

**Efekat ekskretorno-sekretornog antigena  
mišićnih larvi *Trichinella spiralis* i  
antihelmintika mebendazola na ćelije  
melanoma u uslovima *in vitro* i *in vivo***

Saša Vasilev

Beograd, 04.12.2012. godine

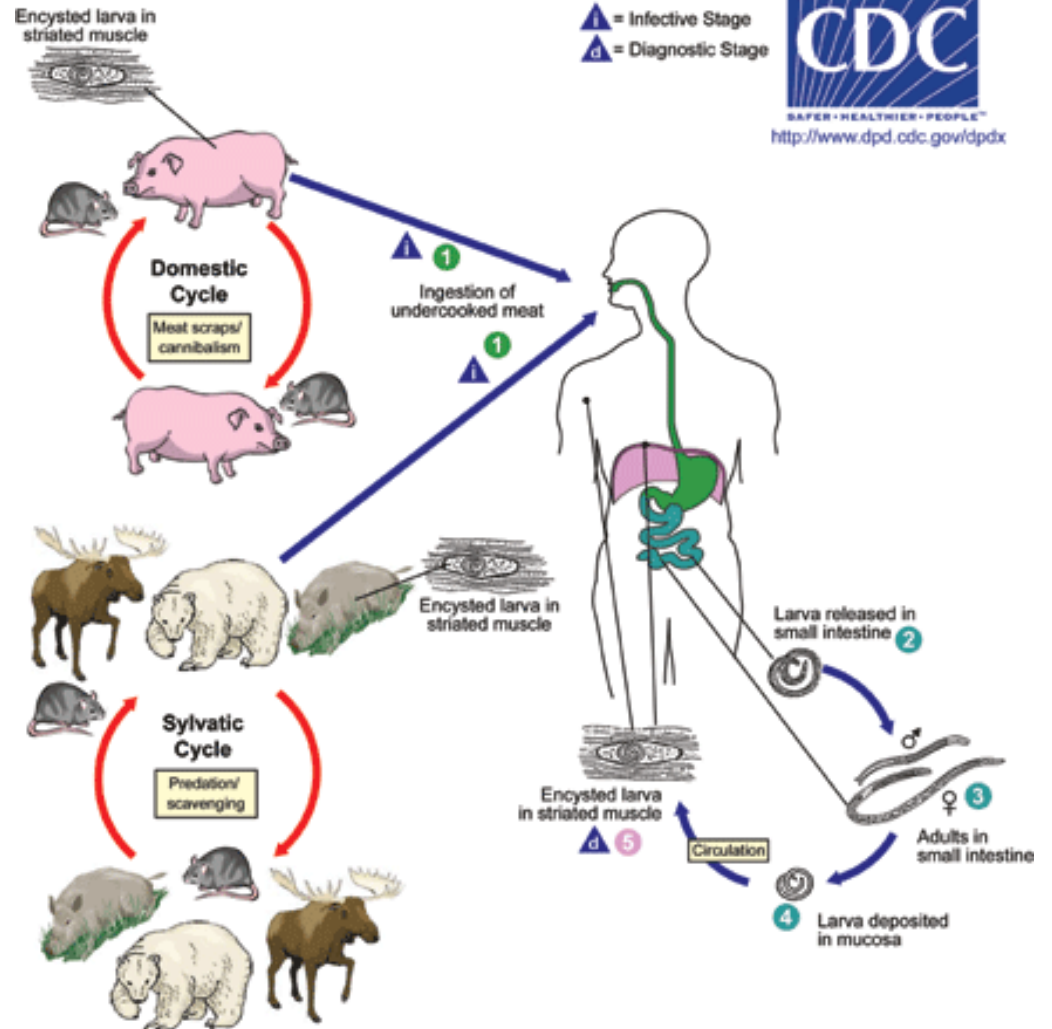
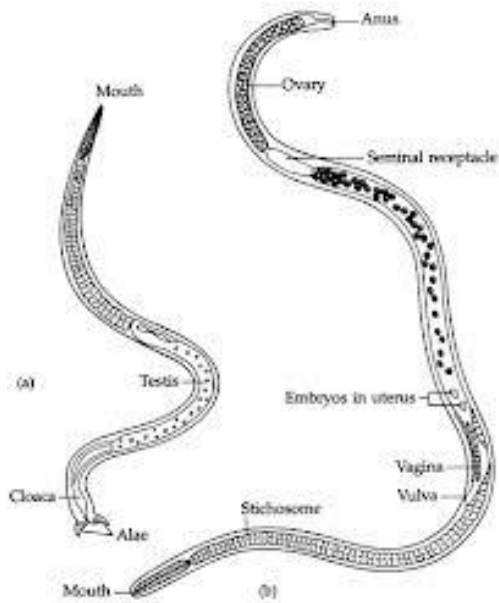
# Melanom

Melanom je najagresivnija forma kancera kože.

Loša prognoza za obolele u napredovaloj formi bolesti

Razvoj novih lekova, nove indikacije za postojeće lekove

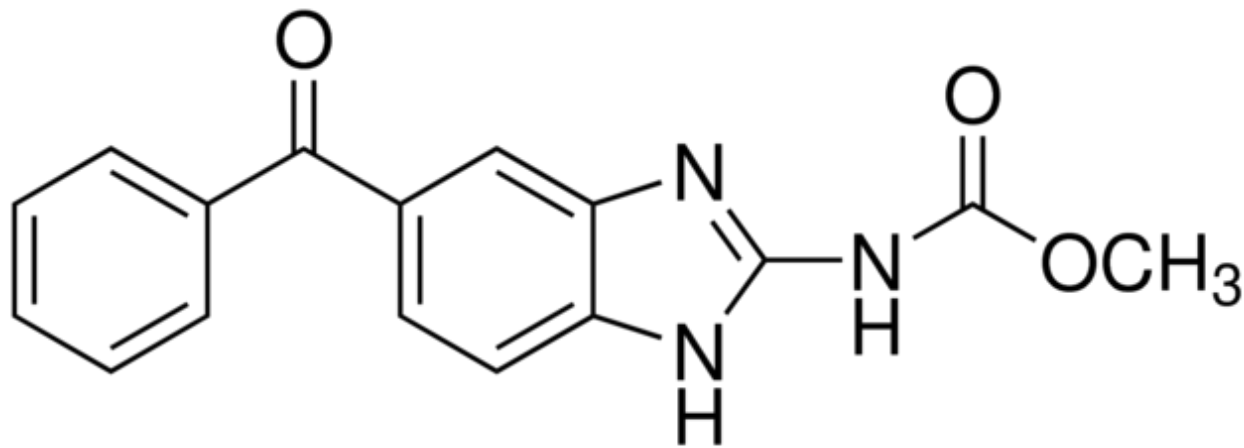
# *Trichinella spiralis*



# Mebendazol

5-Benzoyl-2-benzimidazolecarbamic acid methyl ester, ili  
Methyl *N*-(5-benzoyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)carbamate

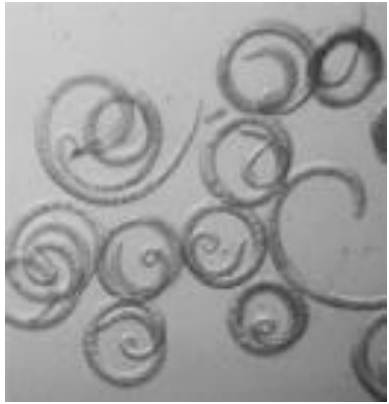
- Empirijska formula  $C_{16}H_{13}N_3O_3$
- Molekulska težina 295.29



