

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Wykorzystanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych izolowanych z komórek macierzystych jako nośników hybrydowych nukleaz w celu edycji genomu *in vivo***

2. Czas trwania projektu: 29 miesięcy.

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): CRISPR/Cas9, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, komórki macierzyste, edycja genomów, *in vivo*.

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.

Zaplanowane doświadczenie ma na celu sprawdzenie skuteczności działania systemu CRISPR/Cas9 (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 nuclease*) przenoszonego za pomocą pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. *Extracellular Vesicles; EVs*) izolowanych z komórek macierzystych, w systemie *in vivo*, celem wyłączenia ekspresji wybranych genów.

Zaproponowana w doświadczeniu nowa metoda dostarczania hybrydowych nukleaz *in vivo*, stanowi alternatywę dla istniejących systemów, opartych na wektorach wirusowych, które niosą ryzyko mutagenezy insercyjnej, jak również dla systemów opartych na liposomach, których skuteczność *in vivo* jest często niezadowalająca.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs) powstają w wyniku naturalnego procesu złuszczenia się błony komórkowej i są ważnymi mediatorami w komunikacji międzykomórkowej. Dzięki zawartym w nich biologicznie aktywnym cząsteczkom, takim jak mRNA, mikroRNA oraz białka, mogą wpływać na zmiany fenotypu oraz funkcjonowania komórek docelowych, co czyni je atrakcyjnymi narzędziami do przenoszenia substancji terapeutycznych.

W opisywanym doświadczeniu planuje się przeszczepienie EVs pochodzących ze zmodyfikowanych genetycznie komórek macierzystych (ang. *induced pluripotent stem cells*; *iPSCs*), zawierających komponenty systemu CRISPR/Cas9, nakierowane na gen markerowy GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*) oraz natywne geny Fas i Pcsk9, których nadmierna ekspresja u ludzi prowadzi do takich chorób jak: niealkoholowe stłuszczenie wątroby oraz hipercholesterolemia. Testowane będzie uzyskanie podwójnej (gen GFP i Fas oraz GFP i Pcsk9) oraz potrójnej (gen GFP, Fas i Pcsk9) modyfikacji genetycznej *in vivo*, co sprawdzane będzie w tkankach myszy *post-mortem*.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa (*Mus musculus*) szczepu NOD/SCID-GFP, wiek: 8 tygodni, 48 sztuk.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych:

_X_EBSCO; _X_PUBMED; _X_Google Scholar; __AGRICOLA; X__ScienceDirect; _X_Web of Science (JCR);

Wykorzystano słowa kluczowe:

Designer nucleases/ CRISPR/Cas9/ extracellular vesicles/ induced pluripotent stem cells/ NOD/SCID mice/ in vivo genome editing

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

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdza się że:

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy do tej pory nie przeprowadzono analogicznego eksperymentu mającego na celu weryfikację skuteczności modyfikacji genetycznych *in vivo* z użyciem systemu CRISPR/Cas9 przenoszonego za pomocą pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z komórek macierzystych.

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:

System CRISPR/Cas9 stanowi skuteczne narzędzie do precyzyjnej edycji genowej *in vitro*. Dostarczenie komponentów systemu CRISPR/Cas9 *in vivo* wymaga najczęściej zastosowania wektorów wirusowych, które mogą być mutagenne i wywoływać zagrażające życiu efekty uboczne.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe izolowane z komórek nowotworowych, mogą przenosić elementy CRISPR/Cas9 i dostarczać je do nowotworów *in vivo* (w modelu mysim). Wiadomo jednak, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzące z komórek nowotworowych, zawierają szereg związków aktywnych biologicznie (RNA, Białka, lipidy), które mogą prowadzić do zwiększenia stopnia złośliwości innych komórek nowotworowych, dlatego ich użycie w terapiach genowych nie jest wskazane.

B. Brak jest danych dotyczących:

Skuteczności dostarczania systemu CRISPR/Cas9 *in vivo*, z użyciem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pozyskanych ze zmodyfikowanych genetycznie komórek macierzystych, w tym z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

Opracowanie nowej metody skutecznego dostarczania elementów CRISPR/Cas9 *in vivo*, z wykorzystaniem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z komórek macierzystych.

A/ Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku:

Rozwoju nowych, bezpiecznych metod inżynierii genetycznej, pozwalających na zastąpienie wektorów wirusowych, zwłaszcza w systemach *in vivo*.

B/ Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na:

Możliwości wykorzystania opracowanej technologii do leczenia ludzkich chorób genetycznych w przyszłości.

W planowanym doświadczeniu uwzględniono następujące zasady:

- zastąpienia- Osiągnięcie planowanego celu naukowego jest niemożliwe bez wykorzystania zwierząt laboratoryjnych, a eksperyment został zaprojektowany zgodnie z przyjętymi standardami zweryfikowanymi na podstawie danych literaturowych.

- ograniczenia- Liczba zwierząt wykorzystywanych w eksperymencie została ograniczona do minimum niezbędnego dla wiarygodnej interpretacji wyników w celu osiągnięcia planowanego celu naukowego.

- udoskonalenia- Przebieg eksperymentu, w tym warunki utrzymania zwierząt oraz planowane procedury i metody badawcze zostały tak zaplanowane, aby ograniczyć cierpienie i dystres zwierząt. Myszy będą utrzymywane w pomieszczeniach i klatkach minimalizujących ryzyko infekcji i zapewniających optymalne warunki temperatury oraz wilgotności. Zwierzęta poddane procedurom będą poddawane znieczuleniu w celu znaczącego ograniczenia ich stresu i cierpienia. Zostaną także uśmiercone w sposób humanitarny z zastosowaniem odpowiednich środków farmakologicznych.

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.