynosił 50%, natomiast w grupie starszej (10–15,5 lat) już tylko 12%. Uzyskane wyniki są zbliżone do danych literaturowych, zgodnie z którymi nowotwory gruczołu mlekowego najczęściej rozwijają się u suk w wieku 8–10 lat (Muto *et al.* 2000, Sorenmo *et al.* 2011). Chociaż w nowszych badaniach wskazywano medianę wieku około 8 lat (Varney *et al.* 2023), co może sugerować przesunięcie wieku diagnozy w zależności od populacji i poprawy metod diagnostycznych. Rozbieżności te mogą również wynikać z udziału większego odsetka psów ras dużych w analizowanej grupie. Struktura rasowa badanej populacji wykazywała przewagę mieszańców (29,7%; 11/37) oraz yorkshire terrierów (24,3%; 9/37). W analizie uwzględniono również jamniki (ok. 5%) oraz pojedyncze przypadki innych ras. Nadreprezentacja yorkshire terrierów nie została jednak uznana za dowód genetycznej predyspozycji, a raczej za odzwierciedlenie popularności tej rasy w Polsce w latach poprzedzających badania. Zjawisko to potwierdzono w konsultacjach z lekarzami weterynarii i mogło ono dodatkowo wynikać z faktu, że małe rasy psów częściej żyją w warunkach domowych, co sprzyja wcześniejszemu wykrywaniu zmian nowotworowych przez właścicieli. Warto zauważyć, że w badaniu Dolki i wsp., zawierającym wyniki z materiału gromadzonego w latach

1996-2019, psy rasowe stanowiły 72,8% populacji, podczas gdy w niniejszej pracy przeważały mieszańce (Dolka *et al.* 2024). Różnica ta może być częściowo związana z rosnącą liczbą adopcji psów w Polsce, co potwierdzają raporty Głównego Inspektoratu Weterynarii z lat 2020 i 2022, chociaż brak jest szczegółowych danych dotyczących struktury rasowej adoptowanych zwierząt.

Należy pamiętać, że struktura rasowa danej populacji może znacząco różnić się w zależności od regionu, co wymaga precyzyjnego określenia dominujących ras w kolejnych badaniach oraz uwzględnienia tego czynnika przy analizie predyspozycji rasowych do występowania określonych typów nowotworów. Niniejsze badanie należy traktować jako pilotażowe, wyznaczające kierunki dalszych analiz i stanowiąc podstawę do formułowania nowych hipotez badawczych.

Interpretację wyników utrudniało znaczne zróżnicowanie historii klinicznej pacjentek. Część zwierząt pochodziła z adopcji, co ograniczało dostęp do informacji na temat wcześniejszego leczenia, przebytych ciąż, czy momencie pojawienia się pierwszych zmian. Braki te utrudniają pełną analizę i ograniczają możliwość pełnego porównania z danymi literaturowymi. W przyszłych badaniach należałoby uwzględnić standaryzację gromadzonej dokumentacji klinicznej oraz kwalifikacji pacjentek uwzględniając dokładną historię leczenia opartą o wyniki badań (parametry hematologiczne i biochemiczne krwi, RTG, USG itp.). Warto również rozważyć poszerzenie diagnostyki o badanie węzłów chłonnych i ocenę podtypów molekularnych, co zwiększyłoby wartość translacyjną uzyskanych danych.

Dodatkowym ograniczeniem była niemożność jednoznacznej oceny skuteczności mastektomii w leczeniu nowotworów gruczołu mlekowego. W niniejszej pracy nie odnotowano wznowy po roku u 11 pacjentek, a u 19 brak było wznowy w ciągu sześciu miesięcy, jednak niewielka liczebność grupy oraz jej heterogenność kliniczna nie pozwalają na wyciąganie ostatecznych wniosków. W literaturze także brakuje szczegółowych analiz uwzględniających wieloogniskowość zmian w obrębie jednej listwy mleczej, nie wiadomo, czy wynika to z faktycznej rzadkości takich przypadków, czy też ograniczania badań do największego guza. Jest to obszar wymagający dalszej eksploracji, który nie tylko pozwoli na pełniejszą analizę porównawczą pod kątem epidemiologicznym, ale również mógłby dostarczyć dodatkowych argumentów w ocenie zasadności wykorzystania modelu CMT dla badań nad rakiem piersi u kobiet.

6.2 Indywidualna charakterystyka mutacji genu *TP53* w kontekście modelu translacyjnego

W przeprowadzonych badaniach wykryto mutacje genu *TP53* w 7 spośród 47 zsekwencjonowanych guzów sutka suk, co odpowiada niecałym 15% analizowanej kohorty. Odsetek ten jest niższy niż w niektórych wcześniejszych badaniach, w których odnotowano wartości na poziomie 30% (Chu *et al.* 1998) oraz 58% (Sakthikumar *et al.* 2024). Jednocześnie uzyskany wynik jest zbliżony do badania Muto i wsp. (2000), którzy po przeprowadzeniu analizy 63 próbek stwierdzili obecność mutacji w 20% przypadków. Co istotne, w pracy Alsaihati i wsp. (2021), obejmującej największą do tej pory kohortę (408 próbek), mutacje w genie *TP53* występowały zaledwie w 5% przypadków (Alsaihati *et al.* 2021). Zaobserwowane rozbieżności mogą wynikać z różnic w wielkości analizowanych grup, zastosowanych metodach badawczych oraz z przyjętych kryteriów histopatologicznych.

Na etapie planowania eksperymentu zakładano frekwencję mutacji u suk zbliżoną do tej obserwowanej u ludzi, tj. około 33% (na podstawie danych The Cancer Genome Atlas – TCGA). Z tego względu oszacowano, że minimalna liczba guzów powinna wynosić 50 (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$ i mocy testu 0,95). Ostatecznie uzyskano dane dla 47 guzów, czyli nieznacznie mniej niż zakładano. Choć RNA zostało wyizolowane z 52 próbek, w kilku przypadkach ilość transkryptu *TP53* była zbyt niska, aby możliwe było przeprowadzenie analizy. Doświadczenie to wskazuje, że przy planowaniu badań w przyszłych projektach należy uwzględniać większą kohortę wyjściową, z uwzględnieniem marginesu utraty próbek na poziomie ok. 20%. W praktyce oznacza to, że dla uzyskania wiarygodnych danych dla ~50 guzów, należałoby rozpocząć badania od co najmniej 60–65 przypadków, z pełną dokumentacją kliniczno-patologiczną oraz wystarczającą ilością materiału do analiz histopatologicznych, molekularnych i *in vitro*.

Niemniej jednak, spośród 47 zsekwencjonowanych próbek DNA wyizolowanych guzów, w 7 stwierdzono mutacje w transkrypcie *TP53*. W Tabeli 26 przedstawiono mutacje w psim *TP53* wykryte w niniejszej pracy oraz odpowiadające im analogiczne zmiany opisane w genie ludzkim.

W przeprowadzonym badaniu wszystkie wykryte mutacje były unikalne i zlokalizowane w różnych miejscach transkryptu *TP53*. Z tego powodu poszczególne zmiany analizowano indywidualnie. Warto podkreślić, że pomimo ograniczonej

liczebności próbek udało się wykazać istotną korelację między obecnością mutacji a typem histopatologicznym, jak i stopniem złośliwości guzów, takich zależności nie stwierdzono w badaniu Muto i wsp. (2000). Należy jednak pamiętać, że uzyskane wyniki mogą być uwarunkowane różnicami w zastosowanej klasyfikacji histopatologicznej, metodzie pobierania próbek oraz heterogennością guzów, szczególnie tych o większych rozmiarach, w których reprezentatywne pobranie tkanki może być utrudnione.

W przedstawianej pracy zdecydowano się na analizę poszczególnych mutacji indywidualnie, ponieważ każda z nich była unikalna i występowała w innym miejscu w transkrypcie, co mogło warunkować odmienny fenotyp komórkowy. Takie podejście pozwoliło również na dokładniejsze określenie potencjalnych konsekwencji funkcjonalnych analizowanych mutacji.

Na szczególną uwagę zasługuje przypadek próbek CMT_020_1 oraz CMT_020_2, w których wykryto identyczną delecję, co może wskazywać na wspólne pochodzenie obu guzów lub obecność przerzutów. Co istotne, obecność tej samej mutacji zarówno w materiale tkankowym, jak i hodowli komórkowej potwierdziła stabilność zmian w trakcie namnażania komórek *in vitro*.

Porównanie z danymi literaturowymi wskazuje, że w dotychczasowych badaniach u suk dominowały mutacje zmiany sensu (ang.: *missense*) oraz nieliczne mutacje nonsensowne i ciche (ang.: *silent*) (Muto *et al.* 2000, Lee *et al.* 2004). W niniejszej pracy wykryto głównie mutacje zmiany sensu, jednak żadna z nich nie pokrywała się z mutacjami wcześniej opisanymi. Szczegółowa analiza wykazała, że dla wielu zidentyfikowanych wariantów mutacji istnieją ludzkie odpowiedniki zarejestrowane w bazach danych, takich jak TCGA oraz IARC TP53 Database, zarówno w przypadku raka piersi, jak i innych typów nowotworów. Na obecnym etapie badań nie było jednak możliwe jednoznaczne określenie wpływu tych zmian na strukturę przestrzenną i funkcję powstałego białka.

Ze względu na różnorodność zidentyfikowanych mutacji, wyciąganie jednoznacznych wniosków dotyczących ich związku z konkretnym typem histopatologicznym lub stopniem złośliwości nowotworu byłoby nieuzasadnione. Niemniej jednak, interesującym spostrzeżeniem jest fakt, że spośród siedmiu guzów zawierających mutacje, cztery charakteryzowały się III stopniem złośliwości, a jeden (bez określonego stopnia) został sklasyfikowany jako mioepitelioma złośliwa. Pozostałe dwa guzy wykazywały I stopień złośliwości.

Z powyższych względów zasadne wydaje się prowadzenie szczegółowej analizy pojedynczych mutacji, z uwagi na ich potencjalne znaczenie biologiczne i translacyjne. Pomimo braku rozbudowanej literatury dotyczącej psich pacjentów, część zidentyfikowanych mutacji, a przynajmniej ich ludzkie odpowiedniki, została już opisana w badaniach onkologicznych.

Tabela 26. Mutacje genu TP53 wykryte w guzach sutka suk w porównaniu z ludzkimi odpowiednikami oraz odpowiadające im linie komórkowe wyprowadzone w niniejszym badaniu.

Mutacja w genie TP53 u psa	Ludzki odpowiednik mutacji (kodon / typ nowotworu wg baz TCGA/IARC)	Wyprowadzona linia komórkowa
N118del	N131del - rak szyjki macicy (linia SKS), rak jajnika, nerki, żołądka	CMT_020_1 CMT_020_2
Y222S	Y234S - rak płuca (TCGA-LUSC)	CMT_009_1
T241P	T253P - rak trzustki (linia Sui71), rak jajnika	CMT_015_1
R261C	R273C - hotspot TP53 rak piersi, oporność na terapię	CMT_015_1
Insercje	Insercje w TP53 - linia MDA-MB-436 (rak piersi, typ bazalny)	CMT_005_1 CMT_016_1 CMT_046_1

W celu identyfikacji i opisu konkretnych mutacji oraz ich ludzkich odpowiedników dla psich wariantów genu TP53 posłużono się bazami danych: NCI (<https://tp53.cancer.gov/>) oraz TCGA.

