

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: Zbadanie roli limfocytów regulatorowych w rozwoju przewlekłej białaczki limfocytowej

2.Czas trwania projektu 1 lipca 2019-30 czerwca 2023

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): TCL1, T regulatorowe, przewlekła białaczka limfocytowa

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.

Wyniki współczesnych badań pokazują, że w rozwoju nowotworu ważną rolę odgrywają komórki tworzące tzw. mikrośrodowisko, dostarczające czynników wzrostu oraz hamujące przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną. Celem doświadczeń jest zbadanie roli komórek odpowiedzialnych za hamowanie odpowiedzi immunologicznej - limfocytów regulatorowych (Tregs) - w przewlekłej białaczce limfocytowej (PBL). W badaniach wykorzystane zostaną komórki nowotworowe, izolowane z myszy transgeniczných, rozwijających PBL. Myszy E μ -TCL1, począwszy od 4-6 miesiąca życia, rozwijają chorobę rozrostową, charakteryzującą się nagromadzeniem komórek białaczkowych w śledzionie, otrzewnej, oraz we krwi obwodowej. Komórki śledziony, wyizolowane z myszy transgeniczných TCL1, u których rozwinęła się białaczka (około 1 roku życia), podane dożylnie myszom szczepu C57BL/6, prowadzą do przyspieszonego rozwoju białaczki, który następuje w ciągu 4-12 tygodni. Rozwijająca się białaczka, powoduje modulację mikrośrodowiska o cechach zbliżonych do

tych, które obserwowane są u ludzi chorych na PBL. Celem projektu jest scharakteryzowanie limfocytów regulatorowych, zbadanie ich roli, funkcji oraz wpływu na progresję PBL. W doświadczeniach wykorzystane zostaną myszy transgeniczne, u których Tregs, ze względu na ekspresję genu zielonej fluorescencji, mogą być izolowane i dalej analizowane pod kątem swojej aktywności i funkcji. Zbadanie roli Tregs może mieć znaczenie dla lepszego zrozumienia przebiegu PBL oraz wpłynąć na projektowanie i planowanie immunoterapii tej choroby.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

112 myszy laboratoryjnych C57BL/6

264 myszy laboratoryjnych B6.Cg-Foxp3^{tm2Tch} GFP

396 myszy laboratoryjnych DREG

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

1. Zastąpienie

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

Na podstawie dostępnej literatury można powiedzieć, że model TCL1 jest jednym z najlepiej odwzorowujących faktyczny 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

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

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 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. Ponadto opracowano testy funkcjonalne ex vivo, które pozwalają badać funkcje limfocytów regulatorowych poza organizmem myszy. Liczba zwierząt zostaje więc ograniczona do dawców badanych komórek

3. Udoskonalenie

Zastosowany w badaniach model przeszczepiania komórek białaczkowych, izolowanych z myszy Eu-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 jako wskazanie do eutanazji zwierząt [1, 2]. 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 [3].

Zwierzęta będą utrzymywane w warunkach zapewniających optymalną temperaturę, wilgotność powietrza oraz dostęp do pokarmu. Zastosowana w procedurze 2 toksyna błonicza użyta będzie w dawce, która według literatury nie ma wpływu na zdrowie zwierząt. 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 eutanazji 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.

[1] Wierz M et al. Dual PD1/LAG3 immune checkpoint blockade limits tumor development in a murine model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2018 Apr 5;131(14):1617-1621. doi:10.1182/blood-2017-06-792267.

[2] Shuai Dong et al. Natarajan Muthusamy, Jennifer R. Brown, Amy J. Johnson, John C. Byrd PI3K p110 δ inactivation antagonizes chronic lymphocytic leukemia and reverses T cell immune suppression *J Clin Invest*. 2019 Jan 2; 129(1): 122–136. Published online 2018 Nov 19. doi: 10.1172/JCI99386

[3] Suljagic M, Longo PG, Bennardo S, Perlas E, Leone G, Laurenti L, Efremov DG. The Syk inhibitor fostamatinib disodium (R788) inhibits tumor growth in the E μ -TCL1 transgenic mouse model of CLL by blocking antigen-dependent B-cell receptor signaling. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):4894-905. doi: 10.1182/blood-2010-03-275180.