

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **TDAG8 jako wspólny gen ryzyka w chorobie zapalnej jelit i stwardnieniu rozsianym.**

2. Czas trwania projektu **01.02.2021-01.07.2024**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **TDAG8, stwardnienie rozsiane, choroby autoimmunologiczne**

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

A. Badania podstawowe.

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.

Stwardnienie rozsiane jest przewlekłą chorobą ośrodkowego układu nerwowego charakteryzującą się utratą osłonki mielinowej neuronów oraz stanem zapalnym. W stwardnieniu rozsianym komórki układu immunologicznego przedostają się do ośrodkowego układu nerwowego i atakują osłonkę mielinową co prowadzi do utraty neuronów. Receptor TDAG8 jest jednym z genów niosących ryzyko zachorowania na stwardnienie rozsiane. Odkryto, że brak receptora TDAG8 u myszy ma niekorzystny wpływ na przebieg choroby w modelach zwierzęcych. W związku z tym, że receptor TDAG8 jest relatywnie niedawno odkrytym genem niewiele wiadomo o jego występowaniu i funkcji w ośrodkowym układzie nerwowym i chorobach.

Obecny projekt ma dwa cele obejmujące badania na zwierzętach. Pierwszy to zbadanie występowania receptora TDAG8 w mózgowiu w normalnych oraz zapalnych warunkach. Drugi to zbadanie właściwości przedostawania się szkodliwych komórek układu immunologicznego do ośrodkowego układu nerwowego. Z naszych wstępnych badań na ludzkiej tkance wynika, że ekspresja receptora TDAG8 znacznie wzrasta w okolicach lezji w mózgowiu osób chorych na stwardnienie rozsiane. Kolejnym krokiem jest zbadanie *in vivo* gęstości występowania receptora TDAG8 w mózgowiu podczas stanu zapalnego oraz odpowiedzenie na pytanie czy stan zapalny wpływa na ilość komórek układu odpornościowego przedostających się do ośrodkowego układu nerwowego i szkód jakie tam

wyrządzają.

Proponowane badania pozwolą nam dokładniej zbadać funkcjonowanie receptora TDAG8 w stwardnieniu rozsianym. Wywołamy stan zapalny u myszy by warunki fizjologiczne przypominały te w stwardnieniu rozsianym. Potencjalne odkrycia z obecnego projektu są ważne ponieważ dostarczą nowych danych odnośnie roli receptora TDAG8 w mózgowiu, w stwardnieniu rozsianym oraz potencjalnie przyczynią się do odkrycia nowych procesów chorobowych stwardnienia rozsianego.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu zostaną wykorzystane 144 myszy szczepu C57BL/6.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Zasady zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia (3R) zostaną uwzględnione w doświadczeniu w następujący sposób:

Ograniczenie: Do doświadczenia zostaną wykorzystane 144 dorosłe (3 miesięczne) myszy. Sześć lub dwanaście myszy w każdej z grup jest optymalną liczbą zwierząt potrzebną do osiągnięcia celów obliczoną przy użyciu kalkulatora mocy testów na podstawie opublikowanych wyników badań *in vitro* oraz *in vivo*. Ilość doświadczeń z użyciem zwierząt została również ograniczona do niezbędnego minimum poprzez zaplanowanie analiz biochemicznych w taki sposób, by każde pobrane mózgowie oraz krew zostały użyte do jak największej ilości oznaczeń białek i markerów oraz analizy laboratoryjnej krwi. Innymi słowy, by cała pozyskana tkanka była wykorzystana do osiągnięcia celów badania bez konieczności powtarzania doświadczenia.

Zastąpienie: Zwierzęta, myszy C57BL/6 zostały wybrane do przeprowadzenia tego doświadczenia. Myszy te zostały wybrane ze względu na wysoką reaktywność immunologiczną w porównaniu z innymi szczepami (Song & Hwang, 2017). Szczep ten jest również wykorzystywany do badań nad układem nerwowym w szczególności w modelach zwierzęcych stwardnienia rozsianego (Torkildsen, Brunborg, Myhr, & Bo, 2008; Constantinescu, Farooqi, O'Brien, & Gran, 2011). Doświadczenie to bazuje na wcześniejszych badaniach *in vivo*, w których wykorzystane zostały myszy z tego szczepu do badań nad receptorem TDAG8 bądź czynnością wstrzyknięcia limfocytów (Tcymbarevich, 2018; Banks et al., 2012). Ponadto, ilość procedur na zwierzętach w tym projekcie została zredukowana do dwóch dzięki zastąpieniu doświadczeń na zwierzętach metodami alternatywnymi, czyli użyciem tkanki ludzkiej. Do większości badań w tym projekcie zostanie pozyskane ludzkie

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

mózgowie oraz próby krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego. Jedynymi procedurami, których nie można zastąpić tkanką ludzką jest indukcja stanu zapalnego oraz wstrzyknięcie autoreaktywnych limfocytów i właśnie do tych celów zostaną wykorzystane myszy.

Po zapoznaniu się z literaturą światową w tym temacie i zastosowaniu frazy „TDAG8” w bazie badań naukowych pubmed.com nie znaleźliśmy informacji o badaniach, które zajmowały się mierzeniem ekspresji receptora TDAG8 bądź właściwości infiltracyjnych autoreaktywnych limfocytów pobranych od osób chorych na stwardnienie rozsiane.

Udoskonalenie: Zwierzęta będą miały zapewniony najwyższy standard warunków utrzymania, tak jak zostały opisane w pkt. 6C powyżej. Tylko przeszkolony i doświadczony personel będzie miał dostęp do zwierząt i wykona procedurę i uśmierci zwierzęta. Wybrana metoda do tego doświadczenia, czyli wstrzyknięcie dootrzewnowe lipopolisacharydu bakteryjnego bądź dożylne wstrzyknięcie limfocytów są procedurami o stosunkowo małej dotkliwości. By złagodzić dotkliwość procedur, zostaną one zakończone po najkrótszym możliwym czasie. By poprawić dobrostan zwierząt, myszy poddane działaniu lipopolisacharydu będą przetrzymywane w innym pomieszczeniu niż zwierzęta z grupy kontrolnej. By zminimalizować stres i dyskomfort, uśmiercenie zwierząt nastąpi w innym miejscu niż to gdzie zwierzęta są przechowywane przy użyciu szybkiej i bezbolesnej metody przedawkowania izofluranu.

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.