

## NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Badanie mechanizmu naprawy uszkodzonej tkanki na modelu niedokrwiennej kończyny u myszy z wykorzystaniem ludzkich mezenchymalnych komórek zrębu pochodzenia tłuszczowego.

2. Czas trwania projektu: 2 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): komórki mezenchymalne, niedokrwienność kończyny, angiogeneza.

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.

Krytyczne niedokrwienie kończyn jest zaawansowanym stadium choroby tętnic obwodowych, w której dochodzi do zwężenia oraz niedrożności tętnic. U 25- 40% pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych występuje duże ryzyko amputacji kończyny. Jedną z metod leczenia tej choroby jest terapia wykorzystująca komórki, które wydzielają czynniki stymulujące powstawanie nowych naczyń krwionośnych m.in. mezenchymalne komórki zrębu izolowane z tkanki tłuszczowej (ADSC).

Celem przedstawionego projektu jest wyjaśnienie mechanizmu, naprawy uszkodzonego mięśnia myszy, powstałego w wyniku podwiązania tętnicy udowej, przy udziale ludzkich mezenchymalnych komórek zrębu pochodzenia tłuszczowego (hADSC).

Komórki hADSC wydzielają szereg cytokin i czynników wzrostu, posiadają właściwości immunoregulacyjne i proangiogenne. Dominującą cytokiną wydzielaną przez te komórki jest Interleukina 6 (IL-6). Uczestniczy ona w procesie przemiany (polaryzacji) makrofagów (komórek układu odpornościowego) prozapalnych (M1) do przeciwzapalnych makrofagów (M2) aktywujących procesy tworzenia nowych naczyń krwionośnych (angiogeneza). Makrofagi M2 biorą udział w hamowaniu reakcji zapalnej oraz inicjują procesy naprawy tkanek.

Naszym zdaniem, naprawa uszkodzonej tkanki mięśniowej przebiega według następującego mechanizmu. Wprowadzone komórki hADSC wydzielają IL-6. Cytokina ta aktywuje makrofagi M2, które są odpowiedzialne za naprawę uszkodzonych tkanek jak również powstawanie nowych naczyń krwionośnych.

Aby potwierdzić to przypuszczenie zaplanowaliśmy kilka doświadczeń. Jako model doświadczalny będziemy wykorzystywać myszy, którym w trakcie zabiegu chirurgicznego zamkniemy tętnicę udową i w ten sposób wywołamy niedokrwienie kończyny. Następnie do uszkodzonej kończyny podamy komórki mezenchymalne zrębu pochodzenia tłuszczowego hADSC.

Uzyskane przez nas wyniki mogą stanowić podstawę do opracowania nowych, bardziej skutecznych metod leczenia krytycznego niedokrwienia kończyn. Naszym zdaniem, szczególnie cenne mogą okazać się wyniki dotyczące przekształcenia makrofagów M1 do makrofagów M2 pod wpływem IL-6, ponieważ mogą one zostać również wykorzystane w opracowaniu nowych strategii przeciwnowotworowych.

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

W doświadczeniu wykorzystana zostanie mysz domowa (*Mus musculus*);

szczep C57BL/6NcrL - 125 myszy,

szczep NOD.CB17-rkdcscid/NcrCrL – 10 myszy

## 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 oraz Google Scholar. Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzono że brak jest dostępnych danych dotyczących wpływu IL-6 wydzielanej przez komórki mezenchymalne zrębu pochodzenia tłuszczowego na makrofagi M1 w kontekście naprawy uszkodzonych tanek. Uzyskane z proponowanego projektu wyniki mogą stanowić podstawę do opracowania nowych, bardziej skutecznych metod leczenia krytycznego niedokrwienia kończyn jak również nowych strategii przeciwnowotworowych.

Przygotowując doświadczenie uwzględniono zasadę zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia (3R):

- 1) Zaproponowane przez nas badania, ze względu na ich złożoność oraz cele jakie chcemy osiągnąć, nie można wykonać na hodowlach tkankowych *in vitro*. Nie istnieją również żadne inne metody alternatywne. Jedynie na modelu zwierzęcym jesteśmy w stanie uzyskać stan niedokrwienia kończyn podobny do stanu obserwowanego u chorych.
- 2) Doświadczenia zaplanowane w projekcie zostały w taki sposób zaprojektowane aby ograniczyć do minimum liczbę zwierząt, przy jednoczesnym zachowaniu istotności statystycznej uzyskanych wyników. Przewidziane procedury będą prowadzone w taki sposób aby po ich zakończeniu uzyskać maksymalną liczbę wyników. Specjalnie do przedłożonego projektu zostały opracowane nowe techniki analizy immunohistochemicznej pozwalające na oznaczenie kilku antygenów jednocześnie. Pobrany materiał tkankowy, od uśmierconych zwierząt po zakończeniu doświadczenia, zostanie w odpowiednich warunkach zamrożony a następnie przechowywany w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$ . Dzięki temu, w razie konieczności wykonania dodatkowych analiz zostanie ponownie użyty, bez konieczności przeprowadzenia doświadczenia z użyciem dodatkowych zwierząt.
- 3) Doświadczenie, które planujemy przeprowadzić, zostało przez nas zaplanowane w taki sposób, aby do minimum ograniczyć ból i stres mysz. Myszy będą trzymane w indywidualnie wentylowanych klatkach, w odpowiedniej dla nich temperaturze i wilgotności. Ich stan będzie monitorowany przez wykwalifikowany personel oraz otoczone będą opieką weterynaryjną (siedem dni w tygodniu). W klatkach ze względów bezpieczeństwa (zapobieganie walki samców) przebywać będzie tylko jedno zwierzę. Klatki są zbudowane z przezroczystego poliwęglanu, co umożliwi zwierzętom kontakt wzrokowy. Myszy będą miały całodobowy dostęp do świeżej wody i specjalistycznej paszy. W celu wzbogacenia środowiska w klatkach oprócz podstawowej, niepylącej, chłonnej osikowej ściółki będzie również ściółka przeznaczona do budowy gniazd. W pomieszczeniu hodowlanym będzie zachowany 12

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

godzinny cykl dobowy światła (dzień/noc). Zwierzęta przez cały czas trwania procedury będą zabezpieczone środkami przeciwbólowymi. W razie stwierdzenia nieodwracalnych zmian chorobowych powodujących u myszy np. zaburzenia w poruszaniu się, przyjmowaniu jedzenia i picia doświadczenie zostanie przerwane a zwierzę zostanie humanitarnie uśmiercone.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną

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