

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Indukcja apoptozy ludzkich komórek raka jelita grubego *in vitro* i *in vivo* przez Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) produkowany i wydzielany przez bakterie *Lactococcus lactis*”.

2. Czas trwania projektu – 14 m-cy

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): TRAIL, apoptoza, rak jelita grubego, *Lactococcus lactis*, immunoterapia nowotworów

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.

Rak jelita grubego (RJG) jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych przewodu pokarmowego u ludzi, z roczną zapadalnością około miliona osób. Pomimo dużych postępów w diagnostyce oraz metodach leczenia, śmiertelność w krajach rozwiniętych wynosi 33%. Wskazuje to na pilną potrzebę poszukiwania nowych strategii terapeutycznych opartych na zastosowaniu leków bardziej selektywnie niszczących komórki nowotworowe nie uszkadzając komórek prawidłowych. TRAIL (Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) jest naturalną cząsteczką białkową, produkowaną w organizmie kręgowców. Biologiczną funkcją TRAIL jest nadzór immunologiczny oraz udział w procesach odporności przeciwnowotworowej. Celem ogólnym projektu jest zbadanie czy niepatogenna bakteria *Lactococcus lactis*, może stanowić bezpieczny wektor, jako „producent oraz nośnik” rozpuszczalnego, ludzkiego białka TRAIL (hsTRAIL), indukującego *in vitro* i *in vivo* u myszy z defektem odpowiedzi immunologicznej (NOD-SCID) eliminację ludzkich komórek raka jelita grubego. Celem projektu jest również określenie stopnia efektywności redukcji masy nowotworu u myszy w wyniku działania hsTRAIL produkowanego przez *L.lactis*, jako pojedynczy czynnik oraz w kombinacji

z chemioterapeutykami: puromycyną (Puro), 5-fluorouracylem (5-FU), irynotekaniem (CPT-11) lub GT-oligonukleotydami homologicznymi do telomerów (GT-oligos). Cele te będą realizowane z wykorzystaniem badań prowadzonych zarówno w modelu *in vitro*, jak i *in vivo* na modelu mysim. Projekt opiera się na założeniu, iż genetycznie zmodyfikowane bakterie *L.lactis* będą efektywnie produkowały hsTRAIL ulegający sekrecji, stanowiąc bezpieczny wektor do skutecznej indukcji apoptozy ludzkich komórek RJG u myszy. W modelu tym, myszy NOD-SCID będą szczepione ludzkimi komórkami RJG, a następnie doguzowo będą im podawane bakterie *L.lactis* produkujące rhTRAIL oraz wybrane cytostatyki. Działanie przeciwnowotworowe rhTRAIL produkowanego przez bakterie *L.lactis* będzie oceniane poprzez wpływ na wielkość guzów (pomiar suwmiarką). Proponowany projekt pozwoli odpowiedzieć na pytanie czy możliwe jest zastosowanie bakterii *L.lactis*, jako skutecznego producenta i nośnika rhTRAIL indukującego apoptozę ludzkich komórek RJG *in vivo* w organizmie myszy. Wykazanie takich właściwości bakterii *L.lactis* produkujących rhTRAIL pozwoliłoby na opracowanie nowych skuteczniejszych form immunoterapii RJG.

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

W badaniach zostaną użyte myszy NOD-SCID obu płci w liczbie 140 sztuk.

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

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED oraz Web of Science (JCR);

Wykorzystałam/em słowa kluczowe:

TRAIL producing bacteria/Lactococcus lactis/colon cancer immunotherapy

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że:

Modyfikowane genetycznie bakterie *Lactococcus lactis* (szeroko stosowane w przemyśle mleczarskim) mogą być wydajnym i bezpiecznym producentem aktywnych biologicznie białek człowieka, np. IL-10. Zastosowanie bakterii *L.lactis*, jako wektora producenta i nośnika białka hsTRAIL zapewni sekrecję klonowanego białka „klasy spożywczej”, wolnego od endotoksyny i ziaren inkluzyjnych oraz niską aktywność zewnątrzkomórkowych proteinaz. *L.lactis* wydaje się stanowić efektywny wektor umożliwiający bezpieczne wprowadzanie hsTRAIL *in vivo* do organizmu zwierząt i wywołanie apoptozy ludzkich komórek nowotworowych. Niektóre komórki nowotworowe wykazują jednakże oporność na cytotoksyczne działanie TRAIL. Liczne badania *in vitro* oraz próby przedkliniczne wykazały, że szereg chemioterapeutyków może zwiększać lub przywracać wrażliwość komórek nowotworowych na proapoptotyczne działanie TRAIL. W proponowanym układzie doświadczalnym określony będzie także stopień skuteczności współdziałania przeciwnowotworowych cytostatyków oraz hsTRAIL na bardziej efektywną eliminację komórek RJG na drodze indukcji ich apoptozy.

