

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu *Skojarzona terapia raka wątroby z wykorzystaniem nanomateriałów*

2. Czas trwania projektu 1 lipca 2019 – 30 czerwca 2020

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) rak wątrobowokomórkowy/ chemioterapia/ fototerapia/ nanocząstki polidopaminy/ model eksperymentalny

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.

Na świecie każdego roku rak wątrobowokomórkowy jest przyczyną śmierci 500 tysięcy osób przy zapadalności 600 tysięcy osób rocznie. **Celem badań jest ocena efektywności łączonej chemio-i fototerapii raka wątrobowokomórkowego z wykorzystaniem wielozadaniowych, biomimetycznych (oddziałujących bezpośrednio na komórki docelowe) nanocząstek.** Nanomateriały dzięki odpowiedniej budowie (polidopamina, o silnych właściwościach fototermicznych) i przeprowadzonej funkcjonalizacji (dołączony kwas foliowy) umożliwią aktywne celowanie leku do komórek nowotworowych. Uwalnianie leku przeciwnowotworowego (doksorubicyny) z nośnika w miejscu docelowym, powinno pozwolić na zmniejszenie efektów ubocznych rutynowo stosowanej chemioterapii.

Istotną częścią doświadczenia będzie **zbadanie lokalizacji nanocząstek tzw. biodystrybucji**, która pozwoli odpowiedzieć gdzie lokują się badane nanocząstki i czy dołączone ligandy celujące pozwalają na efektywniejsze dostarczenie do komórek nowotworowych. Obrazowanie zostanie

wykonane nieinwazyjnie w 4 punktach czasowych (po 0,5;6;24 h i 7 dniach od podania), z wykorzystaniem systemu Xenogen.

W zaplanowanych badaniach z udziałem **80 samic myszy (*Mus musculus*)**, **wsobnych szczepu BALB/c-Nude**, zostaną wszczepione podskórnio ludzkie komórki nowotworu wątroby. Myszy z wywołanym nowotworem zostaną **podzielone na 10 grup, odpowiadających kolejno procedurom 1-10, otrzymujących:**

- I. PBS (vehiculum), (kontrolna), n=8;
- II. PBS i poddawana napromieniowaniu laserem (fototerapia), n=8;
- III. lek przeciwnowotworowy bez nośnika (chemioterapia), n=8;
- IV. nanomateriały bez leku, n=8;
- V. nanomateriały z lekiem (chemioterapia), n=8;
- VI. nanomateriały bez leku, napromieniowane laserem (fototerapia), n=8;
- VII. lek bez nośnika, napromieniowanie laserem (chemioterapia+fototerapia), n=8;
- VIII. nanomateriały z lekiem, napromieniowane laserem (chemioterapia+fototerapia), n=8;
- IX. PBS (badanie biodystrybucji), n=4;
- X. nanomateriały z lekiem (badanie biodystrybucji), n=12.

**Zmiana biodystrybucji transportowanego leku spowoduje istotne zmniejszenie cytotoksyczności środków chemioterapeutycznych i znacznie zniweluje, obserwowane w przypadku konwencjonalnej terapii, działania niepożądane.**

Przewidywane szkody w trakcie eksperymentu u badanych zwierząt doświadczalnych to dystres związany z iniekcją, pojawienie się objawów związanych ze wzrostem guza. **W momencie zaobserwowania oznak cierpienia procedura zostanie niezwłocznie zakończona, zwierzęta zostaną natychmiast humanitarnie uśmiercone.** Szkodą ostateczną będzie śmierć zwierząt.

