

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Fotoimmunoterapia - nowa strategia leczenia glejaka wielopostaciowego.**

2. Czas trwania projektu: dwa lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **glejak wielopostaciowy, EGFR, affibody, fotoimmunoterapia.**

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.

Glejak wielopostaciowy (GBM) należy do najbardziej złośliwych, pierwotnych guzów mózgu. Badania dowodzą, że mutacje genu kodującego receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), odpowiadają za oporność nowotworu na chemioterapię oraz radioterapię. Alternatywą może być fotoimmunoterapia wykorzystująca światłoczułe związki przyłączone do cząsteczek selektywnie akumulujących się w tkance nowotworowej. Najczęściej stosowane są przeciwciała monoklonalne (mAb) wykazujące wysokie powinowactwo do receptorów na komórkach nowotworowych. Wykorzystanie mAb jest jednak ograniczone przez barierę krew-mózg tj. fizjologiczną barierę oddzielającą mózg od układu krążenia i zapobiegającą przenikaniu szkodliwych substancji w głąb układu nerwowego. W projekcie, będą wykorzystane mniejsze białka, tzw. affibody, łatwiej docierające w głąb guza i szybciej wydalone z organizmu. Proponowany koniugat oparty na cząsteczkach affibody ukierunkowanych na EGFR i

połączonych z fotouczulaczem IR700DX będzie wybiórczo toksyczny dla komórek GBM.

Cele projektu:

1. Porównanie dystrybucji podanego dożylnie koniugatu Affi_{EGFR}-IR700DX na zwierzęcym (mysim) modelu guza zlokalizowanego pod skórą i w mózgu (model ortotopowy). Zwierzętom wszczepiane będą ludzkie linie komórkowe GBM (komercyjnie dostępne oraz wyprowadzone z tkanki guza pobranej od pacjenta) a także mysie komórki GBM wykazujące różną ekspresję receptora EGFR. W eksperymentach zostanie użyta technika nieinwazyjnego obrazowania fluorescencyjnego i luminescencyjnego *in vivo*.
2. Badanie wpływu fotoimmunoterapii na eliminację komórek GBM z wykorzystaniem w/w modeli zwierzęcych. Odpowiedź na terapię będzie monitorowana *in vivo* za pomocą obrazowania optycznego oraz po pobraniu guzów *ex vivo* metodami biologii molekularnej.
3. Ocena odpowiedzi układu immunologicznego na fotoimmunoterapię z wykorzystaniem mysiego modelu GBM.

Konieczne do wykonania procedury mogą wiązać się z pewnym stresem zwierzęcia, który w niektórych przypadkach może prowadzić do wystąpienia utraty wagi ciała, zaburzenia rytmu oddychania lub objawów neurologicznych takich jak długotrwałe drżenie kończyn. Wystąpienie tego rodzaju pogorszenia dobrostanu zwierząt będzie skutkowało natychmiastową eutanazją zwierzęcia.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz (Mus musculus) NOD scid gamma/ Atymiczna mysz nude (NCr) – 153 osobniki
Mysz (Mus musculus) C57BL/6-albino – 84 osobniki

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Zasada zastąpienia

Aktualnie dostępne metody *in vitro* pozwalają na ocenę aktywności biologicznej oraz badanie mechanizmu działania związków chemicznych na poziomie molekularnym. Należy podkreślić, że glejak wielopostaciowy jest nowotworem, który charakteryzuje niezwykle wysoki stopień heterogenności genetycznej, prowadzący do zwiększenia stopnia jego złośliwości. Dlatego Wnioskodawcy zamierzają w projekcie wykorzystać zarówno hodowle komórek adherentnych (2D) jak również hodowle komórkowe 3D (neurosfer), które lepiej odzwierciedlają odpowiedź na zastosowane leczenie bowiem objętość neurosfery może osiągnąć rozmiary ogniska przerzutowego *in vivo*. Bardzo istotnym celem projektu jest porównanie wyników uzyskanych w modelach hodowli komórkowych 2D, 3D oraz modelem *in vivo* z wykorzystaniem pierwotnych linii komórkowych wyprowadzonych z fragmentu guza pobranego śródoperacyjnie. Pozwoli to bowiem na lepsze zrozumienie procesów zachodzących w zróżnicowanej morfologicznie i funkcjonalnie populacji komórek nowotworowych tkanki pacjenta. Niestety, żaden z aktualnie dostępnych modeli *in vitro*, w tym hodowli komórkowych 3D, nie pozwala na pełne odzwierciedlenie warunków *in vivo*, w tym złożoności organizmu na poziomie tkanek i narządów. Pomimo intensywnego rozwoju modeli przedklinicznych nadal analiza procesów ADME (podania, dystrybucji, metabolizmu, wydalania) oraz złożoności procesu nowotworowego możliwa jest tylko w modelu zwierzęcym. W związku z tym w badaniach przedklinicznych kandydatów na leki, niezbędne jest wykorzystanie zwierząt.

