

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu:

Ocena wpływu działania kinazy sfingozyny typu 1 oraz 2 na farmakologiczną mobilizację krwiotwórczych komórek macierzystych/progenitorowych.

2. Czas trwania projektu 25.06.2018-04.03.2019

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) krwiotwórcze komórki macierzyste, mobilizacja, sfingozyna 1-fosforan, kinaza sfingozyny.

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.

Sfingozyna-1 fosforan (S1P) to bioaktywny sfingolipid produkowany w przestrzeni międzykomórkowej w procesie katalizowanym przez kinazę sfingozyny (SphK). Scharakteryzowano dwie izoformy kinazy sfingozyny: typu 1 (SphK1) i typu 2 (SphK2). Pomimo wysokiego podobieństwa w sekwencji aminokwasowej tych dwóch izoform, pochodzą one z dwóch odrębnych genów, posiadają różne drogi powstawania, tkankowo specyficzną ekspresję oraz lokalizację w obrębie komórki, a także różne właściwości kinetyczne. Wykazano, że wśród bioaktywnych lipidów, S1P, razem z ceramido-1 fosforanem odgrywają istotną rolę w retencji limfocytów oraz jak odkryto niedawno, również krwiotwórczych komórek macierzystych/progenitorowych (KKM/P). Nasz zespół wykazał, że myszy z niedoborem kinazy sfingozyny typu 1 (SphK1-KO) charakteryzują się upośledzeniem we wszczepieniu i zasiedleniu niszy szpikowych przez KKM/P pochodzące z myszy typu dzikiego (WT). Doświadczenia te wskazują na ważną rolę S1P w tych procesach. Co ciekawe, badania myszy z niedoborem kinazy sfingozyny typu 2 (SphK2-KO) wykazały znacznie wyższy poziom S1P w krwi obwodowej w porównaniu do myszy kontrolnych. Z drugiej jednak

strony podanie inhibitora SphK1 dynamicznie obniża poziom endogennej S1P we krwi myszy. Uwzględniając wszystkie te informacje, wysnuto hipotezę, że wpływ SphK1 i 2 na regulację poziomu S1P we krwi obwodowej jest różny, a przez to odmiennie będą one wpływały na zjawisko mobilizacji KKM/P czyli wyjścia tych komórek z niszy szpikowej do krwi obwodowej.

Dlatego celem obecnego projektu jest porównanie farmakologicznej mobilizacji KKM/P u myszy z niedoborem SphK1 oraz SphK2. Uzyskane wyniki mogą rozszerzyć wiedzę na temat retencji tych komórek w mikrośrodku szpiku komórkowego oraz stanowić bazę dla dalszych, bardziej szczegółowych eksperymentów.

Lepsza znajomość czynników (np. S1P) i zjawisk związanych z migracją KKM/P ze szpiku do krwi obwodowej po podaniu czynników mobilizujących, ma kluczowe znaczenie w optymalizacji wyników klinicznych związanych z terapiami opartymi na KKM/P, wykorzystywanymi w walce z wieloma chorobami hematologicznymi.

Doświadczenia zostaną przeprowadzone na myszach typu knock-out z defektem kinazy sfingozyny typu 1 (SphK1-KO) i 2 (SphK2-KO) oraz myszy WT - grupa kontrolna.

Zostanie dokonane oznaczenie parametrów hematologicznych myszy w stanie fizjologicznym. W 2 etapie badań zostanie zaindukowana mobilizacja KKM/P u zwierząt doświadczalnych za pomocą czynnikiem stymulującym tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF) lub antagonistą CXCR4 (AMD3100). Po ich wstrzyknięciu, zostanie pobrana krew z żyły głównej do analizy hematologicznej, cytometrycznej oraz testów klonogennych.

