NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu:

Rola sygnałowania purynergicznego w procesach mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych

3.Czas trwania projektu: 01.09.2019– 31.09.2022

Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) krwiotwórcze komórki macierzyste, mobilizacja sygnałowanie purynergiczne

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.

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 roli sygnałowania purynergicznego na zjawisko retencji KKM ze szczególnym uwzględnieniem farmakologicznej mobilizacji tych komórek ze szpiku do krwi obwodowej.
Dokładne poznanie procesów, czynników oraz zjawisk biorących udział w migracji KKM ze szpiku do krwi obwodowej pozwoli na pełniejsze i bardziej wydajne wykorzystanie metod transplantacji KKM.

W trakcie badań zostanie dokonane oznaczenie parametrów hematologicznych myszy w stanie fizjologicznym. W 2-gim etapie badań zostanie zaindukowana mobilizacja KKM u zwierząt doświadczalnych za pomocą czynników mobilizujących. W trakcie eksperymentów zostanie pobrana krew 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, uniedogodnieniem będą natomiast drogi podawania środków-podskórnie i dootrzewnowe wstrzyknięcia.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu zaplanowano wykorzystanie zwierząt z gatunku *Mus musculus* w liczbie 162:

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA[1]

Przygotowując projekt badawczy sprawdzono obecny stan wiedzy na temat realizowany w przedstawionym doświadczeniu w następujących bazach danych: Google Scholar, PUBMED, ScienceDirect, Web of Science, wykorzystując słowa kluczowe: hematopietic stem/progenitor cells, mobilization, G-CSF mobilization, AMD3100 mobilization.

Plan przedłożonego doświadczenia obejmuje zagadnienia związane z rozwojem wiedzy na temat farmakologicznej mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) przy udziale sygnałowania purynergicznego. Badania przeprowadzone przez nasz zespół wykazały wpływ sygnałowania purynergicznego na zjawisko mobilizacji komórek, jednak niezbędne są dalsze badania w celu uszczegółowienia uzyskanych wyników, badając znaczenie poszczególnych nukleotydów zewnątrzkomórkowych.
Badanie farmakologicznej mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych jest istotne ponieważ, allo- lub autoprzeszczepy KKM są metodami stosowanymi w leczeniu chorób układu krwiotwórczego. Zawiesina komórkowa tworząca materiał przeszczepowy, pozyskiwana jest z krwi obwodowej dawcy po farmakologicznej mobilizacji czynnikiem stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF) lub antagonistą CXCR4-AMD3100. Skuteczność samego przeszczepu zależy od wielu parametrów, w tym liczby przeszczepionych KKM. W związku z tym znajomość czynników i zjawisk związanych z migracją KKM ze szpiku do krwi obwodowej i procesie wszczepienia 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 zewnątrzkomórkowych nukleotydów i sygnałowania purynergicznego w procesie mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych.

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

Metodyka doświadczenia została oparta na publikacjach traktujących o tematyce odnoszącej się do retencji, mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych, znajdujących się w renomowanych czasopismach.

Zastąpienie

Model zwierzęcy szczepów myszy został wybrany do zaplanowanego doświadczenia 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 216 osobników uwzględniając przy tym dwukrotne powtórzenie eksperymentu (wymóg statystyczny) w celu wykluczenia możliwości błędu. Jest to najmniejsza liczba zwierząt jaką możemy użyć celem prawidłowego przeprowadzenia doświadczenia. Ilość zwierząt w grupach dostosowaliśmy do stosowanych w tego typu badaniach modelów statystycznych oraz do tzw. „dobrej praktyki laboratoryjnej.

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 ~500cm2 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. Zwierzęta utrzymywane zostaną grupowo do 5 osobników na klatkę. W klatkach zostaną wprowadzone urozmaicenia poprawiające komfort zwierząt. Przeprowadzony zostanie handling mający na celu zminimalizowanie stresu związanego z podjęciem zwierzęca z klatki i przyzwyczajenie go do chwytu wykonywanego podczas procedury podania substancji.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną[2]

- ☐ 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.