

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Zmiana profilu metabolomicznego indukowanego czerniaka w trakcie terapii kombretastatyną A4

2. Czas trwania projektu: 30.08.2018 – 30.08.2021

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): profil metabolomiczny, nowotworzenie, SPME, mysz, kombretastatyna A4

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.

Jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny jest poszukiwanie skutecznych technik in vitro umożliwiających dokładne odwzorowanie wyników in vivo czyli tzw. in vitro-in vivo extrapolation (IVIVE). Celem niniejszego projektu jest porównanie profilu metabolomicznego komórek czerniaka linii B16F10 in vitro oraz in vivo wraz z oceną ich odpowiedzi na leczenie kombretastatyną A4 (CA4). Równocześnie badanie to pozwoli na weryfikację czy nowo stworzona platforma analityczna złożona z mikroekstrakcji do fazy stałej (ang. SPME) i spektrometrii mas (MS) pozwoli w przyszłości zmniejszyć, a nawet całkowicie wyeliminować, wykorzystanie zwierząt w eksperymentach. SPME nie wymaga pobrania próbek, a mikrosondy (\varnothing k. 200 μ m, głębokość wklucia 2-4 mm) minimalnie naruszają strukturę tkanki.

Umożliwia to przeprowadzenie tzw. „chemicznej biopsji” od jednego osobnika wielokrotnie w czasie badania.

Badania zostaną przeprowadzone na 32 samcach myszy szczepu C57BL6/J/cmdb (wiek 8-tygodni), podzielonych na cztery grupy (n=8):

- indukcja nowotworem (wszczepienie mysich komórek czerniaka linii B16F10) w dole pachwinowym + leczenie CA4 (grupa 1),
- indukcja nowotworem (wszczepienie mysich komórek czerniaka linii B16F10) w dole pachwinowym + podaż soli fizjologicznej (vehiculum - grupa 2),
- brak indukcji nowotworem + leczenie CA4 (grupa 3)
- brak indukcji nowotworem + podaż soli fizjologicznej (vehiculum – grupa kontrolna, 4).

Skrócony opis eksperymentu: Wszystkie zwierzęta poddane będą chemicznej biopsji (procedura 1-4, czynność 2). Po losowym przydzieleniu zwierząt do grup, 16 osobnikom (grupy 1 i 2) wszczepione zostaną komórki nowotworowe (procedura 1 i 2, czynność 3), w grupie 3 zwierzętom nie indukowanym nowotworem podany zostanie roztwór CA4 (procedura 3, czynność 4), natomiast u myszy z grupy kontrolnej (grupa 4) nie będzie indukowany nowotwór i będzie podawana sól fizjologiczna (procedura 4, czynność 4). Wielkość guza monitorowana będzie za pomocą suwmiarki. Kiedy guz (wg danych literaturowych [1]) po około 6 dniach osiągnie wielkość 4-5 mm zostanie wprowadzone leczenie (grupa 1 - procedura 1, czynność 4 oraz grupa 3 - procedura 3, czynność 4) lub podaż soli fizjologicznej (grupa 2 - procedura 2, czynność 4 oraz grupa 4 – procedura 4, czynność 4) Równolegle zwierzęta będą poddawane chemicznej biopsji (procedura 1-4, czynność 2) aż do dnia uśmiercenia (procedura 1-4, czynność 5).

1. Mitrus, I., Sochanik, A., Cichon, T., & Szala, S. (2009). Combination of combretastatin A4 phosphate and doxorubicin-containing liposomes affects growth of B16-F10 tumors. *Acta Biochimica Polonica*, 56(1), 161. Mitrus, I., Sochanik, A., Cichon, T., & Szala, S. (2009). Combination of combretastatin A4 phosphate and doxorubicin-containing liposomes affects growth of B16-F10 tumors. *Acta Biochimica Polonica*, 56(1), 161.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu wykorzystanych zostanie 32 myszy.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

1. Przygotowując projekt badawczy sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w następujących bazach danych: EBSCO; PUBMED; Science Direct; Springer; Wiley Online Library; Web of Science.

2. Wykorzystano słowa kluczowe: solid phase microextraction, untargeted metabolomics, metabolomic profiling, tumorigenesis, B16F10, C57bl/6, combretastatin A4, CA4, fosbretabulin.

3. Mimo, że w literaturze występują doniesienia dotyczące skuteczności terapii kombretastatyny A4 wobec indukowanego czerniaka linii B16F10 w modelu mysim z wykorzystaniem szczepu C57bl/6 [1,2], w przeszukiwanej literaturze nie znaleziono badań dotyczących zmian profilu metabolomicznego w trakcie rozwoju choroby oraz leczenia.

