

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Rola CD73 (ekto-5'-nukleotydazy) w procesach promocji i progresji raka sutka oraz jego ocena jako celu terapeutycznego**

2. Czas trwania projektu: **4 lata**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **rak sutka, CD73 (ekto-5'-nukleotydaza), knockout CD73, przerzuty, kancerogeneza chemiczna**

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.

Rak sutka, najczęściej występujący nowotwór złośliwy u kobiet, jest ciągle uznawany za wyzwanie kliniczne ze względu na jego częste nawroty po terapii i wynikającą z tego wysoką śmiertelność. W przypadku nowotworów złośliwych nowym celem terapeutycznym, jest CD73 (ekto-5'-nukleotydaza), enzym generujący zewnątrzkomórkową adenozyne. W modelach zwierzęcych, gdzie wzrost nowotworu jest indukowany poprzez podanie syngeneicznych komórek nowotworowych, wykazano, że zarówno knockout genu CD73 u gospodarza jak i chemiczna inhibicja tego enzymu prowadzą do zahamowania wzrostu jak i rozsiewu różnego typu nowotworów złośliwych, także raka sutka. Jednakże w przypadku raka sutka w badaniach klinicznych wyniki korelacji ekspresji CD73 z przeżyciem i prognozą pacjentów okazały się kontrowersyjne, wskazując, że być może rola CD73 zależna jest w raku sutka od innych parametrów klinicznych, jak np. typ nowotworu, zaawansowanie.

Głównym celem projektu będzie określenie roli CD73 w rozwoju raka sutka w zależności od etapu rozwoju (na początkowym etapie wzrostu guza oraz na etapie uzłośliwienia guza pierwotnego) oraz od typu nowotworu

(pod względem histologicznym i molekularnym). Cel ten realizowany będzie poprzez indukcję rozwoju raka sutka za pomocą chemicznej kancerogenezy, co pozwoli na odzwierciedlenie podobnej różnorodności i ścieżki powstawania raka sutka jak w przypadku nowotworów człowieka. Uzyskane wyniki zostaną porównane do standardowego modelu uzyskanego przez iniekcje syngeneicznych komórek linii raka sutka, w celu określenia potencjalnych różnic mogących prowadzić do niezgodności obecnej w badaniach klinicznych.

Zostaną zastosowane dwie grupy doświadczalne: myszy C57BL/6, niemodyfikowane genetycznie oraz myszy modyfikowane genetycznie, pozbawione ekspresji CD73 poprzez usunięcie funkcjonalnej kopii genu z genomu (tzw. knockout) z tłem genetycznym C57BL/6. Zmiany w różnych parametrach wzrostu guza, korelowane będą z ekspresją CD73 i typem raka sutka. Wykonana zostanie analiza wieloparametryczna, guzy/gruczoły sutkowe zostaną poddane analizie histopatologicznej, sekwencjonowaniu RNA oraz analizie immunohistochemicznej. Będą także analizowane: rozsiew komórek raka sutka we krwi, szpiku kostnym i płucach oraz zmiany w układzie immunologicznym (guz, krew, śledziona, płuca), a także zmiany w komórkach pnia raka sutka, potencjalnie ważnych w procesach wznowy nowotworowej.

Uzyskane wyniki rozszerzą naszą wiedzę na temat roli CD73 w rozwoju raka piersi i wyjaśnią czy CD73 może być celem terapeutycznym w raku sutka, co jest szczególnie ważne teraz, gdy terapia anty-CD73 wkracza do badań klinicznych (NCT02503774) w przypadku innych nowotworów złośliwych.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

52 osobniki myszy C57BL/6 niemodyfikowane genetycznie oraz 52 osobniki myszy C57BL/6 z knockoutem w genie *cd73* (zwierzęta nie posiadają CD73 w wyniku modyfikacji genetycznej).

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Zasada 3R została uwzględniona w oparciu o zalecenia wydawane przez European Animal Research Association (EARA), a także na podstawie danych z literatury, odpowiednich dla tego typu badań.

Podczas przygotowywania niniejszego projektu przeszukano między innymi bazy danych: PUBMED, Google Scholar, Research Gate i Science Direct w zakresie tematyki objętej wnioskiem badawczym. Wykorzystano słowa kluczowe: rak sutka, CD73 (ekto-5'-nukleotydaza), knockout CD73, przerzuty, kancerogeneza chemiczna.

