

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Ipatasertib jako modulator odpowiedzi immunologicznej w terapii glejaka wielopostaciowego.**

2. Czas trwania projektu: 20.03.2020-31.12.2023

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **glejak wielopostaciowy, AKT, inhibitor, immunoterapia.**

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.

Glejak wielopostaciowy (GBM) jest najczęstszą pierwotną złośliwą postacią raka mózgu u dorosłych. Standardowe leczenie GBM obejmuje maksymalną resekcję, oraz radioterapię z uzupełniającymi terapiami ogólnoustrojowymi. Pomimo to pacjenci mają złe rokowanie, a 5-letni wskaźnik przeżycia wynosi zaledwie 3-5%. Dlatego trwają prace nad opracowaniem nowych režimów terapeutycznych.

Ostatnio nastąpił rozwój immunoterapii przeciwnowotworowej z udziałem przeciwciał ukierunkowanych na białko programowalnej śmierci komórki 1 oraz jego ligand (PD-1/PD-L1) co dało obiecujące wyniki. W przypadku GBM niewielka grupa pacjentów odpowiada na leczenie przeciwciałami anty-PD-1/PD-L1. Zaobserwowano, że infiltracja cytotoksycznych limfocytów T do guza czyni komórki GBM bardziej wrażliwymi na terapię przy pomocy inhibitorów PD1/PD-L1.

W oparciu o wcześniejsze obserwacje dokonane w badaniach komórek T oraz modeli mysich uzyskanych z wykorzystaniem komórek ludzkiego raka piersi i prostaty postawiliśmy hipotezę, iż zastosowanie nowego związku, ipatasertibu, będzie stymulować przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną, co może stanowić podstawę do opracowania nowego sposobu leczenia GBM.

Hipoteza będzie weryfikowana przez zbadanie wpływu ipatasertibu na eliminację mysich komórek nowotworowych wszczepionych myszom wraz z oceną jego przenikalności przez barierę krew-mózg oraz odpowiedzi układu immunologicznego. Dotychczas wykazaliśmy, iż ipatasertib posiada silne właściwości toksyczne w hodowli *in vitro* ludzkich oraz mysich komórek GBM. Zaobserwowaliśmy, że badany związek hamuje w tych komórkach aktywność czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za ekspresję genów odpowiedzi immunologicznej.

Planowane procedury mogą wywołać u zwierząt objawy wynikające z rozwoju nowotworu i towarzyszący temu dyskomfort, utratę wagi ciała, zaburzenia oddychania lub objawy neurologiczne takie jak długotrwałe drżenie kończyn. Ich wystąpienie będzie skutkowało natychmiastową eutanazją zwierzęcia. Za szkodę należy uznać również śmierć zwierzęcia.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa (*Mus musculus*) szczepu wsobnego w hodowli krewniaczej C57BL/6J (Jackson Laboratory, USA) – 112 osobników

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Zasada zastąpienia

Aktualnie dostępne metody *in vitro* pozwalają na ocenę aktywności biologicznej oraz badanie mechanizmu działania związków chemicznych na poziomie molekularnym. Należy podkreślić, że glejak wielopostaciowy jest nowotworem, który charakteryzuje niezwykle wysoki stopień heterogenności genetycznej, prowadzący do zwiększenia stopnia jego złośliwości. Niestety, żaden z aktualnie dostępnych modeli *in vitro*, nie pozwala na pełne odzwierciedlenie warunków *in vivo*, w tym złożoności organizmu na poziomie tkanek i narządów. Pomimo intensywnego rozwoju modeli przedklinicznych

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

nadal analiza procesów ADME (podania, dystrybucji, metabolizmu, wydalania) oraz złożoności procesu nowotworowego możliwa jest tylko w modelu zwierzęcym. Nie jest możliwe użycie innego modelu, który mógłby odzwierciedlić niezwykle skomplikowane zależności czynników modulujących rozwój procesu nowotworowego. W związku z tym w badaniach przedklinicznych kandydatów na leki, niezbędne jest wykorzystanie zwierząt.

