

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projekt: Zbadanie wpływu zahamowania aktywacji limfocytów T regulatorowych na działanie immunoterapii przewlekłej białaczki limfocytowej

2.Czas trwania projektu: 3 lata

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) CLL, TCL1, Tregs, przewlekła białaczka limfocytowa, PD-L1, IDO

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.

W rozwoju przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL), poza komórkami nowotworowymi, ważną rolę odgrywają komórki tworzące tzw. mikrośrodowisko. Komórki mikrośrodowiska dostarczają czynniki wzrostu oraz hamują przeciwnowotworowe działanie układu odpornościowego. Planowane doświadczenia skupiają się wokół komórek odpowiedzialnych za hamowanie przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej: limfocytów regulatorowych (Tregs). W badaniach wykorzystane zostaną komórki białaczkowe TCL1. Komórki TCL1 wstrzykiwane myszom, namnażają się prowadząc do rozwoju choroby. Wraz z rozwojem białaczki, głównie w śledzionie, kształtuje się mikrośrodowisko o cechach zbliżonych do tych, które obserwowane są u ludzi chorych na PBL. Celem projektu jest zbadanie znaczenia Tregs w rozwoju białaczki oraz ich wpływu na działanie stosowanych terapii. U

mysz rozwinie się białaczka oraz będą przeprowadzane wielokrotne zastrzyki substancji o potencjalnym działaniu leczniczym. Na koniec doświadczeń zwierzęta będą uśmiercane. Zbadanie roli Tregs w przebiegu PBL może mieć znaczenie dla lepszego zrozumienia rozwoju i przebiegu PBL, co przyszłości może przyczynić się do opracowania bardziej skutecznych terapii tej choroby. Choć PBL jest chorobą przewlekłą, część pacjentów rozwija oporną na leczenie agresywną postać. Ważne jest więc poszukiwanie nowych sposobów leczenia PBL.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa: 558

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

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

☒ PUBMED; ☒ ScienceDirect; ☒ Web of Science (JCR); ☐

Wykorzystałam słowa kluczowe:

przewlekła białaczka limfocytowa, limfocyty regulatorowe, TCL1, PD-L1, IDO

Na podstawie dostępnej literatury można powiedzieć, że model TCL1 jest jednym z najlepiej odwzorowujących rozwój przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL) u ludzi. Choć w wielu nowotworach litych rola limfocytów regulatorowych (Tregs) została już zbadana, to w wypadku PBL wciąż nie jest jasne w jaki sposób Tregs wpływają na progresję choroby i na zahamowanie przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Wiadomo jednak, że wzrost odsetka Tregs u chorych jest negatywnym czynnikiem prognostycznym. Stąd niezwykle ważne jest poznanie mechanizmów związanych z Tregs, odpowiedzialnych za tworzenie mikrośrodowiska białaczki w modelu TCL1 i wykorzystanie tej wiedzy w immunoterapii PBL. W projekcie tym nie jest możliwe wykorzystanie modeli in vitro, gdyż badane są złożone interakcje między różnymi populacjami komórek, w tym komórek układu odpornościowego. Ponadto komórki TCL1, podobnie jak komórki białaczkowe izolowane od chorych na PBL, jak również limfocyty regulatorowe, nie mogą być

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

hodowane w warunkach in vitro, gdyż już po 24 godzinach w znacznym stopniu ulegają apoptozie.

2. Redukcja liczby wykorzystanych zwierząt

W oparciu o literaturę naukową oraz wieloletnie doświadczenie eksperymentatorów, zastosowano obliczenia statystyczne, umożliwiające wykorzystanie minimalnej liczby zwierząt.

3. Udoskonalenie

Zastosowany w badaniach model przeszczepiania komórek białaczkowych, izolowanych z myszy E μ -TCL1 jest na tę chwilę najlepiej obrazującym mikrośrodowisko PBL. Na podstawie doświadczeń eksperymentatorów, zdobytych w instytutach specjalizujących się w badaniu przebiegu PBL z wykorzystaniem modelu TCL1 oraz zgodnie z dostępną literaturą wyznaczono maksymalny odsetek: 80% komórek białaczkowych we krwi (wśród wszystkich białych krwinek) jako wskazanie do uśmiercenia zwierząt. U zwierząt, u których odsetek komórek białaczkowych jest mniejszy niż 80% nie zaobserwowano zmian (utrata masy, zaprzestanie spożywania pokarmu, zmierzwienie sierści, apatię), które wskazywałyby na silniejsze niż umiarkowane pogorszenie dobrostanu zwierząt. Ponadto, uważa się, że dopiero powyżej 50% komórek białaczkowych we krwi można uznać chorobę PBL za rozwiniętą. Zwierzęta będą utrzymywane w warunkach zapewniających optymalną temperaturę, wilgotność powietrza oraz dostęp do pokarmu. Zastosowane w procedurach 1,2,3 i 4 związki chemiczne użyte będą w dawkach, które według literatury nie wykazują działania toksycznego. Podanie toksyny myszom transgenicznym DEREK umożliwi selektywne i bardzo wydajne usunięcie Tregs, co stanowi szczególnie ważne narzędzie w badaniach nad rolą tych komórek. Ponadto, wszystkie zwierzęta będą monitorowane przynajmniej dwa razy w tygodniu, tak, aby nie dopuścić do zbyt intensywnego rozwoju choroby. Analiza krwi za pomocą cytometrii przepływowej, umożliwi ilościową ocenę zaawansowania choroby. Na podstawie doświadczenia w pracy z modelem PBL punkt, w którym odsetek komórek białaczkowych osiągnie 80% leukocytów krwi, uznano za graniczny, powyżej którego dobrostan zwierząt mógłby ulec pogorszeniu. Stąd też 80% komórek TCL1 we krwi będzie stanowił o zakończeniu doświadczenia i uśmierceniu zwierząt. Dane uzyskane w projekcie przyczynią się do rozwinięcia istniejącej wiedzy dotyczącej biologii nowotworów, zwłaszcza przewlekłej białaczki limfocytowej. Zgodnie z wiedzą eksperymentatorów zaplanowane badania mają charakter nowatorski, a w literaturze nie są dostępne wyniki z zaplanowanych doświadczeń.