

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu - Rola oksygenazy hemowej-1 w różnicowaniu kardiomiocytów z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (HOx-Card)

2. Czas trwania projektu – 5 lat

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) HO-1, hiPSCs, pluripotencja

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.

Celem zgłaszanego projektu jest zbadanie roli oksygenazy hemowej-1 (HO-1), enzymu rozkładającego hem o właściwościach przeciwutleniających i przeciwzapalnych w różnicowaniu ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (hiPSCs, ang. Human induced pluripotent stem cells) do kardiomiocytów. W celu uzyskania ludzkich iPSC pozbawionych ekspresji badanego enzymu zostanie użyta metoda edytowania genomu CRISPR/Cas9 (ang. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Bardzo ważną częścią doświadczeń wykorzystujących komórki iPSCs jest ich dokładna charakterystyka, zwłaszcza potwierdzająca ich pluripotencję, czyli zdolność do różnicowania do wszystkich typów komórek dorosłego organizmu. Standardowym testem określającym taki potencjał jest test tworzenia potworniaków po podskórnym podaniu do myszy z upośledzonym układem immunologicznym. W zgłaszanym projekcie proponuje się zbadanie zdolności tworzenia

- potworniaków przez komórki hiPSCs: 1. Kontrolnych - HO-1+/+
2. Pozbawionych genu HO-1 - HO-1-/-
  3. hiPSCs HO-1-/- z przywróconą za pomocą wektorów lentiwirusowych ekspresją formy enzymatycznie aktywnej HO-1 - HO-1-/- + HO-1wt oraz form:
  4. Enzymatycznie nieaktywnej - HO-1-/- + HO-1inactivated
  5. Cytoplazmatycznej - HO-1-/- + HO-1cytoplasm
  6. Mitochondrialnej - HO-1-/- + HO-1mitochondrial
  7. Jądrowej - HO-1-/- + HO-1NLS
  8. Jąderkowej - HO-1-/- + HO-1nuclear
  9. Skróconej HO-1-/- + HO-1truncated
  10. Kontrola dla linii hiPSC transdukowanych - hiPSC HO-1-/- transdukowane plazmidem pLV bez wstawki HO-1-/- + pLVempty.

Komórki będą podawane podskórnie do grzbietu myszy NOD-SCID (pozbawionych limfocytów T, B oraz NK) – procedura 1, czynność 2.

Guzy pobrane po eutanazji (procedura 1, czynność 3) zostaną poddane analizie histologicznej w celu określenia czy występują w nich tkanki pochodzące ze wszystkich trzech listków zarodkowych.

Otrzymane wyniki mogą przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów regulujących proces różnicowania hiPSCs do kardiomiocytów.

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Ze względu na specyfikę proponowanego doświadczenia proponuje się użycie min. 5 myszy na każdą grupę w celu otrzymania miarodajnych wyników. Dodatkowo zakłada się przeprowadzenie doświadczenia na 3 różnych liniach hiPSC, co w sumie daje 150 myszy z upośledzonym układem immunologicznym (szczep NOD-SCID)

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

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

Wykorzystano słowa kluczowe:

Human induced pluripotent stem cells/teratoma formation assay/heme oxygenase-1/pluripotency

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzono, że test tworzenia potworniaków jest najlepszą dostępną metodą potwierdzania pluripotencjalnego fenotypu hiPSCs.

Zastosowanie 3R:

Replacement (zastąpienie): projekt koncentruje się na sprawdzeniu pluripotencjalnego fenotypu hiPSCs, które będą wykorzystywane do badania roli HO-1 w rozwoju ludzkich kardiomiocytów. Wymaga to przeprowadzenia badań na zwierzętach, gdyż test tworzenia potworniaków jest najbardziej dokładną metodą badania zdolności hiPSCs do różnicowania w komórki pochodzące z trzech listków zarodkowych. Wykonanie tego typu doświadczeń jest możliwe jedynie w układzie in vivo, ponieważ doświadczenia in vitro nie pozwalają na dokładne odtworzenie warunków umożliwiających formowanie się w pełni zróżnicowanych i strukturalnie zorganizowanych tkanek.

Reduction (ograniczenie): liczba zwierząt została ograniczona do minimalnej liczby potrzebnej do uzyskania statystycznie istotnych wyników;

Refinement (udoskonalenie): wykorzystywane zwierzęta są utrzymywane w warunkach SPF, w wentylowanych klatkach, a metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak, aby ograniczały do minimum albo eliminowały ból i cierpienie. Przenoszenie oraz czynności badawcze są prowadzone przez wyspecjalizowany personel. Opisane procedury tworzenia potworniaków są ogólnie przyjęte na świecie i jednocześnie pozwalają na rzetelne porównanie otrzymanych wyników opublikowanych przez różne jednostki badawcze.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☒ NIE

---

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.