REDUCTION: Planuje się zastosować najmniejszą możliwą liczebność zwierząt zapewniającą minimalną ilość wyników wymaganą do przeprowadzenia wiarygodnej analizy statystycznej, ale z wzięciem pod uwagę ewentualnych przykrych wydarzeń zmniejszających liczbę osobników w danej grupie (śmierć z niewiadomego powodu lub znaczne pogorszenie stanu zdrowia wymagające uśmiercenia zwierzęcia). Liczbę zwierząt oszacowano w sposób możliwie redukujący ich ilość do wymaganego statystycznie minimum dla każdej z

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

procedur. Ponadto, w doświadczeniu zamierza się pobrać jak największą ilość narządów i tkanek (krew obwodową, krew szpikowa, guz/gruczoł sutkowy, śledziona, płuca) w celu wykonania oznaczeń wieloparametrycznych. W planowanych badaniach stosowane będą nowoczesne metody badawcze w jednostce wyposażonej w odpowiednią infrastrukturę.

REFINEMENT: Aby ograniczyć dystres zwierząt podczas wykonywania wyżej wymienionych czynności uwzględnia się **staranne przeprowadzenie handlingu mającego na celu aklimatyzację zwierząt do osoby eksperymentatora oraz oswojenie z procedurą oraz** ograniczenie liczby procedur do niezbędnego minimum, a przy procedurach bardziej inwazyjnych (podanie dożołądkowe) wykonywanie procedur w tygodniowych odstępach. Czas trwania poszczególnych etapów doświadczenia został skrócony do niezbędnego minimum. Dodatkowo, w celu ograniczenia dyskomfortu zwierząt podczas uśmiercania, mysz zostanie znieczulona za pomocą mieszanki ketaminy z ksylazyną a po skrwawieniu zwierzęcia w celu pobrania jak największej ilości krwi obwodowej, zwierzę zostanie uśmiercone poprzez dyslokację kręgów szyjnych.

REPLACEMENT: Ze względu na próbę określenia roli celu terapeutycznego, jakim jest CD73 w raku sutka, gdzie jego rola, w przeciwieństwie do np. nowotworów układu pokarmowego, jest kontrowersyjna, oraz określenie jego roli w procesach przerzutowania i wznowy raka sutka, do przeprowadzenia badań niezbędne będzie wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych. Badania na liniach komórkowych oraz materiale klinicznym nie umożliwią pełnej oceny zmian w procesach zarówno promocji jak i progresji nowotworu. Materiał kliniczny obejmuje jedynie okres od momentu, gdy guz jest już wyczuwalny, natomiast linie komórkowe nie pozwalają na ocenę wieloparametrycznych zmian zachodzących w żywym organizmie jak np. zmiany w umiejscowieniu komórek pnia raka sutka w obrębie guza pierwotnego, zmiany w unaczynieniu guzów pierwotnych, zmiany w ekspresji specyficznych markerów molekularnych rozwoju choroby nowotworowej w obrębie mikrośrodowiska gruczołu sutkowego czy guza a także w przypadku samych komórek raka sutka (zmiany ekspresji genów związanych z uzłośliwieniem komórek), zmiany w ilościach krążących komórek nowotworowych w krwi obwodowej i szpiku kostnym a także przerzutów w płucach, oraz zmiany w układzie immunologicznym. Podsumowując, uzyskane wyniki mogą się przyczynić do rozszerzenia naszej wiedzy, co do roli CD73 w rozwoju raka piersi (jest to ważne, ponieważ aktywność tego enzymu wzrasta m.in. w stanie zapalnym towarzyszącym rozwojowi choroby nowotworowej, a także, ponieważ jednym z blokerów receptorów dla adenozyiny produkowanej przez CD73 jest m.in. powszechna używka, jaką jest kofeina). Dodatkowo mogą wyjaśnić, czy CD73 może być celem terapeutycznym w raku sutka, co jest szczególnie ważne teraz, gdy terapia anty-CD73 wkracza do badań klinicznych (NCT02503774) w przypadku innych nowotworów złośliwych.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

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

