

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Ocena zmian ekspresji i aktywności NNMT w modelu 4T1 raka sutka u myszy

2. Czas trwania projektu: 5 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) NNMT, nowotwory, przerzutowość nowotworowa,

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.

Aktywność N-metylotransferazy nikotynamidu (NNMT), katalizującej metylację nikotynamidu, ma wpływ na wiele procesów komórkowych – od wiązania grup metylowych, poprzez wpływ na syntezę NAD<sup>+</sup>, po metabolizm energetyczny. Istnieją doniesienia o regulacji ekspresji NNMT w komórkach nowotworowych człowieka jednak mechanizm regulacji ekspresji NNMT do tej pory nie został dobrze poznany.

Celem projektu jest ocena roli zmian ekspresji i aktywności N-metylotransferazy nikotynamidu (NNMT) w rozwoju raka gruczołu sutkowego, które mogą mieć wpływ na rozwój guza pierwotnego oraz na mechanizmy prowadzące do metastazy. Doświadczenie ma charakter poznawczy i jego celem jest poszerzenie wiedzy na temat wpływu tego enzymu podczas rozwoju nowotworu w warunkach in vivo, a uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do kolejnych badań nad rozwojem nowych terapii

przeciwnowotworowych.

Do realizacji badań zostaną wykorzystane myszy szczepu BALB/c nastrzykiwane komórkami nowotworowymi ortotropowo do gruczołu sutkowego (czynność 2). Model ten wykazuje wysokie podobieństwo z ludzkim rakiem piersi oraz analogiczną kinetykę, z jaką dochodzi do spontanicznego przerzutowania. Warto dodać, że w modelu wykorzystana zostanie niewielka ilość komórek nowotworowych (10.000 komórek/mysz) co zapewnia wolny rozwój nowotworu oraz możliwość badania wczesnych zmian zapoczątkowujących proces metastazy.

W ramach projektu planowane są kompleksowe badania mające na celu zbadanie wpływu NNMT na proces karcenogenezy, a obejmujące badanie zmian ekspresji enzymu w różnych tkankach oraz badania aktywności enzymu w warunkach ex vivo, poprzez inkubację tkanek z substratem enzymu - nikotynamidem. Ponadto, celem oceny roli enzymu w zmianach biochemicznych, oznaczone zostaną wybrane metabolity różnych szlaków metabolicznych związanych metylacją, biosyntezą poliamin ochroną antyoksydacyjną, inne.

Klasyfikacja doświadczenia tabela nr 2 Poz. 2.2/2a, tabela nr 4 Poz. 4.4/4a

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

W odniesieniu do patogenezy chorób człowieka, jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej biomedycyny jest lepsze zrozumienie mechanizmów chorób, zwłaszcza gdy wiedza ta jest znikoma. Pomimo tego, że dotychczas opublikowano wiele prac wskazujących na zwiększenie ekspresji i aktywności NNMT w różnych nowotworach, jego rola w procesie karcenogenezy nie jest do końca znana. Ponadto, niewiadomym pozostaje również wpływ zwiększonej ekspresji oraz aktywności NNMT w procesie przerzutowości nowotworowej. Dotychczas NNMT badana była w wielu różnych liniach komórek nowotworowych (Ulanovaskaya et al., 2013, Yu et al., 2015), a także m.in. w rozwoju i patogenezie raka przewodu pokarmowego (Chen et al., 2016), niedrobnokomórkowego raka płuc (Sartini et al., 2015), czy raka trzustki (Xu et al., 2016), jednakże nie badano jego roli w rozwoju i przerzutowości raka piersi.

Myszy szczepu BALB/c są wielofunkcyjnym modelem powszechnie wykorzystywanym w badaniach nad nowotworami, podatnym na występowanie spontanicznych nowotworów gruczołu sutkowego. Model ten jest najczęściej wykorzystywany ze względu na swój rozmiar, szybki wzrost życiowy oraz łatwość w utrzymaniu. Wykorzystując model zwierzęcy możliwe jest również badanie kinetyki zachodzących zmian w rozwoju raka gruczołu sutkowego.

Biorąc pod uwagę powyższe zależności, można podejrzewać, że zmiany biochemiczne zachodzące w komórkach organizmów myszy BALB/c mają odzwierciedlenie w organizmie ludzkim. Celem niniejszego projektu jest analiza zmian ekspresji i aktywności NNMT u myszy zdrowych oraz myszy z wszczepionymi ortotopowo komórkami nowotworu gruczołu sutkowego (model 4T1).

