

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „Ocena działania przeciwnowotworowego 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-214) w spersonalizowanym modelu raka jajnika”

2. Czas trwania projektu **01.02.2019 – 01.02.2022**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **metrylowe analogi resweratrolu, DMU-214, CYP1A1, wt p53, hipoksja**

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) **Badania podstawowe**

## A. Badania podstawowe

B. Badania translacyjne lub stosowane

C. Badania mające na celu zachowanie gatunku

D. Badania z zakresu medycyny sądowej

E. Badania zapewniające poprawę dobrostanu zwierząt lub warunków chowu lub hodowli zwierząt gospodarskich

F. Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania

G. Badania w celu ochrony środowiska naturalnego

H. Badania w celu kształcenia na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych

## 5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

Celem doświadczenia jest ocena działania przeciwnowotworowego DMU-214 (3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu), metabolitu metylowego analogu resweratrolu DMU-212 (3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu), wobec komórek raka surowiczego jajnika pochodzących od pacjentek. Pomimo, że częstość występowania raka jajnika jest mniejsza w porównaniu do innych nowotworów u kobiet, współczynnik śmiertelności jest bardzo wysoki z powodu szybkiego postępu choroby oraz oporności wielolekowej pojawiającej się już na wczesnym etapie leczenia. W zaawansowanym stadium choroby, konieczne jest, oprócz resekcji fragmentu guza, wprowadzenie chemioterapii. Paklitaksel oraz karboplatyna, standardowo stosowane w leczeniu raka jajnika, indukują zróżnicowaną odpowiedź wśród pacjentek, a terapie celowane molekularnie są bardzo rzadko używane. Dlatego bardzo ważnym jest rozwijanie modelu spersonalizowanego leczenia raka jajnika w oparciu o jego charakterystykę molekularną oraz genetyczną, która pozwoliłaby przewidzieć odpowiedź pacjenta na zastosowaną terapię. Proponowane doświadczenie jest kontynuacją naszych wcześniejszych badań w modelu *in vitro*, które wykazały, że silne działanie przeciwnowotworowe DMU-214 w dwóch dostępnych komercyjnie

ustalonych liniach komórkowych raka jajnika o nazwie A-2780 i SKOV-3 uwarunkowane jest m.in. profilem ekspresji białka p53 oraz CYP1A1, jednego z enzymów należących do rodziny cytochromu P450 CYP1. Dlatego też postawiliśmy hipotezę, że oznaczanie poziomu białka p53 i CYP1A1 u pacjentek z rakiem jajnika może być czynnikiem prognostycznym skuteczności działania DMU-214. Scharakteryzowane pod kątem molekularnym (z określonym poziomem ekspresji m.in. wt p53 oraz CYP1A1) trzy linie komórkowe (wyprowadzone od trzech pacjentek) w pierwszym etapie badań (części eksperymentalnej in vitro) hodowane były w modelu 3D, co miało na celu znacznie bardziej wiarygodne odwzorowanie warunków panujących w organizmie w stosunku do tradycyjnego, najczęściej stosowanego w eksperymentach in vitro modelu 2D. Hodowle trójwymiarowe wykazują dużo większe podobieństwo do tkanki pod względem kontaktów międzykomórkowych, ścieżek sygnałowych, ekspresji genów oraz dystrybucji składników odżywczych i tlenu. Dlatego też, analiza działania przeciwnowotworowego DMU-214 została przeprowadzona w modelu 3D utworzonym z komórek pochodzących od pacjentek z rakiem jajnika. Wyniki naszych badań otrzymanych w części eksperymentalnej in vitro wykazały silne działanie anty-proliferacyjne DMU-214 zależne od ekspresji niezmutowanego białka p53 (ang. wild type p53). Zasadnym jest zatem, że w końcowym etapie realizacji projektu wnioskodawca zamierza zweryfikować aktywność biologiczną związku w eksperymencie in vivo z wykorzystaniem myszy immunoniekompetentnych SCID, którym zostaną wszczepione komórki nowotworowe pochodzące od tych samych pacjentek.