Cel eksperymentu został zakwalifikowany zgodnie z ustawą art.3, jako **badania podstawowe[PBI] Onkologia, niezależnie od badanego układu.**

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

Do badań zostaną wykorzystane **samice myszy domowej (*Mus musculus*, stado krewniacze) szczepu BALBc-Nude, łącznie 80 osobników.** Gatunek *Mus musculus* jest najczęściej wykorzystywanym modelem zwierzęcym w badaniach z uwagi na swój rozmiar, szybki cykl życiowy, niskie koszty oraz łatwość utrzymania. Stosuje się je w badaniach immunologicznych i nowotworowych. Myszy mają wiele cech genetycznych, anatomicznych i fizjologicznych wspólnych z człowiekiem. Są uważane za odpowiedni model do badań nad chorobami ponieważ ich geny w 99% odpowiadają ludzkim. Możliwość manipulacji w genomie myszy pozwala na stworzenie szczepów myszy zmodyfikowanych, u których rozwija się wiele nowotworów podobnych pod względem morfologii, histopatologii, fenotypu i genotypu do nowotworów powstających u człowieka. **Myszy szczepu BALBc-Nude** to szczep myszy hodowany laboratoryjnie, rozwinięty w trakcie krzyżowań i backcrossingu między BALB/cABom-nu i BALB/cAnNCrj-nu w Charles River Laboratories Japan. Czystej krwi ciężarne samice CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl otrzymano w Charles River Japan w 1985 roku.

Myszy są wsobne i ich monitoring genetyczny potwierdza bycie BALB/c Nude.

Na potrzeby doświadczenia zostaną użyte zwierzęta jednej płci (samice) ze względu na zminimalizowanie ilości zwierząt użytych doświadczeniu, a także ze względu na fakt, że w eksperymencie będą istotne przede wszystkim obserwacje dotyczące wzrostu guza i informacje czy lek z nośnikiem podany dożylnie dociera w miejsce docelowe (okolice guza) w żywym organizmie. Samice nie przejawiają ponadto typowych dla samców zachowań typu wygryzanie guza, agresywność wobec innych osobników w klatce, co dodatkowo utrudnia prowadzenie eksperymentu i obserwacji.

**Na podstawie piśmiennictwa myszy Nude są modelowymi zwierzętami wykorzystywanymi do badań biologii guzów nowotworowych.** Brak grasicy powoduje zanik produkcji limfocytów T, a tym samym defekt immunologiczny. Limfocyty T to limfocyty grasicozależne – odpowiedzialne za komórkową odpowiedź odpornościową. W badaniach podstawowych w onkologii wykorzystuje się modele uzyskane poprzez wszczepianie myszom z niedoborami immunologicznymi, komórek nowotworowych pobranych bezpośrednio z nowotworów człowieka lub z linii komórkowych wyprowadzonych z komórek nowotworowych człowieka. Niedobór limfocytów T znacznie upośledza układ odpornościowy myszy i umożliwia wszczepienie, wzrost i ostatecznie przerzuty komórek nowotworowych z ksenoprzeszczepu po implantacji. Komórki linii HepG2, które zostaną wykorzystane w doświadczeniu do wywołania nowotworu wątrobowokomórkowego, to jedna z najczęściej stosowanych (referencyjnych) ludzkich linii komórek nowotworowych w badaniach nad metabolizmem i toksycznością powszechnie stosowanych chemioterapeutyków. Modele nowotworów rozwijających się u myszy są zbliżone do nowotworów rozwijających się u człowieka, co umożliwia dokonanie analizy skuteczności zaproponowanej terapii, a wyniki te mogą później zostać przeniesione na ludzi.

Nie jest możliwe zastąpienie tego typu doświadczeń na zwierzętach metodami *in vitro* (hodowle komórkowe, tkankowe) ze względu na **konieczność analizy mechanizmów zachodzących w organizmie żywym, aby dokładnie ocenić sposób działania zaproponowanej terapii raka wątroby z wykorzystaniem nanomateriałów.**

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

Na podstawie przeglądu istniejącej literatury, stwierdzam, że są to badania oryginalne, innowacyjne i brak jest danych dotyczących oceny efektywności łączonej chemio- i fototerapii raka wątrobowokomórkowego z wykorzystaniem biomimetycznych nanocząstek funkcjonalizowanych polidopaminą. Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na podjęcie dalszych kroków w kierunku proponowania skutecznej terapii leczenia raka wątrobowokomórkowego, który należy do najpoważniejszych problemów współczesnej onkologii.

