

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: *Ocena wpływu niedoboru NO oraz dysfunkcji śródbłonka naczyniowego na progresję raka sutka oraz jego przerzutowość u myszy w modelu 4T1*

2. Czas trwania projektu: 4 lata (wrzesień 2020)

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): eikozanoidy, L-NAME, rak sutka, NO

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.

Opisane w procedurze czynności są konieczne do realizacji części zadań projektu badawczego Strategmed zatytułowanego: „*Farmakoterapia śródbłonna naczyniowego i aktywacji płytek krwi zależna od prostacykliny, tlenku azotu i tlenku węgla – nowa strategia w zapobieganiu przerzutowości nowotworowej*” przyznanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR). Celem zaplanowanego doświadczenia jest ocena wpływu zmniejszonej dostępności tlenku azotu (NO) na szybkość progresji raka sutka u myszy Balb/c oraz jego przerzutowości do płuc i wątroby. W związku z faktem, iż NO może wykazywać nie tylko działanie przeciwnowotworowe, ale także może sprzyjać nowotworzeniu oraz przerzutowości nowotworowej poprzez aktywację COX-2 zostanie także oceniony profil zmian PGI₂ oraz PGE₂ w każdym tygodniu rozwoju choroby. Działanie i rola NO w progresji raka sutka na poszczególnych etapach jego rozwoju nie jest do końca poznana i wyjaśniona. Poszerzenie wiedzy na temat roli NO oraz mechanizmów, które są regulowane przez tą cząsteczkę w chorobach nowotworowych umożliwi w przyszłości opracowanie lepszych narzędzi diagnostycznych oraz terapeutycznych tej jednej z najczęściej występujących chorób cywilizacyjnych.

Niedobór tlenku azotu u myszy Balb/c zostanie wywołany poprzez podawanie w wodzie do pica inhibitora NOS jakim jest L-NAME lub spożywanie paszy o obniżonej zawartości NO (czynność 2). Po tygodniu spożywania L-NAME lub paszy o niskiej zawartości NO wybranym grupom zwierząt zostaną wszczepione komórki raka sutka linii 4T1 (czynność 3). W każdym tygodniu rozwoju choroby myszy będą umieszczane w klatkach metabolicznych w celu zebrania próbek moczu (czynność 4). Ponadto, ocena progresji nowotworu u myszy zostanie przeprowadzona metodą nieinwazyjną (czynność 5). Zwierzęta po eksperymencie zostaną uśmiercone pod głęboką narkozą (czynność 6).

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 zaplanowanych doświadczeniach wykorzystane zostaną myszy szczepu Balb/c. Mechanizmy i procesy fizjologiczne przebiegające w organizmie tych zwierząt możemy porównywać z organizmem ludzkim z uwagi na ogromne podobieństwo do genomu ludzkiego wynoszące 99%.

W celu wywołania raka sutka myszy zostaną ortotopowo nastrzyknięte komórkami nowotworowymi linii 4T1 w okolicę gruczołu sutkowego w ilości 10 000 komórek/mysz. Ten model doświadczalny wykazuje wysokie podobieństwo do ludzkiego raka piersi oraz analogiczną kinetykę, z jaką dochodzi do spontanicznego przerzutowania do innych tkanek (min.: płuc, wątroby i kości). W modelu tym zastosowana zostanie niewielka ilość komórek nowotworowych co zapewni wolny rozwój nowotworu oraz możliwość badania wczesnych zmian zapoczątkowujących proces metastazy.

Ponieważ, celem zaprojektowanego doświadczenia jest ocena wpływu oraz roli endogennego NO na rozwój raka piersi oraz zdolności do jego przerzutowania, u część myszy komórki nowotworowe zostaną wstrzyknięte po wywołaniu deficytu NO, a co za tym idzie dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w wyniku podawania L-NAME w wodzie do picia przez okres 1 tygodnia. W dalszym etapie prowadzenia doświadczenia myszom będzie podawana woda do picia z dodatkiem L-NAME w celu utrzymania niedoboru NO oraz dysfunkcji śródbłonna.

