

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Rola syntazy galaktozyloceramidu (UGT8) i galaktozyloceramidu (GalCer) w lekooporności komórek raka gruczołu piersiowego.**

2. Czas trwania projektu: **01.06.2018 - 31.08. 2019**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **UGT8, GalCer, apoptoza, doksorubicyna**

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): **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.

Wcześniejsze badania własne wykazały, że enzym - syntaza galaktozyloceramidu (UGT8) poprzez syntezę galaktozyloceramidu (GalCer) może mieć udział w progresji raka gruczołu piersiowego do bardziej złośliwej postaci. Uzyskane wyniki sugerują, że obecność GalCer w komórkach rakowych związana jest z ich większą opornością na stres. Z kolei wyższa oporność komórek raka gruczołu piersiowego na stres komórkowy jest prawdopodobnie wynikiem ich większej oporności na apoptozę, na co wskazują wyniki z indukcją apoptozy za pomocą doksorubicyny. Dlatego, w oparciu o te wyniki proponujemy, że GalCer może mieć swój bezpośredni udział nie tylko w progresji raka gruczołu piersiowego do bardziej złośliwego fenotypu, ale również odgrywać istotną rolę w oporności komórek raka gruczołu piersiowego na chemioterapię. Aby jednak te spostrzeżenia mogły znaleźć praktyczne zastosowanie w klinice raka gruczołu piersiowego konieczne są dalsze badania, których celem będzie

wykazanie wpływu UGT8 i GalCer na apoptozę komórek raka gruczołu piersiowego indukowaną cytostatykami w testach *in vivo* z wykorzystaniem modelu zwierzęcego. W planowanych badaniach wykorzystane zostaną komórki 4T1 mysiego raka sutka z nadekspresją mysiego enzymu UGT8 (komórki 4T1.PURO/UGT8 produkujące znaczne ilości GalCer, które charakteryzują się zwiększoną opornością na apoptozę indukowaną dokсорubicyną w porównaniu z komórkami kontrolnymi (komórki 4T1.PURO), analogicznie jak to ma miejsce w przypadku ludzkich komórek raka gruczołu piersiowego. Komórki 4T1.PURO/UGT8 i komórki 4T1.PURO przeszczepiane będą myszom BALB/c, a następnie zwierzęta obarczone nowotworem leczone będą przez podawanie dokсорubicyny. Ten model zwierzęcy ze względu na czynny układ odpornościowy, wydaje się być lepszy od modelu bezgrasiczych myszy nu/nu z przeszczepionymi komórkami ludzkimi.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

56-osobników- mysz domowa (<i>Mus musculus</i>)- 8 tygodniowe myszy, samice, szczep Balb/c.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Doświadczenie będzie prowadzone zgodnie z tzw. zasadą 3R (Zastąpienia, Ograniczenia i Udoskonalenia) :

Zastąpienie: Planowane badania *in vivo* poprzedzone zostały badaniami *in vitro*, które wykazały anty-apoptotyczny charakter UGT8 i GalCer w leczeniu dokсорubicyną. W badaniach konieczne jest użycie zwierząt ponieważ tylko w żywym organizmie w pełni można zbadać wpływ dokсорubicyny na proces nowotworowy komórek modelowych różniących się poziomem ekspresji UGT8 i GalCer, 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 faz badań klinicznych.

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

Udoskonalenie: Myszy wykorzystywane do zaplanowanych doświadczeń utrzymywane będą w warunkach zapewniających dobrostan zwierząt. Zapewnione zostanie wzbogacenie środowiska w postaci tuneli i klocków dla gryzoni z drewna oraz odpowiedni wymiar wentylowanej klatki zgodnie z rozporządzeniem ministra rolnictwa i rozwoju wsi z dnia 14 grudnia 2016 roku. Liczba myszy na klatkę nie będzie przekraczać 5-sztuk.

Ograniczenie: Zaplanowane procedury zaprojektowano tak, by możliwie maksymalnie ograniczyć liczbę zwierząt w badaniu oraz by zminimalizować ból, cierpienie i stres wykorzystywanych zwierząt. Myszy szczepu Balb/c, w optymalnych dla tych zwierząt warunkach hodowli, stanowią stabilny model badawczy i w tym względzie liczebność grup, na które składa się 8 sztuk, jest wystarczająca do otrzymania statystycznie istotnych wyników eksperymentu, z uwzględnieniem możliwości wystąpienia artefaktów i/lub upadku zwierząt. Zastosowany zostanie nieparametryczny test statystyczny do określenia istotnych różnic we wzroście guza, który jest zwykle stosowany dla grupy o niskiej liczebności lub w przypadku gdy rozkład zmiennych jest różny od rozkładu normalnego (*Anova two-way Bonferroni posttest*).

W przypadku zaobserwowania znacznego pogorszenia stanu zdrowia zwierząt zostanie zastosowane wczesne, humanitarne zakończenie procedury. Ponadto u myszy z wyraźnym guzem nowotworowym lub po zaobserwowaniu potencjalnych przerzutów stosowany będzie preparat przeciwbólowy (buprenorfina), a procedura będzie prowadzona do wielkości guzów nie przekraczającej 2000 mm³.

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: EBSCO; PUBMED; Google Scholar; AGRICOLA; Science Direct; Web of Science (JCR); Thomson Innovation

Wykorzystałem słowa kluczowe i ich kombinacje: UGT8, galactosylceramide, mice, doxorubicin therapy, apoptosis, caspase-3.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że: wyniki badań uzyskanych w trakcie realizacji projektu pozwolą na zdobycie wiedzy na temat wykorzystania UGT8 i GalCer w terapii raka gruczołu piersiowego. Oryginalne wykorzystanie komórek 4T1.PURO/UGT8 z neoekspresją UGT8 pozwoli na potwierdzenie hipotezy badawczej dotyczącej możliwości wykorzystania UGT8 jako celu terapii przeciwnowotworowej, którego zahamowanie powinno zwiększać wrażliwość komórek nowotworowych na standardową chemioterapię.

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* wskazują, iż ekspresja UGT8 w komórkach raka gruczołu piersiowego zmniejszała ich wrażliwość na cytotoksyczne działanie dokсорubicyny, co najprawdopodobniej wiąże się z ich obniżoną podatnością na apoptozę indukowaną tym cytostatykiem.

B. Brak jest danych, lub też dane są mało wiarygodne lub nie są sprawdzone w zakresie: brak jest danych dotyczących roli UGT8 w oporności komórek nowotworowych na leczenie z wykorzystaniem dokсорubicyny, prowadzonych *in vivo*, z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. Jedynym wyjątkiem są badania z wykorzystaniem komórek MDA-MB-231 raka gruczołu piersiowego z zahamowaną ekspresją UGT8, które przeszczepiano myszom Crl:NU-Foxn1^{nu} w celu określenia jej roli w progresji tego nowotworu (Owczarek i wsp., 2013).

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na: jednoznaczne określenie funkcji UGT8 w biologii raka gruczołu piersiowego i jego roli we wrażliwości/oporności komórek raka gruczołu piersiowego na leczenie dokсорubicyną.

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.

B/ Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na upowszechnieniu wykorzystania UGT8 do konstrukcji testów diagnostycznych i predykcji raka gruczołów piersiowego. Na otrzymaniu inhibitora UGT8 w celu zahamowania jego aktywności i tym samym zwiększenia wrażliwości komórek raka gruczołu piersiowego z ekspresją UGT8 na leczenie dokсорubicyną i innymi cytostatykami

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.