## **Cilj ovih ispitivanja je bio:**

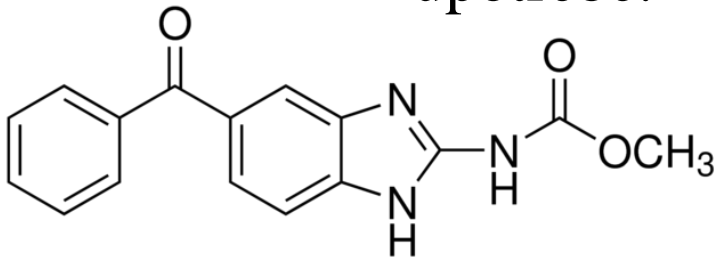
- I) da se *in vitro* ispita efekat: a) ES L1 antigena; i b) mebendazola na ćelije humanog (Fem-X) i mišjeg (B16) melanoma.
- II) da se *in vivo* na C57BL/6 miševima (kao pogodnom eksperimentalnom animalnom modelu za proučavanje rasta tumora) ispita efekat
- a) hronične infekcije sa *T. spiralis*
  - b) tretmana mebendazolom
- na rast tumora kod C57BL/6 miševa.

# Materijal i metode



Za održavanje soja *T. spiralis* (ISS 161) korišćeni su pacovi Wistar soja. Infektivne mišićne larve su dobijene veštačkom digestijom i kultivisane za produkciju ES L1 antigena.

Mebendazol (Sigma) je pripreman neposredno pre upotrebe.



## ***I) In vitro ispitivanja***

su obavljena korišćenjem ćelijskih linija mišjeg (B16) i humanog (Fem-X) melanoma. Ove ćelijske linije su kultivisane u RPMI medijumu, na 37°C, u prisustvu 5% CO<sub>2</sub>.

Posle skupljanja ćelija i brojanja, u ploču sa 96 mesta postavljeno je po 2000 ćelija/otvoru, a nakon 24h dodate su ispitivane supstance u koncentracijama od 0 – 200 µg/ml (ES L1), odnosno 0–2,5µM (mebendazol). Ovako pripremljene ploče sa ćelijama i supstancijama su kultivisane u termostatu, na temperaturi od 37°C i pri koncentraciji CO<sub>2</sub> od 5%. Posle isteka perioda inkubacije mereno je preživljavanje, korišćenjem metode MTT.

Apoptoza je određivana na protočnom citometru posle bojenja sa PI.

## II) *In vivo* ispitivanja :

grupa 1: C57BL/6 miševi inficirani sa po 200 mišićnih larvi *T. spiralis* kojima su nakon 40 dana subkutano aplikovane ćelije mišjeg (B16) melanoma.

grupa 2: Kontrola - C57BL/6 miševi kojima su aplikovane tumorske ćelije.

grupa 3: C57BL/6 miševi kojima su aplikovane tumorske ćelije i koji su nakon pojave prvih palpabilnih tumora tretirani peroralno mebendazolom (50 mg/kg, pet dana).

Životinje svih grupa su praćene 25 dana kada su žrtvovane radi vađenja tumora i njihovog merenja.

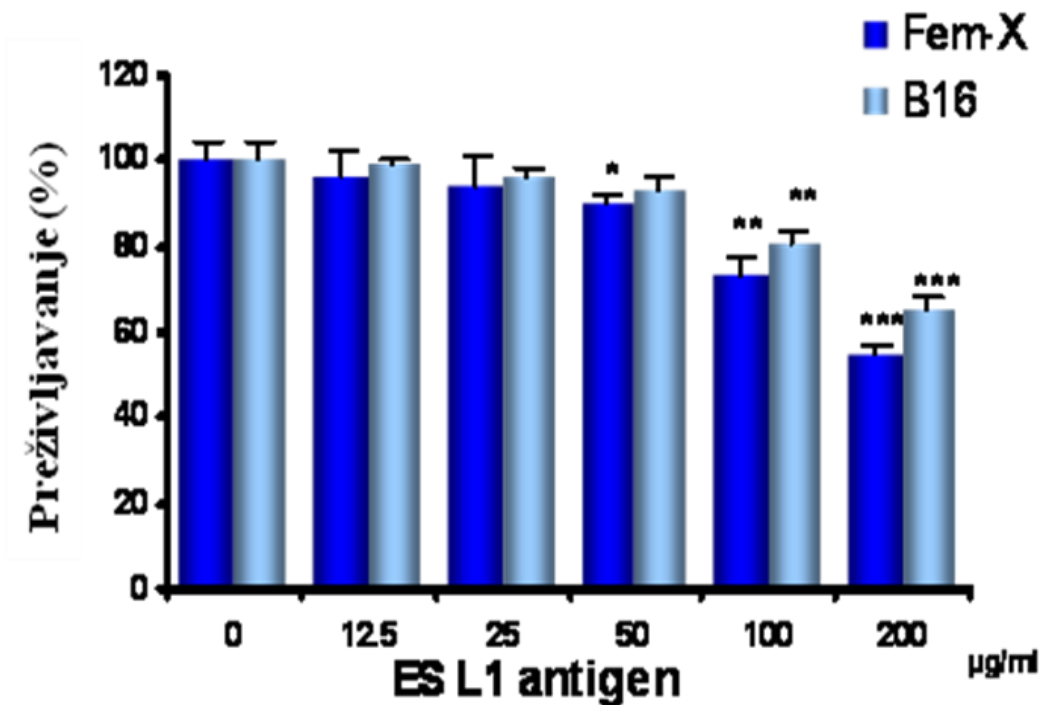
Za statističku analizu ispitivanih parametara korišćen je Student-t test.



