

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: **Eksperymentalna terapia dla choroby Huntingtona z wykorzystaniem „sztucznych mikroRNA”.**

2.Czas trwania projektu 03.12.2018 - 30.12.2022

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) choroba Huntingtona, badania przedkliniczne, sztuczne mikroRNA, YAC128

4.Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) **B. Badania translacyjne,** Zaburzenia układu nerwowego i zaburzenia psychiczne u człowieka.

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.

Choroby genetyczne człowieka wciąż stanowią wyzwanie dla naukowców opracowujących podejścia terapeutyczne. Choroba Huntingtona (HD) jest doskonałym przykładem na to, że pomimo poznania podłoża genetycznego choroby (ponad 20 lat temu) i wielu lat badań prowadzonych na całym świecie jest ona nadal nieuleczalna, a pacjentom oferuje się jedynie możliwość łagodzenia objawów. Główną przyczyną choroby jest obecność toksycznego białka, zawierającego nadmiernie wydłużony ciąg poliglutaminowy. Istnieje pozytywna korelacja między długością ciągu a nasileniem objawów chorobowych, które pojawiają się zwykle w 4-5 dekadzie życia i prowadzą do śmierci pacjenta.

W związku z tym planujemy zbadać skuteczność nowych, potencjalnych terapeutyków dla HD w modelu mysim. W tym celu wykorzystamy technologię interferencji RNA oraz wektorowe cząsteczki typu sh-miRNA, znane również jako „sztuczne mikroRNA” do wyciszenia ekspresji toksycznego białka huntingtyny. Nasza strategia badawcza została opublikowana w 2013 roku oraz zgłoszona do ochrony

patentowej (patent USA, nr US9970004B2). Po ponad 5 latach testów cząsteczek tego typu na modelach komórkowych planujemy rozpocząć kolejny etap badań na modelu zwierzęcym. Powodzenie tych eksperymentów rozpocznie długą drogę rozwoju terapeutyku w kierunku badań klinicznych. Zakładamy, że dostarczone do mózgu myszy „sztuczne miRNA” będą efektywnie i specyficznie redukowały poziom toksycznego białka huntingtyny, co wpłynie na zahamowanie/cofanie się postępu choroby bez wywoływania szkód. Mysi model HD wykorzystany w projekcie charakteryzuje się nieznacznymi zaburzeniami motorycznymi i behawioralnymi. Testy behawioralne mogą wywołać niewielki stres u badanych zwierząt. Ponadto myszy będą poddane operacji iniekcji stereotaktycznej wektorów AAV do mózgu. W związku z tym po operacji zwierzęta mogą odczuwać niewielki dystres spowodowany raną.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu użytych zostanie 100 osobników Myszy domowej (*Mus musculus*) płci męskiej.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

ZASTĄPIENIE: Przed podjęciem decyzji o wykorzystaniu zwierząt w planowanych doświadczeniach, dokonano szczegółowego przeglądu dostępnej literatury naukowej w zakresie patogenezy choroby Huntingtona z użyciem modeli komórkowych i zwierzęcych. Wykorzystano do tego bazy danych jak: PUBMED, EBSCO oraz Web of Science. Przeanalizowano wszystkie możliwości wykorzystania niższych organizmów jak *S. cerevisiae*, *C. elegans*, czy *D. melanogaster*, które mogłyby stanowić alternatywę dla ssaków. Wspomniane modele muszki owocowej, nicieni czy rybek z rodzaju danio są wprawdzie stosowane do modelowania chorób człowieka, jednak nie wykazują złożonych fenotypów behawioralnych, co stanowi znaczne ograniczenie w ocenie progresji choroby czy stosowanej strategii terapeutycznej. Dlatego też zastosowanie ich w prezentowanym projekcie badawczym nie zapewniłoby wiarygodnych i miarodajnych wyników, udzielających jasnej odpowiedzi na postawione pytania. Model mysz jest więc niezbędnym etapem na drodze rozwoju terapeutyku w kierunku badań klinicznych.

Aby w pełni ocenić skuteczność i bezpieczeństwo stosowania potencjalnej cząsteczki terapeutycznej dla choroby neurodegeneracyjnej konieczne jest użycie kręgowców o złożonym układzie nerwowym, dla których dostępne są wyspecjalizowane testy behawioralne. Pomimo, iż znane są już duże modele zwierzęce HD jak makaki, świnie czy owce, w pierwszym etapie planujemy zastosować model mysz. W odniesieniu do obecnego stanu wiedzy i hipotezy przedstawionego projektu stwierdzamy, iż nie jest możliwe zastąpienie modelu gryzoni innym. Dane literaturowe wskazują, że myszy laboratoryjne są najczęściej wykorzystywanym obiektem do testowania strategii terapeutycznych w chorobie Huntingtona.

OGRANICZENIE: Wykorzystanie modelu YAC128 w projekcie jest podyktowane dużą wiedzą na temat przebiegu choroby Huntingtona w tym modelu zwierzęcym. Był on stosowany w wielu

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

eksperymentach, w tym podczas opracowywania podejść terapeutycznych z wykorzystaniem wektorów AAV i technologii RNAi. Bogate doświadczenie eksperymentatorów w pracy z tymi zwierzętami zostało wykorzystane do optymalizacji czasów analizy i dawek, co wpłynęło na zminimalizowanie grup osobników.

