

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Ocena wpływu badanych związków na układ immunologiczny i wzrost czerniaka B16F10 u myszy**

2. Czas trwania projektu **1.08.2016 – 1.09.2017**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **czerniak, immunoterapia, białka: BTLA, HVEM**

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.

Czerniak jest to nowotwór złośliwy występujący najczęściej w skórze, którego współczynnik zachorowalności w ostatnich latach wykazuje skłonność do ciągłego wzrostu.

Zgłoszony przez nas projekt zakwalifikować należy to badań podstawowych a ich celem jest sprawdzenie czy zaprojektowane i zsyntetyzowane przez nas związki stymulują układ odpornościowy do walki z komórkami czerniaka poprzez aktywację cytotoksycznych limfocytów T. Na powierzchni limfocytów T znajduje się białko BTLA, które w wyniku tworzenia kompleksu z innym białkiem HVEM, znajdującym się na powierzchni komórek czerniaka, hamuje odpowiedź immunologiczną. Nasze związki mają za zadanie hamować tworzenie kompleksu białek BTLA-HVEM. Przeprowadzone metodami chemicznymi i biochemicznymi badania wskazują, że zsyntezowane przez nas peptydy oddziałują z białkiem BTLA w warunkach *in vitro*, nie wiadomo jednak czy zadziałają one w warunkach *in vivo*, co chcielibyśmy sprawdzić na modelu myszy z indukowanym czerniakiem. Związki, antygen nr1 oraz antygen nr2, blokując połączenie pomiędzy BTLA i HVEM, powinny aktywować limfocyty T do walki z komórkami czerniaka.

Zaprojektowane przez nas związki oparte są o strukturę białka HVEM, dlatego chcielibyśmy sprawdzić również czy w organizmach myszy zostaną wyprodukowane przeciwciała, które będą wiązały się z białkiem HVEM znajdującym się na komórkach nowotworowych, jednocześnie blokując połączenie HVEM-BTLA. Hipoteza ta zostanie sprawdzona na myszach z grup 1,2,4,5,6 w których osoczu szukali będziemy przeciwciał anti-HVEM. Jest to druga ścieżka, która może zostać wykorzystana w terapii leczenia czerniaka wpisująca się w nurt poszukiwań nowych możliwości immunoterapii tego nowotworu.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniach wykorzystanych zostanie 60 myszy szczepu C57BL/6. W każdej grupie znajdowało się będzie 10 myszy, gdyż taka liczba osobników powinna oddać prawdziwość procesu masowego a nie pojedynczego przypadku, co stanowi prawidłowość statystyczną.

- **Grupa 1** - 10 myszom zostaną podane komórki nowotworowe czerniaka w 1. dniu doświadczenia. Tego samego dnia zwierzęta te otrzymają antygen nr 1. Po 3., po 6., po 9. i po 12. dniach od podania komórek nowotworowych odbędzie się kolejne podanie antygeny nr 1. Po 21 dniach zwierzęta poddane zostaną całkowitemu skrwawieniu i zbadana zostanie masa pobranego guza.
- **Grupa 2** - 10 myszom zostaną podane komórki nowotworowe czerniaka w 1. dniu doświadczenia. Tego samego dnia zwierzęta te otrzymają antygen nr 2. Po 3., po 6., po 9. i po 12. dniach od podania komórek nowotworowych odbędzie się ponowne podanie antygeny nr 2. Po 21 dniach zwierzęta poddane zostaną całkowitemu skrwawieniu i zbadana zostanie masa pobranego guza.
- **Grupa 3** - 10 zwierząt – grupa kontrolna, którym zostaną podane jedynie komórki nowotworowe czerniaka w 1. dniu doświadczenia. Podobnie jak w grupie 1 i 2 zwierzęta poddane zostaną całkowitemu skrwawieniu i zbadana zostanie masa guza.
- **Grupa 4** - 10 myszy poddanych zostanie immunizacji antygenem nr 1 w 1. i w 9. dniu doświadczenia. Po 21 dniach zwierzęta poddane zostaną całkowitemu skrwawieniu w celu sprawdzenia czy wyprodukowały one przeciwciała.
- **Grupa 5** - 10 myszy poddanych zostanie immunizacji antygenem nr 2 w 1. i w 9. dniu doświadczenia. Po 21 dniach zwierzęta poddane zostaną całkowitemu skrwawieniu w celu sprawdzenia czy wyprodukowały one przeciwciała.
- **Grupa 6** - 10 myszy – grupa kontrolna, której nie zostanie podany antygen ani komórki nowotworowe czerniaka. Zwierzęta te poddane zostaną skrwawieniu w celu sprawdzenia obecności przeciwciał występujących u zdrowych i u immunizowanych antygenem 1 i 2 zwierząt (grupa 4 i 5).

