

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „**Ocena skuteczności preparatu (API-ES-1) zawierającego białka wydzielnicze z psich mezenchymalnych komórek macierzystych na proces leczenia atopowego zapalenia skóry na modelu myszy**”

2. Czas trwania projektu15.01.2020-30.11.2020.....

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów)mezenchymalne komórki macierzyste MSC, in vivo model atopowego zapalenia skóry, medium kondycjonowane

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.

Atopowe zapalenie skóry u psów jest najczęściej konsultowanym problemem dermatologicznym u tego gatunku zwierząt. Schorzenie jest wynikiem zaburzenia złożonych i nie do końca poznanych interakcji genetycznych, immunologicznych i środowiskowych. Schorzenie dotyka przede wszystkim psy zamieszkujące duże miasta. Choroba obniża znacząco komfort życia pacjentów oraz ich właścicieli i jest leczona objawowo.

Głównym celem projektu jest ocena skuteczności preparatów zawierających białka wydzielnicze psich mezenchymalnych komórek macierzystych (głównie czynniki wzrostu oraz cytokiny) pochodzących z

tkanki tłuszczowej (atMSC) w łagodzeniu objawów atopowego zapalenia skóry na modelu mysim. Badania obejmują dwa preparaty różniące się składem i postacią farmaceutyczną, a także stabilnością substancji czynnych. Aktywność immunomodulacyjna preparatów uzyskanych z pożywek atMSC została dotychczas szczegółowo potwierdzona w modelach *in vitro* z wykorzystaniem szeregu linii komórkowych, gdzie zaobserwowano zmiany w profilu wydzielanych cytokin przez komórki traktowane badanymi preparatami. Aby zweryfikować potencjał immunomodulacyjny czynników bioaktywnych wydzielanych przez komórki atMSC *in vivo* posłużymy się modelem mysim atopowego zapalenia skóry. Z racji niewielkiego fragmentu skóry (1cm²) na grzbiecie myszy poddanych uczuleniu, dyskomfort zwierząt będzie niewielki, a umiejscowienie rany i stosowanie opatrunków silikonowych ograniczy możliwość drapania i wtórnych infekcji ran.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa szczepu Balb/c -40 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: canine mesenchymal stem cells, MSC-conditioned medium, atopic dermatitis, *in vivo* model of atopic dermatitis,

Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:

- jedną z wielu właściwości MSC jest ich zdolność do modulowania odpowiedzi immunologicznej, między innymi poprzez parakrynowe oddziaływanie na komórki układu odpornościowego wydzielanymi czynnikami wzrostu, cytokinami i chemokinami.¹⁻⁴ -
- istnieją przykłady testowania produktów białkowych wydzielanych przez mezenchymalne komórki macierzyste w na modelach myszy.⁵⁻⁸
- zmiany skórne wywołane przez uczulenie na owoalbuminę dobrze odwzorowują objawy atopowego zapalenia skóry u ludzi.³⁻⁴

B. Brak jest danych dotyczących:

- immunomodulacyjnego wpływu białek wydzielanych przez psie MSC na objawy atopowego zapalenia skóry w modelu myszy

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

-optymalnego sposobu podania preparatów białek z psich MSC w modelach atopowego zapalenia skóry.

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.⁹

Zastąpienie użycia modelu zwierzęcego poprzez stosowanie modeli *in vitro* w proponowanym projekcie jest technicznie bardzo trudne i dostarczające tylko punktowych danych dotyczących skuteczności klinicznej badanych substancji. Proponowane doświadczenie zostało poprzedzone badaniami *in vitro*, których wyniki wskazują na korzystne efekty immunomodulacyjne wobec keratynocytów ekspozowanych na białka wydzielane przez psie komórki macierzyste. Te wyniki muszą być jednak potwierdzone *in vivo* co do skuteczności.

W eksperymencie zastosowano zasadę udoskonalenia poprzez ograniczenie powierzchni podrażnionej skóry zwierząt, a co za tym idzie zmniejszenie cierpienia zwierząt wynikającego ze świądu. Także zrezygnowano z chemicznego sposobu uczulania z zastosowaniem ekspozycji skóry na rozpuszczalniki organiczne (np. aceton), wywołujących większe cierpienie zwierząt niż podrażnienie mechaniczne w narkozie. Myszy wykorzystywane do zaplanowanych doświadczeń utrzymywane będą w warunkach zapewniających dobrostan. Zaplanowane procedury zaprojektowano tak, by możliwie ograniczyć ból i cierpienie. W przypadku wystąpienia nieprzewidywalnych na tym etapie doświadczenia, niekorzystnych dla dobrostanu zwierząt konsekwencji podrażnienia skóry (np. widocznych objawów zakażeń bakteryjnych ran, wydzieliny ropnej z miejsca uszkodzenia skóry) lub w efekcie zastosowania nośnika zawierającego lub nie zawierającego substancji bioaktywnych, doświadczenie będzie przerwane, a myszy poddane eutanazji.

Bibliografia:

1. Waldner i wsp., Characteristics and immunomodulating functions of adipose-derived and bone marrow-derived mesenchymal stem cells across defined human leukocyte antigen barriers. *Frontiers in Immunology* 2018; 9:1642.
2. Bertheuil i wsp., Adipose mesenchymal stromal cells: Definition, immunomodulatory properties, mechanical isolation and interest for plastic surgery. *Annales de chirurgie plastique*
3. Wang i wsp., Repeated epicutaneous exposures to ovalbumin progressively induce atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Clinical & Experimental Allergy* 2007; 37(1):151-161.
4. Kim i wsp., Beneficial effects of melittin on ovalbumin-induced atopic dermatitis in mouse. *Scientific Reports* 2017; 7:17679.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.