

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu: Badanie heterogenności i plastyczności macierzystych komórek rakowych i ich roli w progresji nowotworów głowy i szyi.

1.Czas trwania projektu: 01.05.2017 – 01.05.2022

2.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): komórki macierzyste, nowotworowe komórki macierzyste, inwazja, metastaza

3.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.

Pkt 4A

Nowotwory płaskonabłonkowe głowy i szyi (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*) powodują wysoką śmiertelność pacjentów z powodu rozwoju przerzutów i pojawienia się trudnych do operowania i opornych na leczenie nawrotów choroby. Nadal pozostaje niewyjaśnione dlaczego niektóre komórki w nowotworze są bardziej odporne na leczenie lub wykazują zwiększone właściwości do inwazji i tworzenia przerzutów. Model nowotworowych komórek macierzystych (CSC, *cancer stem cells*) sugeruje zróżnicowanie wśród komórek nowotworowych gdzie mała populacja komórek CSC może po przetrwaniu chemioterapii i po inwazji odtworzyć cały nowotwór. Jednakże brak narzędzi do wyznaczenia i śledzenia losów prekursorów CSC stanowi duży problem w badaniach heterogenności nowotworów i scharakteryzowaniu potencjalnych terapii skierowanych przeciwko CSC. W naszych badaniach proponujemy użycie nowych systemów reporterowych, które pozwalają nam wyznaczyć i śledzić CSC (Oct4-GFP oraz SORE6) oraz inwazyjne komórki nowotworowe (Catulin-GFP) aby lepiej zrozumieć właściwości biologiczne CSC oraz scharakteryzować

ścieżki sygnałowe, które regulują fenotypową plastyczność CSC w HNSCC. W tym celu pod skórę myszy wstrzyknięte zostaną ludzkie linie reporterowe Oct4-GFP, SORE6-Tomato oraz catulin-GFP (Proc.1, czynność 1), które utworzą nowotwór co pozwoli na wyizolowanie i scharakteryzowanie CSC oraz komórek inwazyjnych. W celu śledzenia losów wyznakowanych komórek macierzystych oraz komórek z nich się wywodzących, genetycznie zmodyfikowane myszy zostaną posmarowane Tamoksyfenem (Proc. 2 czynność 1) co pozwoli na indukcję onkogennej Kras i utworzenie nowotworu. Zebrany materiał zostanie poddany dalszej analizie.

Zwierzęta nie poniosą znaczących szkód w trakcie wykonywania procedur. W celu ograniczenia stresu i cierpienia zwierząt, procedury i czynności zostały zaplanowane tak, aby ich stopień dotkliwości był umiarkowany (golenie skóry grzbietu za pomocą trymera; podawanie tamoksifenu poprzez aplikację na skórę lub wstrzykiwanie linii reporterowych z krótkotrwałą anestezją poprzez wziewny izofluran).

Zaproponowane badania pozwolą na lepsze zrozumienie, jak zachowane w ewolucji czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za utrzymanie embrionalnych komórek macierzystych wpływają na utrzymanie stanu macierzystego i plastyczność CSC. Zrozumienie na poziomie molekularnym ścieżek sygnałowych i molekuł, które są kluczowe w regulacji tych procesów będzie miało w przyszłości istotne znaczenie w rozwoju efektywnych terapii nowotworowych. Hodowla 2D nie odzwierciedla przestrzennej złożoności nowotworów, od której zależy plastyczność i heterogenność nowotworowych komórek macierzystych. W hodowli 2D niemożliwe jest zbadanie interakcji między komórkami nowotworowymi a ich otoczeniem i charakteryzacja heterogennych komórek nowotworowych. Dlatego w celu badania wyżej wymienionych procesów niezbędne jest wykorzystanie modeli mysich.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu zostaną wykorzystane myszy transgeniczne uzyskane w wyniku krzyżowania myszy genetycznie zmodyfikowanych, zawierających systemy do tkankowo-specyficznej, warunkowej aktywacji genów jak również białka reporterowe Tomato pod kontrolą tkankowo-specyficznych promotorów. Tło genetyczne myszy to NOD scid gamma i C57BL6/CD1/FVB1, 3 różne linie. Łączna liczba planowanych myszy to 660.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy sprawdzono istniejący stan wiedzy w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: MEDLINE (via Pubmed), Web of Science. Wykorzystano słowa kluczowe: CSC, oral stem cells, invasion, metastasis and mouse models.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzamy, że izolacja i charakteryzacja nowotworowych komórek macierzystych w celu odkrycia nowych celów terapeutycznych jest utrudniona w systemie in vitro. Złożoność i heterogenność nowotworów może być tylko badana w modelu in vivo. Dlatego zrozumienie na

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

poziomie molekularnym ścieżek sygnałowych i molekuł, które są kluczowe w regulacji tych procesów będzie miało w przyszłości istotne znaczenie w rozwoju efektywnych terapii nowotworowych.

Zasadę 3R wprowadzimy do naszego projektu w następujący sposób:

Zastąpienie: Hodowla komórek nowotworowych *in vitro* jest jedną z możliwości zastąpienia wykorzystania żywych zwierząt w projekcie. Jednak z powodu stopnia złożoności takie warunki są niemożliwe do odtworzenia w hodowli komórkowej *in vitro*. Część eksperymentów pilotowych będziemy jednak starali się przeprowadzić na modelu 3D jako hodowlę komórek nowotworowych w sferach w matrigelu aby ograniczyć liczbę używanych do eksperymentów zwierząt.

Redukcja: Podjęto kilka kroków mających na celu zminimalizowanie ilości zwierząt biorących udział w projekcie. Hodowla będzie prowadzona przez wykwalifikowaną i doświadczoną osobę w taki sposób aby otrzymać potrzebną liczbę osobników o pożądanym genotypie w optymalny sposób.

Doskonalenie: Wykorzystane przez nas procedury nie powodują dotkliwego bólu u myszy. Osoby biorące udział w projekcie przeszły odpowiednie szkolenie z zakresu opieki nad zwierzętami i przeprowadzania procedur, co więcej posiadają one co najmniej roczny staż pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi.