

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „**Zbadanie charakteru pluripotencjalnego mysich komórek iPS *in vivo***”
2. Czas trwania projektu: 1.04.2017r. - 1.04.2018r.
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): *Induced pluripotent stem cells, NOD/SCID mice, teratoma assay*
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

Głównym celem planowanego doświadczenia jest weryfikacja charakteru pluripotencjalnego mysich komórek iPS (z ang. *induced pluripotent stem cells*). Z hodowli komórek iPS uzyskanych w laboratorium izolowane są pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs, ang. *extracellular vesicles*), czyli kuliste struktury, w których fragment cytoplazmy otoczony jest błoną komórkową. Skład molekularny EVs (zawartość m.in. białek, miRNA i mRNA) jest ściśle zależny od komórek, z których są one uwalniane, dlatego EVs z komórek iPS mogą stanowić szczególnie atrakcyjny z punktu widzenia medycyny regeneracyjnej przedmiot badań.

W celu prowadzenia badań nad EVs pozyskanymi z komórek iPS, niezbędne jest namnażanie tych komórek w warunkach bezsurowiczych oraz bez obecności warstwy komórek odżywczych (tzw. warunki *serum-free, feeder-free*), czyli w warunkach zmodyfikowanych względem procedur standardowych. Uzyskane w w/w hodowli komórki iPS zostały już szczegółowo scharakteryzowane w warunkach *in vitro*. Aby ostatecznie potwierdzić pluripotencję komórek iPS konieczne jest przeprowadzenie testu tworzenia potworniaka (teratomy) *in vivo*, który jest ogólnie przyjętym

funkcjonalnym testem oceny pluripotencjalności komórek iPS.

W ramach doświadczenia planowana jest podskórna iniekcja uprzednio namnożonych w hodowli *in vitro* mysich komórek iPS do myszy szczepu NOD/SCID. Po upływie 14 tygodni od podania myszom komórek iPS lub w przypadku, gdy dłuższa oś guza osiągnie 12 mm, myszy zostaną uśmiercone, a wyizolowane guzy poddane analizie histopatologicznej.

Podobne doświadczenie zostało już poprzednio wykonane, zgodnie z Uchwałą nr 24/2017 z dnia 19-01-2017. W związku ze wzrostem nowotworów złośliwych u myszy i brakiem rozwoju potworniaka, Wnioskodawca zamierza powtórzyć eksperyment zmniejszając liczbę wszczepianych do myszy komórek.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa (*Mus musculus*), szczep NOD/SCID; 10 myszy (samce i samice)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Przygotowując projekt badawczy, sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED; ScienceDirect i Web of Science (JCR). Wykorzystano słowa kluczowe: *Induced pluripotent stem cells/ NOD/SCID mice/ teratoma assay*

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzono, że test tworzenia potworniaka (teratomy) *in vivo* u myszy NOD/SCID jest ogólnie przyjętym funkcjonalnym testem pluripotencjalności komórek iPS.

Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że do wiarygodnego potwierdzenia charakteru pluripotencjalnego komórek iPS konieczne jest przeprowadzenie szeregu testów, zarówno tych *in vitro* np. kontrolowanego różnicowania w komórki każdego z trzech listków zarodkowych, jak i *in vivo*, jak test tworzenia potworniaka.

Uzyskanie danych z proponowanego doświadczenia pozwoli na potwierdzenie pluripotencji komórek iPS i kontynuowanie nowatorskich projektów badawczych z ich wykorzystaniem, w tym projektu obejmującego izolację pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) z nadsączy hodowlanych i zbadanie ich roli w regeneracji tkanek uszkodzonych w wyniku niedotlenienia (np. tkanki sercowej).

W planowanym doświadczeniu uwzględniono następujące zasady:

Zastąpienia: Osiągnięcie planowanego celu naukowego jest niemożliwe bez wykorzystania zwierząt laboratoryjnych, a eksperyment został zaprojektowany zgodnie z przyjętymi standardami zweryfikowanymi na podstawie danych literaturowych.

Ograniczenia: Liczba zwierząt wykorzystywanych w eksperymencie została ograniczona do minimum niezbędnego dla osiągnięcia planowanego celu naukowego. Ograniczono utratę zwierząt poprzez zaplanowanie zbadania podawanych myszom komórek pod kątem obecności *Mycoplasma* sp., wybranie odpowiedniej objętości i drogi podania komórek i zastosowanie nie wywołującego podrażnień tkankowych buforu do zawieszenia komórek. W celu ograniczenia liczby zwierząt odstąpiono także od wprowadzenia dodatkowej grupy myszy przeszczepianych jedynie roztworem soli PBS (nośnikiem komórek), co nie jest niezbędne w celu właściwej interpretacji wyników doświadczenia.

Udoskonalenia: Przebieg eksperymentu, w tym warunki utrzymania zwierząt oraz planowane procedury i metody badawcze zostały tak zaplanowane, aby ograniczyć cierpienie i dystres zwierząt. Myszy będą utrzymywane w pomieszczeniach i klatkach minimalizujących ryzyko infekcji i zapewniających optymalne warunki temperatury oraz wilgotności. Zwierzęta zostaną poddane procedurze łagodnej i zostaną uśmiercone w sposób humanitarny z zastosowaniem odpowiednich środków farmakologicznych.