

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu ***Wpływ Białka Indukowanego Prolaktyną*** (ang. *Prolactin Inducible Protein, PIP*) ***na proces apoptozy indukowany doksorubicyną i cyklofosfamidem***

2. Czas trwania projektu **01.06.2019 do 01.06.2021**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) *białko indukowane prolaktyną, cyklofosfamid, doksorubicyna, apoptoza.*

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.

Nowotwory piersi są największym problemem onkologicznym w krajach rozwiniętych, są również narastającym problemem w krajach rozwijających się. W Polsce 16500 tys. kobiet zapada rocznie na raka gruczołu piersiowego. Ze względu na rosnącą liczbę zachorowań oraz coraz młodszy wiek chorych, problem raka gruczołu piersiowego staje się problemem społecznym i ekonomicznym. Dlatego identyfikacja kluczowych czynników determinujących skuteczność leczenia oraz dążenie do zapewnienia ich optymalnego wykorzystania – poprawiającego jakość i długość życia kobiet chorych na ten nowotwór powinno stanowić cel w walce z tą chorobą. Jednym z podstawowych problemów rzutujących niekorzystnie na lecznicze efekty spowodowane podawaniem cytostatyków jest lekooporność.

Wielolekooporność definiowana jest jako brak wrażliwości na podawane leki, które nie wykazują strukturalnego podobieństwa, a ponadto mają zróżnicowane molekularne punkty uchwytu. Nasze ostatnie badania wskazują, że zwiększona oporność pacjentek na leczenie standardową terapią adjuwantową (doksorubicyna + cyklofosfamid) jest istotnie skorelowana z niską ekspresją białka PIP. Wykorzystując modele komórkowe wykazaliśmy następnie w testach *in vitro*, że obecność białka PIP w komórkach raka gruczołu piersiowego powoduje ich zmniejszoną przeżywalność i zwiększoną wrażliwość na apoptozę indukowaną doksorubicyną lub cyklofosfamidem. W dalszych badaniach przeprowadzonych na modelu myszy nu/nu wykazaliśmy, że guzy nowotworowe utworzone przez przeszczepione komórki MDA-MB-231 z neoekspresją PIP (MDA-231/PIP) były istotnie większe w porównaniu z guzami utworzonymi przez kontrolne komórki MDA-MB-231 (MDA-231/PURO). Co ważne, po dożylnym podaniu doksorubicyny (3 mg/kg.m.c.- w dwóch dawkach podzielonych) myszom nu/nu obarczonych guzami nowotworowymi utworzonymi przez komórki MDA-231/PIP obserwowano istotnie lepszą odpowiedź na leczenie w porównaniu z kontrolnymi komórkami MDA-231/PURO. Przy czym u myszy, którym podawano doksorubicynę, obserwowano zmniejszenie ekspresji markera proliferacji Ki-67 w guzach utworzonych przez komórki MDA-231/PIP w porównaniu z guzami tworzonymi przez kontrolne komórki MDA-231/PURO. Efektu tego nie obserwowano u myszy, którym podawano sól fizjologiczną. Natomiast, wykorzystując metodę TUNEL, nie wykazano różnic w liczbie komórek apoptotycznych pomiędzy guzami MDA-231/PIP i MDA-231/PURO pochodzącymi od myszy, którym podawano albo doksorubicyną, albo placebo. Dlatego, aby spostrzeżenia te mogły znaleźć praktyczne zastosowanie w klinice raka gruczołu piersiowego konieczne są dalsze badania, których celem będzie wykazanie wpływu białka PIP na apoptozę komórek raka gruczołu piersiowego indukowaną doksorubicyną i cyklofosfamidem w testach *in vivo* z wykorzystaniem myszy bezgrasiczych Balb/c (crl: NU(NCr)-Foxn1^{nu}). Zwierzęta poddane zostaną leczeniu za pomocą doksorubicyny i cyklofosfamidu. Jest to jedyny sposób poznania takich właściwości komórek nowotworowych jak wzrost w postaci guza i tworzenie przerzutów, a także określenie efektów i monitorowanie terapii przeciwnowotworowej, ponieważ żadne modele *in vitro* nie są w stanie zastąpić w takich badaniach żywego organizmu.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

106 osobników- mysz domowa (*Mus musculus*)- 6-7 tygodniowe myszy, samice, szczep Balb/c (Nude)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Planowane badania *in vivo* poprzedzone zostały badaniami klinicznymi oraz badaniami *in vitro*, które wykazały pro-apoptotyczny charakter białka PIP w leczeniu doksorubicyną i cyklofosfamidem.

