

## NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projekt „Wpływ rapamycyny na przeżywalność neuronów kory mózgowej w modelu fotoudaru niedokrwienego u szczurów.”
2. Czas trwania projektu 3 lata
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): fototrombotyczny udar niedokrwieny, mTOR, autofagia, rapamycyna, neuroprotekcja.
4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): A. Badania podstawowe.

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.

Udar mózgu każdego roku dotyka 15 mln ludzi na świecie, z czego 6 milionów ludzi umiera, a u 5 milionów prowadzi do trwałego kalectwa. Leczenie udaru niedokrwienego (>85% udarów) polega na udrożnieniu zamkniętego naczynia poprzez rozpuszczenie skrzepliny - tromboliza. Jednak tylko <3% pacjentów jest poddawanych terapii, głównie z powodu przekroczenia okna czasowego (4,5-6 godzin od wystąpienia objawów), bądź przeciwwskazań do leczenia. Ognisko udarowe dzieli się na wewnętrzny rdzeń martwicy, w którym znaczne obniżenie perfuzji prowadzi do śmierci komórek i zewnętrzną strefę penumbry, gdzie komórki są w stanie szoku, jednak pozostają metabolicznie aktywne. Jeżeli reperfuzja nie nastąpi odpowiednio szybko, komórki penumbry także umierają, a ognisko martwicy się

powiększa. Istotne jest zatem poszerzanie wiedzy o mechanizmach zachodzących w komórkach nerwowych w sytuacji niedokrwienia i poszukiwanie czynników mogących wydłużyć okno terapeutyczne dla reperfuzji poprzez stabilizację penumbry.

Autofagia jest wewnątrzkomórkowym procesem degradacji makrocząsteczek i organelli, istotnym w utrzymaniu homeostazy w odpowiedzi na bodźce uszkodzające. Autofagia ulega nasileniu w neuronach przy niedokrwieniu, co oznacza, że może działać ochronnie i stanowić punkt wyjścia dla terapii w udarach. Jednym z leków stymulujących autofagię jest rapamycyna (lek immunosupresyjny z grupy antybiotyków makrolidowych, inhibitor mTOR). Wływ aktywności szlaku mTOR (wewnątrzkomórkowego enzymu z grupy kinaz, głównego regulatora reakcji komórek na zmiany stanów energetycznych) na przeżywalność komórek nerwowych w warunkach niedokrwienia nie został dokładnie opisany, ale wstępnie wykazano rapamycynę jako potencjalny lek neuroprotekcyjny (zwiększający przeżywalność neuronów i zmniejszający rozmiar ogniska udarowego). Stąd naszym celem jest zbadanie, jak niedokrwienie wpływa na ekspresję szlaku mTOR i aktywność autofagii w komórkach nerwowych oraz jaki wpływ na neurony będzie miało leczenie rapamycyną.

W projekcie będą wykorzystane szczury u których będzie indukowany udar niedokrwienno przy pomocy uznanego modelu fotoudaru w obrębie kory mózgu. Części zwierząt przed zabiegiem leczona będzie rapamycyną. Celem zaobserwowania zmian przeżywalności neuronów we wczesnej fazie niedokrwienia mózgu, zwierzęta poddawane będą eutanazji w 1,3,6,24 godziny po wywołaniu udaru, a pobrane narządy będą służyły dalszym badaniom biochemicznym i histologicznym. Planowane badania zostaną przeprowadzone z udziałem szczurów szczepu Long Evans, które były już wykorzystywane w tego typu doświadczeniach.

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

Planowane badania zostaną przeprowadzone z udziałem 120 samców szczura laboratoryjnego szczepu Long Evans.

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

Wpływ rapamycyny na neurony po udarze niedokrwiennym zaobserwować można tylko na modelu zwierzęcym.

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

\_\_EBSCO; \_\_PUBMED; \_\_Google Scholar; \_\_AGRICOLA; \_\_ScienceDirect; \_\_Web of Science (JCR); \_\_

Wykorzystałam/em słowa kluczowe:

Photothrombotic stroke, mTOR, autophagy, rapamycin, neuroprotection.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że: nie przeprowadzono dotychczas podobnego eksperymentu

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że zastosowanie rapamycyny zwiększy przeżywalność neuronów po udarze niedokrwiennym poprzez stymulację autofagii,

B. Brak jest danych, lub też dane są mało wiarygodne lub nie są sprawdzone w zakresie: wpływu aktywności szlaku mTOR na przeżywalność neuronów po udarze niedokrwiennym mózgu.