Przy wykonywaniu wszystkich procedur na zwierzętach zawsze będzie stosowana zasada 3R (Replacement, Reduction, Refinement), odnosząca się do polepszenia bytu i humanitarnego traktowania zwierząt.

**Zasada udoskonalenia:** Codziennie będzie prowadzona kontrola stanu zwierząt co potencjalnie pozwoli na szybkie zidentyfikowanie wszystkich chorych lub okaleczonych zwierząt i podjęcie

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

odpowiednich działań. Wszystkie czynności będą wykonywane przez znaną zwierzętom osobę wykonującą doświadczenie, procedury badawcze będą poprzedzone 5 dniowym oswojeniem/handlingiem, co pozwoli zwierzętom przyzwyczać się do eksperymentatorów i ograniczy ewentualny stres odczuwany przez zwierzęta. Zwierzęta będą utrzymywane w klatkach zawierających wzbogacenia (klocki drewniane, bawełniane kokony na ściółce osikowej odpylonej), co poprawi ich dobrostan. Przed naświetlaniem laserem oraz wizualizacją *in vivo* za pomocą systemu Xenogen zostanie podany anestetyk wziewnie (izofluran) co zminimalizuje dystres jakiego mogłyby doświadczyć zwierzęta. Osoba przeprowadzająca doświadczenie będzie również przygotowana do przeprowadzenia zabiegu uśmiercania (również w przypadkach nagłych) przez zastosowanie humanitarnej procedury uśmiercania, tak aby radykalnie zminimalizować ból, cierpienie, dystres.

**Zasada ograniczenia:** czyli zmniejszenie całkowitej liczby zwierząt użytych w doświadczeniu. Zaproponowano 8 osobników w grupie ze względu na ryzyko (ok. 10-20%), że nie u wszystkich osobników zostanie wywołany guz. Wówczas do grup zostanie przydzielonych po 6 ( $\pm 2$ ) osobników co stanowi minimum do oceny statystycznej wyników badań. Zaproponowana liczebność grup badanych stanowi optymalną liczbę aby zmaksymalizować naukową integralność generowanych danych przy jednoczesnym wykorzystaniu minimalnej liczby zwierząt, niezbędną do obliczeń statystycznych wyników badań i wyciągnięcia na tej podstawie właściwych wniosków z przeprowadzonego eksperymentu.

**Zasada zastąpienia:** W odniesieniu do zaproponowanego doświadczenia myszy Nude są modelowymi zwierzętami wykorzystywanymi do tego typu badań. Nie jest możliwe zastąpienie doświadczeń na zwierzętach metodami *in vitro* (hodowle komórkowe, tkankowe) ze względu na konieczność analizy mechanizmów zachodzących w organizmie żywym. Leki przeciwnowotworowe testowane na kulturach komórkowych *in vitro* często nie mogą być przenoszone na warunki, w których nowotwory rosną u ludzi, z powodu braku odpowiedniego mikrośrodowiska guza, które ma wpływ na rozwój guza i interakcji podczas wzrostu (np. unaczynienie, układ odpornościowy itd.). Przedkliniczna faza badań nad rakiem musi obejmować modele *in vivo*, które możliwie odwzorowują warunki rozwoju nowotworu w ludzkim organizmie, tak aby można je później przenieść na warunki kliniczne z udziałem ludzi. Zastąpienie myszy zwierzętami o niższym stopniu rozwoju ewolucyjnego również nie pozwoli potwierdzić lub wykluczyć hipotezy badawczej ze względu na różnice anatomiczne i fizjologiczne w porównaniu do ssaków. W związku z tym badania przeprowadzone na bezkręgowcach nie miałyby odniesienia do zjawisk obserwowanych u pacjentów.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☐ NIE

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.