

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „Wykorzystanie mezenchymalnych komórek macierzystych osadzonych na mikrorusztowaniach z różną porowatością i zawartością siarczanu chondroityny w procesie gojenia i regeneracji krążków międzykręgowych po operacji przezskórnej laserowej dekompresji krążków międzykręgowych w odcinku lędźwiowym kręgosłupa”

2. Czas trwania projektu- **01.02.2019-28.02.2024**

Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **Krążki międzykręgowe, regeneracja krążków międzykręgowych, degeneracja krążków międzykręgowych, terapie komórkowe**

Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) **B. Badania translacyjne lub stosowane, 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**

3.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.

Obecnie leczenie choroby zwyrodnieniowej krążka międzykręgowego ma charakter głównie objawowy. 80% przypadków tego schorzenia leczona jest z dobrym efektem przeciwbólowym metodami zachowawczymi. Dopiero brak efektu terapeutycznego skłania do zastosowania leczenia operacyjnego. W niewielu tylko przypadkach leczenie rozpoczyna się od zastosowania procedur chirurgicznych (laserowa dekompresja krążka międzykręgowego, nukleoplastyka, chemonukleoliza, discektomia,

zabiegi chirurgiczne z całkowitym usunięciem krążka międzykręgowego i zastąpieniem go implantem ze stabilizacją kręgosłupa przez nasadową). Poznanie i zrozumienie procesów biochemicznych zachodzących w krążkach międzykręgowych, a przede wszystkim zmian zachodzących na poziomie molekularnym, ściśle związanych z degeneracją IVD, stało się bodźcem do poszukiwania nowych metod leczenia, między innymi z wykorzystaniem terapii komórkowych. Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na wykorzystanie tego rodzaju procedury w leczeniu zwyrodnienia krążków międzykręgowych u ludzi.

Opracowany przez zespół model uszkodzenia krążków międzykręgowych posłużył do potwierdzenia procesu regeneracji po podaniu mezenchymalnych komórek macierzystych. W kolejnym doświadczeniu planowane jest wykorzystanie wyselekcjonowanych mikrorusztowań, z różną porowatością i zawartością siarczanu chondroityny w procesie gojenia i regeneracji krążków międzykręgowych po operacji przezskórnej laserowej dekompresji krążków międzykręgowych (PLDD) w odcinku lędźwiowym kręgosłupa w modelu dużego zwierzęcia z indukowaną degeneracją krążka międzykręgowego. Biodegradowalne mikrorusztowania mają za zadanie stworzyć warunki dla produkcji przez komórki macierzy międzykomórkowej niezbędnej w odbudowie struktury jądra miażdżystego, a poprzez właściwości fizyczne rusztowania pozwolić na przywrócenie naturalnej wysokości i elastyczności krążka międzykręgowego, istotnej dla prawidłowo postępującego procesu regeneracji dysków. Badanie cytotoksyczności i biokompatybilności analizowanych biomateriałów zostanie przeprowadzone w doświadczeniach *in vitro* poprzedzających doświadczenie z modelem zwierzęcym, by móc wybrać materiał bezpieczny dla biorcy.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu zostanie użyta jako zwierzę modelowe świnia domowa w liczbie 8 sztuk. Świnia jest gatunkiem uznanym, na podstawie dostępnej literatury światowej, za jeden z najlepszych, a czasem jedyny model doświadczalny, z którego wyniki mogą być bezpośrednio wykorzystywane w badaniach klinicznych u ludzi. W przypadku planowanego doświadczenia zostanie wykorzystany ten gatunek, gdyż charakteryzuje się on zbliżoną do człowieka wielkością kręgów kręgosłupa, a co za tym idzie, przestrzeni międzykręgowej i krążków międzykręgowych, co zostało potwierdzone licznymi danymi literaturowymi. Ponadto, w celu uzyskania danych niezbędnych do przeprowadzenia analizy statystycznej oraz maksymalnego ograniczenia liczby zwierząt użytych w doświadczeniu planuje się u każdego zwierzęcia wykorzystać zdrowy nieuszkodzony krążek międzykręgowy jako kontrolę. Wykonane doświadczenie będzie stanowiło wstęp do opracowania procedur mających na celu wstrzykiwanie rusztowań dla wzrostu komórek macierzystych, które będą wykonywane u ludzi.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Ochrona zwierząt podczas doświadczenia będzie zgodna z zasadami 3R (zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia). Zasady 3R zostały spełnione poprzez przegląd literatury naukowej mający na celu wybranie właściwego modelu doświadczalnego (świnia), liczby użytych zwierząt (analiza statystyczna) oraz prawidłowe zaplanowanie przebiegu doświadczenia (m.in. jednoczesne wykorzystanie zwierząt, jako grupy kontrolnej i eksperymentalnej).