Kolejna mutacja, N118del, czyli delecja całego kodonu dla asparaginy, została wykryta w guzach CMT_020_1 oraz CMT_020_2. Odpowiadająca mutacja w genie ludzkim (N131del) została wcześniej opisana w kilku przypadkach nowotworów u ludzi. Jedna z linii komórkowych z tą mutacją (SKS), wyprowadzona z raka szyjki macicy (typ drobnokomórkowy), została szczegółowo scharakteryzowana przez Sagę i wsp. (2001). Linia SKS wykazuje fenotyp bardzo podobny do obserwowanego dla linii CMT_020_1 na późniejszych pasażach, w tym częściowo zawiesinowy charakter wzrostu i tendencję do tworzenia agregatów komórkowych. Czas podziału komórek w obu przypadkach jest również zbliżony (44 godz. dla SKS i 46 godz. dla CMT_020_1). Komórki SKS poddano działaniu sześciu cytostatyków, jednak żaden z nich nie pokrywał się z substancjami testowanymi w niniejszej pracy, co uniemożliwia bezpośrednie porównanie uzyskanych wyników. Zarówno nowotwór, z którego wyprowadzono linię SKS, jak i guz CMT_020_1, wywoływały chorobę o agresywnym przebiegu doprowadzając do śmierci

gospodarza. W momencie operacji u suki, z guzem CMT_020_1, stwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych pachowych dlatego w dwa miesiące później została uśpiona. Natomiast pacjentka, od której wyprowadzono linię SKS, zmarła trzy miesiące po zabiegu w następstwie rakowego zapalenia otrzewnej i opłucnej, będącego wynikiem rozsiewu komórek nowotworowych. Analiza kariotypu wykazała, że komórki linii SKS zawierają 50-56 chromosomów, co sugeruje, że taką analizę warto by było wykonać dla linii CMT_020_1, w raz z oceną jej stabilności genetycznej. W przyszłości należałoby lepiej, bardziej szczegółowo scharakteryzować tę linię, gdyż może stanowić cenny psi odpowiednik dla ludzkiego modelu nowotworowego z tą samą mutacją.

Z innych danych literaturowych wynika, że mutacja N131del została również opisana w dwóch przypadkach raka jajnika (Bi *et al.* 2020, Devor *et al.* 2017), a także w raku nerki (Wegert *et al.* 2017) oraz żołądka (TCGA-STAD). W pracy Bi i wsp. (2020) przeprowadzono modelowanie strukturalne białka p53 z taką mutacją i wykazano, że powoduje ona utratę interakcji stabilizujących strukturę domeny wiążącej DNA, szczególnie w regionach S10-S2'-S2-H2, w tym utratę połączeń hydrofobowych z L130 oraz wiązań cynkowych, co skutkuje obniżoną zdolnością do wiązania DNA (Bi *et al.* 2020). W badaniach Wegert i wsp. oraz Devor i wsp. stwierdzono, że mutacja wiązała się ze zwiększonym poziomem białka p53 (Devor *et al.* 2017, Wegert *et al.* 2017).

W przyszłości należałoby poszerzyć analizy przeprowadzone w tej pracy o badania poziomu białka p53, ponieważ obecnie dysponujemy jedynie wynikami dotyczącymi ilości transkryptów. W niniejszym badaniu mediana ΔCT dla *TP53* wynosiła 10,13, natomiast dla pojedynczych próbek tj. CMT_020_1 oraz CMT_020_2 ΔCT wynosiło odpowiednio 11,86 oraz 7,13, co oznacza, że ekspresja *TP53* była niższa w CMT_020_1, a wyższa w CMT_020_2. Należy jednak zaznaczyć, że ilość transkryptu *TP53* w tkance guza CMT_020_1 była tak niska, że nie uzyskano satysfakcjonującej ilości produktu w reakcji PCR, na tej podstawie nie można też zakładać, czy próbować dokonywać oceny reprezentacji białka w guzie.

Mutacja Y222S (tyrozyna→seryna), wykryta w guzie CMT_009_1, odpowiada ludzkiemu kodonowi Y234. Znalezione dokładnie jedną taką samą mutację (Y234S) u człowieka, występującą w raku płuc i oskrzeli (TCGA-LUSC). W tym kodonie opisano również inne substytucje aminokwasowe, Y234C (tyrozyna→cysteina), Y234D (tyrozyna→kwas asparaginowy), Y234H (tyrozyna→histydyna) oraz Y234N (tyrozyna→asparagina). Nie ma jednak wielu badań dotyczących wpływu tej mutacji na fenotyp guza. Warto dodać, że mutacja Y234C jest znanym wariantem i pojawia się w

0.67% przypadków nowotworów (Baugh *et al.* 2018), lecz do tej pory nie została scharakteryzowana pod względem funkcjonalnym.

Mutacja T241P (treonina →prolina), wykryta w guzie CMT_015_1, ma odpowiednik w ludzkim kodonie T253. Ta sama mutacja została opisana w gruczolakoraku trzustki, a z jego przerzutu do wątroby wyprowadzono linię komórkową Sui71 (Yanagihara *et al.* 2008). Nie znaleziono jednak szczegółowych danych dotyczących charakterystyki tej linii. Mutacja T253P została także opisana w raku jajnika (Calapre *et al.* 2023). Z kolei dokładniej został opisany wariant mutacji T253I (treonina → izoleucyna), który występuje jako mutacja germinalna w zespole Li-Fraumeni i prowadzi do upośledzenia zdolności białka p53 do wiązania DNA i aktywacji genów naprawy. Dla tego mutantu stwierdzono również zwiększoną ekspresję genu *TP53*, a obniżoną dla *MDM2* (Holcomb *et al.* 2025).

W niniejszej pracy, porównując ilość transkryptów genów *TP53* i *MDM2* z guza CMT_015_1 z medianą wartości dla guzów z *WTp53*, stwierdzono wyższy poziom ekspresji obu genów w guzie z mutacją. Ponieważ tkanka kontrolna nie została zsekwencjonowana, nie można na tym etapie określić, czy mutacja ma charakter germinalny czy somatyczny, jednak materiał biologiczny został zabezpieczony i może zostać wykorzystany w przyszłych analizach.

Guz CMT_015_1 poza wyżej opisaną mutacją zawierał również mutację R261C (arginina → cysteina). Jej ludzkim odpowiednikiem jest hotspot R273C, występujący w 3,31% guzów u ludzi (Baugh *et al.* 2018, Ke *et al.* 2024), który charakteryzuje się zwiększoną opornością na chemioterapię i radioterapię (Zhang *et al.* 2022). Komórki guza CMT_015_1, rzeczywiście wykazały większą oporność na działanie doksorubicyny we wszystkich badanych stężeniach, co koreluje z obserwacjami dla mutacji ludzkiej. Zidentyfikowano także ludzką linię komórkową raka piersi (SUM-229-PE) z taką samą mutacją (Wasielewski *et al.* 2006), która posiada również delecję w genie *CDKN2A* (inhibitor kinazy cyklinozależnej 2A; ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) i mutację w genie *KRAS* (homolog wirusowego onkogenu mięsaka szczura Ki-ras2 Kirsten). Linia ta charakteryzuje się obniżoną ekspresją *TP53*, (Wasielewski *et al.* 2006), zwiększoną ekspresją *EGFR* (Ignatowski 1999) oraz nadekspresją *BRCA1* (Elstrodt, Hollestelle *et al.* 2006).

Mutacje insercyjne należą do stosunkowo rzadkich u ludzi i stanowią ok. 3,3% wszystkich mutacji *TP53* w porównaniu do mutacji zmiany sensu (62%), nonsensownych (14%), czy delecji (9,2%) (Wang and Sun 2017). W analizie insercji wykrytych w guzach

CMT_005_1, CMT_016_1 oraz CMT_046_1 odniesiono się do linii ludzkiego raka piersi MDA-MB-436 (gruczolakorak, typu bazalnego) (Cailleau *et al.* 1978, Kenny *et al.* 2007), która jednak oprócz mutacji w genie *TP53* posiada także mutacje w genach *BRCA1* (Elstrodt *et al.* 2006) oraz *RBI* (Hollestelle *et al.* 2010). Z tego względu trudno jednoznacznie określić, które cechy fenotypowe są bezpośrednim następstwem insercji w *TP53*.

Podsumowując, pomimo ograniczeń wynikających z liczebności próbek oraz braku kompleksowej analizy całogenomowej, uzyskane wyniki wskazują na obecność szeregu mutacji w genie *TP53* w guzach nowotworu gruczołu mlekowego suk, z których część ma swoje odpowiedniki w nowotworach ludzkich. Wyniki te potwierdzają potencjał psich raków sutka jako modelu translacyjnego do badań nad ludzkim rakiem piersi, zarówno w zakresie badań podstawowych, jak i oceny skuteczności nowych terapii przeciwnowotworowych. W przyszłości konieczne będzie poszerzenie analiz o: (i) ocenę poziomu białka p53 i jego interakcji z genami, których jest regulatorem (ii) analizę mutacji w innych genach kluczowych dla kancerogenezy w tkance piersiowej (np. *BRCA1/2*, *GATA3*, *CDH1*), oraz (iii) badania ekspresji genów regulowanych przez p53. Niemniej, analiza uzyskanych wyników w odniesieniu do typu mutacji wykazała interesujące korelacje, które omówiono w kolejnych rozdziałach. Wyniki te mogą stanowić podstawę do przeprowadzenia bardziej usystematyzowanych i zaawansowanych analiz, a także przyczynić się do opracowania psiego modelu eksperymentalnego do prowadzenia badań nad rakiem piersi u ludzi.

6.3 Charakterystyka *in vitro* badanych guzów w kontekście mutacji w genie *TP53* oraz potencjału translacyjnego.

W ramach niniejszej pracy opracowano zoptymalizowany protokół izolacji komórek z guzów pierwotnych, obejmujący precyzyjnie opisaną procedurę pobierania materiału biologicznego, określenie minimalnej ilości tkanki wymaganej do poszczególnych analiz oraz identyfikację potencjalnych punktów krytycznych procesu. Uzyskane linie komórkowe charakteryzowały się zróżnicowaną morfologią, fenotypem oraz dynamiką wzrostu. Każda z linii została szczegółowo scharakteryzowana pod względem morfologicznym i funkcjonalnym, a następnie zdeponowana w banku komórek, co stwarza możliwość ich ponownego wykorzystania w przyszłych badaniach

porównawczych. Opracowano również dedykowane protokoły analiz, obejmujące testy inwazyjności, migracji, chemiooporności oraz klonogeniczności.

Analiza inwazyjności wykazała znaczne zróżnicowanie pomiędzy badanymi guzami, które nie zawsze korelowało z wynikami testów migracji w warunkach 2D. Guzy wykazujące najwyższy potencjał migracyjny w modelu 2D nie zawsze wykazywały największą inwazyjność w modelu 3D, co można tłumaczyć odmiennymi mechanizmami ruchu komórek w zależności od środowiska hodowlanego (Duval *et al.* 2017). Zaobserwowano również istotną korelację pomiędzy inwazyjnością a typem histopatologicznym nowotworu, co, jak dotąd, nie było przedmiotem badań na modelu psim. Wszystkie analizowane przypadki raka łitego wykazywały inwazyjność, co sugeruje potencjalną zależność pomiędzy morfologią guza a jego zdolnością do naciekania. Każdy guz o III stopniu złośliwości histopatologicznej został zaklasyfikowany jako inwazyjny, co pozostaje zgodne z doniesieniami literaturowymi (Higgins *et al.* 2025). Istotnym spostrzeżeniem jest jednak fakt, że spośród 14 guzów o niskim stopniu złośliwości (I), aż 10 wykazywało cechy inwazyjności. Mechanizmy leżące u podłoża tego zjawiska pozostają nieznane i wymagają dalszych badań molekularnych.

Warto także podkreślić, że wszystkie guzy zawierające mutacje w genie *TP53* wykazały inwazyjność, co może wskazywać na związek pomiędzy dysfunkcją p53 a rozwojem fenotypu agresywnego. Dla potwierdzenia takiej zależności konieczne jest jednak zwiększenie liczby analizowanych przypadków i wykonanie badań funkcjonalnych.

W kontekście badań nad migracją komórek należy zaznaczyć, że brakuje doniesień naukowych dotyczących zależności pomiędzy migracją komórek nowotworów gruczołu mlekowego suk a typem histopatologicznym lub statusem genu *TP53*. Dotychczasowe publikacje koncentrują się głównie na migracji komórek nowotworowych w odpowiedzi na czynniki chemotaktyczne, takie jak chemokiny (np. czynnik pochodzący z komórek stromalnych 1, ang.: *Stromal cell-derived factor 1*; CXCL2) (Kudo *et al.* 2023).