Drugim sposobem wywołania niedoboru NO u myszy będzie podawanie paszy Harlan Teklad TD99366 o obniżonej zawartości NO_2^- oraz NO_3^- . Pasza Harlan Teklad TD99366 zaspokaja wszystkie potrzeby żywieniowe zwierząt i nie wywołuje zaburzeń klinicznych.

Wśród badanych grup zwierząt uwzględnione zostały zarówno grupy kontrolne myszy jak i zwierzęta ze wstrzykniętymi komórkami raka sutka linii 4T1. Jednym z celów zaplanowanego badania jest ocena kinetyki zmian rozwoju procesu karcinogenezy i przerzutowości dlatego też, koniecznym jest utworzenie osobnych grup kontrolnych i analogicznych grup myszy ze wszczepionymi komórkami nowotworowymi na różnym etapie rozwoju guza (1, 2, 3 4 lub 5 tygodni).

W każdym tygodniu trwania doświadczenia zostaną uśmiercone myszy z grup kontrolnych oraz ze wszczepionymi komórkami nowotworowymi w celu oceny progresji nowotworu oraz jego przerzutowości do innych narządów, a także oceny opisanych parametrów biochemicznych w poszczególnych tygodniach rozwoju choroby (1, 2, 3, 4 lub 5 tygodni). Uwzględnienie w doświadczeniu myszy kontrolnych jest konieczne ze względu na uzyskanie wiarygodnych wyników i wyciągnięcie prawidłowych wniosków na temat roli NO oraz wybranych eikozanoidów w nowotworzeniu i przerzutowaniu.

Całkowita liczba myszy Balbc/c planowanych do przeprowadzenia całego badania wynosi 392. Szczegółowe zestawienie wszystkich grup myszy oraz ich podział znajduje się w poniższej Tabeli.

Wszystkie grupy myszy będą umieszczane raz w tygodniu w klatkach metabolicznych w celu zebrania próbek moczu.

Podana liczba mysz (392) potrzebnych do wykonania doświadczenia jest minimalną ilością osobników potrzebną do uzyskania rzetelnych wyników oraz niezbędną do przeprowadzenia wiarygodnej analizy statystycznej.

Grupa (liczność)	Opis	Ilość osobników
kontrola 1 (10)	czysta woda, pasza AIN 93, uśmiercenie w 0, 1, 2, 3 i 4 lub 5 tygodniu	10x5=50
kontrola 2 (10)	woda z L-NAME (100mg/kg/dzień), pasza AIN 93, uśmiercenie w 0, 1, 2, 3 i 4 lub 5 tygodniu	10x5=50
kontrola 3 (10)	czysta woda, pasza Harlan TD99366, uśmiercenie w 0, 1, 2, 3 i 4 lub 5 tygodniu	10x5=50
kontrola 4 (10)	woda z L-NAME (100mg/kg/dzień), pasza Harlan TD99366, uśmiercenie w 0, 1, 2, 3 i 4 lub 5 tygodniu	10x5=50
4T1 1 (12)	czysta woda, pasza AIN 93, wszczepienie komórek 4T1, uśmiercenie w 1, 2, 3 i 4 lub 5 tygodniu progresji nowotworu	12x4=48
4T1 2 (12)	woda z L-NAME (100mg/kg/dzień), pasza AIN 93, wszczepienie komórek 4T1 po 1 tygodniu podawania L-NAME, uśmiercenie w 1, 2, 3 i 4 lub 5 tygodniu progresji nowotworu	12x4=48
4T1 3 (12)	czysta woda, pasza Harlan TD99366, wszczepienie komórek 4T1, uśmiercenie w 1, 2, 3 i 4 lub 5 tygodniu progresji nowotworu	12x4=48
4T1 4 (12)	woda z L-NAME (100mg/kg/dzień), pasza Harlan TD99366, wszczepienie komórek 4T1 po 1 tygodniu podawania L-NAME, uśmiercenie w 1, 2, 3 i 4 lub 5 tygodniu progresji nowotworu	12x4=48
suma		392

