

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

## 1. Tytuł projektu:

Rola sygnałowania purynergicznego w procesie zasiedlenia krwiotwórczych komórek macierzystych do nisz szpikowych

2. Czas trwania projektu: 01.09.2019– 31.09.2022

Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) krwiotwórcze komórki macierzyste, zasiedlenie szpiku

3. 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.

Materiał stosowany w leczeniu chorób układu krwiotwórczego (ostrej białaczki limfoblastycznej, ostrej białaczki szpikowej czy zaburzenia odporności) stanowi zawiesina komórkowa pobrana od dawcy z krwi obwodowej po farmakologicznej mobilizacji. Skuteczność transplantacji zależy od liczby przeszczepionych krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM). W związku z tym znajomość czynników i zjawisk związanych z retencją tych komórek ma kluczowe znaczenie w optymalizacji wyników klinicznych związanych z terapiami opartymi na KKM. Celem projektu jest określenie wpływu sygnałowania purynergicznego na zjawisko retencji KKM ze szczególnym uwzględnieniem zasiedlenia tych komórek niszy szpikowej.

Dokładne poznanie procesów, czynników oraz zjawisk biorących udział w migracji KKM z krwi obwodowej do szpiku kostnego i jego zasiedlenia pozwoli na pełniejsze i bardziej wydajne wykorzystanie metod transplantacji KKM.

Zostanie dokonane oznaczenie parametrów hematologicznych myszy w stanie fizjologicznym. W 2-gim etapie badań zostanie zaindukowane zasiedlenie krwiotwórczych komórek macierzystych u myszy poddanych kondycjonowaniu do przeszczepu z pomocą promieniowania  $\gamma$ . W trakcie eksperymentów zostanie pobrana

krw z żyły głównej do analizy hematologicznej, cytometrycznej, testów klonogennych oraz już po śmierci myszy zostaną pobrane z niej tkanki na analizy Western blot, Real-time PCR oraz testy ELISA.

Powyższy opis obejmuje badania biologiczne o charakterze podstawowym obejmujące zagadnienia hematologiczne. Wzorując się na dostępnej literaturze oraz własnym doświadczeniu, organizm zwierząt nie reaguje negatywnie na wykorzystane w badaniu środki farmakologiczne.

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

W doświadczeniu zaplanowano wykorzystanie zwierząt z gatunku *Mus musculus* w liczbie 160:

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

Przygotowując projekt badawczy sprawdzono obecny stan wiedzy na realizowany temat w przedstawionym doświadczeniu w następujących bazach danych: Google Scholar, PUBMED, ScienceDirect, Web of Science, wykorzystując słowa kluczowe: CD73, CD39, purynergic signaling, hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs), engraftment.

Model myszy zakłada wykorzystanie szczepu: C57Bl/6, był on szczepem wyjściowym dla myszy z defektem CD73 i CD39, na których przeprowadzono doświadczenia opisane w pracy „Novel evidence that extracellular nucleotides and purinergic signaling induce innate immunity-mediated mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells”.

Plan przedłożonego doświadczenia obejmuje zagadnienia związane z rozwojem wiedzy na temat mechanizmów zasiedlenia krwiotwórczych komórek macierzystych do nisz szpikowych przy udziale sygnałowania purynergicznego. Badania przeprowadzone przez nasz zespół wykazały wpływ sygnałowania purynergicznego na zjawisko zasiedlenia nisz szpikowych, jednak niezbędne są dalsze badania w celu uszczegółowienia uzyskanych wyników. Badając poszczególne szlaki prowadzące do zasiedlenia nisz szpikowych oraz aby wskazać udział sygnałowania purynergicznego w tych procesach niezbędne są dalsze badania.

Skuteczność przeszczepu krwiotwórczych komórek macierzystych zależy od wielu parametrów. W związku z tym znajomość czynników i zjawisk związanych z procesem zasiedlenia komórek do niszy szpikowej, ma kluczowe znaczenie w optymalizacji wyników klinicznych związanych z terapiami komórkowymi. Dane uzyskane w planowanym doświadczeniu dostarczą kluczowych informacji na temat roli sygnałowania purynergicznego i nukleotydów zewnątrzkomórkowych w zasiedleniu krwiotwórczymi komórkami macierzystymi nisz szpikowych. Metodyka doświadczenia została oparta na publikacjach traktujących o tematyce odnoszącej się do retencji, mobilizacji, wszczepienia, zasiedlenia oraz odnowy hematologicznej przez KKM, znajdujących się w renomowanych czasopismach.

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

**Zastąpienie**

Modele zwierzęce myszy zostały wybrane do zaplanowanych doświadczeń ze względu na swoją użyteczność w badaniach związanych z sygnałowaniem purynergicznym. Na etapie badań podstawowych jest to najlepszy materiał do badań in vivo. Z uwagi na złożoność układu krwiotwórczego, szeregu zjawisk oraz ilości czynników mających wpływ na farmakologiczną mobilizację KKM z niszy szpikowej do krwi obwodowej, niemożliwe jest przy obecnej wiedzy i technologii przeprowadzenie analizy metodami in vitro, z udziałem linii komórkowych, hodowli tkankowych lub in vivo przy pomocy zwierząt bezkręgowych.

**Ograniczenie**

Korzystając z narzędzi pozwalających oszacować liczebność grupy w doświadczeniu planowane jest zbadanie łącznie 170 osobników uwzględniając przy tym dwukrotne powtórzenie eksperymentu (wymóg statystyczny) w celu wykluczenia możliwości błędu lub przypadkowego (losowego) otrzymania wyników. Jest to najmniejsza liczba zwierząt jaką możemy użyć celem prawidłowego przeprowadzenia doświadczenia.

**Udoskonalenie**

W celu zapewnienia jak najwyższego dobrostanu zwierząt, wykonanie doświadczenia oraz opieka nad nimi zostanie zapewniona przez personel mający duże doświadczenie w pracy ze zwierzętami. Zastosowane indywidualnie wentylowane klatki o powierzchni ~500cm<sup>2</sup> zapewniają komfort przestrzenny zwierzętom. Nasz zespół posiada znaczne doświadczenie w pracy ze zwierzętami, a wszystkie procedury zostały zaplanowane na podstawie uzyskanej przez nas dotychczas wiedzy wyniesionej z eksperymentów przeprowadzonych z przeszłości tak, aby ryzyko niepowodzenia i konieczności powtarzania wnioskowanego doświadczenia zostało zminimalizowane. W trakcie uśmiercania zwierząt zostanie wykorzystana ksylazyna/ketamina, aby jak najbardziej zredukować stres i ból myszy.

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