Na podstawie danych literaturowych (Valdivia *et al.* 2021) dobrano zestaw chemioterapeutyków o różnym mechanizmie działania oraz znanych wartościach IC₅₀ (Tabela 27). W badaniach własnych stwierdzono jednak, że poszczególne linie komórkowe wykazywały odmienne profile wrażliwości na zastosowane dawki cytostatyków, w tym niektóre wykazywały całkowitą oporność na określone mechanizmy działania.

W interpretacji wyników należy uwzględnić ograniczenia metodologiczne zastosowanych testów żywotności, takie jak czas inkubacji, gęstość wysianych komórek, warunki hodowli (2D vs 3D) oraz różnice w metabolizmie komórek między poszczególnymi liniami. Dotychczas nie prowadzono tego typu analiz porównawczych z wykorzystaniem psich linii nowotworowych gruczołu mlekowego, dlatego uzyskane wyniki należy uznać za unikalne i pionierskie w skali badań translacyjnych.

Tabela 27. Zastosowane chemioterapeutyki wraz z mechanizmem działania i wartościami IC₅₀.

Chemioterapeutyk	Mechanizm działania	Zakresy IC₅₀ (wzg. literatury)
Doksorubicyna	Inhibitor topoizomerazy I i II	0,1 - 44 µM linia MCF-7 (Liu <i>et al.</i> 2008, Amata <i>et al.</i> 2020)
Karboplatyna	Tworzenie wiązań krzyżowych pomiędzy nićmi DNA	1,9 - 25 µM linie HCC1937 i EUFA423F z mutacjami w genach <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> (Clark <i>et al.</i> 2012)
Fosforan toceranibu	Inhibitor kinaz o działaniu antyangiogennym	5,90 -12,35 µM linia HCC (Qiao <i>et al.</i> 2023)

W niniejszej pracy nie określono wartości IC₅₀, a szeroki zakres stężeń w celu wyznaczenia krzywej odpowiedzi na cytostatyk określono jedynie dla jednego guza, a następnie wybrane stężenia, które znajdowały się na przegięciu krzywej stosowano do pozostałych próbek. Zastosowany test cytotoksyczności w modelu 2D w większym stopniu odzwierciedlał utratę zdolności komórek do adhezji, natomiast w modelu 3D, uszkodzenie i perforację błony komórkowej, jednak oba procesy ostatecznie prowadziły do śmierci komórek.

Jedynie linie komórkowe wywodzące się z guza CMT_020 na późnych pasażach hodowli wykazywały zdolność wzrostu w zawiesinie, podczas gdy pozostałe, po odklejeniu od podłoża, ulegały śmierci komórkowej. W przyszłości konieczne jest zastosowanie bardziej precyzyjnych testów żywotności, takich jak MTT, XTT, czy testy luminescencyjne (np. CellTiter-Glo, Promega), które nie wchodzą w interakcje z cytostatykami i umożliwiają dokładniejsze oszacowanie efektu cytotoksycznego. Niezbędne jest również indywidualne wyznaczenie wartości IC₅₀ dla każdej z linii komórkowych, co wymaga rozszerzenia zakresu testowanych stężeń leków oraz zwiększenia liczby powtórzeń biologicznych.

Interesującym spostrzeżeniem jest różnica w odpowiedzi na cytostatyki pomiędzy liniami CMT_020_1 i CMT_020_2, mimo występowania tej samej mutacji w genie *TP53*. Wynik ten wskazuje na możliwy wpływ dodatkowych czynników molekularnych, takich jak różnice w ekspresji genów regulatorowych, epigenetyce lub zmianach w mikrośrodowisku komórkowym, i sugeruje potrzebę dalszej charakterystyki porównawczej obu linii. Istotne znaczenie ma również porównanie odpowiedzi komórek w modelach 2D i 3D, ponieważ efektywność działania leków przeciwnowotworowych może znacząco różnić się w zależności od przestrzennej organizacji hodowli.

Odniesienie obecności określonej mutacji w *TP53* do różnic w odpowiedzi na leki wymaga pogłębionej analizy konkretnych mechanizmów molekularnych. Porównując linie o różnych mutacjach w genie *TP53*, zaobserwowano istotne różnice w odpowiedzi na poszczególne cytostatyki. Przykładowo, dla guza CMT_015_1 skuteczniejszym lekiem okazała się karboplatyna niż doksorubicyna, natomiast dla CMT_020_2 wyższą efektywność wykazywał fosforan toceranibu. W modelu 3D najlepsze efekty zaobserwowano po zastosowaniu karboplatyny, choć molekularne podłoże tej różnicy wymaga dalszych badań. W analizie opartej na statusie *TP53* zaobserwowano, że sferoidy pochodzące z guzów z mutacją były mniej odporne na stosowane cytostatyki niż komórki z allelem typu dzikiego (*WTp53*). Ze względu na ograniczoną moc statystyczną i niewystarczającą liczebność próbek, wynik ten należy traktować jako obserwację wstępną wymagającą potwierdzenia w szerszym badaniu.

Uzyskane dane stanowią wstępny screening, który wskazuje na konieczność:

- zwiększenia liczby testowanych stężeń i powtórzeń biologicznych,
- doboru uniwersalnego testu żywotności odpowiedniego dla modeli 2D i 3D,
- oceny stabilności fenotypu i genotypu linii komórkowych w kolejnych pasażach,
- zestawienia wyników *in vitro* z danymi klinicznymi pacjentek (suk),
- określenia ekspresji wybranych markerów molekularnych, takich jak HER-2, ER, PR czy Ki-67.

Realizacja powyższych zadań umożliwi stworzenie bazy dobrze scharakteryzowanych psich linii komórkowych jako modeli dla poszczególnych typów nowotworów, analogicznie do koncepcji przyjętej w przypadku ludzkich linii nowotworowych (Barretina *et al.* 2012).

Pozostałe analizy nie wykazały istotności statystycznej, co może wynikać z dużego zróżnicowanych uzyskanych danych, które utrudnia ich bezpośrednie porównanie.

W kontekście medycyny translacyjnej szczególnie interesujące są doniesienia wskazujące, że psie sferoidy mają wysoką zgodność odpowiedzi na cytostatyki stosowane w leczeniu raka piersi u ludzi, a sposób przechowywania komórek ma ograniczony wpływ na ich wrażliwość na leki (Raffo-Romero *et al.* 2023). Wyniki te potwierdzają potencjał modeli psich jako wartościowych narzędzi w badaniach przedklinicznych. Dodatkowo, opracowanie modeli 3D z wykorzystaniem macierzy zewnątrzkomórkowej (ang.: *Extracellular matrix*; ECM) może jeszcze lepiej odwzorowywać warunki panujące w mikrośrodku guza *in vivo*, co wykazano w licznych badaniach. Dowiedziono bowiem, że zarówno ekspresja mikroRNA, jak i obecność hipoksji wpływają na różnice w odpowiedzi komórek na chemioterapeutyki w modelach 2D i 3D (Osaki *et al.* 2023, Reynolds *et al.* 2017, Tevis *et al.* 2017, Januškevičienė and Petrikaitė 2024).

Warto również podkreślić, że mutacje *TP53* występujące w liniach ludzkich raka piersi (np. R280K, arginina→lizyna) mogą wiązać się z różnicami w odpowiedzi na chemioterapię, co dodatkowo uzasadnia konieczność porównania wyników uzyskanych dla psich linii z danymi literaturowymi i klinicznymi z badaniami translacyjnymi (Saunus *et al.* 2018). Co więcej, oporność na chemioterapię może wynikać z zaburzeń w ekspresji czynników transkrypcyjnych, takich jak Sox4 (ang.: *SRY-Box Transcription Factor 4*), którego nadekspresja wiązana jest z opornością na cisplatynę (Hu *et al.* 2024).

Badania nad psimi liniami komórkowymi mogą w przyszłości znacząco przyczynić się do identyfikacji podobnych mechanizmów molekularnych.

Należy również zwrócić uwagę na ograniczenia niniejszej pracy. Analiza klonogeniczności nie przyniosła jednoznacznych wyników, co mogło wynikać zarówno z różnic w kondycji komórek, jak i ograniczonej liczby prób. W przyszłości wskazane jest zoptymalizowanie stosowanych protokołów oraz zastosowanie dodatkowych metod badawczych, takich jak western blot, czy cytometria przepływowa w celu oceny poziomu białka p53, wpływu cytostatyków na cykl komórkowy, czy rozszerzenie panelu badań molekularnych w kierunku metod bardziej dostosowanych do specyfiki badanych próbek.

6.4 Ekspresja wybranych genów w guzach gruczołu mlekowego suk w odniesieniu do mutacji w genie *TP53* i porównanie z danymi dotyczącymi raka piersi u ludzi

Do analizy ekspresji genów wybrano dziesięć genów z panelu PAM50: *ESR1*, *MAPT*, *FOXA1*, *MLPH*, *SLC39A6*, *MYBL2*, *CCNE1*, *PHGDH*, *CDC20*, oraz *CDH3*. Było to pięć genów o najniższej oraz pięć o najwyższej ekspresji w guzach z mutacją w genie *TP53* u ludzi. W pierwotnym panelu do grupy genów o niskiej ekspresji zaliczany jest także *NAT1* (N-acetylotransferaza 1), jednak gen ten nie występuje u psów (Trepanier *et al.* 1997). Z tego względu w niniejszej analizie uwzględniono kolejny gen z listy, *SLC39A6*. Dodatkowo, ze względu na główny cel pracy, do badań włączono również gen *TP53* oraz gen *MDM2*, jego negatywny regulator.

Do analizy qPCR wykorzystano RNA wyizolowane z tkanek nowotworowych. W przyszłości wskazane byłoby rozszerzenie badań o materiał pochodzący zarówno z komórek nowotworowych hodowanych *in vitro*, jak i z tkanek kontrolnych. Takie podejście umożliwiłoby identyfikację potencjalnych markerów prognostycznych i predykcyjnych, a także weryfikację obserwowanych trendów ekspresji.

W niniejszej pracy dostępne były w większości przypadków tkanki kontrolne, niezmienione nowotworowo, jednak wyprowadzenie aktywnie dzielących się komórek linii prawidłowej okazało się wyzwaniem technicznym, którego nie udało się zrealizować w trakcie badań. Problemem pozostaje również opracowanie odpowiedniego protokołu pobierania fragmentów tkanek kontrolnych, ponieważ konieczne jest jednoznaczne ustalenie optymalnego marginesu od guza pierwotnego oraz określenie, która część tkanki powinna być pobierana do analiz.

Otrzymane wyniki wskazują, że w guzach obu typów (zarówno *MUTp53*, jak i *WTp53*) ilość transkryptu *TP53* była niższa niż transkryptu *MDM2*. W literaturze badano, czy sama ekspresja *TP53* koreluje z typem histopatologicznym i/lub stopniem złośliwości, jednak takiej zależności nie stwierdzono (Oliveira *et al.* 2017). Zależności tego typu wykazano natomiast dla innych genów.

Analiza ilości poszczególnych transkryptów ujawniła następujące zależności:

- gen *ESR1* (koduje receptor estrogenowy) - wykazano istotnie niższą ekspresję w guzach z mutacją *TP53* w porównaniu do guzów *WTp53*. Ponadto, ekspresja *ESR1* była najwyższa w guzach o najniższym stopniu złośliwości (I), a najniższa w guzach III stopnia;
- gen *MLPH* (koduje białko melanosominy uczestniczącą w transporcie melanosomów w melanocytach; pigmentacja sierści) - wykazano obniżoną ekspresję w guzach *MUTp53* względem *WTp53*. Podobnie jak w przypadku genu *ESR1*, najwyższy poziom transkryptu obserwowano w guzach I, a najniższą w III;
- gen *MYBL2* (koduje czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny za regulację progresji cyklu komórkowego) - poziom transkryptu był istotnie wyższy w guzach *MUTp53*. Najwyższy poziom transkryptu stwierdzono w guzach III, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami wskazującymi na związek tego genu ze zdolnością nowotworów do przerzutowania u suk (Klopfleisch *et al.* 2010);
- gen *FOXAI* (ang.: *Forkhead Box AI*) - czynnik transkrypcyjny - najwyższy poziom ekspresji odnotowano w guzach I i III, natomiast niższą w guzach II;
- gen *CDH3* (ang.: *P-cadherin*) - gen białka adhezyjnego; kadheryny - poziom ekspresji różnił się w zależności od stopnia złośliwości guzów, osiągając najniższe wartości w guzach II a najwyższe w guzach III.