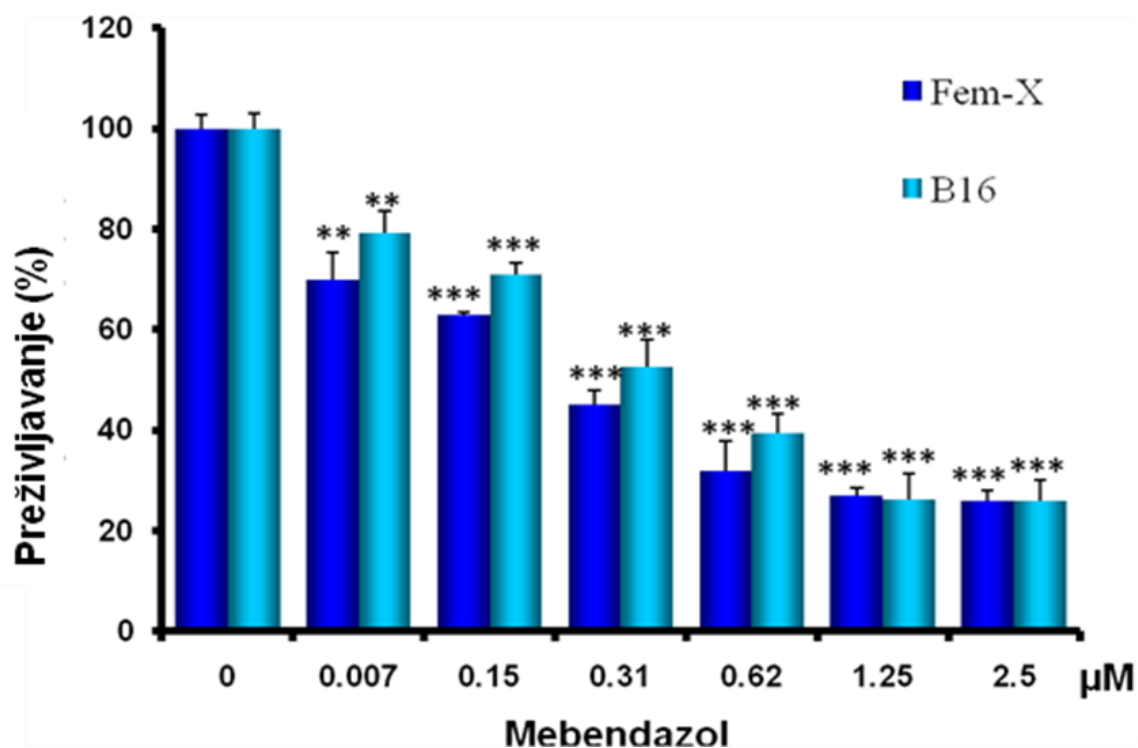
**REZULTATI**

# I) *in vitro* ispitivanja

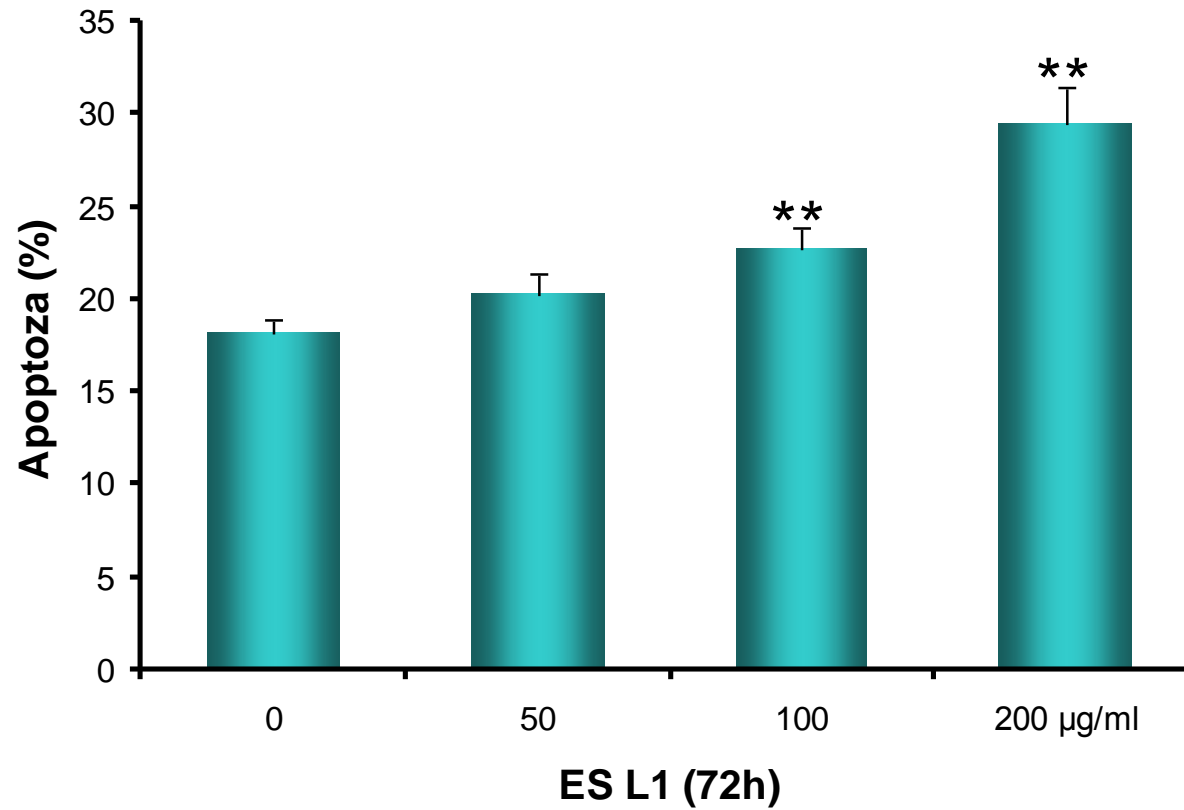
# Efekat ES L1 antigena na preživljanje ćelija melanoma



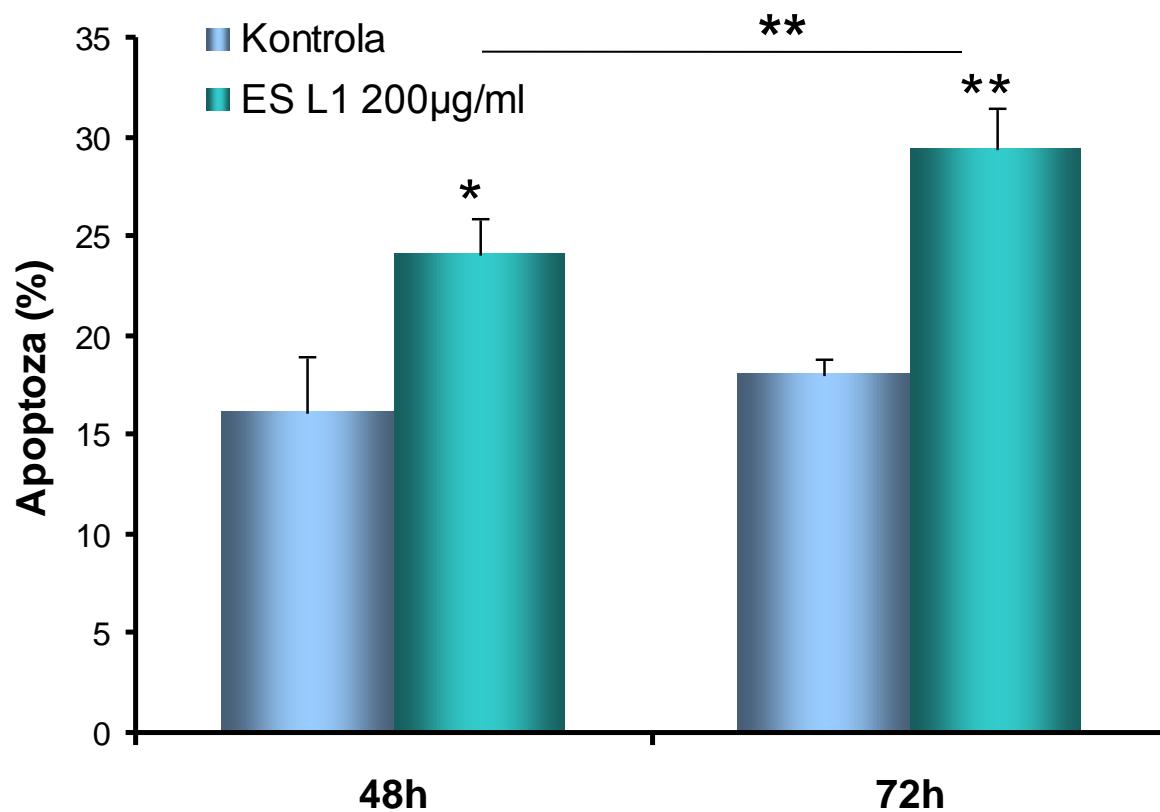
# Efekat mebendazola na preživljavanje ćelija melanoma



