

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Ocena profilu transkrypcyjnego i epigenetycznego makrofagów wspierających rozwój glejaka wielopostaciowego w dwóch modelach eksperymentalnych**

2. Czas trwania projektu: **5 lat**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **glejak złośliwy, mikroglej/ makrofagi, epigenetyka**

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

Glejaki złośliwe są najczęściej występującymi guzami mózgu, w przypadku których nie ma skutecznej terapii, a pacjenci przeżywają średnio 15 miesięcy do momentu diagnozy. Obiecującym celem terapeutycznym są komórki układu odpornościowego infiltrujące guz (mikroglej/makrofagi), które w mikro-środowisku glejaka tracą zdolność do wywołania stanu zapalnego i wspierają rozwój guza, zamiast mu przeciwdziałać. Dotychczas w badaniach *in vitro* wykazaliśmy, że traktowanie mikrogleju czynnikami produkowanymi przez komórki glejaka trwale hamuje transkrypcję genów odpowiedzi zapalnej, prowadzi do zmian epigenetycznych, w tym modyfikacji histonów w obszarach regulatorowych tych genów odpowiedzi zapalnej, co wskazuje na rolę modyfikacji histonów w wyciszaniu odpowiedzi układu odpornościowego.

Histony stanowią białkowy rdzeń, wokół którego owinięte jest DNA, a ich modyfikacje regulują odczytywanie informacji genetycznej. Modyfikacje histonów powodują rozluźnianie, bądź zacieśnianie wiązania histon-DNA, co prowadzi do podwyższenia, bądź obniżenia ekspresji genów.

Celem projektu jest poznanie epigenetycznych mechanizmów regulujących przeprogramowanie mikrogleju/makrofagów w mikrośrodowisku glejaka u myszy.

Są to pionierskie badania, wykorzystujące nowoczesną metodologię sekwencjonowania DNA i bioinformatykę. Badania nad mechanizmami epigenetycznymi, które regulują „przejęcie kontroli” nad komórkami układu odpornościowego przez glejaka, pomogą nam zidentyfikować nowe cele terapeutyczne tj. czynniki biorące udział w zahamowaniu naturalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej. W przyszłości, nasze wyniki mogą przyczynić się do rozwoju nowych możliwości leczenia glejaka, polegających na re-aktywacji komórek układu odpornościowego mózgu za pomocą zdefiniowanych inhibitorów epigenetycznych..

W projekcie skupiamy się na wczesnym stadium rozwoju nowotworu, więc doświadczenie zakończy się przed wystąpieniem fizycznych objawów choroby. Pozwoli to zminimalizować ból i dystres zwierząt, spowodowany rozwojem nowotworu. Nie mniej jednak, w przypadku zaobserwowania fizycznych oznak rozwoju guza, zaplanowano zastosowanie humanitarnego punktu końcowego.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Projekt zakłada wykorzystanie 120 dorosłych samców myszy C57BL/6J oraz 120 dorosłych samców myszy NU/J.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych: PUBMED, Google Scholar, ScienceDirect.

Wykorzystano następujące słowa kluczowe: glioma; microglia/macrophages; polarization; histone modification; ChIP-seq, RNA-seq

Na podstawie nagromadzonej literatury, stwierdzono, że:

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że metodologia ChIP-seq została już zastosowana do badań epigenetycznych nad mikroglejem pozyskiwanym z modelu mysiego, jednak

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

były to badania dotyczące roli mechanizmów epigenetycznych w rozwoju mikrogleju i nie dotyczyły one procesu nowotworzenia. Pojawiło się doniesienie o zmianach w obszarach otwartej chromatyny w mikrogleju pozyskanym z mysiego modelu glejaka, co wskazuje na prawdopodobne zmiany w modyfikacjach histonów tych komórek, jako że modyfikacje histonów biorą udział w regulacji otwartości chromatyny.

B. Brak jest danych dotyczących zmian w modyfikacjach histonów w mikrogleju infiltrującym guza oraz ich roli w nabywaniu przez mikroglej immunosupresyjnego fenotypu, wspierającego proces nowotworzenia.

Uzyskanie danych z opisywanego projektu pozwoli na:

A. Poszerzenie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w zakresie mechanizmów molekularnych aktywacji komórek wspierających rozwój guzów mózgu.

B. Zastosowanie uzyskanej wiedzy w dalszych badaniach nad kluczowymi czynnikami epigenetycznymi regulującymi aktywację mikrogleju w mikrośrodowisku guza, co może pozwolić na zidentyfikowanie nowych celów terapeutycznych.

Zasada zastąpienia:

W badaniach *in vitro* wykazaliśmy, że traktowanie mikrogleju czynnikami pochodzenia nowotworowego powoduje zmiany na poziomie modyfikacji histonów w obszarach genów odpowiedzi zapalnej. Tym samym przeprowadziliśmy badania wstępne, wykorzystując modele nie-zwierzęce. Ze względu na złożoność badanego procesu, a w szczególności na występowanie ścisłej interakcji pomiędzy komórkami glejaka, a mikroglejem i innymi typami komórek układu odpornościowego, badania z wykorzystaniem zwierząt kręgowych z prawidłowo działającym układem odpornościowym są niezbędne do osiągnięcia celu doświadczenia.

Zasada Ograniczenia:

W celu ograniczenia liczby zwierząt, przeprowadziliśmy optymalizację procedury ChIP-seq na komórkach z hodowli, co pozwoliło nam 10-krotnie zmniejszyć ilość materiału wejściowego w porównaniu do klasycznego protokołu. Dodatkowo, sekwencjonowanie nowej generacji pozwala na pozyskanie informacji w skali całego genomu, a nie tylko wybiórczych genów, co pozwala zwiększyć ilość danych uzyskanych w przeliczeniu na jedno zwierzę oraz ograniczyć ilość powtórzeń, a co za tym idzie zmniejszyć liczbę zwierząt, na dany punkt statystyczny.

Zasada Udoskonalenia:

Zastosowane procedury mogą powodować umiarkowany stopień bólu i dystresu. Stan zwierząt jest monitorowany poprzez sprawdzanie masy ciała, stanu sierści, aktywności ruchowej oraz oznak bólu i dystresu. Po implantacji zwierzęta wykazują oznaki bólu (mrużenie oczu, stroszenie sierści, zmniejszona aktywność) do kilku godzin po operacji, po tym czasie oznaki tego typu nie występują aż do momentu zakończenia procedury. Zwierzęta zostaną uśmiercone przed pojawieniem się fizycznych objawów rozwijającego się guza. Przyjęte zostaną następujące kryteria zastosowania humanitarnego punktu końcowego: spadek masy ciała >20%, oznaki bólu i dystresu (zmniejszenie aktywności ruchowej, stroszenie sierści, mrużenie oczu) .

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy

TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

X NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.