

STRESZCZENIE

Jednym z głównych powodów umieralności ludzi na całym świecie są choroby nowotworowe. Pomimo, iż ostatnie dekady przyniosły znaczący postęp w wielu dziedzinach, między innymi medycynie, farmakologii i naukach pokrewnych, zachorowalność i śmiertelność stale wzrastają. W związku z powyższym, istnieje potrzeba prowadzenia efektywnych badań nad przyczynami powstawania oraz metodami skutecznego leczenia chorób nowotworowych.

Owocystatyna, wyizolowana z białka jaja kurzego, będąca ortologiem ludzkiej cystatyny C, jest wszechobecnym białkiem produkowanym przez wszystkie jądrzaste komórki organizmu. Sugeruje się jej istotny udział w różnych etapach procesu nowotworowego ze względu na pełnienie funkcji silnego inhibitora proteaz cysteinowych

Celem pracy było zbadanie aktywności owocystatyny względem komórek wybranych linii nowotworowych oraz komórek prawidłowych. Dodatkowym celem było określenie mechanizmu uszkodzenia komórek na przykładzie wybranej linii raka płuc.

Do badań wykorzystano następujące nowotworowe linie komórkowe: raka gruczołu piersiowego (MCF-7 i MDA-MB-231), czerniaka (BM), raka płuc (A549), raka wątrobowokomórkowego (HepG2) oraz kontrolnej prawidłowej linii fibroblastów skórnych (NHDF). Badano dwie formy liofilizowanej owocystatyny: monomeryczną i dimeryczną.

W celu oceny żywotności wyżej wymienionych linii komórkowych zastosowano kolorymetryczny test MTT z użyciem obu form owocystatyny. W celu sprawdzenia mechanizmu uszkodzenia komórek przeprowadzono ocenę nasilenia procesu apoptozy po zastosowaniu monomeru w komórkach linii A549 i NHDF następującymi metodami: kolorymetryczną detekcją

apoptozy, immunoblotingiem – DotBlot oraz morfologiczną - transmisyjną mikroskopią elektronową.

W testach MTT wykazano, że wzrost komórek wszystkich badanych linii nowotworowych ulega zahamowaniu po zastosowaniu zarówno monomerycznej, jak i dimerycznej owocystatyny. Stwierdzono, że komórki linii A549 posiadają największą wrażliwość na działanie monomerycznej owocystatyny po jej dwukrotnym podaniu. Jednocześnie, nie obserwowano hamującego wpływu monomeru na komórki prawidłowej linii. Ponadto, dowiedziono, że dimeryczna forma wykazuje słabszą aktywność hamującą żywotność, wobec czego została wyeliminowana z dalszych badań. Kolorymetryczną detekcją apoptozy nie stwierdzono wpływu owocystatyny na wystąpienie apoptozy w komórkach linii A549 i NHDF. Efektem tych badań było wytypowanie stężenia monomerycznej formy białka, które zostało poddane dalszym badaniom. W kolejnym etapie badań nie wykazano zmian poziomu ekspresji wybranych białek zaangażowanych w proces apoptozy. Jedynie czynnik hipoksji, HIF-1 α wykazywał istotny wzrost ekspresji. W ostatnim etapie przeprowadzono obserwację morfologii badanych komórek na poziomie ultrastrukturalnym metodą TEM. Stwierdzono obecność nielicznych komórek apoptotycznych oraz prezentujących cechy autofagii.

Podsumowując, wykazano, że badany monomer owocystatyny wpływa hamująco na żywotność komórek nowotworowych, jednocześnie wykazując minimalny wpływ na komórki prawidłowe. Dimer natomiast nie wykazuje, tak znacznego jak monomer, zahamowania żywotności komórek nowotworowych. Przepuszczalnie, mechanizm działania monomeru owocystatyny polega na uszkodzeniu komórek nowotworowych na drodze autofagii oraz apoptozy. Cytostatyczne działanie monomeru owocystatyny w wybranych stężeniach na komórki nowotworowe, może w przyszłości pozwolić na jej wykorzystanie w przeciwnowotworowej terapii wspomagającej.