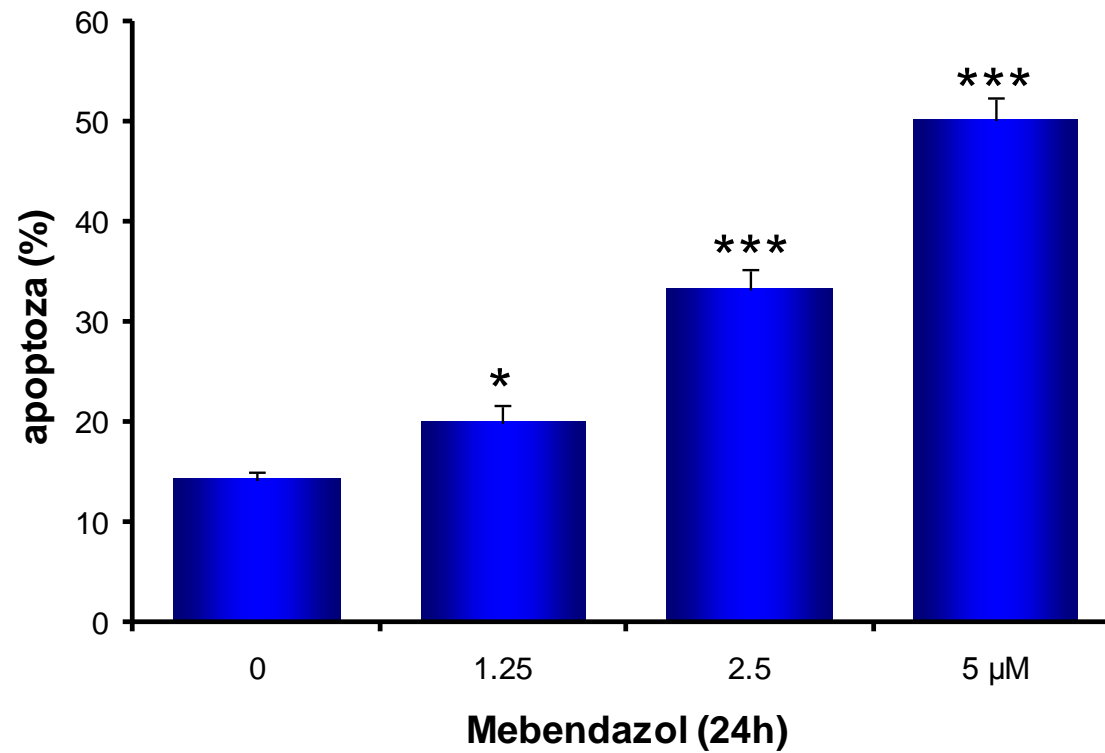
# Efekat ES L1 antigena *T. spiralis* na apoptozu B16 ćelija



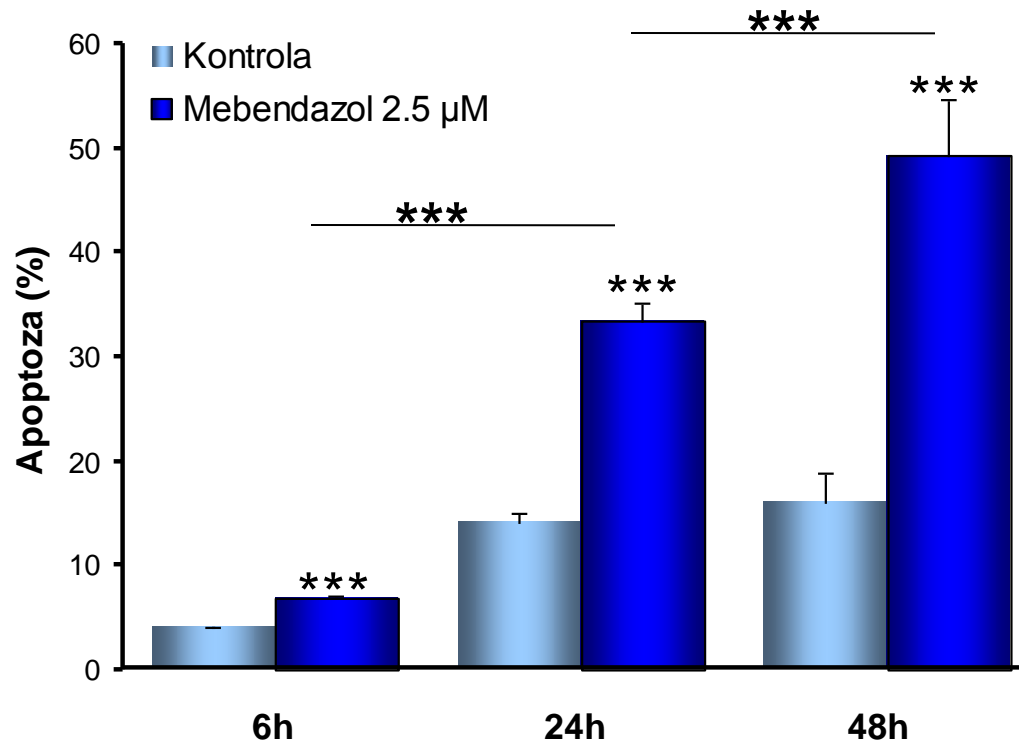
# Efekat ES L1 antigena *T. spiralis* na apoptozu B16 ćelija je vremenski zavisian