Jednym z powszechnie używanych na świecie modeli w badaniach procesów nowotworowych na zwierzętach są ksenografty. Ksenograft to przeszczep tkanek między różnymi gatunkami zwierząt. Model ten 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. Ze względu na wspomniane zróżnicowanie genetyczne komórek glejaka wielopostaciowego w celu uzyskania jak najbardziej wiarygodnych wyników badań w projekcie zaplanowano wykorzystanie dwóch modeli mysich ksenograftów, podskórnego (heterotopowego) oraz mózgowego (ortotopowego) uzyskanych poprzez przeszczep ludzkich komórek GBM co pozwoli na lepsze zrozumienie biologii tego

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

nowotworu i procesów w nim zachodzących w odpowiedzi na zastosowaną terapię. Dodatkowo planowane jest użycie modelu syngenicznego uzyskanego poprzez wszczepienie ortotopowo komórek nowotworowych linii GL-261-Luc myszom C57BL/6-albino. Model ten, w przeciwieństwie do modelu ortotopowego w myszach nude (NCr)/NOD scid gamma (NSG) z wykorzystaniem ludzkich komórek nowotworowych, pozwoli na ocenę odpowiedzi układu immunologicznego na proponowaną terapię.

Uzyskane w ten sposób informacje mogą posłużyć w przyszłości do lepszego planowania badań klinicznych.

Zasada ograniczenia

Po dogłębnym zapoznaniu się z dostępną literaturą dotyczącą przeprowadzania eksperymentów z wykorzystaniem gryzoni liczba zwierząt zaplanowanych w doświadczeniach została ograniczona do poziomu niezbędnego do uzyskania wyników wiarygodnych statystycznie. W proponowanych badaniach zamierza się wykorzystać obrazowanie luminescencyjne, wykorzystujące komórki z wprowadzonym genem lucyferazy, czyli białka uczestniczącego w reakcji, której towarzyszy emisja światła. W ten sposób będzie możliwa ocena lokalizacji guza oraz stopnia metabolizmu komórek nowotworowych.

Zastosowanie nieinwazyjnych metod obrazowania pozwala na znaczne zredukowanie (4-8 krotne) liczby zwierząt w eksperymencie. W klasycznym eksperymencie bez użycia tego rodzaju technik konieczne jest uśmiercenie grupy zwierząt na każdym etapie doświadczenia. W modelu zaproponowanym przez Wnioskodawcę uśmiercanie zwierząt będzie zastąpione wizualizacją komórek transfekowanych lucyferazą za pomocą systemu do obrazowania bioluminescencji *in vivo*. Ponadto, zastosowanie przez Wnioskodawcę obrazowania fluorescencyjnego pozwoli śledzić w czasie rzeczywistym farmakokinetkę badanego związku (Affi_{EGFR}-IR700DX) bez konieczności eutanazji zwierząt na poszczególnych etapach doświadczenia.

Pomimo zastosowania powyższych założeń liczba zwierząt zaplanowana do użycia w proponowanym projekcie wynosi 237 osobników. Trzeba wziąć pod uwagę, że implantacja komórek nowotworowych nie zawsze prowadzi do rozwoju guza, dlatego niektóre osobniki mogą zostać wyeliminowane z badań. Każda grupa eksperymentalna uwzględnia również grupę kontrolną zwierząt, konieczną do prawidłowego porównania wyników. Podsumowując, proponowana liczba zwierząt jest niezbędna do prawidłowej oceny statystycznej otrzymanych wyników.

Zasada udoskonalenia

Prezentowany projekt opiera się na wykorzystaniu szeregu technik nieinwazyjnego obrazowania, które nie wymagają przeprowadzenia eutanazji zwierząt po każdym dokonanym pomiarze. Myszy NOD scid gamma/ oraz NCr, a także C57BL/6-albino będą utrzymywane w odpowiednich warunkach zapewniających dobrostan zwierząt (zakłada się ograniczenie do minimum niekorzystnych skutków oraz odczuć zwierząt w czasie procedury oraz utrzymywanie ich w jak najlepszych warunkach bytowych).

W klatkach będzie znajdować się ściółka roślinna oraz wzbogacenia w celu ograniczenia stresu i ryzyka agresji w grupie (klocki drewniane pełniące rolę gryzaków, rurki, materiał na gniazda). W przypadku zwierząt poddanych procedurom dotkliwym (podanie komórek GBM do mózgu) zwierzęta otrzymają przed zabiegiem i po zabiegu środki przeciwbólowe i przeciwzapalne. Ponadto, zwierzęta będą obserwowane podczas całego eksperymentu przez weterynarza i zespół ds. dobrostanu zwierząt.

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.