



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt
Zakład Fizjologii Zwierząt

lek. wet. Paulina Golach

**Ocena wybranych markerów stresu oksydacyjnego
oraz stanu zapalnego u suk z nowotworem gruczołu
mlekowego przed i po zabiegu mastektomii**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Bożena Króliczewska, prof. uczelni

Promotor pomocniczy: dr n. wet. Jolanta Bujok

Wrocław 2023

7. STRESZCZENIE

Badania epidemiologiczne pokazują, że guzy gruczołu sutkowego stanowią około 50% wszystkich nowotworów u samic psów i aż 82% nowotworów układu rozrodczego, z czego 49% zmian ma charakter złośliwy. Liczne badania wskazują, że ryzyko rozwoju nowotworów sutka związane jest z wpływem: hormonów płciowych, czynnikami genetycznymi, środowiskowymi oraz dietą zwierząt. Jednakże etiologia i mechanizmy molekularne zaangażowane w patogenezę choroby w dalszym ciągu pozostają niejasne, pomimo prowadzonych badań. Dlatego tak ważne jest, aby prowadzić dalsze szerokie i różnokierunkowe doświadczenia, nie tylko w celu poznania mechanizmów powstawania i rozwoju zmian nowotworowych, ale także, aby na wczesnym etapie je wykrywać.

Zatem w swojej pracy doktorskiej skupiłam się na wpływie zaburzeń stanu równowagi oksydacyjno-redukcyjnej oraz powiązanego z nim procesu zapalnego na guzy gruczołu sutkowego u suk. W badaniach wzięło udział 36 samic różnych ras (14 stanowiło grupę kontrolną), które były pacjentami przychodni Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, w Polsce. Średnia wieku psów z wykrytymi zmianami nowotworowymi gruczołu sutkowego wyniosła 11.5 roku, co potwierdziło, iż guzy te najczęściej wykrywane są u suk w zaawansowanym wieku. Podczas prowadzonych badań wykonałam analizy poziomu parametrów hematologicznych i biochemicznych krwi oraz analizy histopatologiczne usuniętych zmian nowotworowych. Poza tym oznaczono całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAS), aktywność enzymów antyoksydacyjnych (CAT, SOD i GPx), nasilenie reakcji utleniania poprzez pomiar poziomu peroksydacji: lipidów (MDA), kwasów nukleinowych (8-OHdG) i białek (poziom grup karbonylowych), a także stężenie białek ostrej fazy (ALB, CRP, FBG). Powyższe analizy wykonano u samic przed i po zabiegu hemimastektomii/mastektomii zjednoczoną owariohisterektomią lub bez niej. Wszystkie dane poddano analizie statystycznej w celu określenia istotności zaobserwowanych zmian oraz wykrycia korelacji pomiędzy analizowanymi parametrami.

Przedstawione wyniki badań wyraźnie potwierdzają współzależność stanu zapalnego i procesu oksydacyjnego w rozwoju nowotworu gruczołu sutkowego u suk. Obserwowaną u chorych samic leukocytozę neutrofilową można przypisać stanom zapalnym lub martwicy tkanek związanych z guzem sutka, natomiast niedoszacowaną w wielu badaniach trombocytozę, należy powiązać ze stopniem zaawansowania nowotworów. Pomimo obserwowanego wzrastającego poziomu fibrynogenu u samic z nowotworem listwy mlecznej, korelacja między jego stężeniem, a rozwojem nowotworu

wydaje się kontrowersyjna. Natomiast obniżone stężenie albumin należy powiązać z procesem zapalnym wywołanym przez chorobę nowotworową. Ponadto wykazana wysoka korelacja pomiędzy poziomem ALB, a stężeniem produktów utleniania komórkowego (MDA, 8-OHdG) wskazuje na molekularny dualizm działania albuminy podczas karcynogenezy.