Podczas realizacji badań wykorzystane zostaną unikatowe techniki badawcze, które pozwolą na ocenę zmiany roli, ekspresji i aktywności NNMT w rozwoju guza pierwotnego i przerzutowości nowotworowej. Do pomiaru ekspresji NNMT w narządach posłuży metoda Western Blot oraz barwienie immunohistochemiczne. Aktywność enzymu NNMT zostanie zmierzona przy wykorzystaniu metody chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrią mas (LC/MS), natomiast stan energetyczny zostanie zmierzony wykorzystując chromatografię cieczową HPLC. Do badań nad zmianami metabolicznymi wykorzystana zostanie metabolomika celowana, która pozwala na ilościowe oznaczenie wybranych metabolitów różnych szlaków biochemicznych jednocześnie. Wybrane do analizy metabolity należą do szlaków biochemicznych bezpośrednio lub pośrednio związane z aktywnością NNMT („cykl aktywnego metylu”, synteza poliamin, stan redoks komórki (synteza NAD/NADH), czy ochrona antyoksydacyjna – GSH, GSSG).

Ponadto, w celu scharakteryzowania zmian kinetycznych w rozwoju patogenezы oraz wczesnych zmian prowadzących do przerzutowania eksperyment zaplanowano z uwzględnieniem odpowiednich punktów czasowych (1, 2, 3, 4 i 5 tygodni od wszczepienia komórek nowotworowych), co pozwoli na wgląd w zarówno wczesne stadium choroby bezpośrednio poprzedzające metastazę oraz późniejsze zmiany odzwierciedlające zmiany po procesie przerzutowania. Z uwagi na dynamiczny charakter prowadzonego badania zmian biochemicznych zachodzących w trakcie procesu kancerogenezy, nie jest możliwe zastąpienie żywych organizmów hodowlami linii komórkowych. Dodatkowo, specyfika projektu wymaga, aby ocena powyższych parametrów, była prowadzona w odniesieniu do komórek i

tkanek pobranych od zwierząt zdrowych, dlatego też w doświadczeniu niezbędne jest utworzenie grup kontrolnych na każdym etapie doświadczenia.

Przewidziano przeprowadzenie następujących badań:

- Badanie masy guza pierwotnego w rozwoju raka gruczołu sutkowego
- Badanie ekspresji NNMT techniką Western Blot oraz aktywności NNMT metoda HPLC
- Badanie histologiczne i immunohistochemiczne – ekspresja i lokalizacja białka NNMT w narządach, określenie progresji rozwoju nowotworu , ilości przerzutów do płuc i wątroby,
- Badanie morfologiczne krwi,
- Badanie biochemiczne w krwi oraz osoczu-ocena stanu zapalnego oraz markerów uszkodzenia
- Badanie zmian metabolicznych- metabolomika celowana
- Oznaczenie metabolitów tlenu azotu – azotany (III) oraz azotany (V),
- Stymulowana produkcja NO w aortalnej i płucach
- Oznaczenie metabolitów nikotynamidu –NA, MNA, Met-2PY, Met-4PY,
- Badanie stanu energetycznego komórek (ATP/ADP; NADH/NAD)
- Oznaczenie ilościowe wybranych metabolitów szlaków biochemicznych: SAH, SAM, homocysteina, metionina i inne.

Układ grup doświadczalnych wraz z liczbą zaplanowanych do wykorzystania zwierząt przedstawiono w poniższej tabeli.

		Grupa kontrolna			
Gatunek myszy	Czas [tygodnie]	Ekspresja, aktywność NNMT oraz stan energetyczny	Metabolomika	Histologia i immunohistochemia	Produkcja NO w narządach
BALB/c	1	10	10	10	10
	2	10	10	10	10
	3	10	10	10	10
	4	10	10	10	10
	5	10	10	10	10
		Grupa myszy z przeszczepionymi ortotopowo komórkami nowotworowymi			
		Ekspresja, aktywność NNMT oraz stan energetyczny	Metabolomika	Histologia i immunohistochemia	Produkcja NO w narządach
BALB/c	1	10	10	10	10
	2	10	10	10	10
	3	10	10	10	10
	4	10	10	10	10
	5	10	10	10	10
Suma		400			

W doświadczeniu przewidziano wykorzystanie 400 myszy, co pozwala na przydział 10 zwierząt do każdej grupy badanej. Jest to najmniejsza liczba zwierząt, pozwalająca na otrzymanie rzetelnych wyników badań oraz zapewnienie im odpowiedniej istotności statystycznej. W celu otrzymania wiarygodnych statystycznie wyników konieczne jest wykorzystanie co najmniej 10 myszy w każdej z grup, zatem poszczególne grupy zwierząt dla każdego doświadczenia będą liczyć po 10 osobników (n=10). Dla grup o n=10, przy odchyleniu standardowym na poziomie 25% w grupie, przy mocy badania na poziomie 80% (beta=0.2), różnica średniej dla grup na poziomie 25% będzie istotna statystycznie na poziomie alfa=0.05.