W przypadku pozostałych analizowanych genów (*TP53*, *MDM2*, *MAPT*, *FOXAI*, *SLC39A6*, *CCNE1*, *PHGDH*, *CDC20*, *CDH3*) nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w poziomie ich ekspresji pomiędzy guzami zawierającymi mutacje w genie *TP53* (*MUTp53*) a guzami z dzikim typem tego genu (*WTp53*).

Zestawiając uzyskane wyniki z danymi literaturowymi dotyczącymi raka piersi u ludzi, należy zauważyć, że choć istotność statystyczną potwierdzono jedynie dla genów *ESR1*, *MLPH* i *MYBL2*, ogólne trendy ekspresji ujętych w tym badaniu genów są zbliżone do obserwowanych w badaniach klinicznych (Sorlie *et al.* 2003).

W guzach *MUTp53* obserwowano podwyższoną ekspresję genów: *MDM2*, *ESR1*, *MAPT*, *FOXAI*, *MLPH*, *SLC39A6* natomiast obniżoną ekspresję w genach *MYBL2*, *CCNE1*, *PHGDH*, *CDC20*.

Szczególnie istotna wydaje się rola genu *MYBL2*, którego zwiększona ekspresja została w tej pracy powiązana z wyższym stopniem złośliwości nowotworu, co koresponduje z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi jego udziału w procesie

przerzutowania (Klopfleisch *et al.* 2010). Wyniki te wskazują na możliwość wykorzystania *MYBL2* jako potencjalnego markera prognostycznego w nowotworach gruczołu mlekowego u suk, umożliwiające określenie ryzyka wystąpienia przerzutów.

Zbieżność trendów w ekspresji badanych genów u psów i u ludzi mogą świadczyć o wysokim potencjale translacyjnym modelu psiego raka gruczołu mlekowego w badaniach nad rakiem piersi u ludzi. Dalsze badania, obejmujące większą liczbę próbek, materiał kontrolny oraz dane kliniczne, są niezbędne, aby zweryfikować te obserwacje i stworzyć podstawy dla opracowania markerów prognostycznych i predykcyjnych (Diniz-Goncalves *et al.* 2023).

6.5 Ocena modelu translacyjnego

Badania przedstawione w niniejszej pracy koncentrowały się na analizie mutacji w genie *TP53* oraz ocenie ich wpływu na właściwości biologiczne komórek nowotworowych gruczołu mlekowego suk *in vitro*, jak również na wybrane parametry kliniczne obserwowane u badanych zwierząt. Pomimo że nie wszystkie zaplanowane analizy udało się zrealizować, zgromadzony materiał badawczy oraz przeprowadzone eksperymenty stanowią solidną podstawę do planowania kolejnych etapów projektu, obejmujących rozszerzenie badań o dodatkowe próby, pogłębione analizy molekularne oraz walidację uzyskanych wyników.

Otrzymane wyniki pozwoliły na sformułowanie nowych hipotez badawczych oraz poszerzyły wiedzę na temat możliwości wykorzystania psa jako modelu translacyjnego w badaniach nad rakiem piersi u ludzi. Zastosowane podejście, łączące aspekty epidemiologiczne, analizy genetyczne, molekularne i funkcjonalne z obserwacjami klinicznymi, umożliwiło uchwycenie złożonych zależności pomiędzy mutacjami w genie *TP53*, ekspresją genów i fenotypem komórek nowotworowych.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy stanowią punkt wyjścia do dalszych badań porównawczych oraz eksperymentów rozszerzających analizę o kolejne geny, markery molekularne i modele hodowlane (2D, 3D, organoidy). Zabezpieczony materiał biologiczny oraz zdeponowane linie komórkowe umożliwiają kontynuację prac w kierunku opracowania stabilnego, funkcjonalnego modelu psiego raka gruczołu mlekowego o potencjale translacyjnym.

Warto podkreślić, że choć przedstawione badania stanowią dopiero pierwszy etap w kierunku pełnej walidacji tego modelu, uzyskane dane przyczyniają się do pogłębienia

zrozumienia podobieństw i różnic pomiędzy nowotworami gruczołu mlekowego u suk a rakiem piersi u kobiet. Niniejsza praca wyznacza ramy metodologiczne i kierunek dalszych badań, które mogą posłużyć do opracowania kompleksowego podejścia do oceny i wykorzystania psiego modelu w onkologii porównawczej (Ke *et al.* 2024, Gherman *et al.* 2024, Kwon *et al.* 2023, Frenel and Nguyen 2023, Raffo-Romero *et al.* 2023).

W świetle tych danych niniejsze badania wpisują się w aktualny nurt rozwoju onkologii porównawczej, stanowiąc ważny krok w kierunku wykorzystania modeli psich w badaniach nad patogenezą i terapią raka piersi.

7 *Wnioski końcowe*

- Mutacje w genie *TP53* w nowotworach gruczołu mlekowego u suk (w badanej kohorcie) występują z częstością około 15%, a więc rzadziej niż w ludzkim raku piersi (ok. 30%), jednak ich obecność wiąże się z podobnymi zmianami w dynamice wzrostu i fenotypie komórek nowotworowych (np. proliferacja, inwazyjność). Stwierdzono istotną korelację pomiędzy obecnością mutacji w genie *TP53* a typem histopatologicznym guza ($p = 0,0121$) oraz stopniem złośliwości ($p=0,0015$).
- Profil ekspresji wybranych genów z panelu opartego na PAM 50 (*MYBL2*, *CCNE1*, *PHGDH*, *CDC20*, *CDH3*, *ESR1*, *MAPT*, *FOXA1*, *MLPH*, *SLC39A6*) u suk odzwierciedla kluczowe wzorce obserwowane w ludzkim raku piersi. Wykazano istotne różnice ekspresji genów *ESR1*, *MLPH*, *MYBL2* w zależności od statusu genu *TP53* oraz w zależności od stopnia złośliwości nowotworu. Otrzymane dane potwierdzają, że ekspresja wybranych genów (m.in. *ESR1*, *FOXA1*, *MLPH*, *MYBL2*, *CDH3*) może stanowić cenny wskaźnik prognostyczny i predykcyjny również u psów.
- Stopień złośliwości histopatologicznej guzów koreluje z parametrami proliferacyjnymi oraz tendencją do większej chemiooporności, co potwierdzono zarówno na poziomie ekspresji genów proliferacyjnych (*MYBL2*), jak i w testach *in vitro* - guzy o wyższej złośliwości charakteryzowały się zwiększoną aktywnością proliferacyjną i mniejszą wrażliwością na cytostatyki.
- Zastosowane chemoterapeutyki (doksorubicyna, karboplatyna oraz fosforan toceranibu), wykazały zróżnicowaną skuteczność w zależności od typu histopatologicznego guza oraz, w niektórych przypadkach, statusu genu *TP53*. Zaobserwowane różnice wskazują na możliwość istnienia zróżnicowanych mechanizmów odpowiedzi na leczenie w zależności od molekularnego podtypu nowotworu.
- Różnice w odpowiedzi komórek na chemioterapeutyki w modelu 2D (najsukuteczniejsza doksorubicyna) oraz 3D (najsukuteczniejsza karboplatyna), mogą wynikać z odmiennych warunków mikrośrodowiska sferoidów (ograniczona dyfuzja, hipoksja, ECM) wpływających na penetrację i skuteczność leków.

- Komórki pochodzące z guzów z mutacją *TP53* wykazywały tendencję do mniejszej oporności na działanie cytostatyków, co sugeruje, że status genu *TP53* może modulować odpowiedź na chemioterapię. Wynik ten ma jednak charakter eksploracyjny i wymaga potwierdzenia na większej liczbie próbek w celu określenia znaczenia biologicznego obserwowanego efektu.
- Model nowotworów gruczołu mlekowego suk posiada istotną wartość translacyjną w badaniach nad rakiem piersi u ludzi. Opracowane i scharakteryzowane linie komórkowe, wraz z uzyskanymi danymi histopatologicznymi i molekularnymi, umożliwiają lepsze zrozumienie mechanizmów inwazyjności, proliferacji oraz oporności lekowej. Przy dalszej walidacji i rozszerzeniu bazy danych model ten może stanowić wartościowe narzędzie w badaniach przedklinicznych ukierunkowanych na rozwój terapii nowotworów.

8 Bibliografia

1. Abadie, J., F. Nguyen, D. Loussouarn, L. Peña, A. Gama, N. Rieder, A. Belousov, I. Bemelmans, L. Jaillardon, C. Ibisch and M. Campone (2018). "Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance." Breast Cancer Res Treat **167**(2): 459-468.
2. Abdelmegeed, S. M. and S. Mohammed (2018). "Canine mammary tumors as a model for human disease." Oncol Lett **15**(6): 8195-8205.
3. Adorno, M., M. Cordenonsi, M. Montagner, S. Dupont, C. Wong, B. Hann, A. Solari, S. Bobisse, M. B. Rondina, V. Guzzardo, A. R. Parenti, A. Rosato, S. Biciato, A. Balmain and S. Piccolo (2009). "A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis." Cell **137**(1): 87-98.
4. Ali, A., A. S. Shah and A. Ahmad (2014). "Gain-of-function of mutant p53: mutant p53 enhances cancer progression by inhibiting KLF17 expression in invasive breast carcinoma cells." Cancer Lett **354**(1): 87-96.
5. Alsaihati, B. A., K. L. Ho, J. Watson, Y. Feng, T. Wang, K. K. Dobbin and S. Zhao (2021). "Canine tumor mutational burden is correlated with TP53 mutation across tumor types and breeds." Nat Commun **12**(1): 4670.
6. Alvarado-Ortiz, E., K. G. de la Cruz-Lopez, J. Becerril-Rico, M. A. Sarabia-Sanchez, E. Ortiz-Sanchez and A. Garcia-Carranca (2020). "Mutant p53 Gain-of-Function: Role in Cancer Development, Progression, and Therapeutic Approaches." Front Cell Dev Biol **8**: 607670.
7. Amata, E., M. Dichiara, D. Gentile, A. Marrazzo, R. Turnaturi, E. Arena, A. La Mantia, B. R. Tomasello, R. Acquaviva, C. Di Giacomo, A. Rescifina and O. Prezzavento (2020). "Sigma Receptor Ligands Carrying a Nitric Oxide Donor Nitrate Moiety: Synthesis, In Silico, and Biological Evaluation." ACS Medicinal Chemistry Letters **11**(5): 889-894.
8. Arenas, C., L. Peña, J. L. Granados-Soler and M. D. Pérez-Alenza (2016). "Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study." Vet Rec **179**(5): 125.