# Efekat mebendazola na apoptozu B16 ćelija

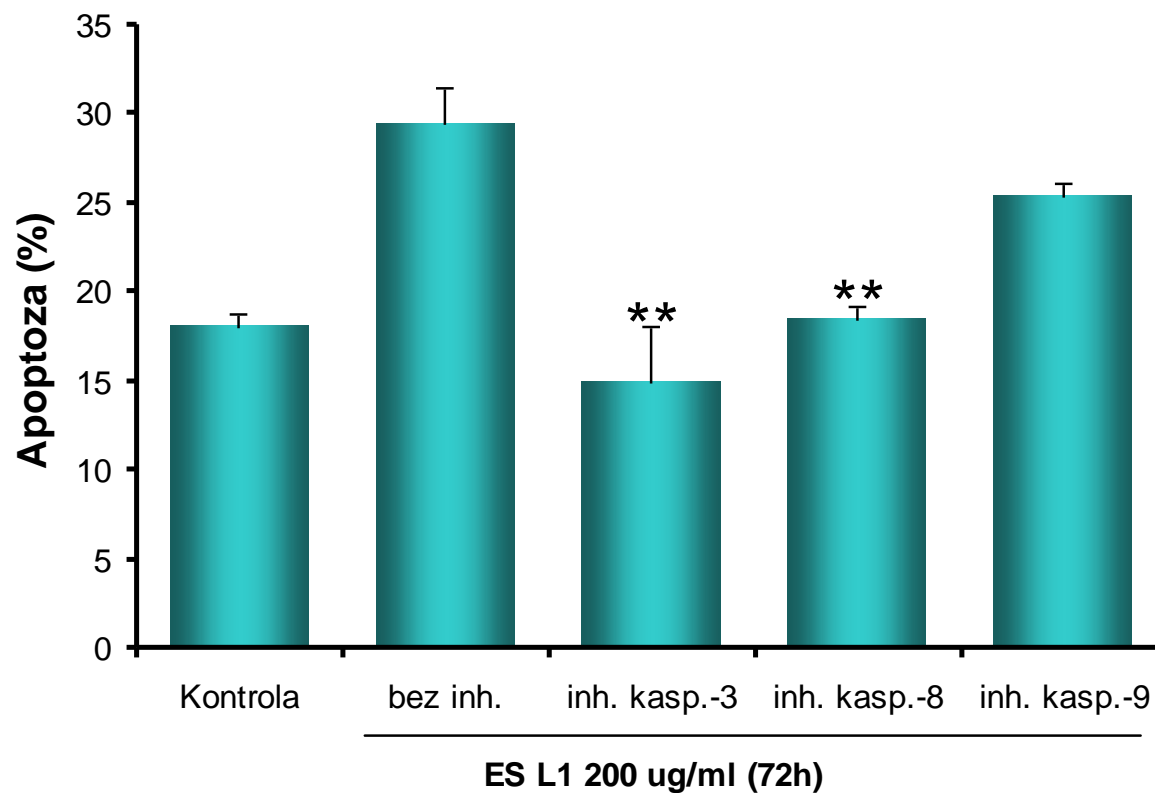


# Efekat mebendazola na apoptozu B16 ćelija je vremenski zavisian

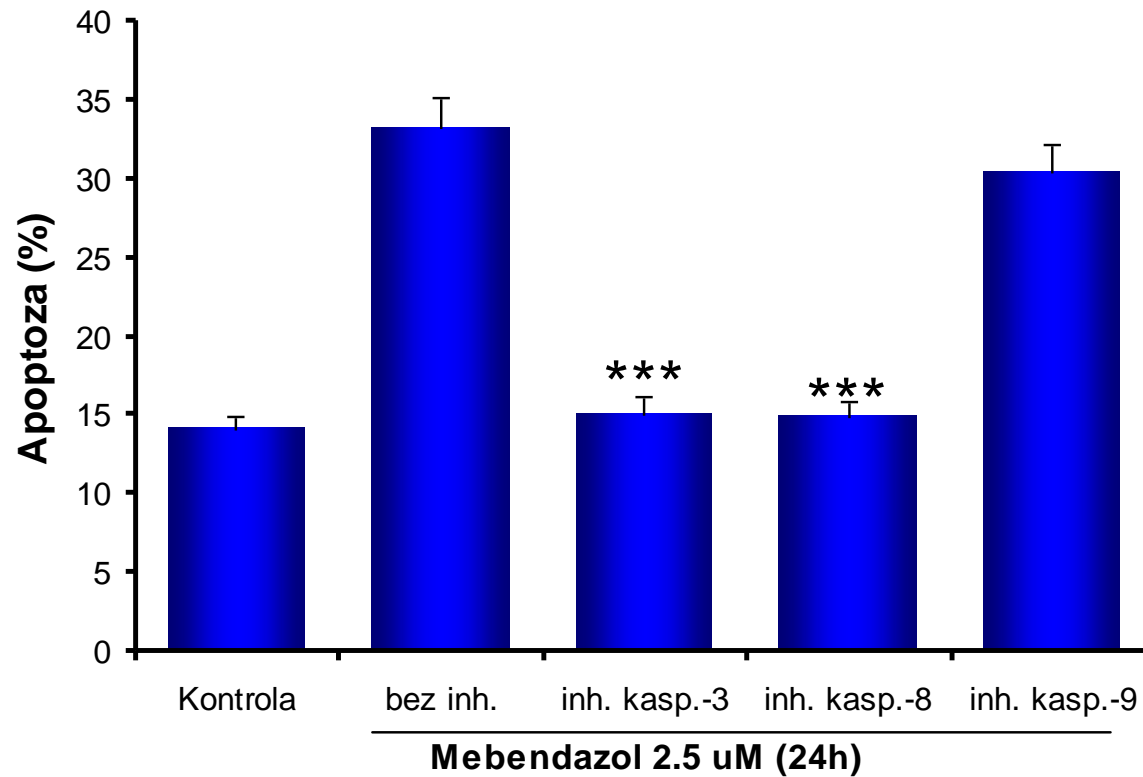




# Efekat inhibitora kaspaza na apoptozu B16 ćelija indukovanu ES L1 antigenom *T. spiralis*



# Efekat inhibitora kaspaza na apoptozu B16 ćelija indukovanu mebendazolom



## II) *in vivo* spitivanja

# Uticaj hronične infekcije sa *T. spiralis* na razvoj melanoma *in vivo*

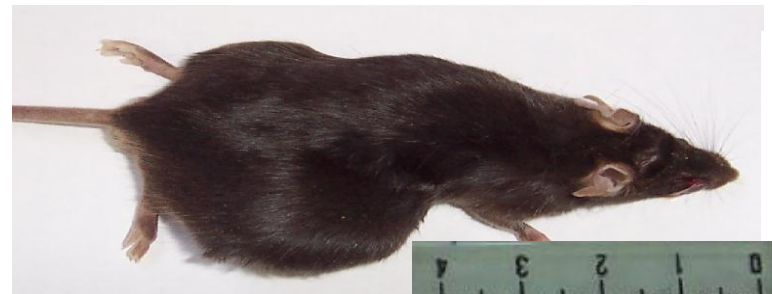
A) Uticaj hronične infekcije sa *T. spiralis* na razvoj melanoma