Antygen nr 1 i 2 – fragmenty białka HVEM, otrzymane na drodze chemicznej syntezy na automatycznym synteźatorze peptydów i oczyszczone przy wykorzystaniu chromatografii cieczowej na fazach odwróconych. Przewidywana czystość uzyskanego na drodze chemicznej peptydu wynosiła będzie 100%.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Ograniczenie: W badaniach oszacowano liczbę zwierząt w taki sposób aby zredukować maksymalnie ich ilość do wymaganego statystycznie minimum w każdej procedurze. Liczba dziesięciu myszy na każdą grupę stanowi minimalną ilość myszy do osiągnięcia zakładanego celu. Potwierdzeniem takiego założenia jest stosowana w badaniach toksyczności Metoda Litchfielda-Wilcoxona, która została przyjęta z pewnymi modyfikacjami przez OECD jako procedura 401. Procedura ta wymaga stosowania co najmniej 10 gryzoni dla każdego poziomu dawkowania jednej substancji. Przyjmując w naszych badaniach jako minimum jeden poziom dawkowania w każdej grupie to test ten wymaga użycia przynajmniej 10 zwierząt w każdej grupie. Także 10 zwierząt w grupie kontrolnej.

Dodatkowo, użycie myszy w grupie 1 i 2 pozwoli na uzyskanie informacji nie tylko dotyczących wielkości powstałego guza a także na temat powstających przeciwciał anti-HVEM, co spowoduje ograniczenie stosowania dodatkowych dwóch grup myszy. W pracach stosowane będą nowoczesne i sprawdzone metody badawcze. Praca będzie przebiegała ze sprawdzonym i dobrze przeszkolonym personelem pracującym ze zwierzętami.

Zastąpienie: Do badań zostały wybrane myszy, gdyż są to zwierzęta o najniższym możliwym poziomie rozwoju posiadające układ immunologiczny oraz którym jednocześnie można przeszczepić komórki czerniaka.

Brak jest informacji na temat istniejącej wiedzy w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w dostępnych bazach danych: EBSCO; PUBMED; Google Scholar; AGRICOLA; ScienceDirect; Web of Science (JCR). Podczas poszukiwań w ww. bazach wykorzystane zostały słowa kluczowe: czerniak, immunizacja myszy, komórki nowotworowe, antygeny, białka BTLA i HVEM, inhibitory, stymulatory. Brak jest danych dotyczących działania wybranych przez nas antygenów na układ immunologiczny zwierząt.

Dane, uzyskane z przeprowadzonych na myszach doświadczeniach pozwolą na ocenę wpływu wybranych antygenów na układ immunologiczny myszy zdrowych oraz z indukowanym czerniakiem. Może się to przyczynić do znalezienia związków stymulujących limfocyty T do walki z komórkami nowotworowymi lub do znalezienia szczepionki przeciwko czerniakowi. Badania nasze stanowią ostatni etap testowania związków. Dotychczas zostały przeprowadzone alternatywne metody badań *in silico* oraz *in vitro* w zakresie oddziaływania białka BTLA z białkiem HVEM (testy powinowactwa, testy ELISA, testy kalorymetryczne). Do badania hamowania oddziaływań białek BTLA i HVEM niezbędne jest wykorzystanie żywych zwierząt, posiadających układ immunologiczny oraz możliwość jednoczesnego podania komórek nowotworowych czerniaka. **Brak jest alternatywnych możliwości badań odpowiedzi układu immunologicznego na obecność komórek czerniaka po podaniu antygenów.**

Udoskonalenie: W badaniach zastosowane zostaną zwierzęta, które prowadzą bezstresowe życie i będą oswojone. Myszy będą żyły w bardzo dobrych warunkach zgodnych z wymogami. Będą miały zapewniony dostęp do pożywienia i picia. W badaniach wykorzystane będą procedury i czynności o

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

najmniejszej dotkliwości dla zwierząt. Celem złagodzenia cierpienia zwierząt po pobraniu krwi zastosowana będzie metoda uśmiercenia myszy poprzez przerwanie im rdzenia kręgowego.