9. Asl, E. R., D. Rostamzadeh, P. H. G. Duijf, S. Mafi, B. Mansoori, S. Barati, W. C. Cho and B. Mansoori (2023). "Mutant P53 in the formation and progression of the tumor microenvironment: Friend or foe." Life Sci **315**: 121361.
10. Balmain, A. (2002). "Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models." Cell **108**(2): 145-152.
11. Barretina, J., G. Caponigro, N. Stransky, K. Venkatesan, A. A. Margolin, S. Kim, C. J. Wilson, J. Lehár, G. V. Kryukov, D. Sonkin, A. Reddy, M. Liu, L. Murray, M. F. Berger, J. E. Monahan, P. ... R. Schlegel and L. A. Garraway (2012). "The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity." *Nature* **483**(7391): 603-607.
12. Baugh, E. H., H. Ke, A. J. Levine, R. A. Bonneau and C. S. Chan (2018). "Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers?" Cell Death Differ **25**(1): 154-160.
13. Beumer, I., A. Witteveen, L. Delahaye, D. Wehkamp, M. Snel, C. Dreezen, J. Zheng, A. Floore, G. Brink, B. Chan, S. Linn, R. Bernards, L. van 't Veer and A. Glas (2016). "Equivalence of MammaPrint array types in clinical trials and diagnostics." Breast Cancer Res Treat **156**(2): 279-287.
14. Bi, J., K. W. Thiel, J. M. Litman, Y. Zhang, E. J. Devor, A. M. Newton, M. J. Schnieders, J. Gonzalez Bosquet and K. K. Leslie (2020). "Characterization of a TP53 Somatic Variant of Unknown Function From an Ovarian Cancer Patient Using Organoid Culture and Computational Modeling." Clin Obstet Gynecol **63**(1): 109-119.
15. Boettcher, S., P. G. Miller, R. Sharma, M. McConkey, M. Leventhal, A. V. Krivtsov, A. O. Giacomelli, W. Wong, J. Kim, S. Chao, K. J. Kurppa, X. Yang, K. Milenkovic, F. Piccioni, D. E. Root, F. G. Rücker, Y. Flamand, D. Neuberg, R. C. Lindsley, P. A. Jänne, W. C. Hahn, T. Jacks, H. Döhner, S. A. Armstrong and B. L. Ebert (2019). "A dominant-negative effect drives selection of TP53 missense mutations in myeloid malignancies." Science **365**(6453): 599-604.
16. Borge, K. S., A. L. Borresen-Dale and F. Lingaas (2011). "Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour." Vet Comp Oncol **9**(4): 241-250.
17. Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and

- mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." CA Cancer J Clin **68**(6): 394-424.
18. Breslin, S. and L. O'Driscoll (2016). "The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance." Oncotarget **7**(29): 45745-45756.
 19. Bronson, R. T. (1982). "Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds." Am J Vet Res **43**(11): 2057-2059.
 20. Brunetti, B., B. Bacci, C. Angeli, C. Benazzi and L. V. Muscatello (2020). "p53, ER, and Ki67 Expression in Canine Mammary Carcinomas and Correlation With Pathological Variables and Prognosis." Veterinary Pathology **58**(2): 325-331.
 21. Bullock, A. N., J. Henckel and A. R. Fersht (2000). "Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy." Oncogene **19**(10): 1245-1256.
 22. Bykov, V. J. N., S. E. Eriksson, J. Bianchi and K. G. Wiman (2018). "Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy." Nat Rev Cancer **18**(2): 89-102.
 23. Cailleau, R., M. Olivé and Q. V. Cruciger (1978). "Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization." In Vitro **14**(11): 911-915.
 24. Calapre, L., T. Giardina, A. B. Beasley, A. L. Reid, C. Stewart, B. Amanuel, T. M. Meniawy and E. S. Gray (2023). "Identification of TP53 mutations in circulating tumour DNA in high grade serous ovarian carcinoma using next generation sequencing technologies." Sci Rep **13**(1): 278.
 25. Camacho, C., G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer and T. L. Madden (2009). "BLAST+: architecture and applications." BMC Bioinformatics **10**(1): 421.
 26. Chan, W. M., W. Y. Siu, A. Lau and R. Y. Poon (2004). "How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer?" Mol Cell Biol **24**(8): 3536-3551.
 27. Chang, C., D. T. Simmons, M. A. Martin and P. T. Mora (1979). "Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells." J Virol **31**(2): 463-471.
 28. Chang, C. J., C. H. Chao, W. Xia, J. Y. Yang, Y. Xiong, C. W. Li, W. H. Yu, S. K. Rehman, J. L. Hsu, H. H. Lee, M. Liu, C. T. Chen, D. Yu and M. C. Hung (2011). "p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs." Nat Cell Biol **13**(3): 317-323.

29. Chao, C. C. (2015). "Mechanisms of p53 degradation." Clin Chim Acta **438**: 139-147.
30. Chiang, M. C., C. Y. Huang, C. Y. Wu and C. Y. Tsai (2021). "Analysis of a Fault-Tolerant Framework for Reliability Prediction of Service-Oriented Architecture Systems." IEEE Transactions on Reliability **70**(1): 13-48.
31. Chu, L. L., G. R. Rutteman, J. M. Kong, M. Ghahremani, M. Schmeing, W. Misdorp, E. van Garderen and J. Pelletier (1998). "Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia." Breast Cancer Res Treat **50**(1): 11-25.
32. Ciuba, A. (2024). "Breast cancer in Poland – the urgent need for effective prevention." Family Medicine & Primary Care Review **26**(1): 107-111.
33. Ciuba, A., K. Wnuk, A. Nitsch-Osuch and M. Kulpa (2022). "Health Care Accessibility and Breast Cancer Mortality in Europe." Int J Environ Res Public Health **19**(20).
34. Clark, C. C., J. N. Weitzel and T. R. O'Connor (2012). "Enhancement of synthetic lethality via combinations of ABT-888, a PARP inhibitor, and carboplatin in vitro and in vivo using BRCA1 and BRCA2 isogenic models." Mol Cancer Ther **11**(9): 1948-1958.
35. Cohen, D., J. S. Reif, R. S. Brodey and H. Keiser (1974). "Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital." Cancer Res **34**(11): 2859-2868.
36. Cooks, T., I. S. Pateras, L. M. Jenkins, K. M. Patel, A. I. Robles, J. Morris, T. Forsheew, E. Appella, V. G. Gorgoulis and C. C. Harris (2018). "Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246." Nat Commun **9**(1): 771.
37. da Silva, E. M. G., T. R. Dos Santos and M. J. B. Silva (2023). "Identifying the Risk Factors for Malignant Mammary Tumors in Dogs: A Retrospective Study." Vet Sci **10**(10).
38. Datta, A., P. Das, S. Dey, S. Ghuwalewala, D. Ghatak, S. K. Alam, R. Chatterjee and S. Roychoudhury (2019). "Genome-Wide Small RNA Sequencing Identifies MicroRNAs Deregulated in Non-Small Cell Lung Carcinoma Harboring Gain-of-Function Mutant p53." Genes (Basel) **10**(11).
39. Dearth, L. R., H. Qian, T. Wang, T. E. Baroni, J. Zeng, S. W. Chen, S. Y. Yi and R. K. Brachmann (2007). "Inactive full-length p53 mutants lacking dominant

- wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers." Carcinogenesis **28**(2): 289-298.
40. Devor, E. J., J. Gonzalez-Bosquet, A. Warriar, H. D. Reyes, N. V. Ibik, B. M. Schickling, A. Newton, M. J. Goodheart and K. K. Leslie (2017). "p53 mutation status is a primary determinant of placenta-specific protein 1 expression in serous ovarian cancers." Int J Oncol **50**(5): 1721-1728.
 41. Dias-Pereira, P. (2022). "Morbidity and mortality in elderly dogs - a model for human aging." BMC Vet Res **18**(1): 457.
 42. Diniz-Goncalves, G. S., A. Hielm-Bjorkman, V. B. da Silva, L. G. R. Ribeiro, C. H. da Costa Vieira-Filho, L. P. Silva, S. M. Barrouin-Melo, G. D. Cassali, K. A. Damasceno and A. Estrela-Lima (2023). "GATA-3 expression and its correlation with prognostic factors and survival in canine mammary tumors." Front Vet Sci **10**: 1179808.
 43. Dobson, J. M., S. Samuel, H. Milstein, K. Rogers and J. L. Wood (2002). "Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs." J Small Anim Pract **43**(6): 240-246.
 44. Dolka, I., M. Czopowicz, D. Stopka, A. Wojtkowska, I. Kaszak and R. Sapierzynski (2024). "Risk factor analysis and clinicopathological characteristics of female dogs with mammary tumours from a single-center retrospective study in Poland." Sci Rep **14**(1): 5569.
 45. Dong, P., M. Karaayvaz, N. Jia, M. Kaneuchi, J. Hamada, H. Watari, S. Sudo, J. Ju and N. Sakuragi (2013). "Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis." Oncogene **32**(27): 3286-3295.
 46. Duffy, M. J., M. Tang, S. Rajaram, S. O'Grady and J. Crown (2022). "Targeting Mutant p53 for Cancer Treatment: Moving Closer to Clinical Use?" Cancers (Basel) **14**(18).
 47. Duval, K., H. Grover, L. H. Han, Y. Mou, A. F. Pegoraro, J. Fredberg and Z. Chen (2017). "Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture." Physiology (Bethesda) **32**(4): 266-277.
 48. Ellis, M. J., V. J. Suman, J. Hoog, L. Lin, J. Snider, A. Prat, J. S. Parker, J. Luo, K. DeSchryver, D. C. Allred, L. J. Esserman, G. W. Unzeitig, J. Margenthaler, G. V. Babiera, P. K. Marcom, J. M. Guenther, M. A. Watson, M. Leitch, K. Hunt and J. A. Olson (2011). "Randomized phase II neoadjuvant comparison between

- letrozole, anastrozole, and exemestane for postmenopausal women with estrogen receptor-rich stage 2 to 3 breast cancer: clinical and biomarker outcomes and predictive value of the baseline PAM50-based intrinsic subtype--ACOSOG Z1031." J Clin Oncol **29**(17): 2342-2349.
49. Elstrodt, F., A. Hollestelle, J. H. A. Nagel, M. Gorin, M. Wasielewski, A. van den Ouweland, S. D. Merajver, S. P. Ethier and M. Schutte (2006). "BRCA1 Mutation Analysis of 41 Human Breast Cancer Cell Lines Reveals Three New Deleterious Mutants." Cancer Research **66**(1): 41-45.
 50. Filippo, D., L. Guardone, V. Listorti and R. Elisabetta (2024). "Microbiome in cancer: A comparative analysis between humans and dogs." Vet J **305**: 106145.
 51. Finocchiaro, L. M. E. and G. C. Glikin (2017). "Recent clinical trials of cancer immunogene therapy in companion animals." World J Exp Med **7**(2): 42-48.
 52. Frenel, J. S. and F. Nguyen (2023). "Mammary carcinoma: Comparative oncology between small animals and humans-New therapeutic tools." Reprod Domest Anim **58 Suppl 2**: 102-108.
 53. Fowles, J. S., K. C. Brown, A. M. Hess, D. L. Duval and D. L. Gustafson (2016). "Intra- and interspecies gene expression models for predicting drug response in canine osteosarcoma." BMC Bioinformatics **17**(1): 93.
 54. Gadea, G., M. de Toledo, C. Anguille and P. Roux (2007). "Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices." J Cell Biol **178**(1): 23-30.
 55. Gardner, H. L., J. M. Fenger and C. A. London (2016). "Dogs as a Model for Cancer." Annu Rev Anim Biosci **4**: 199-222.
 56. Gherman, L. M., P. Chiroi, A. Nutu, C. Bica and I. Berindan-Neagoe (2024). "Profiling canine mammary tumors: A potential model for studying human breast cancer." Vet J **303**: 106055.
 57. Gherman, M. L., O. Zanoaga, L. Budisan, L. Raduly and I. Berindan-Neagoe (2023). "Doxorubicin as a Potential Treatment Option in Canine Mammary Tumors." Vet Sci **10**(11).
 58. Godfrey, J. D., J. P. Morton, A. Wilczynska, O. J. Sansom and M. D. Bushell (2018). "MiR-142-3p is downregulated in aggressive p53 mutant mouse models of pancreatic ductal adenocarcinoma by hypermethylation of its locus." Cell Death Dis **9**(6): 644.

