

## NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Ocena wpływu obniżenia poziomu cyrkularnych RNA na zahamowanie wzrostu i rozwoju glejaka wielopostaciowego**

2. Czas trwania projektu: 1.10.2019-30.09.2024

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): koliste RNA, glejak wielopostaciowy, progresja i rozwój nowotworu.

4. 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.

Glejaki wielopostaciowe (*glioblastoma* multiforme, GBM) są nie tylko najczęstszymi, ale również najbardziej złośliwymi nowotworami Centralnego Układu Nerwowego (CUN). Średnia życia pacjentów wynosi od 12 do 14 miesięcy od momentu rozpoznania. Ostatnio pojawiły się doniesienia o istnieniu kolistych RNA (circRNA) - klasie cząsteczek RNA o niezdefiniowanej dotychczas roli w rozwoju i progresji guzów mózgu, które mogłyby być zarówno markerami, jak i celami terapeutycznymi w leczeniu glejaka.

Celem doświadczenia jest ocena wpływu obniżenia poziomu wybranych circRNA: hsa-circGBM1 oraz hsa-circGBM2 na zahamowanie wzrostu i rozwoju guza mózgu. Stanowi ono kontynuację naszych wcześniejszych badań z wykorzystaniem materiału biologicznego pochodzącego od pacjentów ze zdiagnozowanym glejakiem wielopostaciowym, gdzie obserwujemy znacząco wyższy poziom wspomnianych wyżej circRNA. Badanie funkcji wskazuje na potencjalny udział tych dwóch cząsteczek (hsa-circGBM1 oraz hsa-circGBM2) w procesach kluczowych dla rozwoju nowotworu, w dostępnych komercyjnie liniach komórkowych glejaka, jak również tych pochodzących bezpośrednio z tkanki pacjentów cierpiących na glejaka.

W celu ograniczenia funkcji potencjalnie patogennych circRNA w komórkach nowotworowych zamierzamy obniżyć ich poziom w liniach komórkowych (w modelu *in vitro*), a następnie ocenić wpływ takiego działania na

tworzenie i rozwój guza w modelu zwierzęcym (*in vivo*).

Doświadczenie rozpocznie się od osławiania zwierzęcia z eksperymentatorem, następnie myszom zostaną wszczepione podskórnie komórki nowotworowe z „prawidłowym dla nowotworu” poziomem patogennych hsa-circGBM1 oraz hsa-circGBM2. Grupom badanych zostaną wszczepione komórki nowotworowe z obniżonym poziomem tych cząsteczek RNA. Następnie, za pomocą suwmiarki, będą mierzone rozmiary guzów uformowanych przez wszczepione komórki nowotworowe. Doświadczenie zakończy się eutanazją zwierząt i pobraniem materiału (tj. guzów nowotworowych oraz wybranych narządów) do dalszych analiz.

Efektami pożądanymi i oczekiwanymi zaplanowanego doświadczenia będzie zahamowanie wzrostu nowotworu, a w związku z tym - redukcja masy i wielkości guza w stosunku do grupy kontrolnej. Badania przedstawione we wniosku mają charakter pilotażowy, jednak uzyskanie pozytywnych wyników może przyczynić się do zaproponowania nowych markerów diagnostycznych, jak również strategii terapeutycznych glejaka wielopostaciowego. Doświadczenie dostarczy cennych informacji nawet w przypadku zaobserwowania braku wyraźnych efektów obniżenia poziomu circRNA, ponieważ wskaże kierunki i możliwości projektowania nowych podejść eksperymentalnych.

Przewidywanymi szkodami u zwierząt włączonych do doświadczenia jest dyskomfort podczas wykonywanych czynności (wszczepienie komórek nowotworowych czy pomiar guza za pomocą suwmiarki). Czynności te nie naruszą jednak w sposób istotny dobrostanu zwierząt. Szkodą dla zwierząt jest również ich eutanazja (śmierć) mająca miejsce na końcu doświadczenia.

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa *Mus musculus*, stado niekrewniacze SCID Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup>, wiek 4 tygodnie – samce, 60 osobników.