W badaniach konieczne jest użycie zwierząt ponieważ tylko w żywym organizmie w pełni można zbadać wpływ doksorubicyny i cyklofosfamidu na proces nowotworowy komórek modelowych różniących się poziomem ekspresji PIP, który zależny jest od wielu złożonych interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi a komórkami śródbłónka i komórkami układu immunologicznego. Ponadto w badaniach *in vitro* nie ma możliwości odtworzenia układu odzwierciedlającego stan fizjologiczny obserwowany podczas rozwoju przerzutów nowotworowych w organizmie. Na tej podstawie, zgodnie z międzynarodowymi normami badań przesiewowych, wybierane są modele zwierzęce *in vivo* stanowiące niezbędne poprzedzenie ewentualnych badań klinicznych. Myszy wykorzystywane do zaplanowanych doświadczeń utrzymywane będą w warunkach zapewniających dobrostan zwierząt. Zaplanowane procedury zaprojektowano tak, by możliwie maksymalnie ograniczyć liczbę zwierząt w badaniu oraz by zminimalizować ból, cierpienie i dystres wykorzystywanych zwierząt. W przypadku zaobserwowania znacznego pogorszenia stanu zdrowia zwierząt zostanie zastosowane wczesne, humanitarne zakończenie procedury. Ponadto u myszy z wyraźnym guzem nowotworowym stosowany będzie preparat przeciwbólowy zgodnie z zaleceniem lekarza weterynarii.

W badaniu zaplanowano wykorzystanie minimalnej liczby zwierząt, takiej która umożliwi uzyskanie istotnych wyników (istotnych statystycznie).

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych:

EBSCO; PUBMED; Google Scholar; AGRICOLA; Science Direct; Web of Science (JCR); Thomson Innovation

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

Wykorzystałam słowa kluczowe i ich kombinacje: Prolactin Induced Protein, PIP, mouse, doxorubicin, cyclophosphamide, therapy, apoptosis, caspase-3.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że: wyniki badań uzyskane w trakcie realizacji projektu pozwolą na zdobycie wiedzy na temat roli białka indukowanego prolaktyną w biologii raka gruczołu piersiowego. Oryginalne wykorzystanie modeli komórkowych MDA-MB-231 z ektopową ekspresją tego białka oraz linii T47D ze stabilnie wyhamowaną jego ekspresją pozwolą na potwierdzenie hipotezy badawczej o pro-apoptotycznym działaniu białka PIP w predykcji standardową terapią adjuwantową (doksorubicyna + cyklofosfamid).

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: wyniki uzyskane na materiale klinicznym i ustalonych *in vitro* liniach komórkowych wskazują iż ekspresja białka PIP w komórkach raka gruczołu piersiowego zwiększa ich wrażliwość na cytotoksyczne działanie doksorubicyny i cyklofosfamidu, co najprawdopodobniej wiąże się z ich podwyższoną podatnością na apoptozę indukowaną tym cytostatykami.

B. Brak jest danych, lub też dane są mało wiarygodne lub nie są sprawdzone w zakresie: brak jest danych dotyczących roli białka PIP w oporności komórek nowotworowych na leczenie z wykorzystaniem doksorubicyny i cyklofosfamidu, które prowadzono *in vivo* z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. Jedynym wyjątkiem są badania z wykorzystaniem komórek MDA-MB-453 raka gruczołu piersiowego z zahamowaną ekspresją PIP, które przeszczepiano myszom NOD/SCID w celu sprawdzenia wpływu aktywacji kinaz ERK1/2 na poziom ekspresji PIP (Naderi A. et al., 2012).

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na: jednoznaczne określenie funkcji tego białka w biologii raka gruczołu piersiowego i jego roli we wrażliwości/oporność komórek raka gruczołu piersiowego na leczenie doksorubicyną i cyklofosfamidem.

A/ Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze lub ugruntowanie istniejącej wiedzy w kierunku spersonalizowanej metody leczenia nowotworów raka gruczołu piersiowego w tym nowotworów opornych na leczenie standardową terapią adjuwantową.

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.