Przeprowadzony zabieg mastektomii spowodował wzrost aktywności SOD oraz spadek aktywności GPx i CRP w porównaniu do stanu przed zabiegiem. Jak wskazują analizy, parametry te są dodatnio związane z nowotworem gruczołu sutkowego i procesem zapalnym, co należy odczytywać jako pozytywną zmianę prowadzącą do przywrócenia homeostazy oksydacyjnej. Niestety pomimo spadku stężenia CRP, wykazano utrzymujący się zwiększony poziom MDA miesiąc po zabiegu, który świadczy o utrzymującym się procesie zapalnym związanym z uszkodzeniem oksydacyjnym lipidów w okresie pooperacyjnym. Dlatego należy rozważyć wprowadzenie okołooperacyjnej suplementacji antyoksydantami. W przypadku katalazy wykazano wzrost jej aktywności tylko u suk najgorzej rokujących, co potwierdza fakt, że w początkowych stadiach rozwoju nowotworu nie obserwuje się wyraźnych zmian w aktywności CAT we krwi obwodowej. Zwiększona aktywność CAT koreluje z odpowiedzią na zwiększony poziom RFT, szczególnie na zaawansowanym etapie kancerogenezy związanym z rozwiniętym stanem zapalnym oraz odgrywa ważną rolę w przebiegu klinicznym, ponieważ hamuje rozwój zapalenia i przerzutowania. W przypadku oceny TAS stwierdzono brak występujących różnic w otrzymanych wartościach u wszystkich badanych zwierząt. Wyniki sugerują, że systemowe mechanizmy obrony antyoksydacyjnej u suk z nowotworem gruczołu sutkowego nie uległy zaburzeniu.

W przebiegu badań wykazano również bardzo niskie stężenie 8-OHdG u wszystkich samic biorących udział w badaniach, wskazując na znikomy wpływ procesów utleniania kwasów nukleinowych na proces karcynogenezy w guzach listwy mlecznej u suk. A także na niską przydatność 8-OHdG jako markera rozwoju nowotworów gruczołu sutkowego u psów w przeciwieństwie do raka piersi u ludzi. Przedstawione przeze mnie badania wskazują również na potrzebę opracowania standardowych metod i testów diagnostycznych specyficznych dla psów w celu lepszego diagnozowania i badania mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój nowotworów gruczołu sutkowego. Na podstawie przeprowadzonych analiz wydaje się, że dobrymi wskaźnikami prognostycznymi, nie wymagającymi stosowania drogich metod molekularnych mogą być: AGR, NLR oraz mGPS, a także aktywność GPx.

Podsumowując, otrzymane wyniki potwierdzają współzależność procesu zapalnego i statusu oksydacyjnego w rozwoju nowotworu gruczołu sutkowego u psów. Nie wiadomo jednak, czy przewlekłe zapalenie może indukować proces nowotworowy, czy zapalenie jest rezultatem progresji guza bądź oba te czynniki nakładają się na siebie, a zmiany statusu oksydacyjnego są stymulowane bardziej stanem zapalnym i rozwojem zmiany nowotworowej lub odwrotnie? W celu odpowiedzi na postawione pytania potrzebne są badania na większej populacji zwierząt o bardziej zróżnicowanym histopatologicznym stopniu zaawansowania nowotworów z wykorzystaniem technik biologii molekularnej, obejmujących badania immunofenotypu, gospodarki hormonalnej oraz zmian ekspresji genów powiązanych z rozwojem nowotworów, w tym tych dotyczących jego mikrośrodowiska.

8. SUMMARY

According to epidemiological studies, mammary gland tumors account for 50% of all tumors in female dogs and 82% of reproductive tract tumors, 49% of which are malignant. Many studies show that the influence of sex hormones, genetic factors, environmental factors, and animal diet all play a role in the development of mammary tumors. Despite ongoing research, the aetiology and molecular mechanisms underlying pathogenesis remain unknown. As a result, it is critical to conduct additional extensive and multifaceted research to understand the mechanisms of tumor formation and development and detect them early. As a result, my doctoral dissertation examines the impact of oxidative-reductive (redox) stress imbalance and related inflammatory processes on mammary gland tumors in dogs. The study included 36 females of various breeds (14 in the control group) who were patients at the Veterinary Medicine Faculty clinic at the Wrocław University of Environmental and Life Sciences in Poland. The average age of female dogs diagnosed with mammary gland cancer was 11.5 years, confirming that these tumors are most commonly found in elderly females.