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

Na podstawie przeglądu literatury (bazy danych Pubmed, Google Scholar, Science Direct, Web of Science, Ebsco), stwierdzono, że przedmiot niniejszego wniosku nie został dotychczas opisany, a posiada duży potencjał aplikacyjny. Badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych są istotnym elementem badań przedklinicznych mających na celu opracowanie skutecznych metod terapeutycznych.

Rak piersi jest u kobiet najczęściej występującym nowotworem złośliwym, dotykającym coraz większy odsetek społeczeństwa. W celu usprawnienia metodyki badań i zwiększenia możliwości monitorowania stanu chorych, projektowania leków oraz usprawnienia badania leków w fazie klinicznej istnieje konieczność dokładnego zbadania kinetyki zmian zachodzących w progresji rozwoju nowotworu piersi. Wykorzystanie modelu zwierzęcego daje jedyną możliwość skutecznego badania rozwoju kancerogenezy oraz procesu przerzutowania. Zaproponowany model 4T1 raka sutka u myszy wykazuje wysokie podobieństwo z ludzkim rakiem piersi oraz analogiczną kinetykę, z jaką dochodzi do spontanicznego przerzutowania do innych tkanek, tj. płuc, mózgu, wątroby i kości.

Z tego względu konieczne jest użycie zwierząt doświadczalnych, aby zapewnić wiarygodność badania i monitorowanie rozwoju procesu kancerogenezy, czego nie zastąpią hodowlane linie komórkowe. Ponadto, podanie komórek w dawce 10 tys. komórek/mysz pozwala na mniej agresywne rozwinięcie choroby i obserwowanie zmian zachodzących w trakcie procesu kancerogenezy oraz daje możliwość obserwacji wczesnych zmian mogących prowadzić do metastazy.

Planowane badania są nowatorskie i zakładają zastosowanie unikatowej aparatury pozwalającej na wysokorozdzielczy, dokładny pomiar masy badanych metabolitów. Nowatorskie jest również badanie zmian metabolitów techniką metabolomiki celowanej pozwalającej na oznaczanie wszystkich wybranych metabolitów w jednej próbce. Umożliwia to ograniczenie konieczności posiadania dużej objętości próbek, które w standardowej technice należało przebadać pod względem każdego interesującego metabolitu oddzielnie. Znacznie zmniejsza to ilość niezbędnych zwierząt oraz eksperymentów na nich wykonywanych.

Liczebność grup została ograniczona do najmniejszej ilości osobników, pozwalającej jednak uzyskać wyniki istotne statystycznie. Ponadto, od zwierząt pobrane zostaną wszystkie narządy i tkanki – serce,

---

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

płuca, nerki, wątroba, śledziona, guz, jelita, mózg, tkanka tłuszczowa, aorta, do badań wykonywanych w ośrodku użytkownika. Planowane badania zakładają dodatkowo wykorzystanie jak najmniejszej ilości zwierząt do wykonania jak największej ilości badań. Przykładowo, zaplanowano wykorzystanie jednej grupy myszy do badania zarówno ekspresji enzymu, jak i jego aktywności, a dodatkowo stanu energetycznego komórek.

Badane myszy będą przechowywane w warunkach, które zapewniają im stały dostęp wody oraz pokarmu koniecznego do utrzymania zdrowia i witalności. Nie będą również odczuwały dyskomfortu związanego ze środowiskiem. Będą miały zapewnioną wystarczającą przestrzeń oraz właściwe wyposażenie oraz możliwość kontaktów socjalnych z innymi osobnikami w klatce. W celu udoskonalenia warunków bytowych zwierząt podczas prowadzenia eksperymentu każda z klatek dla zwierząt zostanie uzupełniona o drewniane tunele do zabawy oraz drewniane gryzaki do ścierania zębów myszy, które po części odzwierciedlają warunki panujące w przyrodzie. W przypadku zachorowania, bólu, zranienia zapewniona będzie właściwa opieka, możliwie szybka diagnoza oraz skuteczne leczenie. Dołożone zostaną wszelkie starania, aby odczucie strachu i stresu wyeliminować do minimum. Opisane w powyższych punktach procedury dobrane zostały tak, aby zwierzęta doświadczalne odczuwały jak najmniejszy dyskomfort. Jeżeli w toku prowadzenia badania zostaną znalezione metody, które nie wpływając na wynik badania, pozwolą jednocześnie w większym stopniu ograniczyć udział zwierząt laboratoryjnych w doświadczeniu, zastąpią obecne procedury.