

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Szlaki sygnałowe receptora EBI2/oksysteroli w patofizjologii, terapii oraz diagnostyce stwardnienia rozsianego.**

2. Czas trwania projektu **01.04.2020-31.03.2024**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **EBI2, stwardnienie rozsiane, bariera krew-mózg**

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.

Projekt ma na celu zbadanie czy receptor EBI2 i ligand, który go aktywuje (oksysterol $7\alpha,25\text{HC}$) są wytwarzane przez komórki budujące naczynia krwionośne w mózgu. Zbadamy czy receptor bądź jego ligand są zaangażowane w przechodzenie komórek immunologicznych z krwi do mózgu. Nasze dotychczasowe badania pokazały, że receptor EBI2 występuje na powierzchni błony komórkowej komórek mózgowych (astrocytów), które również tworzą naczynia krwionośne w mózgu. Odkryliśmy również, że receptor EBI2 pełni ważną funkcję w obronie immunologicznej mózgu, przemieszczaniu się komórek, budowy mieliny i wielu innych. Co ważniejsze, badania zrobione przez nas i inne grupy badawcze sugerują, że receptor EBI2 oraz oksysterole są zaangażowane w procesy chorobowe stwardnienia rozsianego. Dla przykładu, w badaniach odkryto, że receptora EBI2 jest więcej w miejscach mózgu u osób ze stwardnieniem rozsianym, gdzie doszło do utraty osłonki tłuszczowej na neuronach. Inne badania pokazały, że więcej receptora występuje w limfocytach, które niszczą osłonkę tłuszczową w stwardnieniu rozsianym u pacjentów przyjmujących lek o nazwie natalizumab. Proponowane badania pozwolą nam dokładniej zbadać funkcjonowanie receptora EBI2 oraz oksysteroli w procesach chorobowych stwardnienia rozsianego. Potencjalne odkrycia z obecnego projektu są ważne ponieważ dostarczą nowych danych odnośnie roli receptora EBI2 w mózgu, w stwardnieniu rozsianym oraz potencjalnie przyczynią się do odkrycia nowych procesów chorobowych, markerów diagnostycznych oraz nowych terapii stwardnienia rozsianego.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu zostaną wykorzystane 36 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 36 dorosłe (3 miesięczne) myszy. Z tych 36 myszy, 12 będzie w grupie kontrolnej i będzie miało jednorazowo wstrzyknięty roztwór soli fizjologicznej. Pozostałe 24 myszy będą w grupie eksperymentalnej, w której lipopolisacharyd bakteryjny zostanie podany dootrzewnowo. Doświadczenie zostanie zakończone i myszy zostaną uśmiercone poprzez przedawkowanie izofluranu po 12 lub 24 godzinach po wstrzyknięciu lipopolisacharydu. Dwanaście myszy w każdej z grup jest minimalną liczbą zwierząt potrzebną do osiągnięcia celu obliczoną przy użyciu kalkulatora mocy testów na podstawie opublikowanych wyników badań in vitro na komórkach. Ilość doświadczeń z użyciem zwierząt została również ograniczona do niezbędnego minimum poprzez zaplanowanie analizy biochemicznej w taki sposób, by każdy pobrany mózg został użyty do jak największej ilości oznaczeń białek (pro-zapalnych cytokin, ilości receptora EBI2, ilości enzymów i oksysteroli). Innymi słowy, by cała pozyskana tkanka była wykorzystana do osiągnięcia celów badania bez konieczności powtarzania.

Zastąpienie: Zwierzęta, myszy C57BL/6, o najniższym możliwym poziomie rozwoju zostały wybrane do przeprowadzenia tego doświadczenia. Myszy te zostały wybrane ze względu na wysoką reaktywność immunologiczną w porównaniu z innymi szczepami. Szczep ten jest również wykorzystywany do badań nad układem nerwowym w szczególności w modelach zwierzęcych stwardnienia. Doświadczenie to bazuje na badaniach in vitro na komórkach mózgowych pozyskanych z myszy z tego szczepu. Kontynuacja badań w warunkach in vivo z użyciem tego samego szczepu myszy ma więc uzasadnienie merytoryczne i nie zakłuci interpretacji wyników. Z naszych i innych opublikowanych badań in vitro na komórkach wynika, że lipopolisacharyd powoduje silną indukcję mRNA enzymów biorących udział w syntezie ligandu receptora EBI2. Kolejnym krokiem jest zbadanie

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

in vivo czy lipopolisacharyd powoduje indukcję tych enzymów i receptora bezpośrednio w barierze krew-mózg i to doświadczenie ma na celu odpowiedzenie na to pytanie. Po zapoznaniu się z literaturą światową w tym temacie i zastosowaniu frazy „EBI2” w bazie badań naukowych pubmed.com nie znaleźliśmy informacji o badaniach, które zajmowały się mierzeniem ekspresji receptora EBI2 oraz enzymów syntetyzujących ligand receptora w barierze krew-mózg w normalnych i zapalnych warunkach.

Ponadto, ilość doświadczeń/procedur na zwierzętach w tym projekcie została zredukowana do jednego dzięki zastąpieniu doświadczeń na zwierzętach metodami alternatywnymi, czyli użyciem tkanki ludzkiej. Do większości badań w tym projekcie zostanie pozyskana ludzka tkanka mózgowa oraz próby krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego. Jedynym doświadczeniem, którego nie można zastąpić tkanką ludzką jest indukcja stanu zapalnego i właśnie do tego celu zostaną wykorzystane myszy.

Udoskonalenie: Zwierzęta będą miały zapewniony najwyższy standard warunków utrzymania. Tylko przeszkolony i doświadczony personel z renomowanego ośrodka Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej (TAZD) będzie miał dostęp do zwierząt i wykona procedurę i uśmiercenia zwierząt. Wybrana metoda do tego doświadczenia, czyli podanie dootrzewnowe lipopolisacharydu bakteryjnego jest procedurą o umiarkowanej dotkliwości, która umożliwia indukcję stanu zapalnego, zbliżoną do stanu zapalnego występującego przy infekcji bakteryjnej. By złagodzić dotkliwość procedury, doświadczenie zostanie zakończone po najkrótszym czasie od wystąpienia stanu zapalnego mającego wpływ na barierę krew-mózg, czyli po 12 oraz po 24 godzinach od podania lipopolisacharydu. 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.