

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „**Ocena działania przeciwnowotworowego kombinacji ksantohumolu i izotiocyjanianu fenetylu w modelu raka wątroby i trzustki**”

2. Czas trwania projektu **15.04.2019-15.04.2021**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) : rak wątroby i trzustki, ksantohumol, izotiocyjanian fenetylu, myszy SCID; Nrf2

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

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 kombinacji naturalnych związków roślinnych: ksantohumolu (należącego do chalkonów) i izotiocyjanianu fenetylu (należącego do glukozynolanów) w modelu raka wątroby i trzustki.

Badania epidemiologiczne szacują, że w 2030 roku spośród trzech wytypowanych nowotworów, charakteryzujących się największym wskaźnikiem śmiertelności będą m.in. nowotwory wątroby i trzustki. Wskazuje to na konieczność prowadzenia badań przesiewowych, stosowania profilaktyki a przede wszystkim znalezienia skutecznych metod leczenia raka wątroby i trzustki. W przypadku nowotworów pochodzących z tych narządów ma to szczególne znaczenie z powodu oporności na aktualnie stosowane terapie, a także brak symptomów umożliwiających ich wczesną diagnostykę.

W powstawaniu nowotworów wątroby i trzustki istotną rolę odgrywają przewlekłe stany zapalne, które są czynnikiem ryzyka jak i istotną przyczyną rozwoju procesu kancerogenezy. Jedną ze strategii hamowania lub zapobiegania nowotworom jest stosowanie związków chemoprewencyjnych (ochronnych). Opisano szereg naturalnych i syntetycznych związków, które wykazują właściwości przeciwzapalne, jak i

hamujące rozwój komórek nowotworowych. Należy do nich ksantohumol (obecny w chmielu), jak i występujący w roślinach kapustnych izotiocyjanian fenetylu. Badania opublikowane w czasopiśmie *Carcinogenesis* wskazują, że w rozwoju nowotworów wątroby istotną rolę pełni szlak sygnałowy zależny od Nrf2 (jądrowego czynnika 2). Przewlekła aktywacja tego czynnika może prowadzić do progresji nowotworów. Stąd poszukiwanie inhibitorów Nrf2 budzi duże zainteresowanie z punktu widzenia ich zastosowania w celach terapeutycznych.

Szereg badań wskazuje, że celem działania naturalnie występujących związków roślinnych jako potencjalnych czynników chemoprewencyjnych i/lub terapeutycznych może być szlak sygnałowy zależny od Nrf2. Nasze wstępne badania *in vitro* wykazały, że naturalnie występujące związki z grupy chalkonów (ksantohumol) oraz produktów degradacji glukozynolanów (izotiocyjanian fenetylu) posiadają zdolność do modulacji ścieżki sygnałowej zależnej od Nrf2 w komórkach nowotworowych wątroby i trzustki, wykazując jednocześnie działanie antyproliferacyjne (obniżające przeżywalność komórek). Ostatnio sugeruje się, że lepsze efekty chemoprewencyjne (ochronne) lub wspomagające chemioterapię można uzyskać stosując zamiast pojedynczych związków ich kombinacje.

W pierwszym etapie badań z wykorzystaniem modelu *in vitro* zostały przebadane kombinacje naturalnych związków roślinnych z grupy chalkonów (ksantohumol), stilbenów (resweratrol), produktów degradacji glukozynolanów (indolo-3-karbinol i izotiocyjanian fenetylu). Spośród badanych związków i ich kombinacji najsilniejsze działanie antyproliferacyjne wykazywała kombinacja ksanthohumolu i izotiocyjanianu fenetylu. Dane literaturowe wskazują, że w przypadku zastosowania podobnej kombinacji (ksantohumolu i honiokolu - należącego do lignanów) zanotowano indukcję apoptozy adipocytów (komórek tłuszczowych). Z kolei kombinacja izotiocyjanianu fenetylu z dibenzoilometanem (składnikiem lukrecji) hamowała wzrost komórek nowotworowych prostaty. Nasze badania *in vitro* wykazały, że kombinacja ksantohumolu i izotiocyjanianu fenetylu hamowała wzrost komórek nowotworowych wątroby (HepG2) i trzustki (PSN1) w porównaniu do wzrostu komórek prawidłowych z tych narządów. Dalsze badania *in vitro* wykazały, że stosowanie tej kombinacji wpływa na szlak zależny od Nrf2 co wiąże się z modulacją enzymów i białek o działaniu antyoksydacyjnym, przeciwzapalnym i cytoprotekcyjnym (prewencyjnym/ ochronnym). Dlatego też postanowiono zbadać aktywność biologiczną ksantohumolu i izotiocyjanianu fenetylu oraz ich kombinacji w eksperymencie *in vivo* z wykorzystaniem myszy SCID (ang. *severe combined immunodeficiency*), którym zostaną wszczepione pochodzące z wątroby ludzkie komórki nowotworowe HepG2 oraz pochodzące z trzustki ludzkie komórki nowotworowe PSN1. Planowane doświadczenie rozpocznie się od oswajania zwierzęcia z eksperymentatorem, następnie myszom zostaną wszczepione podskórnie komórki raka wątroby oraz raka trzustki. Po upływie dwóch dni od podania komórek zostaną wykonane fotografie w celu potwierdzenia rozwoju guza, a następnie myszom zostaną podane związki badane. Wówczas będzie miała miejsce ponowna analiza rozmiaru guzów w celu zbadania wpływu testowanych związków na rozwój nowotworu. Doświadczenie zostanie zakończone eutanzją zwierząt w celu pobrania guzów do analiz molekularnych i histopatologicznych.

Wyniki otrzymane w ramach badań *in vivo* mogą stanowić podstawę do badań przedklinicznych i klinicznych służących zwiększeniu skuteczności terapii nowotworów wątroby i trzustki. Ponadto badania te pozwolą na poznanie mechanizmu działania badanych związków ksantohumolu, izotiocyjanianu fenetylu a szczególnie ich kombinacji w kontekście badanego szlaku sygnałowego zależnego od Nrf2, co będzie przydatne w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych.

Przewidywanymi szkodami u zwierząt włączonych do doświadczenia jest dyskomfort podczas

wykonywanych czynności (anestezja, wszczepianie komórek nowotworowych, iniekcja związków).

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Do doświadczenia zostanie włączone 80 osobników, 8 grup po 10 zwierząt (samce) gatunku Mysz domowa (*Mus musculus*), stado niekrewniacze SCID Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, w wieku 8 tygodni w momencie zakupu.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

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: rak wątroby i trzustki; ksantohumol; izotiocyanian fenetylu; myszy SCID; Nrf2; ang.liver and pancreas cancer; xanthohumol, phenethyl isothiocyanate; mice SCID; Nrf2).

Realizacja zasad zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia (3R)

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 80 osobników, osiem 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 pozwala na znaczne zredukowanie liczby zwierząt w eksperymencie. W klasycznym eksperymencie bez użycia techniki bioobrazowania luminescencyjnego, konieczne jest uśmiercenie grupy myszy w każdym etapie, punkcie czasowym doświadczenia. W modelu zaproponowanym przez wnioskodawcę jest to zastąpione wizualizacją nieinwazyjną, wymagającą jedynie chwilowego znieczulenia myszy, które- po zakończonym badaniu- są ponownie włączane do

¹ Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

trwającego doświadczenia.

3. Zasada udoskonalenia

W proponowanych badaniach zamierza się wykorzystać gatunek Mysz domowa, *Mus Musculus*; stado niekrewniacze SCID Crl:SHO-*Prkdc^{scid}Hr^{hr}*, 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.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

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

X NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.