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONAŁENIA<sup>1</sup>

**Zasada zastąpienia** Pomimo, że przy użyciu metod *in vitro* możliwe jest badanie funkcji potencjalnych biomarkerów czy cząsteczek terapeutycznych 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 ciągle tylko w modelu zwierzęcym. Fakt ten znajduje potwierdzenie w przypadku większości nowotworów, ale szczególnie ważny jest dla badania glejaka wielopostaciowego- nowotworu o niezwyklej heterogenności histologicznej i molekularnej. Ponadto mysz model ludzkich ksenograftów umożliwia obserwację rozwoju ludzkiego guza nowotworowego w organizmie myszy z uwzględnieniem wszystkich aspektów wpływu całego organizmu na tworzenie guza nowotworowego. Są one ciągle niemożliwe do odtworzenia w warunkach hodowli komórkowych lub innych znanych obecnie modelach badawczych. W progresji nowotworu znaczącą rolę odgrywa tzw. mikrośrodowisko: komórki zrębu oraz inne jego elementy, takie jak np. naczynia krwionośne. Procesy rozwoju nowotworu regulowane są przez wieloetapowe i kompleksowe mechanizmy związane z oddziaływaniami między komórkami nowotworowymi a zdrowymi tkankami organizmu. Stosowane przez nas standardowe adherentne linie komórkowe są modelami dwuwymiarowymi, które nie odzwierciedlają ani mikrośrodowiska tkanki ani, ze względu na jednorodny typ komórek- oddziaływań pomiędzy komórkami różnego typu. Wprowadzone przez nas w ostatnim czasie trójwymiarowe modele kultur komórkowych (3D) wykazują większe podobieństwo do tkanek pod względem ekspresji genów, oddziaływań międzykomórkowych oraz dystrybucji sygnałów i metabolitów, jednak i w tym modelu nie jesteśmy w stanie uwzględnić np. roli naczyń krwionośnych w rozwoju guza nowotworowego.

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

Zasadnym jest więc zastosowanie ich w modelu *in vivo*, aby odtworzyć warunki towarzyszące rozwojowi guza w organizmie.

#### **Zasada ograniczenia**

Doświadczenie będzie obejmowało 60 osobników, sześć 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. Liczebność grup uwzględnia specyfikę eksperymentu i możliwość różnej odpowiedzi osobniczej na wszczepione komórki guza. Jak wskazują dane - wyniki eksperymentów z podobną liczebnością osobników w grupie pozwoliły kontynuować później badania na etapie klinicznym.

Zastosowanie nieinwazyjnych metod pomiarów rozmiaru guzów (za pomocą suwmiarki) to kolejny czynnik, który pozwala na znaczne zredukowanie liczby zwierząt w eksperymencie

#### **Zasada udoskonalenia**

W proponowanych badaniach zamierza się wykorzystać gatunek Mysz domowa, *Mus Musculus*; stado niekrewniacze SCID Crl:SHO-*Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup>*, które charakteryzuje się brakiem sierści. Wykorzystanie tego modelu eksperymentalnego pozwala na łatwe przeprowadzenie czynności tj.: podskórne wszczepienie myszom komórek nowotworowych. Wprowadzana jest niewielka ilość komórek, co nie powoduje bólu ani zbyt dużego dystresu zwierząt – nie różni się znacząco od standardowej iniekcji podskórnej. Ponadto wszczepienie komórek guza pod skórę ułatwi pomiar jego wzrostu, a także umożliwi monitorowanie jego wzrostu bez konieczności uśmiercania zwierząt. W celu sprawdzenia wpływu danego czynnika na rozwój guzów przeprowadza się zazwyczaj eutanazję badanych grup zwierząt w określonych punktach czasowych – dotyczy to np. guzów rozwijających się wewnątrz organizmu. W eksperymencie zaproponowanym przez wnioskodawcę jest to zastąpione wielokrotnym nieinwazyjnym pomiarem, wymagającym jedynie chwilowego unieruchomienia i wykonaniu analizy rozmiaru guzów rozwijających się u myszy, które- po zakończonym badaniu- są ponownie włączane do trwającego doświadczenia. Dystres związany jest więc z chwilowym unieruchomieniem zwierzęcia oraz przyłożeniem suwmiarki do guza. Ważnym aspektem jest czas przeprowadzenia procedur. Jest on ograniczony na tyle, że u zwierząt nie rozwijają się następstwa choroby nowotworowej - ból, zmiana behawioru, znaczący dyskomfort.

#### 8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

☒ **NIE**

**Sformatowano:** Wcięcie: Z lewej: 0,63 cm, Bez punktów lub numeracji

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.