59. Goldschmidt, M., L. Pena, R. Rasotto and V. Zappulli (2011). "Classification and grading of canine mammary tumors." Vet Pathol **48**(1): 117-131.
60. Goldschmidt, M. H., L. Peña and V. Zappulli (2016). Tumors of the Mammary Gland. Tumors in Domestic Animals: 723-765.
61. Goncalves, R. and R. Bose (2013). "Using multigene tests to select treatment for early-stage breast cancer." J Natl Compr Canc Netw **11**(2): 174-182; quiz 182.
62. Gordon, I., M. Paoloni, C. Mazcko and C. Khanna (2009). "The Comparative Oncology Trials Consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway." PLoS Med **6**(10): e1000161.
63. Gray, M., J. Meehan, C. Martinez-Perez, C. Kay, A. K. Turnbull, L. R. Morrison, L. Y. Pang and D. Argyle (2020). "Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer." Front Oncol **10**: 617.
64. Guil-Luna, S., R. Sanchez-Cespedes, A. Rivas Crespo, M. Dolores Fernandez, J. A. Fernandez Sarmiento, A. Rodriguez-Ariza and Y. Millan (2023). "Analysis of cell-free DNA concentration, fragmentation patterns and TP53 gene expression in mammary tumor-bearing dogs: A pilot study." Front Vet Sci **10**: 1157878.
65. Guo, F. and Y. Zheng (2004). "Rho family GTPases cooperate with p53 deletion to promote primary mouse embryonic fibroblast cell invasion." Oncogene **23**(33): 5577-5585.
66. Hanahan, D. (2022). "Hallmarks of Cancer: New Dimensions." Cancer Discov **12**(1): 31-46.
67. Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
68. Hanel, W., N. Marchenko, S. Xu, S. Xiaofeng Yu, W. Weng and U. Moll (2013). "Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis." Cell Death & Differentiation **20**(7): 898-909.
69. Higgins, K. S., A. J. Yu and C. T. Gomillion "3D In Vitro Models of Breast Cancer: Current Challenges and Future Prospects Toward Recapitulating the Microenvironment and Mimicking Key Processes." Advanced Biology **n/a**(n/a): e00846.
70. Holcomb, N., A. Harrington, H. Pu, B. Halilovic, N. Shelman, S. Zhang, C. Sears, T. Armstrong, B. Shelton, L. Corum and J. D'Orazio (2025). "Characterization of p53 p.T253I as a pathogenic mutation underlying Li-Fraumeni Syndrome." medRxiv: 2025.2002.2026.25322616.

71. Hollestelle, A., J. H. Nagel, M. Smid, S. Lam, F. Elstrodt, M. Wasielewski, S. S. Ng, P. J. French, J. K. Peeters, M. J. Rozendaal, M. Riaz, D. G. Koopman, T. L. Ten Hagen, B. H. de Leeuw, E. C. Zwarthoff, A. Teunisse, P. J. van der Spek, J. G. Klijn, W. N. Dinjens, S. P. Ethier, H. Clevers, A. G. Jochemsen, M. A. den Bakker, J. A. Foekens, J. W. Martens and M. Schutte (2010). "Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines." Breast Cancer Res Treat **121**(1): 53-64.
72. Hu, M., J. Li, Y. Fu, E. Xu, D. Li, S. Huang, D. Tong, S. Jin, T. Guan and Y. Liu (2024). "Establishment and characterization of cisplatin-resistant cell lines from canine mammary gland tumors." Theriogenology **217**: 103-112.
73. Ignatoski, K. M. and S. P. Ethier (1999). "Constitutive activation of pp125fak in newly isolated human breast cancer cell lines." Breast Cancer Res Treat **54**(2): 173-182.
74. Inglebert, M., M. Dettwiler, K. Hahn, A. Letko, C. Drogemuller, J. Doench, A. Brown, Y. Memari, H. R. Davies, A. Degasperi, S. Nik-Zainal and S. Rottenberg (2022). "A living biobank of canine mammary tumor organoids as a comparative model for human breast cancer." Sci Rep **12**(1): 18051.
75. Januškevičienė, I. and V. Petrikaitė (2024). "Exploring doxorubicin transport in 2D and 3D models of MDA-MB-231 sublines: impact of hypoxia and cellular heterogeneity on doxorubicin accumulation in cells." Am J Cancer Res **14**(7): 3584-3599.
76. Ji, L., J. Xu, J. Liu, A. Amjad, K. Zhang, Q. Liu, L. Zhou, J. Xiao and X. Li (2015). "Mutant p53 promotes tumor cell malignancy by both positive and negative regulation of the transforming growth factor β (TGF- β) pathway." J Biol Chem **290**(18): 11729-11740.
77. Ju, Q., L. Zhao, J. Gao, L. Zhou, Y. Xu, Y. Sun and X. Zhao (2019). "Mutant p53 increases exosome-mediated transfer of miR-21-3p and miR-769-3p to promote pulmonary metastasis." Chin J Cancer Res **31**(3): 533-546.
78. Jurutha, J., Y. Piyasanti, K. Sritabtim, S. Chaipipat, K. Siripattaraprat, S. Prukudom, U. Jermnak, R. Sinsiri, K. Wongsupabut, C. Wongsali, N. Niyatiwatchanchai, W. Sutthiprapa, N. Swainson and W. Supsavhad (2025). "Establishment and molecular characterization of novel luminal A and luminal B canine mammary cancer cell lines for comparative oncology." Vet World **18**(6): 1725-1740.

79. Kasthuber, E. R. and S. W. Lowe (2017). "Putting p53 in Context." Cell **170**(6): 1062-1078.
80. Ke, C. H., C. N. Lin and C. S. Lin (2024). "Hormone, Targeted, and Combinational Therapies for Breast Cancers: From Humans to Dogs." Int J Mol Sci **25**(2).
81. Kennedy, M. C. and S. W. Lowe (2022). "Mutant p53: it's not all one and the same." Cell Death Differ **29**(5): 983-987.
82. Kenny, P. A., G. Y. Lee, C. A. Myers, R. M. Neve, J. R. Semeiks, P. T. Spellman, K. Lorenz, E. H. Lee, M. H. Barcellos-Hoff, O. W. Petersen, J. W. Gray and M. J. Bissell (2007). "The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression." Molecular Oncology **1**(1): 84-96.
83. Kitayner, M., H. Rozenberg, N. Kessler, D. Rabinovich, L. Shaulov, T. E. Haran and Z. Shakked (2006). "Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers." Mol Cell **22**(6): 741-753.
84. Klemke, L., C. F. Fehlau, N. Winkler, F. Toboll, S. K. Singh, U. M. Moll and R. Schulz-Heddergott (2021). "The Gain-of-Function p53 R248W Mutant Promotes Migration by STAT3 Deregulation in Human Pancreatic Cancer Cells." Front Oncol **11**: 642603.
85. Klopffleisch, R., D. Lenze, M. Hummel and A. D. Gruber (2010). "Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles." BMC Cancer **10**: 618.
86. Kogan-Sakin, I., Y. Tabach, Y. Buganim, A. Molchadsky, H. Solomon, S. Madar, I. Kamer, P. Stambolsky, A. Shelly, N. Goldfinger, S. Valsesia-Wittmann, A. Puisieux, A. Zundeleovich, E. N. Gal-Yam, C. Avivi, I. Barshack, M. Brait, D. Sidransky, E. Domany and V. Rotter (2011). "Mutant p53R175H upregulates Twist1 expression and promotes epithelial–mesenchymal transition in immortalized prostate cells." Cell Death & Differentiation **18**(2): 271-281.
87. Król, M. and T. Motyl (2014). "Exploiting cancer genomics in pet animals to gain advantage for personalized medicine decisions." Journal of Applied Genetics **55**(3): 337-341.
88. Kudo, A., H. Sawahata, S. Yoshimoto, A. Yamauchi, R. Oshita, E. Kanai and S. Takagi (2023). "Evaluation of the influence of the C-X-C motif chemokine ligand

- 12 / C-X-C chemokine receptor 4 axis on canine mammary gland tumor cell migration." J Vet Med Sci **85**(8): 837-843.
89. Kuruoglu, F. E., Z. M. Ekici, D. Nak, M. O. Ozyigit, Z. A. Kupeli and D. Koca (2024). "Investigation of efficacy of two different chemotherapy protocols used in neoadjuvant chemotherapy in clinical stages II-IV canine malignant mammary tumours." Vet Comp Oncol **22**(2): 284-294.
 90. Kwon, J. Y., N. Moskwa, W. Kang, T. M. Fan and C. Lee (2023). "Canine as a Comparative and Translational Model for Human Mammary Tumor." J Breast Cancer **26**(1): 1-13.
 91. Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature **358**(6381): 15-16.
 92. Lavalle, G. E., C. B. De Campos, A. C. Bertagnolli and G. D. Cassali (2012). "Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors." In Vivo **26**(3): 375-379.
 93. Lee, C. H., W. H. Kim, J. H. Lim, M. S. Kang, D. Y. Kim and O. K. Kweon (2004). "Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors." J Vet Sci **5**(1): 63-69.
 94. Lee, K. H., H. M. Park, K. H. Son, T. J. Shin and J. Y. Cho (2018). "Transcriptome Signatures of Canine Mammary Gland Tumors and Its Comparison to Human Breast Cancers." Cancers (Basel) **10**(9).
 95. Lindblad-Toh, K., C. M. Wade, T. S. Mikkelsen, E. K. Karlsson, D. B. Jaffe, M. Kamal, M. Clamp, J. L. Chang, E. J. Kulbokas, ..., A. Zimmer and E. S. Lander (2005). "Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog." Nature **438**(7069): 803-819.
 96. Liu, D., H. Xiong, A. E. Ellis, N. C. Northrup, C. O. Rodriguez, Jr., R. M. O'Regan, S. Dalton and S. Zhao (2014). "Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer." Cancer Res **74**(18): 5045-5056.
 97. Liu, M. C., B. N. Pitcher, E. R. Mardis, S. R. Davies, P. N. Friedman, J. E. Snider, T. L. Vickery, J. P. Reed, K. DeSchryver, B. Singh, W. J. Gradishar, E. A. Perez, S. Martino, M. L. Citron, L. Norton, E. P. Winer, C. A. Hudis, L. A. Carey, P. S. Bernard, T. O. Nielsen, C. M. Perou, M. J. Ellis and W. T. Barry (2016). "PAM50 gene signatures and breast cancer prognosis with adjuvant anthracycline- and

- taxane-based chemotherapy: correlative analysis of C9741 (Alliance)." NPJ Breast Cancer **2**: 15023-.
98. Liu, X.-L., H.-W. Tee and M.-L. Go (2008). "Functionalized chalcones as selective inhibitors of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein." Bioorganic & Medicinal Chemistry **16**(1): 171-180.
 99. Lüder Ripoli, F., S. Conradine Hammer, A. Mohr, S. Willenbrock, M. Hewicker-Trautwein, B. Brenig, H. Murua Escobar and I. Nolte (2016). "Multiplex Gene Expression Profiling of 16 Target Genes in Neoplastic and Non-Neoplastic Canine Mammary Tissues Using Branched-DNA Assay." Int J Mol Sci **17**(9).
 100. Macià, F., M. Porta, C. Murta-Nascimento, S. Servitja, M. Guxens, A. Burón, I. Tusquets, J. Albanell and X. Castells (2012). "Factors affecting 5- and 10-year survival of women with breast cancer: an analysis based on a public general hospital in Barcelona." Cancer Epidemiol **36**(6): 554-559.
 101. Mantovani, F., L. Collavin and G. Del Sal (2019). "Mutant p53 as a guardian of the cancer cell." Cell Death Differ **26**(2): 199-212.
 102. Marei, H. E., A. Althani, N. Afifi, A. Hasan, T. Caceci, G. Pozzoli, A. Morriore, A. Giordano and C. Cenciarelli (2021). "p53 signaling in cancer progression and therapy." Cancer Cell International **21**(1): 703.
 103. Meneghetti, B. V., R. Wilson, C. K. Dias, N. A. Cadore, F. Klamt, A. Zaha, H. B. Ferreira and K. M. Monteiro (2022). "p53 mutants G245S and R337H associated with the Li-Fraumeni syndrome regulate distinct metabolic pathways." Biochimie **198**: 141-154.
 104. Meuten, D. J. (2016). Tumors in Domestic Animals, Wiley.
 105. Milner, J. and E. A. Medcalf (1991). "Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation." Cell **65**(5): 765-774.
 106. Moe, L. (2001). "Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds." J Reprod Fertil Suppl **57**: 439-443.
 107. Muto, T., S. Wakui, H. Takahashi, S. Maekawa, T. Masaoka, S. Ushigome and M. Furusato (2000). "p53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog." Vet Pathol **37**(3): 248-253.
 108. Nance, R. L., A. M. Sajib and B. F. Smith (2022). "Canine models of human cancer: Bridging the gap to improve precision medicine." Prog Mol Biol Transl Sci **189**(1): 67-99.

