

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu Charakterystyka tumorogenności i zdolności do przerzutowania komórek mysiego raka sutka wszczepionych ortotopowo oraz opracowanie modelu doświadczalnego przerzutowania komórek mysiego raka sutka i prostaty u myszy z wyidukowaną dysfunkcją śródbłónka.

1. Czas trwania projektu 2 lata
2. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) przerzutowanie, dysfunkcja śródbłónka
3. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) **A Badania podstawowe**

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.

Przerzuty nowotworowe są jedną z głównych przyczyn zgonów osób z chorobą nowotworową. Do tej pory, główną przeszkodą w badaniach na przerzutami była słaba dostępność nowych mysich modeli raka sutka, który odzwierciedlają proces przerzutowania u ludzi. Celem projektu jest dokładna charakterystyka procesu przerzutowania przy użyciu nowych linii nowotworowych. Prace badawcze będą obejmować dokładną charakterystykę procesów towarzyszących rozwojowi raka sutka u myszy doświadczalnych, związanych przede wszystkim z aktywnością płytek krwi, czynnością śródbłónka naczyń i odpowiedzią zapalną organizmu. Na różnych etapach rozwoju nowotworu pobierane będą krew oraz inne narządy, które następnie będą analizowane przy użyciu różnych technik takich jak Real Time PCR czy ELISA. Zestawienie i porównanie danych doświadczalnych opracowanych na podstawie odmiennych modeli pozwoli na wytypowanie

uniwersalnych swoistych markerów świadczących o stopniu uszkodzenia śródbłónka i aktywacji płytek krwi. W kolejnym etapie zostanie opracowany dożylny model przerzutowania komórek mysiego raka sutka oraz raka prostaty, poddanych transdukcji u myszy z wyindukowaną dysfunkcją śródbłónka płuc. Opracowanie takiego modelu umożliwi ocenę wpływu dysfunkcji śródbłónka płuc na wydajność tworzenia niszy pre-metastatycznej, a w konsekwencji przerzutowania nowotworów.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

359 myszy

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Główną przeszkodą w badaniach nad przerzutami nowotworowymi jest słaba dostępność modeli, które rzetelnie odzwierciedlają proces przerzutowy występujący u ludzi. Aby odnaleźć unikalne markery przerzutowania wspólne dla różnych rodzajów linii raka sutka, konieczna jest charakterystyka potencjału przerzutowego nowych nie opisanych jak dotąd w literaturze mysich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego - Eph4 1424, Eph4 1424.1, Eph4 1424.2 oraz E0771 i E0771.LMB, a następnie porównanie ich zdolności do przerzutowania z opisanym już w literaturze modelem 4T1 i 67NR. Badania przeprowadzone in vitro przez Wnioskodawcę i jego Współkonsorcjantów mające na celu molekularną i funkcjonalną charakterystykę panelu mysich linii raka sutka wskazały ich duże zróżnicowanie. Ponieważ w żywym organizmie procesy przerzutowania oraz dysfunkcja śródbłónka zależą również od złożonych interakcji pomiędzy komórkami śródbłónka, komórkami układu immunologicznego i płytkami krwi niemożliwe jest odtworzenie in vitro układu doświadczalnego odzwierciedlającego stan fizjologiczny obserwowany podczas rozwoju przerzutów nowotworowych w organizmie. Dlatego też wykorzystanie modelu zwierzęcego jest kluczowe dla ustalenia unikalnych markerów przerzutowania.

W doświadczeniach zaplanowano wykorzystanie minimalnej liczby zwierząt umożliwiającej uzyskanie istotnych wyników. Liczebność grup podczas etapu I związana jest z małą ilością materiału jaką można uzyskać z myszy. W projekcie zaplanowano szereg badań ex vivo wykorzystujących różne metody w celu dokładnego scharakteryzowania procesu przerzutowania raka gruczołu sutkowego, jednak uzyskana ilość materiału z jednej myszy jest nie wystarczająca na przeprowadzenie wszystkich zaplanowanych testów jakimi są np. PCR oraz analizy histopatologiczne czy Western blotting. Etap drugi jest eksperymentem pilotażowym. Liczba myszy zaplanowanych do tego etapu ma umożliwić uzyskanie optymalnego modelu do kolejnych badań.

Zwierzęta wykorzystywane do zaplanowanych doświadczeń utrzymywane będą w warunkach, zapewniających dobrostan zwierząt. Zaplanowane procedury zaprojektowano tak, by możliwie maksymalnie ograniczyć liczbę zwierząt w badaniu oraz by zminimalizować ból, cierpienie i dystres wykorzystywanych zwierząt.