1 x 0.3 cm

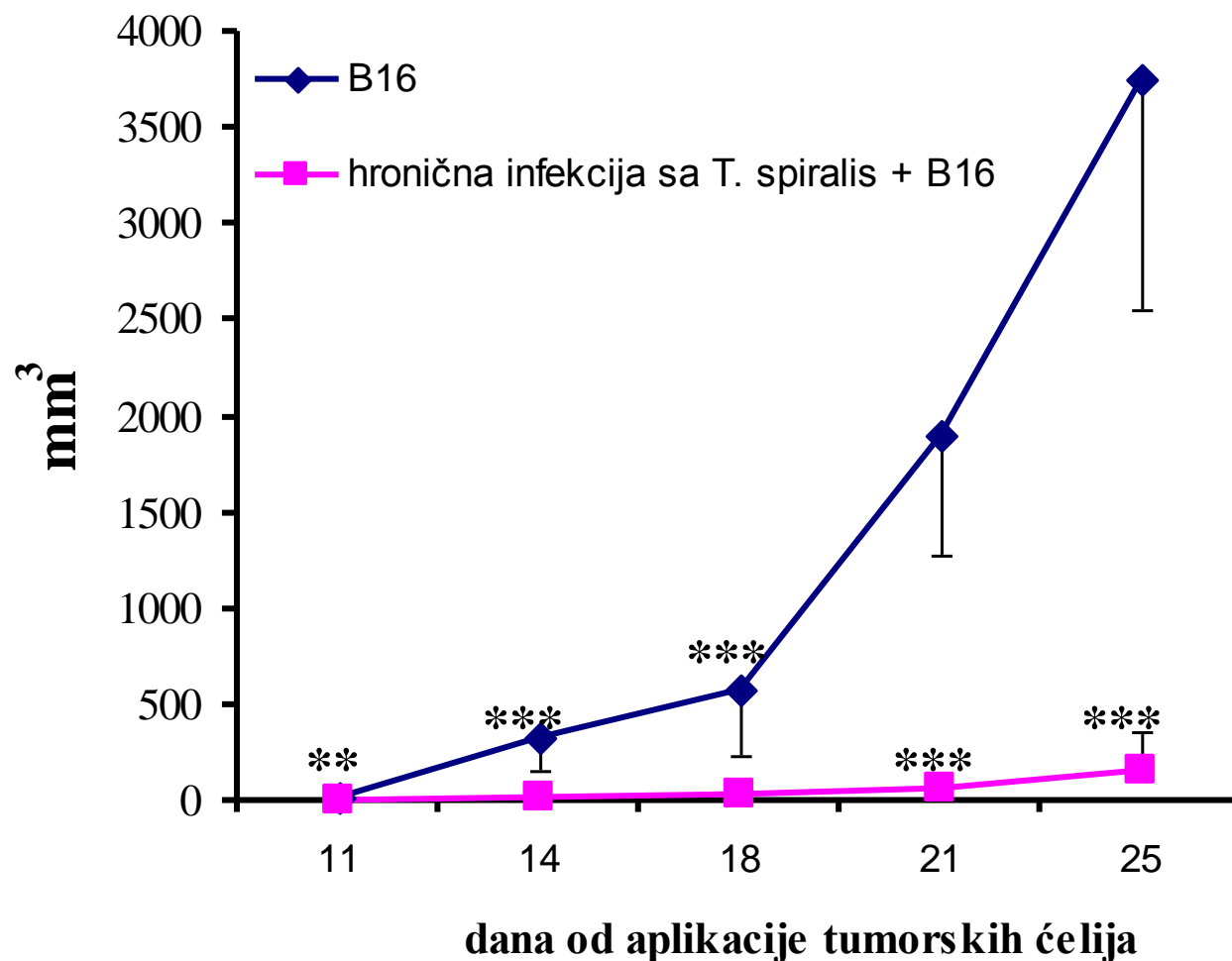
- Hronična infekcija sa *T. spiralis* dovodi do smanjenja tumora kod C57Bl/6 miševa.

