

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „Zastosowanie mezenchymalnych komórek zrębu pochodzących z tkanki tłuszczowej oraz kardiomiocytów pozyskanych na drodze różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w regeneracji uszkodzonego mięśnia sercowego”

2. Czas trwania projektu: 5 lat.

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): Adipose-derived Mesenchymal Stromal Cells / induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes / myocardial infarction in porcine model / intramyocardial injection model in porcine

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): B

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 projektu jest zbadanie efektu zastosowania terapii komórkowej do regeneracji pozawałowego serca świni. Dotychczas atrakcyjne pod względem terapeutycznym wydawały się komórki mezenchymalne zrębu izolowane z ludzkiej tkanki tłuszczowej (ASC – ang. *Adipose-tissue derived Mesenchymal Stromal Cells*). Efektu terapeutycznego komórek ASC upatrywano przede wszystkim w wydzielaniu czynników wzrostowych oraz cytokin (substancji wpływających na działanie komórki), które mają stymulować różne procesy w organizmie m.in. powstawanie nowych naczyń, zmniejszenie wielkości blizny pozawałowej, poprawę perfuzji mięśnia

sercowego i w efekcie zwiększenie frakcji wyrzutowej lewej komory serca.

Jednakże w ostatnich latach szczególną uwagę zwrócono na wykorzystanie w terapii komórek zdolnych do odtworzenia uszkodzonych kardiomiocytów. Ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste, otrzymywane z łatwo dostępnych komórek somatycznych (np. komórek krwi) wykazują zdolność do wydajnego różnicowania w kierunku kardiomiocytów (hiPSCs-CM, ang. hiPSCs-derived cardiomyocytes). Dotychczasowe badania przedkliniczne wykazały, że podanie hiPSCs-CM do uszkodzonego zawałem mięśnia sercowego poprawia jego funkcjonowanie, niemniej dalsza optymalizacja takiego podejścia terapeutycznego jest istotna ze względu na ograniczoną przeżywalność hiPSCs-CM po podaniu *in vivo*, co w konsekwencji zmniejsza możliwość maksymalnego odtworzenia prawidłowo działającej tkanki sercowej.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Swinia domowa (*Sus scrofa domesticus*), 30 szt.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

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:

Mesenchymal stromal cells/ adipose tissue-derived stromal cells/ Myocardial infarction model in porcine/ intramyocardial injection model in porcine / human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes

Choroby układu sercowo-naczyniowego stanowią główną przyczynę zgonów w państwach rozwiniętych [1]. Wśród nich szczególnie niebezpieczny dla pacjentów jest zawał mięśnia sercowego, który może prowadzić do zaawansowanej kardiomiopatii niedokrwiennej. Pomimo rozwoju farmakologicznego leczenia przewlekłej niewydolności serca, w wielu przypadkach jedyną formę terapii tego schorzenia stanowi przeszczep serca. Niemniej ze względu na niedobór dawców istnieje ogromna potrzeba opracowania nowych metod przywracających prawidłowe funkcjonowanie mięśnia sercowego [2]. W ostatnich latach szczególną uwagę zwrócono w tym kontekście na wykorzystanie terapii komórkowej zakładającej podanie do tkanki dotkniętej

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

zawałem komórek zdolnych do odtworzenia uszkodzonych kardiomiocytów bądź też zwiększających jej unaczynienie. Większość badań w tym zakresie prowadzono dotychczas z wykorzystaniem komórek izolowanych ze szpiku kostnego w tym mezenchymalnych komórek stromalnych, wykorzystuje się także komórki ASC izolowane z tłuszczu, niemniej ze względu na ich brak zdolności do różnicowania w kierunku kardiomiocytów jak i ograniczoną przeżywalność po podaniu *in vivo*, badania te nie doprowadziły do opracowania skutecznej terapii zawału serca i przewlekłej niewydolności serca [3]. W przeciwieństwie do tych populacji komórkowych, iPSCs wykazują zdolność do wydajnego różnicowania w kierunku kardiomiocytów. Opublikowane dotychczas wyniki badań przedklinicznych wykazały poprawę funkcji objętego zawałem mięśnia sercowego po implantacji hiPSCs-CM [4], niemniej dalsza optymalizacja takiego podejścia terapeutycznego jest istotna ze względu na ograniczoną przeżywalność hiPSCs-CM po podaniu *in vivo*, co w konsekwencji zmniejsza możliwość maksymalnego odtworzenia prawidłowo działającej tkanki sercowej. Dodatkowo zastosowanie trójwymiarowego systemu mapowania elektroanatomicznego (oceny potencjałów elektrycznych i kurczliwości różnicujących tkankę prawidłową od blizny pozawałowej) NOGA XP pozwoli na ocenę przestrzenną, elektryczną i mechaniczną miokardium oraz małoinwazyjne dostarczenie do serca komórek terapeutycznych. Według naszej wiedzy badania z wykorzystaniem tego systemu podania iPSC-CM nie były dotychczas przeprowadzane. Zastosowanie tej unikatowej technologii pozwoli na zdobycie umiejętności niezbędnych w przyszłości do stosowania podobnej strategii u pacjentów.

