

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „**Ocena działania przeciwnowotworowego morfolidu kwasu 3-hydroksyiminoolean-12-en-28-owego oraz jego koniugatu z diklofenakiem w modelu raka wątroby i trzustki**”

1.Czas trwania projektu **15.04.2019-15.04.2021**

2.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) : rak wątroby i trzustki; morfolid kwasu 3-hydroksyiminoolean-12-en-28-owego; diklofenak; myszy SCID; Nrf2 i NF-kB

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.

Celem doświadczenia jest ocena działania przeciwnowotworowego morfolidu kwasu 3-hydroksyiminolean-12-en-28-owego (pochodnej kwasu oleanolowego) oraz jego koniugatu z niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym (NLPZ) – diklofenakiem (czyli kompleksu zbudowanego z morfolidu kwasu 3-hydroksyiminolean-12-en-28-owego oraz diklofenaku) w modelu raka wątroby i trzustki.

Badania epidemiologiczne wskazują, że nowotwory trzustki i wątroby należą do najgorzej rokujących i charakteryzują się najwyższymi wskaźnikami śmiertelności. Wiąże się to m.in. z opornością na aktualnie stosowane terapie, jak również brakiem symptomów umożliwiających ich wczesną diagnostykę.

W patogenezie obu tych nowotworów istotną rolę odgrywają przewlekłe stany zapalne, w których dochodzi do zmiany wielu szlaków sygnałowych m.in. szlaku sygnałowego zależnego od NF-kB (jądrowego czynnika – kappa B) oraz szlaku sygnałowego związanego z czynnikiem jądrowym 2 (Nrf2), który odpowiada m.in. za indukcję enzymów i białek pełniących funkcje ochronne w organizmie.

Do tej pory opisano wiele związków, które wykazują właściwości przeciwnowotworowe, jednak ostatnio szczególną uwagę zwracają pochodne kwasu oleanolowego. Triterpenoidy - ogromna grupa związków, których przedstawicielem jest właśnie kwas oleanolowy - są uważane obecnie za obiecujące czynniki chemoprewencyjne i/lub chemioterapeutyczne. Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) zostały natomiast zatwierdzone przez Urząd Rejestracji Leków USA jako jedne z pierwszych związków możliwych do zastosowania m.in. w chemoprewencji nowotworów jelita grubego. Jednym z NLPZ jest diklofenak, powszechnie znany z działania przeciwzapalnego związanego z oddziaływaniem na szlak sygnałowy NF-kB.

W pierwszym etapie badań z wykorzystaniem modelu *in vitro* zbadaliśmy 4 pochodne kwasu oleanolowego i 10 ich koniugatów z NLPZ. Spośród badanych pochodnych i ich koniugatów najsilniejsze działanie antyproliferacyjne wykazywał morfolid kwasu 3-hydroksyiminolean-12-en-28-owego oraz jego koniugat z diklofenakiem. Dane literaturowe wskazują, że w przypadku morfolidu kwasu 3-hydroksyiminolean-12-en-28-owego zaobserwowano właściwości cytotoksyczne w odniesieniu do linii nowotworowych piersi, szyjki macicy i brodawczaka. Nasze badania *in vitro* wykazały, że morfolid kwasu 3-hydroksyiminolean-12-en-28-owego i jego koniugat z diklofenakiem hamowały również wzrost komórek nowotworowych wątroby i trzustki w porównaniu do wzrostu komórek prawidłowych z tych narządów. Dalsze analizy w modelu *in vitro* wykazały, że morfolid kwasu 3-hydroksyiminolean-12-en-28-owego i jego koniugat z diklofenakiem wpływa na regulację szlaku sygnałowego NF-kB i Nrf2. Dlatego też postanowiono zbadać aktywność biologiczną morfolidu kwasu 3-hydroksyiminolean-12-en-28-owego oraz jego koniugatu z diklofenakiem w eksperymencie *in vivo* z wykorzystaniem myszy SCID (ang. *severe combined immunodeficiency*), którym zostaną wszczepione pochodzące z wątroby ludzkie komórki nowotworowe HepG2 oraz pochodzące z trzustki ludzkie komórki nowotworowe PSN1. Planowane doświadczenie rozpocznie się od osławiania zwierzęcia z eksperymentatorem, następnie myszom zostaną wszczepione podskórnie komórki raka wątroby oraz raka trzustki. Po upływie dwóch dni od podania komórek zostaną wykonane zdjęcia w celu potwierdzenia rozwoju guza, a następnie myszom zostaną podane związki badane. Wówczas będzie miała miejsce ponowna analiza rozmiaru guzów w celu zbadania wpływu testowanych związków na rozwój nowotworu. Doświadczenie zostanie zakończone eutanazją zwierząt w celu pobrania guzów do analiz molekularnych i histopatologicznych.