B) Bez infekcije, melanom raste

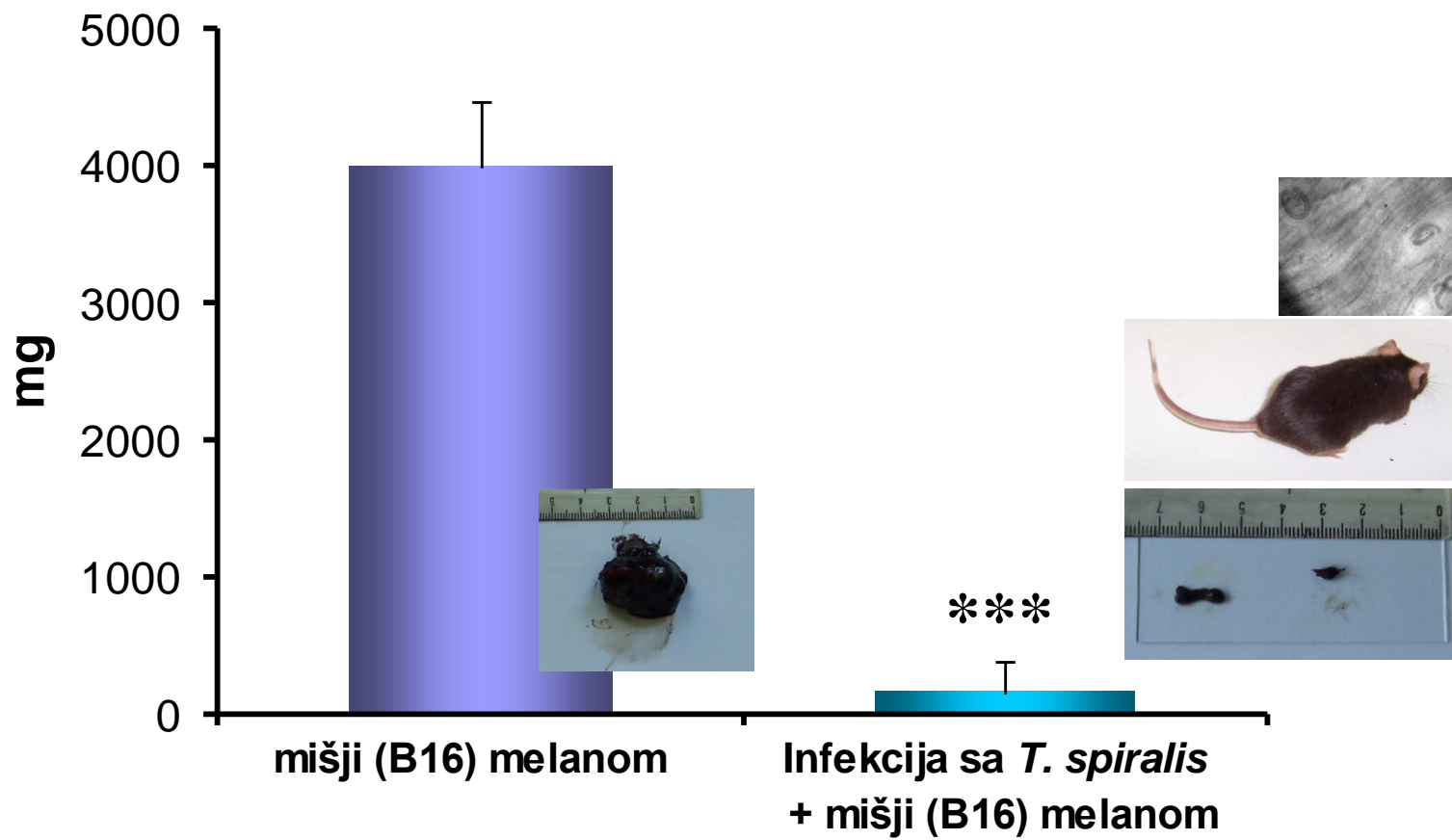


3.8 x 3.5 cm

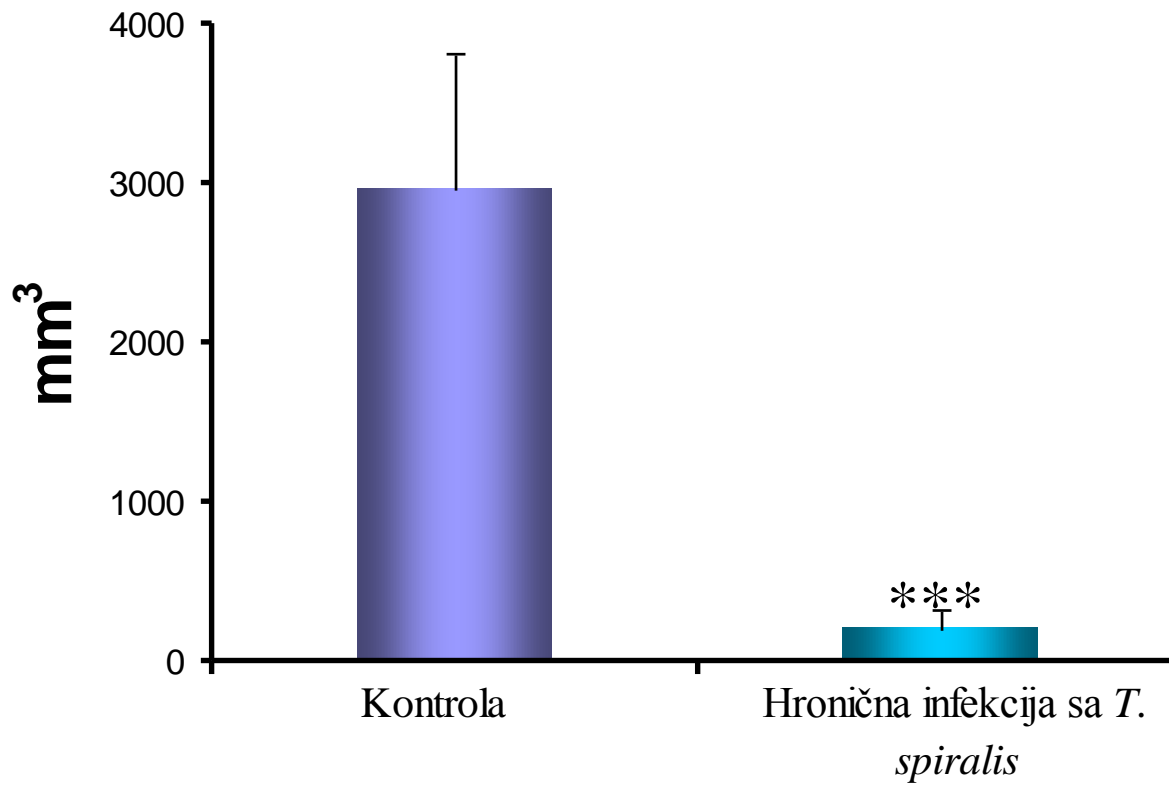
# Efekat hronične infekcije sa *T. spiralis* na zapreminu melanoma



# Efekat hronične infekcije sa *T. spiralis* na masu melanoma



# Efekat hronične infekcije sa *T. spiralis* na zapreminu izvađenog melanoma



# Uticaj tretmana mebendazolom na razvoj melanoma *in vivo*

## A) Uticaj tretmana mebendazolom na razvoj melanoma



0.6 x 0.3 cm

- Tretman miševa mebendazolom dovodi do smanjenja tumora kod C57Bl/6 miševa.