All patients' health status was evaluated using haematological and serum biochemical parameters. During the study, a histopathological examination of the removed neoplastic tissues was performed. Furthermore, the following parameters were examined: total antioxidant status (TAS), antioxidant enzyme activity (CAT, SOD, and GPx), lipid (MDA), nucleic acid (8-OHdG), protein (carbonyl) peroxidation, and acute-phase protein concentration (ALB, CRP, and fibrinogen). The above studies were carried out on female dogs before and after hemimastectomy or mastectomy alone or in combination with ovariohysterectomy. All data were statistically analysed to confirm the significance of the observed changes and to detect correlations between the selected parameters.

The findings demonstrate the interdependence of inflammatory and oxidative processes in the development of mammary gland tumors in dogs. Furthermore, the neutrophilic leukocytosis seen in the affected dogs could be due to inflammation or tissue necrosis caused by mammary gland tumors. In contrast, thrombocytosis, which has been understudied in many studies, should be linked to the degree of tumor progression. Despite increased fibrinogen levels in female dogs with mammary gland tumors, the relationship between fibrinogen concentration and tumor progression appears to be debatable. On the other hand, a reduced albumin concentration should be linked to the inflammation caused by the neoplastic process. Furthermore, the high correlation between ALB levels and

cellular oxidation products (MDA, 8-OHdG) concentrations suggests albumin molecular dualism during carcinogenesis.

After mastectomy, SOD activity increased while GPx activity and CRP concentration decreased compared to their pre-surgery levels. According to the findings, these parameters are associated with mammary gland tumors and the inflammatory process. The positive responses described above can be interpreted as physiologically adaptive changes to reestablish oxidative homeostasis following mastectomy. Unfortunately, despite a decrease in CRP, a sustained increase in MDA levels was detected one month after surgery, indicating an ongoing inflammatory process associated with lipid oxidative damage in the postoperative period. Perioperative antioxidant supplementation should thus be considered.

Furthermore, a recent study found an increase in mean catalase activity only in dogs with a poor prognosis, confirming that there are no significant changes in CAT activity in the peripheral blood during the early stages of tumor development. Increased CAT activity correlates with a response to an increased level of RFT, particularly at the advanced stage of carcinogenesis associated with developed inflammation, and plays an essential role in tumor progression by inhibiting inflammation and metastasis. The TAS assessment revealed no differences in the obtained values in any of the animals tested. According to the findings, the systemic antioxidant defence mechanisms in female dogs with mammary gland cancer were not disrupted.

The study also found a low concentration of 8-OHdG in all female dogs participating in the study, indicating that nucleic acid oxidation processes have little influence on the carcinogenesis process in mammary gland tumors in bitches. In contrast to human breast cancer, this study found 8-OHdG to be ineffective as a marker of mammary gland tumor development in dogs. Furthermore, the experimental study revealed the need for new dedicated diagnostic tests that can be used to diagnose and monitor cancer disease in dogs in particular. Cancer prognosis in veterinary medicine can be difficult. Many of the early symptoms are nonspecific and can be difficult to distinguish from those of common benign conditions. The study discovered that AGR, NLR, the mGPS indicator, and GPx activity are important prognostic indicators in female mammary gland cancer diagnostics that do not require expensive molecular methods.

Finally, the findings support the link between the inflammatory process and the oxidative status in the development of canine mammary gland tumorigenesis. However, it is unknown whether chronic inflammation can initiate the neoplastic process, whether

inflammation results from tumor progression, whether both factors overlap, and whether changes in oxidative status are more stimulated by inflammation and tumor development or vice versa. Furthermore, more research on a larger population of animals with a more diverse histopathological stage of tumor progression is needed to understand the relationship between cancer and inflammation in relation to immunophenotype, hormonal imbalance, and changes in the expression of genes associated with tumor development, including those related to the tumors microenvironment.