

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu Ocena rzeczywistego wpływu białka RBP4 na zdolność do przerzutowania komórek mysiego raka sutka wszczepionych ortotopowo oraz bezpośredni wpływ RBP4 na dysfunkcję śródbłonka i proces przerzutowania w modelu z dożylnym podaniem komórek mysiego raka sutka.

Czas trwania projektu: 1 rok

Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) przerzutowanie, dysfunkcja śródbłonka, RBP4

1. 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.

Białko wiążące retinol typu 4 (RBP4) jest zaangażowane w rozwój cukrzycy, chorób układu krążenia oraz choroby nowotworowej gdzie może bezpośrednio przyczyniać się do zapalenia śródbłonka naczyniowego. Przeprowadzone przez nas badania *in vivo* z wykorzystaniem modelu mysich raków: przerzutującego 4T1 raz jego nieprzerzutującego odpowiednika – 67NR wskazały, że stężenie RBP4 było dwukrotnie wyższe w osoczu myszy zaszczepionych nowotworem 4T1 niż u myszy z nowotworem 67NR, a różnica ta prawdopodobnie wynika z samego rodzaju nowotworu.

Celem projektu jest ocena wyselekcjonowanej przez nas nowej cząsteczki o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym, jaką jest RBP4, oraz ocena jej wpływu na proces zapalny i przerzutowanie komórek mysiego raka sutka poprzez dokładną charakterystykę procesów towarzyszących rozwojowi raka sutka u myszy doświadczalnych. W tym celu planujemy wprowadzanie nowych modeli badawczych z różną ekspresją RBP4:

67NR RBP4+ (z nadekspresją dla genu kodującego RBP4) i 4T1 RBP4- (z wykasowanym genem dla RBP4). Zestawienie i porównanie danych doświadczalnych opracowanych na podstawie nowych modeli nowotworu gruczołu sutka potwierdzi znaczenie wytypowanej przez nas cząsteczki jako uniwersalnego markera świadczącego o stopniu uszkodzenia naczyń krwionośnych śródbłónka w przebiegu choroby nowotworowej.

W kolejnym etapie zostanie opracowany dożylny model przerzutowania komórek mysiego raka sutka z wykorzystaniem komórek transdukowanych białkiem fluorescencyjnym bliskiej podczerwieni iRFP, umożliwiającą przyżyciową obserwację płuc zajętych przez nieprzerzutujący 67NR-iRFP i przerzutujący 4T1-iRFP. Opracowanie takiego modelu umożliwi analizę wydajności tworzenia niszy pre-metastatycznej, a także posłuży do dalszych badań mających na celu sprawdzenie wpływu RBP4 na uszkodzenie śródbłónka. Z kolei te badania zweryfikują udział RBP4 w przebudowie i uszkodzeniu ścian śródbłónka, co jest nieodłącznym elementem towarzyszącym progresji nowotworowej.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

111 myszy

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Przygotowując wniosek dokonano szerokiego rozeznania w zakresie objętym wnioskiem. W przeszukiwanych przez nas bazach danych (PubMed, Research Gate, Web of Science, Google Scholar) znaleziono informacje świadczące jedynie o podniesionym poziomie RBP4 u ludzi z chorobą nowotworową jednak nie o korelacji pomiędzy rodzajem nowotworu (przeczytujący bądź nieprzerzutujący) a stężeniem RBP4 w organizmie, które jak pokazują nasze badania jest znacznie większe u osobnika z nowotworem przerzutującym. Ponieważ związek RBP4 z procesem przerzutowania nie został dotychczas udowodniony zdecydowaliśmy się na wprowadzenie nowych modeli badawczych pozwalających na zweryfikowanie tej zależności.

Ponieważ w żywym organizmie dysfunkcja śródbłónka oraz proces przerzutowania zależą od złożonych interakcji pomiędzy różnymi komórkami, niezbędne jest wykorzystanie modelu zwierzęcego. Tylko w ten sposób uda się udowodnić złożoną zależność procesu zapalnego od sekrecji RBP4.

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 1 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 niewystarczająca na przeprowadzenie wszystkich zaplanowanych testów. Wcześniejsze badania pozwoliły na wyliczenie minimalnych ilości materiału pozwalających na uzyskanie wiarygodnych wyników. Oznacza to z pojedynczego osobnika można oznaczyć jedynie 4 markery osoczowe. Aby dzięki wybranym przez nas markerom scharakteryzować odpowiedź zapalną i wykazać związek między samym procesem zapalnym, angiogenezą i RBP4 konieczna była liczba 10 osobników w grupie. Ponadto ilość tkanki tłuszczowej uzyskana od jednego osobnika, która jest tkanką sekrecyjną RBP4 i naszym głównym obiektem zainteresowania, jest niewielka gdyż w trakcie progresji nowotworu dochodzi do wykorzystania zmagazynowanych w tkance substancji. Ilości białka pozyskanego z tej tkanki są tak małe, że starczą zaledwie na 2 oznaczenia przy pomocy testów Elisa. Etap 2A jest eksperymentem pilotażowym. Liczba myszy zaplanowanych do tego etapu ma umożliwić uzyskanie optymalnego modelu do kolejnych badań. Obraz morfologiczny czy badanie aktywności płytek krwi ma

potwierdzić obraz uzyskany w wyniku obrazowania fluorescencyjnego, dlatego nie wymaga to tak dużej liczby myszy jak w etapie 1. Z kolei w etapie 2B z pobranego materiału zostaną oznaczone markery wybrane w etapie 1, stąd można było zredukować liczbę osobników. Zwierzęta wykorzystywane do zaplanowanych doświadczeń utrzymywane będą w warunkach, zapewniających dobrostan zwierząt. Utrzymywane będą w pomieszczeniach klimatyzowanych z stałym dostępem do wody i standardowej paszy dla gryzoni, z wzbogaceniami takimi jak materiał gniazdowy czy domki. Ponadto będą miały zapewniony stały nadzór weterynaryjny, a ich stan zdrowia będzie codziennie monitorowany. Zaplanowane procedury zaprojektowano tak, by możliwie maksymalnie ograniczyć liczbę zwierząt w badaniu oraz by zminimalizować ból. Wszystkie procedury przeprowadzane będą przez wykwalifikowany personel. W razie zaobserwowania u zwierząt oznak bólu, podawane będą środki o działaniu przeciwbólowym lub zwierzę będzie poddawane wcześniejszej eutanazji.