

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Wpływ zwiększonej ekspresji kinazy MLK4 na rozwój raka piersi.**

2. Czas trwania projektu: 01.09.2016 - 01.09.2021

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): MLK4, rak piersi, terapia nowotworów

4. Cel projektu (art. 3 ustawy):

A. Badania podstawowe

5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Celem badań jest dostarczenie informacji na temat dynamiki wzrostu guzów pierwotnych i zdolności do tworzenia ognisk przerzutowych komórek raka piersi charakteryzujących się wysoką ekspresją kinazy serynowo-treoninowej MLK4. Jedną z przyczyn powstawania i rozwoju komórek nowotworowych jest proces amplifikacji genu, którego wynikiem jest zwiększona ilość białka w komórce. Zwiększona ekspresja białka często prowadzi do rozregulowania ważnych procesów komórkowych, a tym samym rozwoju nowotworu. Hipoteza badawcza zakłada, iż komórki, które cechują się zwiększonym poziomem kinazy MLK4 będą wykazywały szybszy wzrost guza pierwotnego oraz większy potencjał do przerzutowania. Do weryfikacji hipotezy niezbędne jest przeprowadzenie badań modelu doświadczalnym *in vivo*, którego zaletą jest nieodbiegająca od warunków naturalnych dynamika wzrostu guza i zdolność do tworzenia ognisk przerzutowych. W tym celu myszom zostaną podane komórki nowotworowe (4T1-luc, 4T1 i EMT6). Modele wykorzystujące powyższe linie komórkowe pozwalają na analizę procesu wzrostu guza w organizmie zwierzęcym z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym. Wszczepione ortotopowo (dosutkowo) komórki są przydatnym modelem do badań nad zdolnością do tworzenia przerzutów, które wykazują preferencje identyczne z ludzkim nowotworem piersi, a więc w płucach, wątrobie, mózgu i kościach. W doświadczeniu będzie porównywany proces wzrostu guza pierwotnego oraz przerzutowania do innych części ciała między grupami kontrolnymi, a grupami w których ekspresja kinazy MLK4 została zmieniona. Oczekiwany rezultat będzie zrozumienie jaki wpływ ma wysoka ekspresja kinazy MLK4 na rozwój raka piersi. Ponadto, wyniki badań pozwolą określić czy kinaza MLK4 może stać się celem terapeutycznym w terapii przeciwnowotworowej.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz, BALB/c samice - 72

Każda z grup doświadczalnych będzie liczyć 9 sztuk. Tak zaplanowana optymalna liczba zwierząt w doświadczeniu wynika z wymagań statystycznych i powinna pozwolić nam na wyciągnięcie wiarygodnych wniosków na temat badanej hipotezy. Obliczenia zostały wykonane używając strony internetowej <http://biomath.info/power/index.htm> pozwalającej określić najmniejszą liczebność dzięki której można zweryfikować hipotezę.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Podczas projektowania doświadczenia sprawdzona została istniejąca wiedza na temat prowadzenia badań objętych wnioskiem badawczym. Wykorzystano słowa kluczowe: MLK4, breast cancer, mouse model. Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzono że brak jest danych umożliwiających zweryfikowanie proponowanej hipotezy badawczej.

Doświadczenia zostały zaplanowane w myśl zasad zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia. Po pierwsze, zostanie przeprowadzony szereg doświadczeń *in vitro* na modelu linii komórkowych 4T1-luc,

4T1 i EMT6 posiadających indukowany system regulacji ekspresji kinazy MLK4. Doświadczenie te obejmą testy klonogenne, testy migracyjne i proliferacyjne w warunkach *in vitro*. W ten sposób zostanie ocenione w jaki sposób zmiana ekspresji kinazy MLK4 w powyższych liniach komórkowych ma wpływ na proces onkogenezy. Tylko wtedy jeśli wyniki doświadczeń *in vitro* będą dawały podstawę do dalszych badań, linie komórkowe 4T1-luc, 4T1, EMT6 zostaną użyte do badań na modelu mysim.

Ponadto, jako pierwszy zostanie przeprowadzony eksperyment wykorzystujący linie komórkowe 4T1-luc. Zaletą tej linii komórkowej jest możliwość przyżyciowego obrazowania luminescencji aparatem IVIS Spectrum. Ponadto, przeprowadzenie doświadczenia przy użyciu IVIS umożliwia wizualizację wyników na bieżąco, a więc możliwość szybszego zakończenia doświadczenia co bezpośrednio wpływa na dobrostan zwierząt. Tylko w przypadku, gdy wyniki uzyskane przy użyciu komórek 4T1-luc będą niesatysfakcjonujące (np. immunogenność lucyferazy lub zanik guzów), doświadczenie zostanie powtórzone z wykorzystaniem komórek 4T1 lub EMT6.

Rozwój choroby nowotworowej wiąże się z występowaniem objawów, które mogą być źródłem dyskomfortu dla zwierząt. Planujemy jednak uśmiercenie zwierząt zanim choroba rozwinie się do stadium, w którym zwierzę doświadczałoby cierpienia. Wyznaczone przez nas kryteria stanu zaawansowania choroby (w mysim modelu raka piersi jest to odwodnienie, utrata masy ciała powyżej 20%, nasilona martwica w miejscu podania komórek nowotworowych, objawy kliniczne rozsianej choroby nowotworowej, średnica guza pierwotnego przekraczająca 15mm) są parametrami uznanymi dla danych modeli i stosowanymi przez inne grupy badawcze na świecie.