Zastąpienie – Planowane doświadczenie stanowi symulację postępowania w klinice człowieka, polega na pobraniu, przygotowaniu autogennych mezenchymalnych komórek macierzystych, osadzeniu ich na biodegradowalnych mikrorusztowaniach w celu produkcji macierzy międzykomórkowej, a następnie wykonaniu procedury neurochirurgicznej i wprowadzeniu komórek do zmienionego chorobowo krążka międzykręgowego. Obejmuje przeprowadzenie operacyjnego wprowadzenia wyselekcjonowanych mikrorusztowań, z różną porowatością i zawartością siarczanu chondroityny, z osadzonymi na nich autologicznymi mezenchymalnymi komórkami macierzystymi do jądra miażdżystego krążka międzykręgowego w zwierzęcym modelu doświadczalnym. Cała procedura odbywa się w warunkach sali operacyjnej, pod kontrolą RTG. Świnia posiada zbliżoną wielkość przestrzeni międzykręgowej i krążków międzykręgowych do ludzkich, co zostało potwierdzone licznymi danymi literaturowymi. Dodatkowo, świnia jest gatunkiem uznanym, na podstawie dostępnej literatury światowej, za jeden z najlepszych, a czasem jedyny model doświadczalny, z którego wyniki mogą być bezpośrednio wykorzystywane w badaniach klinicznych u ludzi.

Swindle MM i wsp. *Swine as models in biomedical research and toxicology testing. Vet Pathol.* 2012 Mar;49(2):344-56.

Sheng SR i wsp. *Comparison of Cervical Spine Anatomy in Calves, Pigs and Humans. PLoS One.* 2016 Feb 11;11(2):e0148610.

Schmidt R1, i wsp. *Limitations of the cervical porcine spine in evaluating spinal implants in comparison with human cervical spinal segments: a biomechanical in vitro comparison of porcine and human cervical spine specimens with different instrumentation techniques. Spine (Phila Pa 1976).* 2005 Jun 1;30(11):1275-82.

Sheng SR i wsp. *Anatomy of large animal spines and its comparison to the human spine: a systematic review. Eur Spine J.* 2010 Jan;19(1):46-56.

McLain RF i wsp. *Comparative morphometry of L4 vertebrae: comparison of large animal models for the human lumbar spine. Spine (Phila Pa 1976).* 2002 Apr 15;27(8):E200-6.

Ograniczenie - Opierając się na licznych danych literaturowych, w których autorzy wykorzystywali podobny układ doświadczenia planowana liczba zwierząt w prezentowanym doświadczeniu, z całą

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

pewnością pozwoli uzyskać pulę wyników niezbędnych do przeprowadzenia wiarygodnej analizy statystycznej.

Barczewska M i wsp. MR monitoring of minimally invasive delivery of mesenchymal stem cells into the porcine intervertebral disc. PLoS One 2013;8: e74658.

Henriksson HB i wsp. Transplantation of human mesenchymal stems cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model. Spine (Phila Pa 1976). 2009 Jan 15;34(2):141-8.

Oehme D i wsp. Mesenchymal progenitor cells combined with pentosan polysulfate mediating disc regeneration at the time of microdiscectomy: a preliminary study in an ovine model. J Neurosurg Spine. 2014 Jun;20(6):657-69.

Udoskonalenie – Zwierzęta będą miały zapewnione optymalne warunki bytowe m.in. będą utrzymywane w grupach, w kojcach uniemożliwiających zranienie, posiadające zabezpieczenia uniemożliwiające wydostanie się zwierząt na zewnątrz. Co więcej, warunki panujące w Zwierzętarni będą miały właściwe parametry środowiska odpowiadającym ich wymogom. W czasie trwania całego doświadczenia wykorzystywane będą metody, które radykalnie zminimalizują ból, cierpienie, dystres lub trwałe urazy, jakich mogą doświadczać zwierzęta, tak by znacząco poprawić ich dobrostan. Zabiegi operacyjne zostaną poprzedzone 2 tygodniowym okresie aklimatyzacji. Zabiegi operacyjne, włączając w to pobranie szpiku kostnego, będą przeprowadzone pod kontrolą lekarza weterynarii w stanie głębokiej narkozy chirurgicznej znoszącej odruchy, odczuwanie bólu, przy zastosowaniu odpowiednich anestetyków i środków przeciwbólowych. Procedury neurochirurgiczne będą prowadzone przez doświadczonych lekarzy neurochirurgów, charakteryzujących się dużym doświadczeniem nie tylko w neurochirurgii człowieka (m.in. zabiegi PLDD), ale także zwierząt, co zostało udokumentowane licznymi opracowaniami naukowymi. Ocena cytotoksyczności i biokompatybilności stosowanych mikrorusztowań wykorzystywanych do wzrostu komórek będzie przeprowadzona w doświadczeniu *in vitro*, które będzie poprzedzało procedury chirurgiczne u zwierząt. Pozwoli to wytypować najbardziej bezpieczny materiał z którego będzie wykonane mikrorusztowanie i który będzie mógł być zastosowany u ludzi. Konstrukt mikrorusztowanie/komórki macierzyste zostanie przygotowany w sterylnych warunkach przez doświadczonego pracownika, na co dzień pracującego w laboratorium komórek macierzystych z certyfikatem GMP (Good Manufacture Practice), przygotowującego preparaty terapii komórkowej do zastosowania u ludzi.

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.