Powszechnie wiadomo, że zarówno p53, jak i CYP1A1 są zaangażowane w proces generowania reaktywnych form tlenu (RFT). Dlatego zakłada się, że stężenie tlenu odgrywa rolę również w działaniu anty-proliferacyjnym DMU-214. Tkanka nowotworowa charakteryzuje się zmniejszonym stężeniem tlenu wynoszącym od około 5%, do nawet 0,05%, a utrzymujący się stan hipoksji stanowi czynnik limitujący efektywność zarówno radio-, jak i chemioterapii, których mechanizm działania jest związany z generowaniem RFT. Dane literaturowe wskazują, że ścieżki sygnalizacyjne p53 oraz CYP1A1, wchodzą w interakcje z czynnikiem hipoksji HIF-1 $\alpha$ . Modulacja procesów odpowiedzialnych zarówno za oporność, jak i śmierć komórek nowotworowych, w których pośredniczą p53 oraz HIF-1 $\alpha$  jest bardzo złożona z uwagi na ich synergistyczne bądź antagonistyczne działanie. Dlatego też, analiza mechanizmu działania DMU-214 w hipoksji występującej w guzie pozwoli na głębsze zrozumienie wzajemnego oddziaływania pomiędzy tymi czynnikami transkrypcyjnymi. Ponadto, pozwoli na rozszerzenie wiedzy na temat udziału hipoksji w oporności komórek nowotworowych na potencjalne chemioterapeutyki. Ścieżki sygnałowe aktywowane w komórkach raka jajnika, które odpowiadają za zjawisko oporności indukowanej przez hipoksję nie są wystarczająco poznane. Planowane w projekcie analizy biochemiczne i molekularne, obejmujące m.in. mikromacierze ekspresyjne mogą przyczynić się do identyfikacji nowych markerów hipoksji oraz oporności komórek raka jajnika na DMU-214. Przewidywanymi szkodami u zwierząt włączonych do doświadczenia jest dyskomfort podczas wykonywanych czynności (anestazja, wszczepianie komórek nowotworowych, iniekcja vehiculum lub związku badanego).

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Do doświadczenia zostanie włączone 60 osobników, 6 grup po 10 zwierząt (samice) gatunku Mysz domowa (*Mus musculus*), stado niekrewniacze SCID Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup>, w wieku 8 tygodni w momencie zakupu.

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

W dostępnym piśmiennictwie PubMed, MEDLINE, BioMed Central, Google Scholar, Scopus, EMBASE, ScienceDirect, Current Contents wykorzystując kilka różnych strategii wyszukiwania nie znaleziono informacji, których uzyskanie jest celem tego projektu (użyte słowa kluczowe: methylated resveratrol analogues, DMU-214, xenograft, in vivo visualisation, MRI, primary ovarian cancer cell lines with the expression CYP1A1 and *wt* p53).

### 1. Zasada zastąpienia

Pomimo, że przy użyciu metod *in vitro* możliwe jest badanie interakcji związków chemicznych z procesami zachodzącymi w żywych komórkach na poziomie molekularnym, to analiza wzajemnych oddziaływań i zależności pomiędzy dziesiątkami typów komórek prawidłowych wchodzących w skład żywego organizmu a komórkami nowotworowymi możliwa jest obecnie tylko w modelu zwierzęcym. Ponadto mysz model ludzkich ksenograftów umożliwia obserwację rozwoju ludzkiego guza nowotworowego w organizmie myszy z uwzględnieniem wszystkich aspektów dystrybucji badanego związku, które są niemożliwe do odtworzenia w warunkach hodowli komórkowych lub innych znanych obecnie modelach badawczych.

### 2. Zasada ograniczenia

Badania będą obejmowały 60 osobników, sześć grup po 10 osobników, co stanowi minimalną liczbę zwierząt w grupie potrzebną do prawidłowej oceny statystycznej otrzymanych wyników biorąc pod uwagę średnią i odchylenie standardowe prób.

Zastosowanie nieinwazyjnych metod obrazowania (MRI) pozwala na znaczne zredukowanie (3 krotne) liczby zwierząt w eksperymencie. W klasycznym eksperymencie bez użycia rezonansu magnetycznego, konieczne jest uśmiercenie grupy myszy w każdym etapie, punkcie czasowym doświadczenia (3 badania MRI). W modelu zaproponowanym przez wnioskodawcę jest to zastąpione wizualizacją nieinwazyjną, wymagającą jedynie chwilowego znieczulenia myszy, które- po zakończonym badaniu- są ponownie włączane do trwającego doświadczenia.

### 3. Zasada udoskonalenia

W proponowanych badaniach zamierza się wykorzystać gatunek Mysz domowa, *Mus Musculus*; stado niekrewniacze SCID Crl:SHO-*Prkdc<sup>scid</sup>HR<sup>hr</sup>*, które charakteryzuje się brakiem sierści. Wykorzystanie tego modelu eksperymentalnego pozwala na szybkie podskórne wszczepienie myszom komórek nowotworowych, co skraca narażenie zwierząt na dystres związany z ich unieruchomieniem oraz nakłuciem skóry.

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☐ NIE

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.