4. Badania przeprowadzone do tej pory jednoznacznie dowodzą, że metoda SPME dzięki swoim unikatowym cechom może być stosowana z powodzeniem w badaniach farmakokinetycznych, metabolomicznych i toksykologicznych u różnych gatunków zwierząt (psów, świń, ryb, szczurów i myszy) [3-8] warunkach *in vivo*. W dostępnej literaturze nie znaleziono jednak żadnych prac dotyczących porównania zmian profilu metabolomicznego tkanki nowotworowej w czasie rozwoju choroby oraz skuteczności zastosowanej terapii. Fakt ten należy tłumaczyć brakiem odpowiednich narzędzi analitycznych, które umożliwiłyby wykonanie takich badań biochemicznych *in vivo* z niską inwazyjnością.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pomoże w zidentyfikowaniu szlaków metabolomicznych aktywujących bądź dezaktywujących się w trakcie rozwoju choroby nowotworowej, w ocenie skuteczności farmakoterapii oraz porównaniu uzyskanych wyników do analogicznych wyników z badań *in vitro*. Potwierdzenie wyników przeprowadzonych *in vitro* (przedstawionych poniżej) w badaniach prowadzonych *in vivo*, jak również zastosowanie metody SPME jako metody alternatywnej do badań *in vivo* pozwoli ograniczyć liczbę zwierząt doświadczalnych wykorzystywanych w przyszłych eksperymentach.

5. Zastosowanie w planowanych badaniach niskoinazyjnej metody mikroekstrakcji, nie wymagającej pobrania tradycyjnej próbki umożliwia znaczne ograniczenie liczby zwierząt wykorzystywanych w procedurze w porównaniu do metod standardowych wymagających homogenizowania badanej próbki. Ponadto mała inwazyjność mikrowłókien ekstrakcyjnych, nie powodująca uszkodzenia większego niż rutynowa iniekcja miejsca indukcji nowotworem, dzięki

czemu pomiary *in vivo* w kolejnych punktach czasowych mogą być przeprowadzane na tym samym zwierzęciu, co nie tylko niweluje konieczność uśmiercania zwierząt, ale dodatkowo eliminuje wpływ zmienności międzyosobniczej, przez co poprawia wiarygodność uzyskanych wyników.

6. Wykorzystanie w planowym eksperymencie nowoczesnego systemu anestezji wziewnej poprawi komfort i zmniejszy stres zwierząt wykorzystywanych w procedurze. Kontakt eksperymentatora ze zwierzęciem zostanie znacznie skrócony, a zwierzęta nie będą narażone na stres związany z wkłuciem i podaniem anestetyku (najczęściej drogą dootrzewnową lub dożylną).

1. Mitrus, I., Sochanik, A., Cichon, T., & Szala, S. (2009). Combination of combretastatin A4 phosphate and doxorubicin-containing liposomes affects growth of B16-F10 tumors. *Acta Biochimica Polonica*, 56(1), 161.
2. Vincent, L., Kermani, P., Young, L. M., Cheng, J., Zhang, F., Shido, K., ... & Bohlen, P. (2005). Combretastatin A4 phosphate induces rapid regression of tumor neovessels and growth through interference with vascular endothelial-cadherin signaling. *The Journal of clinical investigation*, 115(11), 2992-3006
3. Lord, H. L., Grant, R. P., Wallis, M., Incledon, B., Fahie, B., & Pawliszyn, J. B. (2003). Development and evaluation of a solid-phase microextraction probe for *in vivo* pharmacokinetic studies. *Analytical Chemistry*, 75(19), 5103-5115.
4. Musteata, F. M., de Lannoy, I., Gien, B., & Pawliszyn, J. (2008). Blood sampling without blood draws for *in vivo* pharmacokinetic studies in rats. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 47(4-5), 907-912
5. Vuckovic, D., de Lannoy, I., Gien, B., Shirey, R. E., Sidisky, L. M., Dutta, S., & Pawliszyn, J. (2011). *In vivo* solid-phase microextraction: capturing the elusive portion of metabolome. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(23), 5344-5348
6. Wang, S., Oakes, K. D., Bragg, L. M., Pawliszyn, J., Dixon, G., & Servos, M. R. (2011). Validation and use of *in vivo* solid phase micro-extraction (SPME) for the detection of emerging contaminants in fish. *Chemosphere*, 85(9), 1472-1480.
7. Bojko, B., Goryński, K., Gomez-Rios, G. A., Knaak, J. M., Machuca, T., Cudjoe, E., ... & Liu, M. (2014). Low invasive *in vivo* tissue sampling for monitoring biomarkers and drugs during surgery. *Laboratory Investigation*, 94(5), 586.
8. Goryński, K., Goryńska, P., Górska, A., Haręźlak, T., Jaroch, A., Jaroch, K., ... & Bojko, B. (2016). SPME as a promising tool in translational medicine and drug discovery: From bench to bedside. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 130, 55-67