Planując eksperyment dążono do zmniejszenia do niezbędnego minimum liczby zwierząt użytych w projekcie. Proponowane grupy badane oraz dobrze przemyślane grupy kontrolne zostały zaplanowane tak, by jak najbardziej ograniczyć dodatkowe użycie zwierząt typu WT stanowiących często stosowane grupy kontrolne. Liczba zwierząt na grupę została określona na podstawie dostępnego piśmiennictwa oraz bazując na doświadczeniu zdobytym podczas charakterystyki innego modelu mysiego, tak by można było przeprowadzić racjonalne analizy statystyczne. Zwierzęta wykorzystane w analizach behawioralnych będą jednocześnie analizowane w testach molekularnych.

UDOSKONALENIE: Spełniając zasadę udoskonalenia, nasze doświadczenia zostały zaplanowane tak, by maksymalnie ograniczyć dyskomfort zwierząt. Podczas realizacji zaplanowanych procedur myszy będą utrzymywane w warunkach laboratoryjnych odpowiednich dla tego gatunku. W klatkach zastosowane zostaną elementy wzbogacające środowisko bytowania jak: papierowe tulejki, materiał do gniazdowania i zgryzania. Zastosowanie tego typu urozmaiceń środowiska poszerzy zakres czynności, jakie mogą wykonywać zwierzęta redukując stres. Jako zespół posiadamy już doświadczenie oraz zaawansowany warsztat badawczy, który został opracowany podczas charakterystyki innego mysiego modelu choroby neurodegeneracyjnej, wygenerowanego w Zakładzie. Czynności w procedurach zostały zaplanowane tak, aby zmniejszały do minimum lub eliminowały ból, cierpienie oraz dystres. Były one także z powodzeniem stosowane u myszy laboratoryjnych wykorzystywanych w tego typu analizach przez inne zespoły badawcze. Planowane w projekcie testy behawioralno-motoryczne, zabiegi oraz ogólne obserwacje zwierząt wyszczególnione w czynnościach 1-4 we wszystkich procedurach, stanowią dobrze scharakteryzowane, jak również łatwo wykonywalne czynności w pracy ze zwierzętami. Posiadane doświadczenie członków zespołu badawczego, umożliwi przeprowadzenie wymienionych czynności sprawnie i szybko, przez co zwierzęta objęte procedurami nie będą narażone na stres czy ból. Najnowocześniejsze aparaty do testów behawioralnych zapewnią uzyskanie dużej ilości danych, pozwalających na uzyskanie wartościowych wyników badań. Wykorzystanie wektora AAV eliminuje konieczność wielokrotnego podawania syntetycznych cząsteczek terapeutycznych, co znacznie redukuje dystres zwierząt.

Dodatkowo, wykorzystanie łagodnego modelu HD YAC128 wprowadza kolejny element udoskonalenia, czyli redukcję wykorzystywania zwierząt z dotkliwym fenotypem, takich jak: R6/2 oraz N171-82Q. Podczas iniekcji mysz zostanie pozbawiona sierści za pomocą kremu depilującego lub golarki, a nie ostrza skalpela czy brzytwy. Rana zostanie zaszyta nićmi rozpuszczalnymi. Na ranę zostanie nałożony antybiotyk, by nie wdało się żadne zakażenie. Mysz będzie przebywać na macie grzewczej, by zapobiec hipotermii i będzie kontrolowana temperatura za pomocą rektalnego termometru. W trakcie operacji na oczy zostanie nałożony lubrykant oraz podana zostanie analgezyja (w postaci niesterydowego leku przeciwzapalnego Meloxicam), by czas pooperacyjny był bezbolesny. Po wybudzeniu mysz będzie miała dostęp do jedzenia i picia na płytce na położonej na ściółce, by nie musiała wstawać oraz klatka umieszczona będzie na regale grzewczym.

Do testu otwartego pola wykorzystamy specjalistyczny system ActiMot, skracając czas eksperymentu i umożliwiając zebranie bardziej precyzyjnych danych, co z kolei wykluczy wielokrotne powtarzanie tego samego testu, by otrzymać statystycznie znaczące dane.

Do testu rotarod myszy będą uprzednio przyzwyczajane i trenowane, aczkolwiek w formie udoskonalenia protokół zostanie skrócony do trzech podejść po 3-6 minut. Zamiast testu Porsolta wprowadziliśmy do zakresu badań nowoczesny sprzęt oceny kognitywistycznej – IntelliCage. Zamierzamy nim przebadать nasze grupy badane z naciskiem na wartość porównawczą do grupy typu dzikiego. Ma to na celu opisanie obu modeli z nowej perspektywy behawioralnej, której do tej pory nikt nie opisał. IntelliCage jest dla myszy bezstresowy, gdyż jest to system typu „Home cage”. Umożliwi to odkrycie innych statystycznie różnych parametrów behawioralnych, które później można będzie używać jako biomarkera w ocenie efektywności terapii bądź jakiegokolwiek ingerencji w te modele.

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.