

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „**Ocena skuteczności opatrunku hydrożelowego zawierającego białka wydzielnicze z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych na proces gojenia ran na modelu myszy**”

2. Czas trwania projektu19.06.2019-31.12.2019.....

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów)mezenchymalne komórki macierzyste MSC, in vivo model gojenia ran, medium kondycjonowane

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.

Głównym celem projektu jest opracowanie opatrunku hydrożelowego zawierającego mieszaninę białek (głównie czynniki wzrostu oraz cytokiny) produkowaną przez ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (atMSC). Badania obejmują utworzenie linii komórkowej atMSC, a następnie charakterystykę fenotypu i profilu wydzielniczego powstałej linii. Kolejnym etapem jest charakterystyka aktywności biologicznej wyizolowanych czynników in vitro przy użyciu komórek zaangażowanych w procesie gojenia się rany, takich jak komórki śródbłonna naczyń, fibroblasty i keratynocyty, zarówno przed jak i po inkorporacji czynników aktywnych do biomateriału. Ostatni etap projektu obejmuje badania mające na celu wstępną ocenę aktywności opracowywanego opatrunku w warunkach in vivo w mysim modelu trudno gojących ran.

Aktywność regeneracyjna supernatantów zawierających czynniki bioaktywne z otrzymanych linii komórkowych atMSC została szczegółowo potwierdzona w modelu trudno gojącej rany in vitro, gdzie zaobserwowano kilkukrotne zwiększenie żywotności komórek śródbłónka naczyń, fibroblastów i keratynocytów w odniesieniu do kontroli (komórki hodowane w medium bez serum przy jednoczesnym zredukowaniu stężenia O₂ do 1%). Ponadto, proangiogenenny potencjał supernatantów został również potwierdzony in vitro, gdzie dodatek supernatantów stymulował tworzenie pseudonaczyń na Matrigelu przez ludzkie komórki śródbłónka.

Czynniki bioaktywne produkowane przez atMSC zostały wyizolowane z supernatantów przez 10-krotne zagęszczenie na kolumnach Amicon (3kDa) i umieszczone w żelu hialuronowym celem przeprowadzenia procedury in vivo. Aby zweryfikować potencjał regeneracyjny czynników bioaktywnych wydzielanych przez komórki atMSC in vivo posłużymy się modelem mysim trudno gojących się ran. Zaproponowany model trudno gojących się ran in vivo z wykorzystaniem modelu myszy diabetycznych został opisany w literaturze 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa szczepu NOD/ShiLtJ -30 sztuk

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: EBSCO; PUBMED; ScienceDirect; Web of Science (JCR).

Wykorzystano słowa kluczowe: human mesenchymal stem cells, MSC-conditioned medium, in vivo model of chronic wound, in vitro model of chronic wound

Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:

- białka wydzielane przez ludzkie komórki macierzyste (hMSC) wpływają korzystnie na proces mikrowaskularyzacji ran oraz proliferacji keratynocytów i fibroblastów [6, 7]
- istnieją przykłady testowania produktów białkowych wydzielanych przez ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste lub ludzkich rekombinowanych czynników wzrostu u myszy [4, 5, 8, 9]
- pierwotne komórki MSC wraz ze wzrostem pasażu tracą swoje właściwości parakryne [10], dlatego

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

zastosowanie stabilnej linii komórkowej do produkcji aktywnych białek może stanowić lepszą alternatywę

B. Brak jest danych dotyczących:

- wpływu białek wydzielanych przez hMSC na pobudzenie odpowiedzi immunologicznej Th2 związanej z zabliźnianiem ran

- wpływu białek z hMSC na pobudzenie ekspresji cząsteczek YM1, Relm- α , arginazy na makrofagach obecnych w skórze

- wpływu białek wydzielanych przez stabilną ludzką linię komórkową MSC na proces gojenia chronicznych ran in vivo

