

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Wpływ indukowanego hipoksja czynnika Hif-1 alfa oraz czynnika transkrypcyjnego Foxn1 na ukierunkowanie procesu gojenia urazów skóry (regeneracyjny vs reparacyjny).

2. Czas trwania projektu od 15 października 2018 do 15 października 2022.

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): skóra, gojenie ran, blizna, regeneracja, czynnik Foxn1.

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.

Zraniona skóra dorosłych ssaków goi się w procesie naprawczym (reparacyjnym), którego efektem jest wytworzenie blizny. Fenomenem w świecie dorosłych ssaków jest szczególny szczep myszy tzw. myszy nagie (pozbawione czynnika transkrypcyjnego Foxn1), których urazy skóry podlegają procesowi regeneracji (gojenie bezbliznowe). Jednakże przyczyny tych różnic jak i mechanizmy leżące u ich podstaw w dalszym ciągu pozostają nieznane. Nasze badania wskazują, że czynnik Foxn1 jest podstawowym elementem odpowiedzialnym za wytworzenie blizny a jego aktywność regulowana jest obniżoną dostępnością tlenu (hipoksja), kluczowym elementem środowiskowym kontrolującym proces gojenia ran. Prezentowany projekt zakłada, iż indukowany hipoksja czynnik Hif-1 α poprzez

współdziałanie z czynnikiem transkrypcyjnym Foxn1 przekierowuje proces gojenia regeneracyjnego (bezbliźnowego) na gojenie naprawcze (bliźnowe). Proponowany projekt jest unikatowy a osiągnięte wyniki mogą umożliwić ukierunkowaną ingerencję w proces gojenia. Uzyskane wyniki na modelu mysim będą podstawą do analiz w tkankach ludzkich ponieważ Foxn1 wykazuje tę samą lokalizację u obu gatunków. Model badawczy będą stanowiły: myszy nagie (gojenie bezbliźnowe) i myszy kontrolne (gojenie bliźnowe). W projekcie planujemy wytworzenie ran, które odbędzie się poprzez wycięcia (4x4mm średnicy) skóry grzbietu oraz wprowadzenia do obszaru pourazowego wektora lentiwirusowego zawierający czynnik Hif-1 α i/lub Foxn1 w postaci iniekcji śródskórnych. Jednorazowa dootrzewnowa iniekcja 5-bromo-2-deoksyurydyny (BrdU) zostanie zastosowana w celu wykazania różnic w procesach migracji i proliferacji komórek w zranionej skórze. Wszystkie procedury będą przeprowadzone pod całkowitą narkozą. Tkanki pourazowe będą zbierane post mortem w dniach 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21 i 36. Z naszych doświadczeń wynika, że myszy dobrze reagują na wziewne podanie izofluoru a rany pooperacyjne goją się bez komplikacji.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Zmiana liczby zwierząt wymaganych w zadaniu badawczym nr. 1 z liczby 114 sztuk (w tym 57 Cby.Cg-Fox1^{+/+}/cmdb i 57 BALB/c^{+/+}/cmdb) do **162** sztuk (w tym **n=81 Cby.Cg-Fox1^{+/+}/cmdb** i **n=81 BALB/c^{+/+}/cmdb**) sztuk.

Zwiększenie liczby zwierząt o **48** w tym: **24 sztuk Cby.Cg-Fox1^{+/+}/cmdb**; i o **24 sztuk BALB/c^{+/+}/cmdb**.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Zasada zastąpienia – przeprowadzone i opublikowane badania wykazały, iż szczep myszy nagich wykazuje unikatowe w świecie dorosłych ssaków zdolności regeneracyjne skóry i jest jedynym modelem umożliwiającym zbadanie tego procesu jak również mechanizmów leżących u jego podstaw. W ramach badań wstępnych na komórkach (*in vitro*) wykazaliśmy, że czynnik Foxn1 jest stymulowany hipoksją, a wprowadzony do komórek skóry (keratynocyty) zmienia ich charakterystykę. Opierając się

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

na wstępnej selekcji *in vitro* do badań *in vivo* (z wykorzystaniem zwierząt) zostaną wybrane odpowiednie dawki i skuteczne wektory. Pomimo tego, że analizy *in vitro* są bardzo pomocne i informatywne nie odwzorują one złożoności procesów zachodzących w organizmie żywym (gojenia urazów skóry). Dodatkowym argumentem przemawiający za przeprowadzeniem zaplanowanych badań na modelu *in vivo* jest unikalny model regeneracyjnego gojenia urazów skóry myszy nagich.

Zasada ograniczenia – Analiza uzyskanych wyników w trakcie przeprowadzonego zadania badawczego nr.1 wykazała potrzebę rozszerzenia badań o dodatkowy punkt pobrania tkanek skórnych - pourazowy dzień 36, o 12 myszy w tym: 6 myszy regeneracyjnych (Cby.Cg-Fox1<nu>/cmdb) i 6 myszy nieregeneracyjnych (BALB/ccmdb). Analiza tkanek z dnia 36 pozwoli na wykazanie różnic w procesie gojenia pomiędzy szczepem regeneracyjnym a reparacyjnym w trakcie późnej fazy gojenia (remodelingu). Ponadto, wyniki badań pilotażowych wskazały na potrzebę rozszerzenia analiz z zastosowaniem znacznika BrdU o dodatkowe dni pourazowe:

Dzień 1 (6 sztuk Cby.Cg-Fox1<nu>/cmdb + 6 sztuk BALB/ccmdb) i

Dzień 2 (6 sztuk Cby.Cg-Fox1<nu>/cmdb + 6 sztuk BALB/ccmdb)

oraz użycie kontrolnych myszy (6 sztuki Cby.Cg-Fox1<nu>/cmdb + 6 sztuki BALB/ccmdb).

Wstępne wyniki analiz tkanek po iniekcji BrdU wykazały, iż różnice w procesie gojenia pomiędzy szczepem regeneracyjnym a reparacyjnym mogą dotyczyć bardzo wczesnej fazy naskórkowania (pourazowy dzień 1 (dodatkowe 12) i 2 (dodatkowe 12). Wskazały również na potrzebę użycia dodatkowej grupy kontrolnej (6 sztuk Cby.Cg-Fox1<nu>/cmdb + 6 sztuk BALB/ccmdb), która nie będzie raniona a otrzyma iniekcje BrdU aby wykazać różnice pomiędzy fizjologiczną odnową naskórka w procesie proliferacji a proliferacją spowodowaną stanem patologicznym, zranieniem.

Zasada doskonalenia – Zwierzęta będą przetrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich bytowania (rodzaj klatek dla myszy o obniżonej odporności – myszy nagie). Procedury: ranienia, iniekcji śródskórnej wektorów oraz iniekcji dootrzewnowych zostaną przeprowadzone w anestezji zgodnie z zasadami sztuki lekarskiej z zastosowaniem środków przeciwbólowych po zabiegu. Wszelkie czynności związane z anestezją, ranieniem i humanitarnym uśmiercaniem będą wykonywane zgodnie z przyjętymi zasadami obowiązującej Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE, przez odpowiednio przeszkolony personel z długoletnim stażem pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi.

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.