Jednym z powszechnie używanych na świecie modeli w badaniach procesów nowotworowych na zwierzętach są modele umożliwiające obserwację rozwoju 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.

Zasada ograniczenia

Po dogłębnym zapoznaniu się z dostępną literaturą dotyczącą przeprowadzania eksperymentów z wykorzystaniem gryzoni liczba zwierząt wykorzystywanych w doświadczeniach została ograniczona do poziomu niezbędnego do uzyskania wyników wiarygodnych statystycznie. W proponowanych badaniach zamierza się wykorzystać mysie komórki linii glejaka poddane transfekcji plazmidem niosącym gen lucyferazy (Luc). W ten sposób będzie możliwa ocena lokalizacji guza oraz stopnia metabolizmu komórek nowotworowych przy zastosowaniu nieinwazyjnego obrazowania bioluminescencyjnego.

Zastosowanie nieinwazyjnych metod obrazowania pozwala na znaczne zredukowanie (7 krotne) liczby zwierząt w procedurze 2 planowanego eksperymentu. W klasycznym eksperymencie bez użycia tego rodzaju technik konieczne jest uśmiercenie grupy zwierząt na każdym etapie doświadczenia. W modelu zaproponowanym przez Wnioskodawcę uśmiercanie zwierząt może być zastąpione wizualizacją komórek transfekowanych lucyferazą za pomocą systemu do nieinwazyjnego obrazowania bioluminescencji *in vivo*.

Każda grupa eksperymentalna uwzględnia również grupę kontrolną zwierząt, konieczną do prawidłowego porównania wyników. Podsumowując, proponowana liczba zwierząt jest niezbędna do prawidłowej oceny statystycznej otrzymanych wyników.

Zasada udoskonalenia

Ze względu zróżnicowanie genetyczne komórek glejaka wielopostaciowego w celu uzyskania jak

najbardziej wiarygodnych wyników badań w projekcie zaplanowano wykorzystanie dwóch modeli, podskórnego (heterotopowego) oraz mózgowego (ortotopowego) uzyskanych poprzez przeszczep mysich komórek GBM linii GL261-Tom-Luc myszom C57BL/6J co pozwoli na lepsze zrozumienie biologii tego nowotworu i procesów w nim zachodzących w odpowiedzi na zastosowaną terapię w tym uwzględniające funkcjonowanie układu immunologicznego.

Uzyskane w ten sposób informacje mogą posłużyć w przyszłości do lepszego planowania badań klinicznych z wykorzystaniem leków immuno-onkologicznych.

Prezentowany projekt opiera się na wykorzystaniu techniki nieinwazyjnego obrazowania, które nie wymaga przeprowadzenia eutanazji zwierząt po każdym dokonanym pomiarze. Ponadto w celu zmniejszenia stresu odczuwanego przez zwierzęta, wykonanie części czynności zaplanowano przy użyciu znieczulenia. Myszy C57BL/6J będą utrzymywane w odpowiednich warunkach zapewniających dobrostan zwierząt. Zakłada się ograniczenie do minimum niekorzystnych skutków oraz odczuć zwierząt w czasie procedury oraz utrzymywanie ich w jak najlepszych warunkach bytowych.

W klatkach będzie znajdować się ściółka roślinna oraz wzbogacenia w celu ograniczenia stresu i ryzyka agresji w grupie (klocki drewniane pełniące rolę gryzaków, rurki, materiał na gniazda). W przypadku zwierząt poddanych procedurom dotkliwym (podanie komórek GBM do mózgu) zwierzęta otrzymają przed zabiegiem i po zabiegu środki przeciwbólowe i przeciwzapalne. Ponadto, zwierzęta będą obserwowane podczas całego eksperymentu przez eksperymentatora minimum dwa razy dziennie oraz przez weterynarza i zespół ds. dobrostanu zwierząt.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

☒ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy

☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

☐ NIE

Sformatowano: Wcięcie: Z lewej: 0,5 cm, Bez punktów lub numeracji

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.