Planuje się wykorzystanie minimalnej liczby zwierząt potrzebnych do otrzymania założonej w projekcie siły wnioskowania statystycznego, przy założeniu niskiej zmienności międzyosobniczej w odpowiedzi na zastosowane bodźce. Doświadczenie będzie przeprowadzane z wykorzystaniem 10 osobników w grupie. Jest to według naszej wiedzy i w oparciu o dane literaturowe liczba minimalna, lecz wystarczająca do planowanego zadania [11]

Zastąpienie użycia modelu zwierzęcego poprzez stosowanie modeli in vitro w proponowanym projekcie jest niemożliwe przy obecnym stanie wiedzy. Proponowane doświadczenie zostało poprzedzone badaniami in vitro, których wyniki wskazują na korzystne pobudzenie aktywności proliferacyjnej komórek nabłonkowych eksponowanych białka wydzielane przez komórki macierzyste. Te wyniki muszą być jednak potwierdzone in vivo co do skuteczności.

W doświadczeniu zastosowano zasadę udoskonalenia poprzez monitorowanie poziomu glukozy u zwierząt przed procedurą, a także poprzez podawanie insuliny w trakcie procedury w celu ochrony zwierząt przed upadkami.

Myszy wykorzystywane do zaplanowanych doświadczeń utrzymywane będą w warunkach zapewniających dobrostan, zastosuje się elementy wzbogacające środowisko bytowania myszy, w szczególności klocki drewniane. Zaplanowane procedury zaprojektowano tak, by możliwie ograniczyć ból i cierpienie poprzez stosowanie leków przeciwbólowych przez dwa dni po wykonaniu biopsji skóry. W przypadku wystąpienia nieprzewidywalnych na tym etapie doświadczenia, niekorzystnych dla dobrostanu zwierząt konsekwencji wykonania ran skórnych (np. widocznych objawów zakażeń bakteryjnych ran, wydzieliny ropnej z miejsca uszkodzenia skóry) lub w efekcie zastosowania żelu hialuronowego zawierającego lub nie zawierającego substancji bioaktywnych, doświadczenie będzie przerwane, a myszy poddane eutanazji.

Bibliografia:

4. Obara K, Ishihara M, Fujita M, Kanatani Y, Hattori H, Matsui T, Takase B, Ozeki Y, Nakamura S, Ishizuka T, Tominaga S, Hiroi S, Kawai T, Maehara T. Acceleration of wound healing in healing-impaired db/db mice with a photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2. *Wound Repair Regen.* 2005;13:390-7.

5. Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, Park BS, Sung JH. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen.* 2009;17:540-7.

6. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res.* 2010;316:1271-81.

7. Kober J, Gugerell A, Schmid M, Zeyda M, Buchberger E, Nickl S, Hacker S, Ankersmit HJ, Keck M. Wound Healing Effect of

Conditioned Media Obtained From Adipose Tissue on Human Skin Cells: A Comparative in Vitro Study. *Ann Plast Surg.* 2016;77:156-63.

8. Park J, Lee JH, Yoon BS, Jun EK, Lee G, Kim IY, You S. Additive effect of bFGF and selenium on expansion and paracrine action of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9:293.
9. Yew TL, Hung YT, Li HY, Chen HW, Chen LL, Tsai KS, Chiou SH, Chao KC, Huang TF, Chen HL, Hung SC. Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38 MAPK activation. *Cell Transplant.* 2011;20:693-706.
10. Rachmawati Noverinaa WW, Wireni Ayuningtyasa, Dedy Kurniawana, Ervi Afifah, Dian Ratih Laksmiawati, Ratih Rinendyaputri, Rilianawati Rilianawati, Ahmad Faried, Indra Bachtar, Firman Fuad Wirakusumah. Growth factors profile in conditioned medium human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (CM-hATMSCs). *Clinical Nutrition Experimental.* 2019;24:34-44.
11. Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sample size determination. *ILAR J.* 2002;43:207-13.

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.