1. Cahill TJ, et al. Heart regeneration and repair after myocardial infarction: translational opportunities for novel therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2017 16, 699-717.
2. Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature.* 2011 473, 326-335.
3. Langrzyk A, et al. Critical View on Mesenchymal Stromal Cells in Regenerative Medicine. *Antioxid Redox Signal.* 2017
4. Gao, Ling, et al. "Large Cardiac Muscle Patches Engineered From Human Induced-Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Cells Improve Recovery From Myocardial Infarction in Swine." *Circulation* 137.16 (2018): 1712-1730.

1. **Reduction-Ograniczenie:** W projekcie liczba zwierząt zaplanowanych w doświadczeniach jest uzasadniona ze statystycznego punktu widzenia pozwalającego na uzyskanie wiarygodnych wyników przeprowadzonego eksperymentu. Uwzględniona została możliwa śmiertelność zwierząt w wyniku indukcji zawału a tym samym minimalna liczba zwierząt niezbędna do przeprowadzenia poprawnych i wiarygodnych analiz statystycznych. Dotychczasowe doświadczenie zespołu, opanowanie techniki wywoływania zawału w modelu świńskim oraz podawania komórek ASC do mięśnia sercowego ma również istotny wpływ na ograniczenie liczby wykorzystanych zwierząt w projekcie. Dodatkowo analizy zaplanowano na kilku poziomach – na poziomie organizmu, tkanek oraz na poziomie molekularnym. Kompleksowe podejście do badań pozwala

na maksymalizację danych uzyskiwanych z każdego zwierzęcia.

2. **Replacement-Zastąpienie**: przedkładany projekt koncentruje się na sprawdzeniu potencjału terapeutycznego ASC oraz kardiomiocytów uzyskanych z hiPSCs. Wymaga to przeprowadzenia badań na zwierzętach, gdyż jedynie korzystanie z modeli *in vivo* umożliwi zbadanie przeżywalności tych komórek po podaniu do uszkodzonego mięśnia sercowego oraz ich zdolność do poprawy funkcji serca. Wykonanie tego typu doświadczeń jest możliwe jedynie w układzie *in vivo*, ponieważ doświadczenia *in vitro* nie pozwalają na dokładne odtworzenie warunków charakterystycznych dla uszkodzonej zawalek tkanki sercowej, a jest to niezbędne dla prawidłowej oceny potencjału terapeutycznego badanych komórek. Mając na uwadze doniesienia naukowe w zakresie kardiologii wykazujące, iż model świni domowej jest najbardziej zbliżony do ludzkiego organizmu pod względem anatomii układu sercowo-naczyniowego, jego zastosowanie pozwoli na optymalne przeprowadzenie badań związanych z niedokrwieniem mięśnia sercowego. Jednocześnie jest to najbardziej rozpowszechniony model niedokrwiennego uszkodzenia serca u dużych zwierząt. Obecnie nie stworzono modelu *in silico* lub *ex vivo*, który w odpowiednim stopniu mógłby odwzorować wpływ niedokrwienia mięśnia sercowego na parametry tkanki serca. Nie istnieje również inna możliwość skutecznego zbadania działania komórek ludzkich w układzie *in vivo* odzwierciedlającym warunki zawału serca, jak tylko poprzez podanie ich zwierzętom.

3. **Refinement- Udoskonalenie**: Doświadczenia na modelu świńskim zaplanowano w taki sposób, aby zmniejszyć do minimum liczbę wykorzystanych zwierząt. Wszystkie procedury będą przeprowadzane przez sprawdzony i dobrze przeszkolony personel z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych tj. trójwymiarowy system mapowania elektroanatomicznego NOGA XP z możliwością wprowadzenia do serca komórek terapeutycznych za pomocą cewnika do iniekcji. Zastosowanie tego systemu pozwoli na kontrolowaną iniekcję komórek zwiększając szansę na efektywność terapii poprzez ograniczenie utraty materiału biologicznego. Procedury zostały zaplanowane w taki sposób, aby minimalizować i łagodzić ból oraz cierpienie podczas ich wykonywania. Zwierzęta będą przetrzymywane w rusztowych, bezściółkowych kojcach dla zwierząt dużych w zwierzętarni Kardio-Med Silesia. W pomieszczeniach dla świń nie będą znajdować się zwierzęta żadnego innego gatunku i nie będzie możliwości przedostania się zapachów innych zwierząt.

Dla zapewnienia potrzeb społecznych zwierząt planuje się przetrzymywanie 2 osobników/ kojec. W kojcach dla zwierząt dostępne będą gumowe zabawki, piłki, w celu urozmaicenia otoczenia. Zwierzęta będą miały stały dostęp do wody, bez ograniczeń co do ilości. Standardowa pasza będzie podawana *ad libitum*. W dzień procedur zabiegowych zwierzęta pozostaną na czczo.

Według potrzeb miejsca bytowania zwierząt będą myte i odkażane w celu utrzymania odpowiednich warunków zoohigienicznych. Wszelkie procedury diagnostyczne oraz leczenie wykonywane będą w osobnym pomieszczeniu, poza zasięgiem wzroku pozostałych zwierząt. Wykwalifikowany personel techniczny zapewni

codzienną kontrolę stanu zdrowia zwierząt i utrzymanie ich dobrostanu. W zależności od potrzeb stan zdrowia zwierząt będzie kontrolowany przez lekarza weterynarii. Dla zwierząt chorych przewidziane jest odrębne pomieszczenie kwarantanny, a dla zwierząt po zabiegach w pełnym znieczuleniu wydzielone jest pomieszczenie z kojcami i wyposażeniem umożliwiającym monitoring parametrów życiowych.

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.