109. National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 443939, Doxorubicin Hydrochloride. Retrieved September 4, 2025 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin-Hydrochloride>
110. National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Substance Record for SID 50018673, 1,1-Cyclobutanedicarboxylate diammine platinum(II), Source: LeadScope. Retrieved September 4, 2025 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/50018673>
111. National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 16034840, Toceranib Phosphate. Retrieved September 4, 2025 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Toceranib-Phosphate>
112. Neilsen, P. M., J. E. Noll, S. Mattiske, C. P. Bracken, P. A. Gregory, R. B. Schulz, S. P. Lim, R. Kumar, R. J. Suetani, G. J. Goodall and D. F. Callen (2013). "Mutant p53 drives invasion in breast tumors through up-regulation of miR-155." *Oncogene* **32**(24): 2992-3000.
113. Nosalova, N., M. Huniadi, L. Hornakova, A. Valencakova, S. Hornak, K. Nagoos, J. Vozar and D. Cizkova (2024). "Canine Mammary Tumors: Classification, Biomarkers, Traditional and Personalized Therapies." *Int J Mol Sci* **25**(5).
114. Novikov, N. M., S. Y. Zolotaryova, A. M. Gautreau and E. V. Denisov (2021). "Mutational drivers of cancer cell migration and invasion." *Br J Cancer* **124**(1): 102-114.
115. Ogilvie, G. K., H. A. Reynolds, R. C. Richardson, S. J. Withrow, A. M. Norris, R. A. Henderson, J. S. Klausner, J. D. Fowler and D. McCaw (1989). "Phase II evaluation of doxorubicin for treatment of various canine neoplasms." *J Am Vet Med Assoc* **195**(11): 1580-1583.
116. Ohnstad, H. O., E. Borgen, R. S. Falk, T. G. Lien, M. Aaserud, M. A. T. Sveli, J. A. Kyte, V. N. Kristensen, G. A. Geitvik, E. Schlichting, E. A. Wist, T. Sørlie, H. G. Russnes and B. Naume (2017). "Prognostic value of PAM50 and risk of recurrence score in patients with early-stage breast cancer with long-term follow-up." *Breast Cancer Res* **19**(1): 120.
117. Oliveira, T. F., T. Maues, M. S. Ramundo, A. M. S. Figueiredo, M. F. V. de Mello, K. B. El-Jaick, M. L. G. Ferreira and A. M. R. Ferreira (2017). "TP53 gene

- expression levels and tumor aggressiveness in canine mammary carcinomas." J Vet Diagn Invest **29**(6): 865-868.
118. Osaki, T., Y. Sunden, K. Warita and Y. Okamoto (2023). "Comparison of Characterization in Two-Dimensional and Three-Dimensional Canine Mammary Gland Tumor Cell Models." Yonago Acta Med **66**(1): 7-18.
 119. Paik, S., S. Shak, G. Tang, C. Kim, J. Baker, M. Cronin, F. L. Baehner, M. G. Walker, D. Watson, T. Park, W. Hiller, E. R. Fisher, D. L. Wickerham, J. Bryant and N. Wolmark (2004). "A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer." N Engl J Med **351**(27): 2817-2826.
 120. Pandit, P., R. Patil, V. Palwe, S. Gandhe, R. Patil and R. Nagarkar (2020). "Prevalence of Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Single Institutional Experience of 2062 Patients." Eur J Breast Health **16**(1): 39-43.
 121. Paoloni, M. and C. Khanna (2008). "Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans." Nature Reviews Cancer **8**(2): 147-156.
 122. Parker, H. G., A. L. Shearin and E. A. Ostrander (2010). "Man's Best Friend Becomes Biology's Best in Show: Genome Analyses in the Domestic Dog*." Annual Review of Genetics **44**(Volume 44, 2010): 309-336.
 123. Parker, J. S., M. Mullins, M. C. Cheang, S. Leung, D. Voduc, T. Vickery, S. Davies, C. Fauron, X. He, Z. Hu, J. F. Quackenbush, I. J. Stijleman, J. Palazzo, J. S. Marron, A. B. Nobel, E. Mardis, T. O. Nielsen, M. J. Ellis, C. M. Perou and P. S. Bernard (2009). "Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes." J Clin Oncol **27**(8): 1160-1167.
 124. Peña, L., P. J. De Andrés, M. Clemente, P. Cuesta and M. D. Pérez-Alenza (2013). "Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics." Vet Pathol **50**(1): 94-105.
 125. Phung, Y. T., D. Barbone, V. C. Broaddus and M. Ho (2011). "Rapid generation of in vitro multicellular spheroids for the study of monoclonal antibody therapy." J Cancer **2**: 507-514.
 126. Piscitelli, E., C. Cocola, F. R. Thaden, P. Pelucchi, B. Gray, G. Bertalot, A. Albertini, R. Reinbold and I. Zucchi (2015). "Culture and characterization of mammary cancer stem cells in mammospheres." Methods Mol Biol **1235**: 243-262.

127. Poirier, V. J., A. E. Hershey, K. E. Burgess, B. Phillips, M. M. Turek, L. J. Forrest, L. Beaver and D. M. Vail (2004). "Efficacy and toxicity of paclitaxel (Taxol) for the treatment of canine malignant tumors." J Vet Intern Med **18**(2): 219-222.
128. Qiao, L., S. Qin, N. Weng, B. Li, M. Luo, Z. Zhang, L. Zhou, D. Wang and C. Huang (2023). "Discovery of canine drug toceranib phosphate as a repurposed agent against human hepatocellular carcinoma." Liver International **43**(4): 928-944.
129. Queiroga, F. L., T. Raposo, M. I. Carvalho, J. Prada and I. Pires (2011). "Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings." In Vivo **25**(3): 455-465.
130. Raffo-Romero, A., S. Aboulouard, E. Bouchaert, A. Rybicka, D. Tierny, N. Hajjaji, I. Fournier, M. Salzet and M. Duhamel (2023). "Establishment and characterization of canine mammary tumoroids for translational research." BMC Biol **21**(1): 23.
131. Rasotto, R., D. Berlato, M. H. Goldschmidt and V. Zappulli (2017). "Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases." Vet Pathol **54**(4): 571-578.
132. Reynolds, D. S., K. M. Tevis, W. A. Blessing, Y. L. Colson, M. H. Zaman and M. W. Grinstaff (2017). "Breast Cancer Spheroids Reveal a Differential Cancer Stem Cell Response to Chemotherapeutic Treatment." Sci Rep **7**(1): 10382.
133. Rodo, A. and E. Malicka (2008). "Immunohistochemical expression of protein p53 in neoplasms of the mammary gland in bitches." Pol J Vet Sci **11**(2): 89-95.
134. Roszkowska, K. A., S. Gizinski, M. Sady, Z. Gajewski and M. B. Olszewski (2020). "Gain-of-Function Mutations in p53 in Cancer Invasiveness and Metastasis." Int J Mol Sci **21**(4).
135. Roszkowska, K. A., A. Piecuch, M. Sady, Z. Gajewski and S. Flis (2022). "Gain of Function (GOF) Mutant p53 in Cancer-Current Therapeutic Approaches." Int J Mol Sci **23**(21).
136. Rowell, J. L., D. O. McCarthy and C. E. Alvarez (2011). "Dog models of naturally occurring cancer." Trends Mol Med **17**(7): 380-388.
137. Rungsipipat, A., S. Tateyama, R. Yamaguchi, K. Uchida, N. Miyoshi and T. Hayashi (1999). "Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene

- products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors." J Vet Med Sci **61**(1): 27-32.
138. Rutteman, G. R. and E. Teske (2009). Chapter 16 - Mammary glands. Medical History and Physical Examination in Companion Animals (Second Edition). A. Rijnberk, F. J. van Sluijs, B. E. Belshaw *et al.* Edinburgh, W.B. Saunders: 132-134.
 139. Saga, Y., M. Suzuki, N. Tamura, M. Ohwada and I. Sato (2001). "Establishment and characterization of a new cell line (SKS) from neuroendocrine small cell carcinoma of the uterine cervix and its chemosensitivity." Oncology **60**(4): 367-372.
 140. Sakthikumar, S., M. Warriar, D. Whitley, S. Facista, J. Adkins, S. Aman, D. Tsinajinnie, N. Duran, G. Siravegna, Z. Ahmed, K. Day, B. Jenkins, N. Patel, K. Ryden, J. Nadai, K. Banovich, B. Powers, J. Edwards, J. Steinberg, S. Fielder, S. Wong, S. A. Byron, T. Izatt, V. Zismann, M. Boateng, Z. Zhu, H. Y. Chuang, J. M. Trent, D. Haworth, E. Chon, W. Hendricks and G. Wang (2024). "Genomic analysis across 53 canine cancer types reveals novel mutations and high clinical actionability potential." Vet Comp Oncol **22**(1): 30-41.
 141. Salas, Y., A. Márquez, D. Diaz and L. Romero (2015). "Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem." PLoS One **10**(5): e0127381.
 142. Sassi, F., C. Benazzi, G. Castellani and G. Sarli (2010). "Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry." BMC Vet Res **6**: 5.
 143. Saunus, J. M., C. E. Smart, J. R. Kutasovic, R. L. Johnston, P. Kalita-de Croft, M. Miranda, E. N. Rozali, A. C. Vargas, L. E. Reid, E. Lorsy, S. Cocciardi, T. Seidens, A. E. McCart Reed, A. J. Dalley, L. F. Wockner, J. Johnson, D. Sarkar, M. E. Askarian-Amiri, P. T. Simpson, K. K. Khanna, G. Chenevix-Trench, F. Al-Ejeh and S. R. Lakhani (2018). "Multidimensional phenotyping of breast cancer cell lines to guide preclinical research." Breast Cancer Res Treat **167**(1): 289-301.
 144. Schneider, R. (1970). "Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer." Cancer **26**(2): 419-426.
 145. Sheikh, M. S. and A. J. Fornace, Jr. (2000). "Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis." Leukemia **14**(8): 1509-1513.

146. Simabuco, F. M., M. G. Morale, I. C. B. Pavan, A. P. Morelli, F. R. Silva and R. E. Tamura (2018). "p53 and metabolism: from mechanism to therapeutics." Oncotarget **9**(34): 23780-23823.
147. Sorenmo, K. U., R. Rasotto, V. Zappulli and M. H. Goldschmidt (2011). "Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms." Vet Pathol **48**(1): 85-97.
148. Sorlie, T., R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C. M. Perou, P. E. Lønning, P. O. Brown, A. L. Børresen-Dale and D. Botstein (2003). "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8418-8423.
149. Subramanian, M., P. Francis, S. Bilke, X. L. Li, T. Hara, X. Lu, M. F. Jones, R. L. Walker, Y. Zhu, M. Pineda, C. Lee, L. Varanasi, Y. Yang, L. A. Martinez, J. Luo, S. Ambs, S. Sharma, L. M. Wakefield, P. S. Meltzer and A. Lal (2015). "A mutant p53/let-7i-axis-regulated gene network drives cell migration, invasion and metastasis." Oncogene **34**(9): 1094-1104.
150. Szymańska, H. (2007). "Genetycznie zmodyfikowane myszy jako modele do badań w onkologii." Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. **61**: 639-645.
151. Tan, B. S., K. H. Tiong, H. L. Choo, F. Fei-Lei Chung, L. W. Hii, S. H. Tan, I. K. Yap, S. Pani, N. T. Khor, S. F. Wong, R. Rosli, S. K. Cheong and C. O. Leong (2015). "Mutant p53-R273H mediates cancer cell survival and anoikis resistance through AKT-dependent suppression of BCL2-modifying factor (BMF)." Cell Death & Disease **6**(7): e1826-e1826.
152. Tavares, W. L., G. E. Lavalle, M. S. Figueiredo, A. G. Souza, A. C. Bertagnolli, F. A. Viana, P. R. Paes, R. A. Carneiro, G. A. Cavalcanti, M. M. Melo and G. D. Cassali (2010). "Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs." Acta Vet Scand **52**(1): 67.
153. Tevis, K. M., Y. L. Colson and M. W. Grinstaff (2017). "Embedded Spheroids as Models of the Cancer Microenvironment." Adv Biosyst **1**(10).
154. Tran, C. M., A. S. Moore and A. E. Frimberger (2016). "Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy." Veterinary and Comparative Oncology **14**(3): 252-262.

