

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „**Wpływ BBR i TMS na komórki macierzyste różnych populacji i ich potencjał regeneracyjny**”

2. Czas trwania projektu **2 lata: 01.04.2019-01.04.2021**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **BBR, TMS, bromodeoksyurydyna, komórki macierzyste**

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

Ostatnio opublikowane dane świadczą, że mysie dorosłe tkanki zawierają populację rozwojowo wczesnych, tak zwanych bardzo małych podobnych do embrionalnych komórek macierzystych VSELs (ang. *Very Small Embryonic Like Stem Cells*). Ponieważ jest to bardzo nieliczna populacja, cały czas trwają poszukiwania nad czynnikami pod wpływem których dojdzie do ich namnażania. Wstępne dane wskazują m.in., że populacja mysich szpikowych komórek VSELs może namnażać się w odpowiedzi na działanie niektórych hormonów płciowych (Mierzejewska et al., 2015).

W tym wniosku uwagę skupia się na roli dwóch związków: Berberine (BBR) i (Z)3,4,5,4'-transtetramethoxystilbene (TMS) w krwiotwórczym różnicowaniu komórek VSELs. TMS jest analogiem resveratrolu. Ostatnie doniesienia wskazują, że resveratrol, który jest naturalną substancją występującą m.in. w dużej ilości w skórce winogron, ma wpływ na wydłużenie długości życia u myszy na wysokokalorycznej diecie. Ponieważ długowieczność jest wiązana ze wzrostem liczby krążących we krwi komórek VSELs, TMS jako efektywny odpowiednik/analog resveratrolu jest dobrym kandydatem na sprawdzenie jego wpływu na ekspansję komórek macierzystych. BBR natomiast, ma podobne działanie do metforminy, która jak wykazaliśmy bezpośrednio stymuluje ekspansję komórek macierzystych w szpiku kostnym. Dlatego też, tak ważne jest dla nas

wykonanie badań oceniających wpływ związków BBR i TMS na komórki macierzyste i ich zdolności do różnicowania.

Procedury zostaną wykonane z wykorzystaniem 30 osobników płci żeńskiej myszy szczepu C57BL/6. Pobrany materiał - szpik kostny oraz krew obwodowa, posłuży do zbadania potencjalnego wpływu BBR i TMS na ekspansję komórek macierzystych oraz potencjał klonogeny komórek jednojądrzastych szpiku kostnego i krwi obwodowej. Dodatkowo, podanie myszom bromodeoksyurydyny pozwoli ocenić potencjał proliferacyjny populacji komórek macierzystych myszy mobilizowanych w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo pobrane zostaną jajniki od zwierząt, aby dokonać oceny histologicznej tkanek, natomiast z komórek uzyskanych z krwi obwodowej oraz szpiku kostnego wysiane zostaną testy klonogenne, których celem jest sprawdzenie potencjału proliferacyjnego komórek *in vitro*.

W ostatnim etapie doświadczenia zwierzęta będą poddawane eutanazji. Uśmiercenie zwierząt zostanie przeprowadzone w wyniku dyslokacji kręgów szyjnych, przez specjalnie do tego celu przeszkoloną osobę.

Wierzimy, że uzyskane wyniki poszerzą istniejącą wiedzę dotyczącą wpływu BBR i TMS na ekspansję oraz różnicowanie komórek macierzystych.

Planowane badania należą do badań podstawowych, zaliczane są do kategorii łagodnych. Zwierzęta uczestniczące w badaniu mogą być narażone na krótkotrwały, umiarkowany ból i dystres. W miejscu wstrzyknięcia danej substancji może (lecz nie powinien) pojawić się obrzęk.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa (*Mus musculus*) C57BL/6 - 30 osobników (samice)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PubMed, Web of Science, EBSCO. Do tego celu wykorzystano słowa kluczowe: BBR, TMS, metformina, komórki macierzyste, długowieczność.

Na podstawie literatury odszukanej w bazach danych stwierdziłam, że badane substancje: BBR i TMS mogą pozytywnie wpływać na mobilizację różnych populacji komórek macierzystych a także potencjał regeneracyjny, co uzasadnia ich wykorzystanie w tym doświadczeniu.

W trakcie przygotowania doświadczenia zastosowano się do zasad 3R (Replacement, Reduction, Refinement).

Replacement (zastąpienie/zastępowanie):

Populacja komórek VSELs (komórek o właściwościach pluripotencjalnych) została wykryta zarówno u ludzi jak i u myszy. Komórki te posiadają uśpioną naturę i nie został do tej pory stworzony model namnażania ich *in vitro*. Z tego też powodu nie istnieje ustalona linia komórkowa dzięki której można byłoby przeprowadzić testy z wykorzystaniem proponowanych w projekcie czynników (BBR, TMS). W związku z tym zaplanowano ocenę wpływu BBR i TMS na mobilizację/ekspansję populacji komórek VSELs oraz innych populacji komórek macierzystych w modelu mysim *in vivo*, który z powodzeniem był wykorzystywany we wcześniejszych pracach

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

naszego zespołu. Przeprowadzając badania *in vivo* będziemy mogli wytypować najbardziej obiecujące czynniki aby, zastąpić badaniami *in vitro*, część doświadczeń *in vivo*, aby w przyszłości ograniczyć również liczbę zwierząt użytych w doświadczeniu, niż pierwotnie zaplanowana.

Reduction (zmniejszenie/ograniczenie):

Do określenia liczebności próby wykorzystałam narzędzie multimedialne ze strony: www.biomath.info. pozwalające wyliczyć niezbędną, najmniejszą liczbą osobników przy największym prawdopodobieństwie uzyskania wiarygodnych wyników. Użycie mniejszej liczby zwierząt mogłyby spowodować niepowodzenie całego doświadczenia i konieczność jego powtórzenia. Liczbę zwierząt w grupie ograniczono do ilości niezbędnej do uzyskania wiarygodnych wyników z uwzględnieniem zmienności osobniczej oraz zróżnicowania oznaczanych parametrów - zaplanowano minimalną liczbę zwierząt, która umożliwi analizę statystyczną.

Refinement (udoskonalenie):

Zgodnie z zasadą udoskonalenia, staramy się, aby zredukować stres i ból u zwierząt. Iniekcje będą robione tylko wtedy, gdy będzie to konieczne (BrdU, BBR i TMS) – są ograniczone do minimum. W przypadku stwierdzenia nietypowego zachowania, podejrzenia odczuwania bólu lub cierpienia po konsultacji z lekarzem weterynarii niezwłocznie zastosowane zostaną odpowiednie środki farmakologiczne (Butorfanol).

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.