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

W celu przygotowania przedstawionego projektu badawczego został sprawdzony obecny stan wiedzy objętej niniejszym wnioskiem korzystając z baz danych takich jak ScienceDirect, PubMed, EBSCO, GoogleScholar. Wśród słów kluczowych użytych do wyszukania danych literaturowych znajdowały się między innymi: eicosanoids, cancer, nitric oxide, L-NAME. Na podstawie przeglądu literaturowego, można stwierdzić, że badania objęte poniższym wnioskiem nie zostały wcześniej przeprowadzone. Do chwili obecnej, brak jest jednoznacznych informacji na temat mechanizmów zależnych od NO zaangażowanych w rozwój raka sutka i jego przerzutowanie do innych narządów. Nowatorskim aspektem badania jest zbadanie jak deficyt NO wpływa na progresję nowotworu oraz jak zmienia się aktywność płytek krwi i profil eikozanoidów powstających na drodze działania COXs, a w szczególności PGI₂ oraz PGE₂ na różnych etapach rozwoju raka sutka. Poszerzenie wiedzy na temat roli NO oraz mechanizmów, które są regulowane przez tę cząsteczkę w chorobach nowotworowych umożliwi w przyszłości opracowanie lepszych narzędzi diagnostycznych oraz terapeutycznych tej jednej z najczęściej występujących chorób cywilizacyjnych.

Wykorzystanie modelu zwierzęcego jest konieczne w celu pełnej i wiarygodnej oceny roli NO w kancerogenezie raka sutka. W celu przeprowadzenia doświadczenia wykorzystane zostaną myszy szczepu Balb/c. Mechanizmy i procesy fizjologiczne przebiegające w organizmie tych zwierząt możemy porównywać z organizmem ludzkim z uwagi na ogromne podobieństwo do genomu ludzkiego wynoszące 99%.

Liczebność grup została ograniczona do najmniejszej ilości osobników, pozwalającej jednak uzyskać wyniki istotne statystycznie.

Ponadto, w zebranych próbkach osocza, moczu oraz narządów pobranych od jednej mysz możliwa jest między innymi ocena:

- zmian w syntezie NO na podstawie pomiaru stężenia jego metabolitów - NO₂⁻, NO₃⁻
- zmian w profilu wybranych eikozanoidów – metabolitów kwasu arachidonowego powstających pod wpływem działania cyklooksygenaz (COX-1 oraz COX-2) takich jak TXB₂ oraz 6-keto-PGF_{1α} (metabolit PGI₂), PGE₂, PGD₂ i ich metabolitów w moczu
- zmian w syntezie śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF)
- aktywności COX-1 oraz COX-2 oraz wybranych syntaz prostaglandynowych
- makroskopowa i mikroskopowa przerzutów w płucach oraz wątrobie

Powyższe pomiary zostaną przeprowadzone z zastosowaniem nowoczesnej aparatury zapewniającej doskonałą czułość, rozdzielczość i dokładność analiz.

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

Myszy przeznaczone do badań będą przebywać w warunkach, które zapewniają im stały dostęp wody oraz paszy ad libitum. Dieta spożywana przez myszy zaspokaja wszystkie potrzeby żywieniowe tych zwierząt oraz zapewnia utrzymanie ich w zdrowiu i pełnej vitalności. Ponadto, myszy będą miały zapewnioną wystarczającą przestrzeń w klatkach bytowych, właściwe wyposażenie oraz możliwość kontaktów socjalnych z innymi osobnikami w klatce. Dodatkowo, w celu udoskonalenia warunków bytowych zwierząt podczas trwania badań w każdej z klatek bytowych oraz metabolicznych umieszczone zostaną takie elementy wzbogacenia jak drewniane tunele do zabawy, drewniane gryzaki do ścierania zębów myszy odzwierciedlające warunki panujące w przyrodzie a także domki. W przypadku zachorowania, zranienia lub innego czynnika wywołujące ból, zapewniona będzie właściwa opieka weterynaryjna, szybka diagnoza oraz skuteczne leczenie. Dołożone także zostaną wszelkie starania, aby odczucie strachu i stresu wyeliminować do minimum.