

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu *Zastosowanie nanosekundowej elektroporacji impulsowej w terapii przeciwnowotworowej – określenie efektu przeciwnowotworowego oraz wpływu na aktywację komórek układu odpornościowego.*

2. Czas trwania projektu .. **15.05.2019 - 31.12.2020**.....

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): nanosekundowe impulsowe pole elektryczne, elektroporacja z wapniem, elektrochemioterapia

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.

Dane literaturowe dotyczące badań na hodowlach komórkowych wskazują, że zastosowanie nanosekundowej elektroporacji (nsPEF) o wysokim natężeniu pola elektrycznego powoduje znaczne zmniejszenie przeżywalności komórek nowotworowych. Wyniki doświadczeń *in vivo* na mysim modelu czerniaka wskazują, że elektroterapia powodowała apoptozę lub autofagię w miejscu leczenia. Dotychczasowe badania przeprowadzano bez obecności chlorku wapnia. Nie wiadomo jaki jest mechanizm działania zastosowanej terapii, a włączenie jonów wapnia może potęgować efekt i nasilać odpowiedź ze strony układu immunologicznego.

W niniejszym projekcie zaplanowano optymalizację parametrów nsPEF oraz połączenie nsPEF z

jonami wapnia. W pierwszym etapie zaplanowano dwa doświadczenia *in vivo*.

Celem pierwszego badania będzie określenie optymalnych parametrów nsPEF, która będzie stosowana jako metoda samodzielna w leczeniu myszy z wszczepionym podskórnie rakiem jelita grubego MC38. Dotychczasowe badania potwierdzają, że wybrane parametry powodują permeabilizację komórek znajdujących się w obszarze elektroporacji, a z drugiej strony będą bezpieczne dla zwierząt.

Celem drugiego badania będzie wybór optymalnego stężenia jonów wapnia stosowanych w formie czynnika wspomagającego efekt przeciwnowotworowy elektroterapii nsPEF w modelu mysiego raka jelita grubego MC38/0. nsPEF wspomaga bowiem wnikanie leków i jonów wapnia do komórek nowotworowych. Zaobserwowano, że zwiększone stężenie jonów wapnia synergistycznie wspomaga działanie ultrakrótkich impulsów elektrycznych.

Oczekujemy, że uzyskane wyniki będą podstawą do opracowania nowych strategii terapii przeciwnowotworowych, w których nie będzie konieczne stosowanie silnie toksycznych leków o działaniu przeciwnowotworowym.

Doświadczenia zaplanowane w niniejszym projekcie zaklasyfikowane są do badań podstawowych, a zaplanowane procedury zaliczane są do kategorii dotkliwości umiarkowanej. **Klasyfikacja celu procedury: Badania podstawowe – onkologia, niezależna od badanego układu.**

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W planowanych doświadczeniach wykorzystanych zostanie łącznie 187 myszy gatunku *mus musculus* (6-8 tygodniowe samice).

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach badawczych: PubMed, Google Scholar, ScienceDirect, Web of Science (JCR).

Wykorzystane zostały następujące słowa kluczowe: nanosecond pulsed electric fields / nanosekundowe impulsowe pole elektryczne, calcium electroporation / elektroporacja z wapniem, electrochemotherapy / elektrochemioterapia

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzamy, że badania zaplanowane w

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

ramach niniejszego projektu są nowatorskie i do tej pory nie zostały opisane. Strategia terapeutyczna z wykorzystaniem nsPEF i jonów wapnia polega na aktywacji sygnałów do śmierci komórkowej oraz aktywacji układu odpornościowego do walki z nowotworem i indukcji swoistej ogólnosystemowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Ponadto aktywacja układu immunologicznego może mieć działanie przeciwpierzutowe.

Brak jest danych w zakresie poznania rzeczywistej aktywności przeciwnowotworowej nsPEF z zastosowaniem ultrakrótkich impulsów elektrycznych (10-20 ns) stosowanej samodzielnie lub w terapii skojarzonej z jonami wapnia w modelu mysiego raka jelita grubego. Zaplanowane doświadczenie terapeutyczne umożliwi określenie wpływu nsPEF na zahamowanie wzrostu guzów nowotworowych i aktywację odpowiedzi przeciwnowotworowej oraz dobranie odpowiednich parametrów elektroterapii. Drugie doświadczenie umożliwi natomiast odpowiedź na pytanie, czy jony wapnia są w stanie znacznie zwiększyć efekt nsPEF w raku jelita grubego oraz jaki mechanizm odpowiedzi przeciwnowotworowej jest uruchamiany w przypadku terapii skojarzonej.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu będzie pierwszym krokiem do opracowania nowych schematów terapii przeciwnowotworowej z nsPEF w formie terapii samodzielnej, lub w skojarzeniu z jonami wapnia.