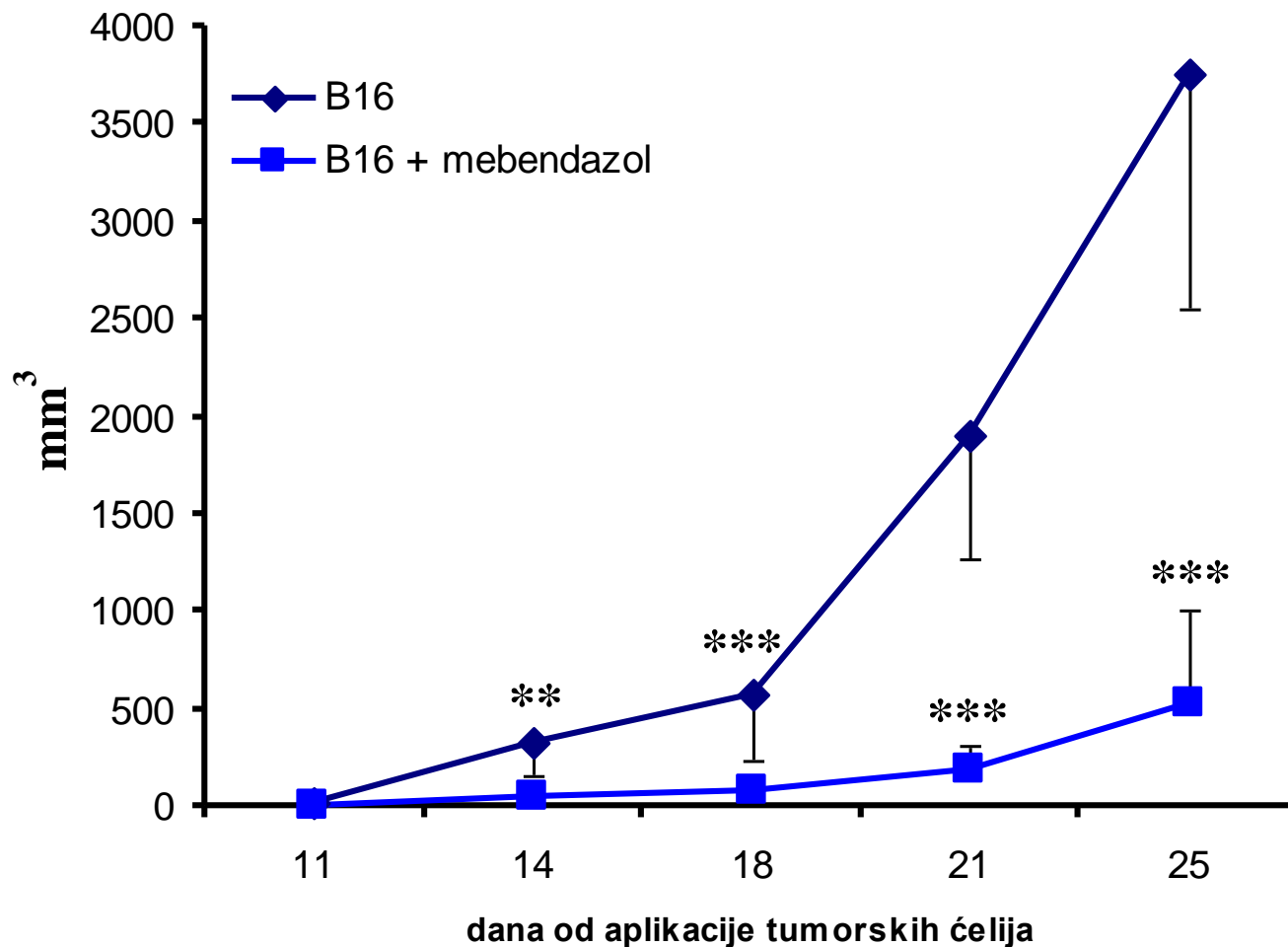
## B) Kontrola, melanom raste



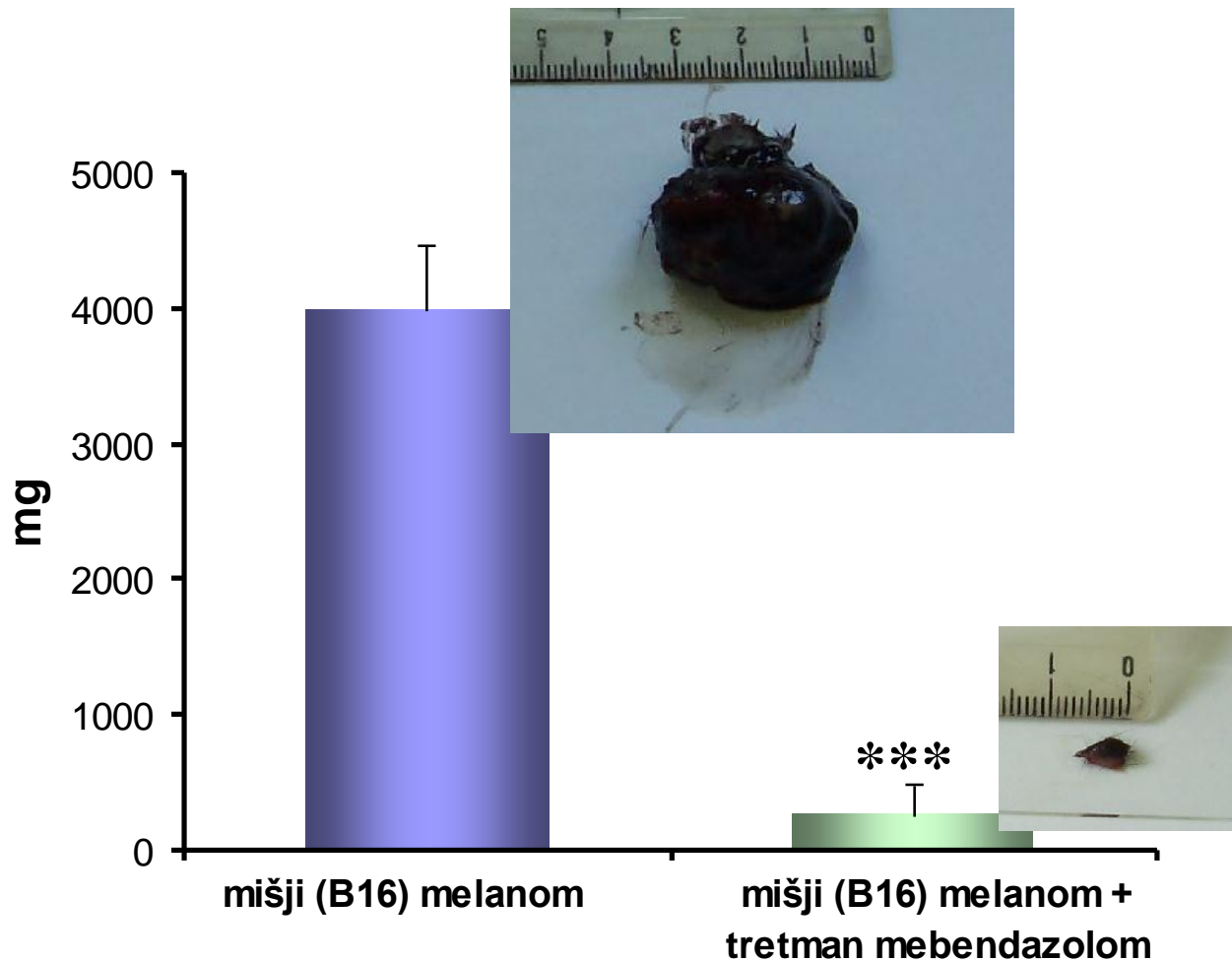
3.8 x 3.5 cm



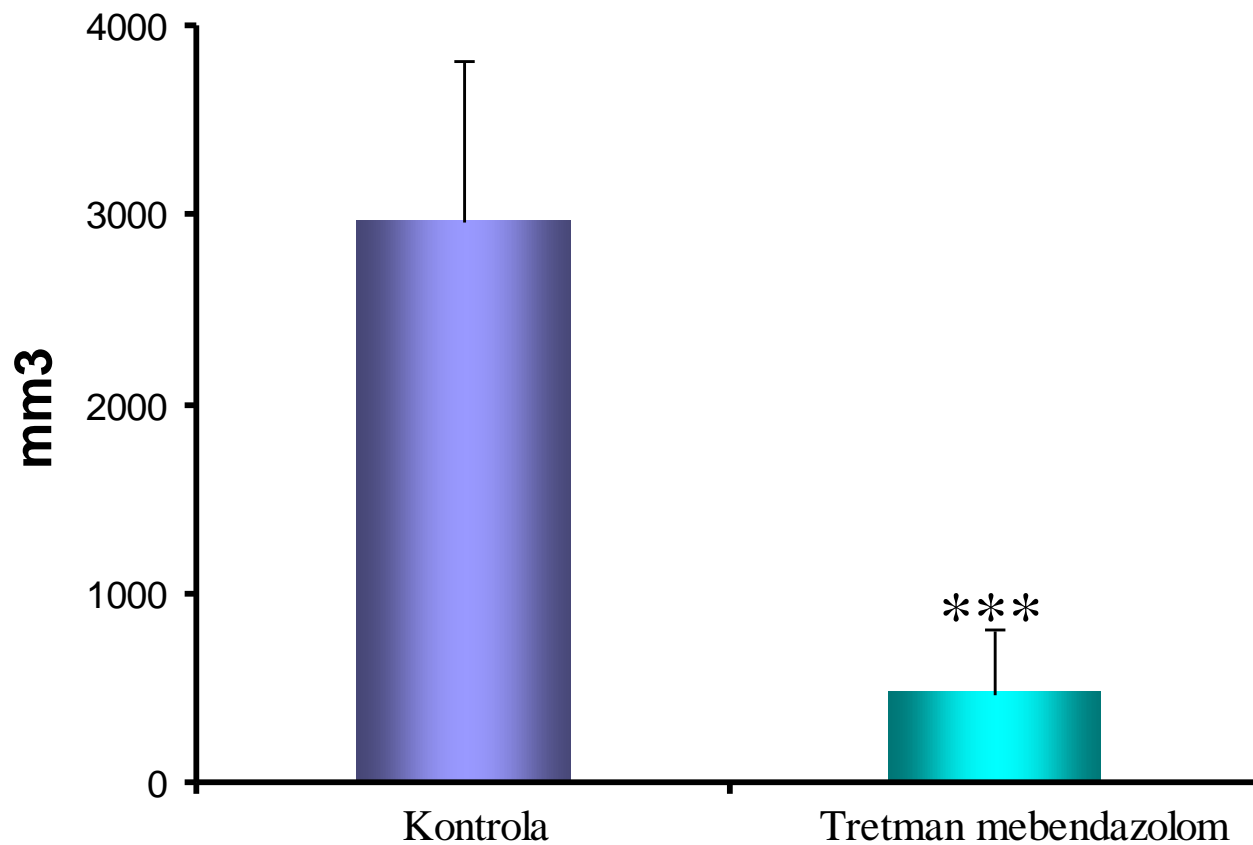
# Efekat tretmana mebendazolom na zapreminu melanoma *in vivo*



# Efekat mebendazola na masu melanoma kod C57Bl/6 soja miševa



# Efekat mebendazola na zapreminu izvađenog melanoma *in vivo*



## Zaključci:

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da obe ispitivane supstance (ES L1 antigen *T. spiralis* i mebendazol) poseduju antitumorski potencijal kako u uslovima *in vitro* tako i u uslovima *in vivo*.

**Hvala na pažnji!**