155. Trepanier, L. A., K. Ray, N. J. Winand, S. P. Spielberg and A. E. Cribb (1997). "Cytosolic arylamine N-acetyltransferase (NAT) deficiency in the dog and other canids due to an absence of NAT genes." Biochem Pharmacol **54**(1): 73-80.
156. Tutt, A., A. Wang, C. Rowland, C. Gillett, K. Lau, K. Chew, H. Dai, S. Kwok, K. Ryder, H. Shu, R. Springall, P. Cane, B. McCallie, L. Kam-Morgan, S. Anderson, H. Buerger, J. Gray, J. Bennington, L. Esserman, T. Hastie, S. Broder, J. Sninsky, B. Brandt and F. Waldman (2008). "Risk estimation of distant metastasis in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer patients using an RT-PCR based prognostic expression signature." BMC Cancer **8**: 339.
157. Valdivia, G., A. Alonso-Diez, D. Perez-Alenza and L. Pena (2021). "From Conventional to Precision Therapy in Canine Mammary Cancer: A Comprehensive Review." Front Vet Sci **8**: 623800.
158. van de Vijver, M. J., Y. D. He, L. J. van't Veer, H. Dai, A. A. Hart, D. W. Voskuil, G. J. Schreiber, J. L. Peterse, C. Roberts, M. J. Marton, M. Parrish, D. Atsma, A. Witteveen, A. Glas, L. Delahaye, T. van der Velde, H. Bartelink, S. Rodenhuis, E. T. Rutgers, S. H. Friend and R. Bernards (2002). "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer." N Engl J Med **347**(25): 1999-2009.
159. Varney, D., D. O'Neill, M. O'Neill, D. Church, A. Stell, S. Beck, M. J. Smalley and D. Brodbelt (2023). "Epidemiology of mammary tumours in bitches under veterinary care in the UK in 2016." Vet Rec **193**(5): e3054.
160. Veldhoen, N. and J. Milner (1998). "Isolation of canine p53 cDNA and detailed characterization of the full length canine p53 protein." Oncogene **16**(8): 1077-1084.
161. Visan, S., O. Balacescu, I. Berindan-Neagoe and C. Catoi (2016). "In vitro comparative models for canine and human breast cancers." Clujul Med **89**(1): 38-49.
162. von Euler, H., P. Rivera, H. Nyman, J. Häggström and O. Borgå (2013). "A dose-finding study with a novel water-soluble formulation of paclitaxel for the treatment of malignant high-grade solid tumours in dogs." Vet Comp Oncol **11**(4): 243-255.
163. Wang, H., M. Guo, H. Wei and Y. Chen (2023). "Targeting p53 pathways: mechanisms, structures and advances in therapy." Signal Transduction and Targeted Therapy **8**(1): 92.

164. Wang, H., P. Liao, S. X. Zeng and H. Lu (2019). "It takes a team: a gain-of-function story of p53-R249S." Journal of Molecular Cell Biology **11**(4): 277-283.
165. Wang, X. and Q. Sun (2017). "TP53 mutations, expression and interaction networks in human cancers." Oncotarget **8**(1): 624-643.
166. Wang, Z., Y. Jiang, D. Guan, J. Li, H. Yin, Y. Pan, D. Xie and Y. Chen (2013). "Critical roles of p53 in epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma cells." PLoS One **8**(9): e72846.
167. Wang, Z., A. Strasser and G. L. Kelly (2022). "Should mutant TP53 be targeted for cancer therapy?" Cell Death & Differentiation **29**(5): 911-920.
168. Wasielewski, M., F. Elstrodt, J. G. Klijn, E. M. Berns and M. Schutte (2006). "Thirteen new p53 gene mutants identified among 41 human breast cancer cell lines." Breast Cancer Res Treat **99**(1): 97-101.
169. Wegert, J., C. Vokuhl, B. Ziegler, K. Ernestus, I. Leuschner, R. Furtwängler, N. Graf and M. Gessler (2017). "TP53 alterations in Wilms tumour represent progression events with strong intratumour heterogeneity that are closely linked but not limited to anaplasia." J Pathol Clin Res **3**(4): 234-248.
170. Weissmueller, S., E. Manchado, M. Saborowski, J. P. t. Morris, E. Wagenblast, C. A. Davis, S. H. Moon, N. T. Pfister, D. F. Tschaharganeh, T. Kitzing, D. Aust, E. K. Markert, J. Wu, S. M. Grimmond, C. Pilarsky, C. Prives, A. V. Biankin and S. W. Lowe (2014). "Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor β signaling." Cell **157**(2): 382-394.
171. Williams, L. A., K. A. Hoadley, H. B. Nichols, J. Geradts, C. M. Perou, M. I. Love, A. F. Olshan and M. A. Troester (2019). "Differences in race, molecular and tumor characteristics among women diagnosed with invasive ductal and lobular breast carcinomas." Cancer Causes Control **30**(1): 31-39.
172. Willis, A., E. J. Jung, T. Wakefield and X. Chen (2004). "Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes." Oncogene **23**(13): 2330-2338.
173. Yanagihara, K., M. Takigahira, H. Tanaka, T. Arao, Y. Aoyagi, T. Oda, A. Ochiai and K. Nishio (2008). "Establishment and molecular profiling of a novel human pancreatic cancer panel for 5-FU." Cancer Sci **99**(9): 1859-1864.
174. Yang-Hartwich, Y., R. Tedja, C. M. Roberts, J. Goodner-Bingham, C. Cardenas, M. Gurea, N. J. Sumi, A. B. Alvero, C. A. Glackin and G. Mor (2019). "p53-Pirh2

- Complex Promotes Twist1 Degradation and Inhibits EMT." Mol Cancer Res **17**(1): 153-164.
175. Zacchetti, A., E. van Garderen and G. R. Rutteman (2007). "Immunohistochemical evaluation of p53 expression with different antibodies in malignant canine tumours with or without p53 gene mutation." Vet Comp Oncol **5**(2): 108-118.
 176. Zambrano-Estrada, X., B. Landaverde-Quiroz, A. A. Dueñas-Bocanegra, M. A. De Paz-Campos, G. Hernández-Alberto, B. Solorio-Perusquia, M. Trejo-Mandujano, L. Pérez-Guerrero, E. Delgado-González, B. Anguiano and C. Aceves (2018). "Molecular iodine/doxorubicin neoadjuvant treatment impair invasive capacity and attenuate side effect in canine mammary cancer." BMC Vet Res **14**(1): 87.
 177. Zeng, C. and J. Zhang (2022). "A narrative review of five multigenetic assays in breast cancer." Transl Cancer Res **11**(4): 897-907.
 178. Zhang, J., M. Liu, Y. Fang, J. Li, Y. Chen and S. Jiao (2022). "TP53 R273C Mutation Is Associated With Poor Prognosis in LGG Patients." Frontiers in Genetics **13**.
 179. Zhang, Y., S. V. Coillie, J. Y. Fang and J. Xu (2016). "Gain of function of mutant p53: R282W on the peak?" Oncogenesis **5**(2): e196-e196.
 180. Zhao, Y., Y. Li, J. Sheng, F. Wu, K. Li, R. Huang, X. Wang, T. Jiao, X. Guan, Y. Lu, X. Chen, Z. Luo, Y. Zhou, H. Hu, W. Liu, B. Du, S. Miao, J. Cai, L. Wang, H. Zhao, J. Ying, X. Bi and W. Song (2019). "P53-R273H mutation enhances colorectal cancer stemness through regulating specific lncRNAs." J Exp Clin Cancer Res **38**(1): 379.
 181. Zhou, Y., J. Xia, S. Xu, T. She, Y. Zhang, Y. Sun, M. Wen, T. Jiang, Y. Xiong and J. Lei (2023). "Experimental mouse models for translational human cancer research." Frontiers in Immunology **Volume 14 - 2023**.

9 Załączniki

9.1 Załącznik 1. Zestawienie informacji o wyprowadzonych liniach komórkowych CMT w ramach realizacji pracy doktorskiej

Nazwa	Wielkość guza	Typ histopatologiczny	Stopień złośliwości	Status p53	Szybkość migracji [μm/h]	Inwazyjność	Obecność tkanki kontrolnej
CMT_008_1	2.5 cm	Rak prosty cewkowo-brodawkowaty	II	WT	7,8	nieinwazyjny	–
CMT_011_1	15 cm	Rak lity	III	WT	3,9	bardzo inwazyjny	–
CMT_012_2	1 cm	Rak w guzie mieszanym	I	WT	9,4	nieinwazyjny	–
CMT_013_2	1 cm	Rak prosty cewkowo-brodawkowaty	I	WT	7,9	inwazyjny	+
CMT_014_2	4–5 cm	Rak przewodowy	I	WT	9,9	bardzo inwazyjny	–
CMT_014_3	10 cm	Mioepitelioma złośliwa	III	WT	16,6	bardzo inwazyjny	–
CMT_015_1	3 cm	Mioepitelioma złośliwa		MUT	10,9	inwazyjny	+
CMT_016_1	5 cm	Rak prosty cewkowo-brodawkowaty	I	MUT	11,5	inwazyjny	+
CMT_020_1	3 cm	Rak lity	III	MUT	9,3	bardzo inwazyjny	+
CMT_020_2	3 cm	Rak lity	III	MUT	6,7	bardzo inwazyjny	+
CMT_021_1	2 cm	Rak złożony	II	WT	7,9	nieinwazyjny	+
CMT_021_2	0.2×5 cm	Rak prosty cewkowy	I	WT	7,7	inwazyjny	+
CMT_024_2	5 cm	Mezotelioma złośliwa		WT	7,0	bardzo inwazyjny	+
CMT_025_1	1.5 cm	Rak prosty cewkowy	I	WT	9,9	inwazyjny	+
CMT_026_1	4×2 cm	Rak prosty cewkowy	II	WT	15,3	bardzo inwazyjny	+
CMT_026_2	6×5 cm	Typ mieszany	I	WT	14,6	inwazyjny	+
CMT_026_3	2×1.5 cm	Rak prosty cewkowo-brodawkowaty	I	WT	3,9	inwazyjny	+
CMT_028_1	3 cm	Typ mieszany	I	WT	12,8	inwazyjny	+
CMT_030_1	2.5 cm	Typ mieszany		WT	6,3	nieinwazyjny	+

CMT_032_1	1.5 cm	Gruczolak		<i>WT</i>	10,6	inwazyjny	+
CMT_034_1	6×4 cm	Typ mieszany	I	<i>WT</i>	7,8	nieinwazyjny	+
CMT_035_1	1 cm	Gruczolak złożony		<i>WT</i>	7,2	nieinwazyjny	+
CMT_036_1	2.5 cm	Rak prosty cewkowo- brodawkowaty	II	<i>WT</i>	12,6	nieinwazyjny	+
CMT_036_2	1 cm	Rak złożony	II	<i>WT</i>	10,6	nieinwazyjny	+
CMT_037_1	2 cm	Rak wewnątrz- przewodowy	II	<i>WT</i>	23,0	inwazyjny	+
CMT_038_1	2 cm	Rak lity	II	<i>WT</i>	6,7	inwazyjny	+
CMT_039_1	2.5 cm	Rak złożony	I	—	7,2	nieinwazyjny	+
CMT_040_1	2.5 cm	Typ mieszany	I	<i>WT</i>	18,2	inwazyjny	+
CMT_043_1	2 cm	Rak złożony cewkowy	I	<i>WT</i>	11,4	nieinwazyjny	+
CMT_044_1	3×1 cm	Rak prosty cewkowo- brodawkowaty	I	<i>WT</i>	12,3	bardzo inwazyjny	+
CMT_045_1	16 cm	Mioepitelioma złośliwa	II	<i>WT</i>	2,9	bardzo inwazyjny	+
CMT_046_1	1.5 cm	Rak lity	III	<i>MUT</i>	8,0	inwazyjny	+

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW

20.10.2025 *Matylda Rosko-R*