Główną przeszkodą w badaniach nad przerzutami nowotworowymi jest słaba dostępność modeli, które rzetelnie odzwierciedlają proces przerzutowy występujący u ludzi. Powszechnie wykorzystuje się mysią linię komórek raka sutka 4T1. Jest to jeden z niewielu modeli raka, który efektywnie przerzuca. Aby ustanowić alternatywę dla modelu 4T1 oraz odnaleźć unikalne markery wspólne dla różnych rodzajów linii raka sutka, zdecydowaliśmy się scharakteryzować potencjał przerzutowy nowych nie opisanych jak dotąd w literaturze mysich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego - Eph4 1424, Eph4 1424.1, Eph4 1424.2 oraz E0771 i E0771.LMB, a następnie porównać ich zdolności do przerzutowania z opisanym już w literaturze modelem 4T1 i 67NR. Badania przeprowadzone *in vitro* przez Wnioskodawcę i jego Współkonsorcjantów mające na celu molekularną i funkcjonalną charakterystykę panelu mysich linii raka sutka wskazały ich duże zróżnicowanie. Utrzymywana aktywność płytek może promować wzrost guza i migrację komórek nowotworowych, dlatego linie te badane były pod kątem zdolności do agregacji oraz aktywacji płytek. Wykazano, iż linie przerzutu mają większy potencjał zarówno do agregacji jak i aktywacji płytek krwi *in vitro*. Agregaty płytek krwi z komórkami nowotworowymi tworzone są za pośrednictwem między innymi białek występujących na ich powierzchni takich jak GPIb-IX-V, GPIIb/IIIa oraz P-selektyny, dlatego też oceniono potencjał przerzutu *in vitro* komórek poprzez dokonanie analizy integryn i glikoprotein powierzchniowych. Oddziaływania aktywowanych płytek krwi z komórkami nowotworowymi sprzyjają adhezji tych ostatnich do komórek śródbłoka naczyniowego w tkance docelowej ich wędrówki, która poprzedza ekstraswazację i ostateczną inwazję do kolonizowanych tkanek. Sprawdzona została również zdolność adhezji do kolagenu i fibronektyny – białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Badanie to wykazało, że linie przerzutu mają nieznacznie większe zdolności do adhezji. Wykazano również zróżnicowane tempo migracji tych komórek. Tak więc wykazano, że linie te znacznie różnią się między sobą pod względem molekularnym oraz funkcjonalnym *in vitro*, jednakże w żywym organizmie procesy przerzutowania oraz dysfunkcja śródbłoka zależą również od złożonych interakcji pomiędzy komórkami śródbłoka, komórkami układu immunologicznego i płytkami krwi, co uniemożliwia odtworzenie *in vitro* układu doświadczalnego odzwierciedlającego stan fizjologiczny obserwowany podczas rozwoju przerzutów nowotworowych w organizmie. Dlatego też wykorzystanie modelu zwierzęcego jest kluczowe dla ustalenia unikalnych markerów przerzutowania.

Kolejne badania przeprowadzone uprzednio przez Wnioskodawcę i jego Współkonsorcjantów, a także opisane w literaturze np. [1], wskazują, że procesowi przerzutowania nowotworów towarzyszy rozwój układowego stanu zapalnego i dysfunkcji komórek śródbłoka naczyniowego w aortalii myszy BALB/c obciążonych mysim rakiem sutka 4T1-luc2-tdTomato. To z kolei może się przyczynić do wzmożonej przepuszczalności naczyń krwionośnych, podwyższonej aktywności płytek krwi oraz zwiększonych właściwościach proadhezyjnych komórek śródbłoka. Aktywność komórek śródbłoka naczyniowego jest jednym z kluczowych czynników zaangażowanych we wzrost i przerzutowanie nowotworów. Jego rola wiąże się między innymi z procesami tworzenia mikrośrodowiska guza nowotworowego, w tym angiogenezy, migracji komórek w naczyniu krwionośnym czy ze sprzyjaniem tworzenia niszy premetastatycznej, co prowadzić może do podwyższonej wydajności procesu przerzutowania. Ponieważ w żywym organizmie dysfunkcja śródbłoka zależy od złożonych interakcji pomiędzy różnymi komórkami, wykorzystanie modelu zwierzęcego jest istotne do badania wpływu dysfunkcji śródbłoka naczyń na wydajność procesu przerzutowania.

W doświadczeniach zaplanowano wykorzystanie minimalnej liczby zwierząt umożliwiającej uzyskanie istotnych wyników. Liczebność grup podczas etapu I związana jest z małą ilością materiału jaką można uzyskać z myszy. W projekcie zaplanowano szereg badań *ex vivo* wykorzystujących różne metody w celu dokładnego scharakteryzowania procesu przerzutowania raka gruczołu sutkowego, jednak uzyskana ilość materiału z jednej myszy jest nie wystarczająca na przeprowadzenie wszystkich zaplanowanych testów jakimi są np. PCR oraz

analizy histopatologiczna czy Western blotting. Etap drugi jest eksperymentem pilotażowym. Liczba myszy zaplanowanych do tego etapu ma umożliwić uzyskanie optymalnego modelu do kolejnych badań.

Zwierzęta wykorzystywane do zaplanowanych doświadczeń utrzymywane będą w warunkach, zapewniających dobrostan zwierząt. Zaplanowane procedury zaprojektowano tak, by możliwie maksymalnie ograniczyć liczbę zwierząt w badaniu oraz by zminimalizować ból, cierpienie i dystres wykorzystywanych zwierząt. W razie zaobserwowania u zwierząt oznak bólu, podawane będą środki o działaniu przeciwbólowym lub zwierzę będzie poddawane wcześniejszej eutanazji.