Powyższy opis obejmuje badania biologiczne o charakterze podstawowym obejmujące zagadnienia hematologiczne. Wzorując się na dostępnej literaturze oraz własnym doświadczeniu, organizm zwierząt nie reaguje negatywnie na wykorzystane w badaniu środki farmakologiczne, uniedogodnieniem będą natomiast drogi podawania środków – podskórnie i dootrzewnowe wstrzyknięcia.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu zaplanowano wykorzystanie zwierząt z gatunku *Mus musculus* w liczbie 72:

1. Szczep: C57BL/6J – 24 szt.
2. Szczep: B6N.129S6-Sphk1^{tm1Rlp}/J – 24szt.
3. Szczep: B6N.129S6-Sphk2^{tm1Rlp}/J – 24szt.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy sprawdzono obecny stan wiedzy na temat realizowany w przedstawionym doświadczeniu w następujących bazach danych: Google Scholar, PUBMED, ScienceDirect, Web of Science, wykorzystując słowa kluczowe: hematopoietic stem/progenitor cells, mobilization, G-CSF mobilization, AMD3100 mobilization, stem cell trafficking, sphingosine kinase knock-out mice.

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

Plan przedłożonego doświadczenia obejmuje zagadnienia związane z rozwojem wiedzy na temat bioaktywnego lipidu jakim jest sfingozyno-1 fosforan. Jego chemotaktyczne właściwości, zostały scharakteryzowane przez nasz zespół, a obecny projekt ma na celu poszerzenie wiedzy w tym zakresie. Doświadczenia przeprowadzone do tej pory wykazały odmienny wpływ SphK1 i SphK2 na poziom S1P we krwi obwodowej. Zaobserwowano także wpływ S1P na wszczepienie i zasiedlania KKM/P w organizmie.

Zastąpienie

Model zwierzęcy szczepów myszy SphK1 oraz SphK2 został wybrany do zaplanowanego doświadczenia ze względu na swoją użyteczność w badaniach związanych ze sfingozyno 1-fosforanem. Na etapie badań podstawowych jest to najlepszy materiał do badań in vivo. Z uwagi na złożoność układu krwiotwórczego, szeregu zjawisk oraz ilości czynników mających wpływ na farmakologiczną mobilizację KKM/P z niszy szpikowej do krwi obwodowej, niemożliwe jest przy obecnej wiedzy i technologii przeprowadzenie analizy metodami in vitro, z udziałem linii komórkowych, hodowli tkankowych lub in vivo przy pomocy zwierząt bezkręgowych.

Ograniczenie

Korzystając z narzędzi pozwalających oszacować liczebność grupy w doświadczeniu planowane jest zbadanie łącznie 72 osobników uwzględniając przy tym dwukrotne powtórzenie eksperymentu (wymóg statystyczny) w celu wykluczenia możliwości błędu lub przypadkowego (losowego) otrzymania wyników. Jest to najmniejsza liczba zwierząt jaką możemy użyć celem prawidłowego przeprowadzenia doświadczenia.

Udoskonalenie

W celu zapewnienia jak najwyższego dobrostanu zwierząt, wykonanie doświadczenia oraz opieka nad nimi zostanie zapewniona przez personel mający duże doświadczenie w pracy ze zwierzętami. Zastosowane indywidualnie wentylowane klatki o powierzchni ~500cm² zapewniają komfort przestrzenny zwierzętom.

Nasz zespół posiada znaczne doświadczenie w pracy ze zwierzętami, włączając w to szczep myszy SphK1-KO oraz SphK2-KO, a wszystkie procedury zostały zaplanowane na podstawie uzyskanej przez nas dotychczas wiedzy wyniesionej z eksperymentów przeprowadzonych z przeszłości tak, aby ryzyko niepowodzenia i konieczności powtarzania wnioskowanego doświadczenia zostało zminimalizowane. W trakcie uśmiercania zwierząt zostanie wykorzystana ksylazyna/ketamina, aby jak najbardziej zredukować stres i ból myszy.

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.