Zgodnie z zasadą 3R, przed przystąpieniem do wykonania doświadczeń *in vivo* wykonano wcześniej doświadczenia *in vitro* potwierdzające założenie, że nsPEF wywołuje skuteczną elektropermeabilizację komórek nowotworowych co wspomaga wnikanie leków i jonów wapnia do komórek nowotworowych, a tym samym potęguje ich działanie w docelowych komórkach. Ponadto zwiększone stężenie leku/jonów wapnia synergistycznie wspomaga działanie ultrakrótkich impulsów elektrycznych. Kolejnym etapem jest weryfikacja uzyskanych wyników w testach *in vivo*. Tylko w ten sposób można poznać rzeczywistą skuteczność nsPEF w zwalczaniu nowotworu oraz poznać prawdziwy mechanizm działania tej terapii. Po drugie, doświadczenia *in vivo* zostały zaplanowane w taki sposób aby maksymalnie zredukować liczbę zwierząt w eksperymencie. Zaproponowana liczba myszy w grupie to minimalna liczba potrzebna do uzyskania miarodajnych wyników i wykonania obliczeń statystycznych, a przy tym jest to liczba, która zapewnia brak potrzeby powtarzania takiego doświadczenia w kolejnych eksperymentach. Po trzecie, wykonując doświadczenie, będziemy maksymalnie eliminować cierpienie zwierząt poprzez podawanie leków przeciwbólowych. Ponadto, w celu polepszenia warunków bytowych myszy, zastosujemy elementy wzbogacające środowisko.

Materiał pobrany od myszy po zakończeniu eksperymentu zostanie przeanalizowany *ex vivo*. Jako punkt odniesienia w interpretacji otrzymanych wyników w eksperymentach *ex vivo* wykorzystane zostaną guzy, narządy i krew pobrane od myszy kontrolnych, nieleczonych.

Literatura:

1. Breton M and Mir LM. Microsecond and Nanosecond Electric Pulses in Cancer Treatments. *Bioelectromagnetics* 33:106-123 (2012).
2. Schoenbach KH, Beebe SJ, Buescher ES. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics* 22:440-448 (2001).
3. Falk, H., et al. Calcium electroporation for treatment of cutaneous metastases; a randomized double-blinded phase II study, comparing the effect of calcium electroporation with electrochemotherapy. *Acta Oncol*, 1-9, <https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1355109> (2017).
4. Falk, H. et al. Calcium electroporation induces tumor eradication, long-lasting immunity and cytokine responses in

- the CT26 colon cancer mouse model. *Oncoimmunology* 6, e1301332, <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1301332> (2017).
5. Rossi, O. N. Pakhomova, et al. Mechanisms and immunogenicity of nsPEF-induced cell death in B16F10 melanoma tumors, *Scientific Reports*, 9:431 (2019)
 6. Guo, S. et al. Nano-pulse stimulation induces potent immune responses, eradicating local breast cancer while reducing distant metastases. *Int J Cancer* 142, 629–640, <https://doi.org/10.1002/ijc.31071> (2018).
 7. Nuccitelli, R. et al. Nanoelectroablation of Murine Tumors Triggers a CD8-Dependent Inhibition of Secondary Tumor Growth. *PLoS One* 10, e0134364, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134364> (2015).
 8. Skeate, J. G. et al. Nano-Pulse Stimulation induces immunogenic cell death in human papillomavirus-transformed tumors and initiates an adaptive immune response. *PLoS One* 13, e0191311, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191311> (2018).
 9. Kulbacka J.: Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) impact and enhanced Photofrin II delivery in photodynamic reaction in cancer and normal cells, *Photodiagn.Photodyn.Ther.* 2015 Vol.12 no.4; s.621-629
 10. Beebe SJ, Chen Y-J, Sain NM, Schoenbach KH, Xiao S (2012) Transient Features in Nanosecond Pulsed Electric Fields Differentially Modulate Mitochondria and Viability. *PLoS ONE* 7(12): e51349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051349>
 11. Tunikowska J., Kulbacka J., Antończyk A., Novickij V., Rembiałkowska N.: First application of nano-electrochemotherapy in feline oral malignant melanoma treatment, W:3rd Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 1st-2nd March 2019 ; eds J. Kulbacka, N. Rembiałkowska, J. Weźgowiec; Wrocław : Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., 2019; s.176 poz.P122, ISBN 978-83-65932-64-8

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.