Wyniki otrzymane w ramach badań *in vivo* mogą stanowić podstawę do badań przedklinicznych i klinicznych służących zwiększeniu skuteczności terapii nowotworów wątroby i trzustki. Ponadto poznanie mechanizmu działania badanych związków – morfolidu kwasu 3-hydroksyiminolean-12-en-28-

owego oraz jego koniugatu z diklofenakiem w kontekście interakcji badanych dróg sygnałowych (NF-kB i Nrf2) będzie przydatne w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych.

Przewidywanymi szkodami u zwierząt włączonych do doświadczenia jest dyskomfort podczas wykonywanych czynności (anestezja, wszczepianie komórek nowotworowych, iniekcja związków).

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Do doświadczenia zostanie włączone 80 osobników, 8 grup po 10 zwierząt (samce) gatunku Mysz domowa (*Mus musculus*), stado niekrewniacze SCID Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, w wieku 8 tygodni w momencie zakupu.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

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

W dostępnym piśmiennictwie PubMed, MEDLINE, BioMed Central, Google Scholar, Scopus, EMBASE, ScienceDirect, Current Contents wykorzystując kilka różnych strategii wyszukiwania nie znaleziono informacji, których uzyskanie jest celem tego projektu (użyte słowa kluczowe: rak wątroby i trzustki; morfolid kwasu 3-hydroksyiminoolean-12-en-28-owego; diklofenak; myszy SCID; Nrf2 i NF-kB; ang.liver and pancreas cancer; 3-hydroxyiminoolean-12-en-28-oic acid morfolide; diclofenac; mice SCID; Nrf2 and NF-kB.

Realizacja zasad zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia (3R)

1. Zasada zastąpienia

Pomimo, że przy użyciu metod *in vitro* możliwe jest badanie interakcji związków chemicznych z procesami zachodzącymi w żywych komórkach na poziomie molekularnym, to analiza wzajemnych oddziaływań i zależności pomiędzy dziesiątkami typów komórek prawidłowych wchodzących w skład żywego organizmu a komórkami nowotworowymi możliwa jest obecnie tylko w modelu zwierzęcym. Ponadto mysz model ludzkich ksenograftów umożliwia obserwację rozwoju ludzkiego guza nowotworowego w organizmie myszy z uwzględnieniem wszystkich aspektów dystrybucji badanego związku, które są niemożliwe do odtworzenia w warunkach hodowli komórkowych lub innych znanych obecnie modelach badawczych.

2. Zasada ograniczenia

Badania będą obejmowały 80 osobników, osiem grup po 10 osobników, co stanowi minimalną liczbę zwierząt w grupie potrzebną do prawidłowej oceny statystycznej otrzymanych wyników biorąc pod uwagę średnią i odchylenie standardowe prób.

Zastosowanie nieinwazyjnych metod obrazowania pozwala na znaczne zredukowanie liczby zwierząt w eksperymencie. W klasycznym eksperymencie bez użycia techniki bioobrazowania luminescencyjnego, konieczne jest uśmiercenie grupy myszy w każdym etapie, punkcie czasowym doświadczenia. W modelu zaproponowanym przez wnioskodawcę jest to zastąpione wizualizacją nieinwazyjną, wymagającą jedynie chwilowego znieczulenia myszy, które- po zakończonym badaniu- są ponownie włączane do trwającego doświadczenia.

3. Zasada udoskonalenia

W proponowanych badaniach zamierza się wykorzystać gatunek Mysz domowa, *Mus Musculus*; stado niekrewniacze SCID Crl:SHO-*Prkdc^{scid}HR^{hr}*, które charakteryzuje się brakiem sierści. Wykorzystanie tego modelu eksperymentalnego pozwala na szybkie podskórne wszczepienie myszom komórek nowotworowych, co skraca narażenie zwierząt na dystres związany z ich unieruchomieniem oraz nakłuciem skóry.

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.