Uzyskane wyniki eksperymentalne powinny dostarczyć kompleksowej informacji na temat możliwości wykorzystania bakterii *L.lactis*, jako nowego, komórkowego, bezpiecznego wektora - „producenta i nośnika” hsTRAIL, do badań *in vitro*, jak i *in vivo*. *L.lactis* jest niepatogenną bakterią w pełni zdolną do replikacji, co umożliwia jej przetrwanie w makroorganizmie przez dłuższy okres czasu. Wydaje się, że system transferu hsTRAIL przy użyciu bakterii *L.lactis* jest bardzo atrakcyjny dlatego, że może pozwolić na uniknięcie konieczności wielokrotnego podawania *in vivo* hsTRAIL. Potwierdzenie skuteczności dostarczania *in vivo* hsTRAIL przy użyciu bakterii *L.lactis* może mieć istotne implikacje dla opracowania bardziej skutecznych form immunoterapii nowotworów.

**Zastąpienie:** Użycie mysiego podskórnego modelu raka jelita grubego jest konieczne, ponieważ, na podstawie

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

wiedzy dostępnej w bazach danych (PUBMED; wykorzystane hasła to: biologically active anticancer protein, preclinical cancer models, tumor biology, biomarkers for drug development), stwierdzamy, że wciąż nie istnieją alternatywne modele pozwalające wiarygodnie odpowiedzieć na zadane pytanie badawcze. W przypadku badań nad nowotworami, testy *in vitro* (hodowle komórkowe) są niewystarczające i nie ma możliwości zastąpienia zwierząt kręgowych innym modelem badawczym.

**Ograniczenie:** Proponowana liczba zwierząt jest minimalną liczbą, przy której jesteśmy w stanie odpowiedzieć na zadane pytanie badawcze, ponieważ badania nie mają charakteru ściśle opisowego i podstawą będą analizy statystyczne. Proponowana liczba zwierząt została określona na podstawie dokładnej analizy wiedzy dostępnej w bazach danych (PUBMED; wykorzystane hasła: tumor cell apoptosis, tumor-targeted delivery, biologically active anticancer protein, mouse subcutaneous tumor model, intratumoral injection).

**Udoskonalenie:** Głównym problemem dotychczasowych badań klinicznych opartych na przeciwnowotworowym działaniu białka TRAIL jest krótki okres jego półtrwania w organizmie kręgowców. Użycie zaproponowanego modelu mysiego raka jelita grubego umożliwi odpowiedź na pytanie, czy wykorzystanie bakterii kwasu mlekowego, jako wektora do dostarczania i produkcji białka TRAIL o właściwościach przeciwnowotworowych, efektywnie przedłuży okno terapeutycznego działania tego białka, poprzez jego stałą produkcję bezpośrednio w środowisku guza.

- 1) Użycie myszy z genetycznym defektem układu odpornościowego NOD-SCID (mutacja spontaniczna) pozwala na ograniczenie dotkliwości ze względu na brak ryzyka odrzucenia przeszczepu ludzkich komórek nowotworowych oraz brak ryzyka silnej reakcji immunologicznej po do guzowym podaniu bakterii. Ponadto, bakterie kwasu mlekowego, stosowane jako nośnik i producent białka terapeutycznego, są niepatogenne.
- 2) Wykorzystywane zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku, przy zastosowaniu odpowiedniej diety (certyfikowane pasze bytowe) i wzbogaceniu środowiska. Stały kontakt i pomoc ze strony lekarza weterynarii oraz codzienny monitoring ze strony opiekuna i eksperymentatora pozwoli na zapewnienie odpowiedniego dobrostanu zwierząt.
- 3) Zwierzęta będą przebywały w pomieszczeniach innych niż pomieszczenia przeznaczone do wykonywania czynności takich jak szczepienie, eksperyment, uśmiercanie, co znacznie ograniczy ich stres i dyskomfort.
- 4) Podawane zwierzętom roztwory będą miały temperaturę zbliżoną do temperatury organizmu myszy, co zapewni uniknięcie szoku temperaturowego oraz uczucia dyskomfortu.
- 5) Podawane zwierzętom roztwory będą sprawdzone pod względem jałowości, natomiast czynność podawanie będzie się odbywać w warunkach sterylnych, w celu zmniejszenia ryzyka zakażenia.
- 6) Odpowiednio dobrane grupy kontrolne zapewnią wiarygodność otrzymanych wyników.

## 8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną

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