### ***Uwzględnienie zasady zastąpienia:***

Eksperymenty, które mają na celu wykazanie wpływu rapamycyny na funkcjonowanie neuronów we wczesnej fazie udaru niedokrwiennego mózgu muszą być przeprowadzane na zwierzętach ze względu na to, że oczekiwany efekt leku obserwowany jest w strefie penumbry, której nie sposób odtworzyć podczas korzystania z innych metod, jak choćby z hodowli komórkowej. Wybór szczurzego modelu wynika z tego, że u zwierząt tych łatwiej przeprowadzić kaniulację żyły ogonowej (droga podania rożu bengalskiego), a stały rozmiar ogniska niedokrwiennego w fotoudarze (~2mm średnicy) stanowi objętościowo mniejszy uraz dla mózgu zwierząt. Zastosowanie szczurów Long Evans jest podyktowane tym, że szczep ten jest często stosowany jako model otyłości (jednego z czynników udaru) oraz był wykorzystywany w modelach udarów niedokrwiennych mózgu u gryzoni.

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

#### ***Uwzględnienie zasady ograniczenia:***

W proponowanych badaniach zostaną zastosowane nowoczesne metody pozwalające na maksymalnie dokładną ocenę i wyciągnięcie wiążących wniosków na podstawie doświadczeń wykonanych na najmniejszej możliwej liczbie osobników. Liczba zwierząt (w grupach 1 – 8 = 10 zwierząt, w grupach 9 – 12 = 8 zwierząt, w grupie 13 = 8 zwierząt) w grupach eksperymentalnych wynika z konieczności przeprowadzenia badań biochemicznych i immunohistochemicznych, w których pobrane mózgi utrwalane są w odmienny sposób. Dlatego na każdą z grup przypadają 2 równe podgrupy, w których pobrane od zwierząt tkanki (n w grupach 1 – 8 = 5 zwierząt, n w grupach 9 – 12 = 4 zwierzęta, n w grupie 13 = 4 zwierzęta) zostaną poddane badaniom biochemicznym i immunohistochemicznym. Liczba zwierząt wykorzystywanych w badaniu została ograniczona do minimum pozwalającego na wiarygodne analizy statystycznie i rzetelne wnioskowanie.

#### ***Uwzględnienie zasady udoskonalenia:***

Wykorzystywane zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku. W naszym modelu wykorzystanie metody fotoudaru niedokrwienego pozwala na ograniczenie do minimum bólu i dystresu zwierząt, w porównaniu do metod opierających się na wypreparowaniu tętnicy szyjnej wspólnej / środkowej mózgu i doprowadzenie do jej mechanicznego zamknięcia. Metoda fotoudaru pozwala na zredukowanie czasu trwania eksperymentu, redukcję rozmiaru niedokrwienia, redukcję deficytów neurologicznych, zmniejszenie rany skórnej przy równoczesnym zwiększeniu powtarzalności metody. Wywołanie udaru niedokrwienego mózgu z uwagi na brak unerwienia czuciowego kory mózgu nie powoduje u zwierząt bólu po zabiegu.

Obserwacje prowadzone we wczesnych fazach udaru są podyktowane przede wszystkim oszacowanym szybkim tempem obumierania neuronów – około 120 milionów neuronów traconych w każdej godzinie trwania niedokrwienia, ze średnią utratą około 1.2 miliarda / udar niedokrwieny [Saver, 2006]. Tempo to stało się podstawą dla motto w leczeniu udarów - „czas to mózg”. Wprowadzenie czterech odstępów czasowych – 1, 3, 6, 24 godziny po wywołaniu udaru niedokrwienego jest konieczne dla obserwacji zmian zachodzących we wczesnych fazach udaru. W odróżnieniu od badań na hodowlach komórkowych zredukowaliśmy ilość odstępów do czterech (w badaniach na hodowlach wykorzystywano pięć). Wykorzystanie trzech odstępów (po 1, 3, 6 godzinach) pozwoli na oszacowanie trendu zmian wewnątrzkomórkowych we wczesnej fazie udaru, bez konieczności zwiększania ilości grup eksperymentalnych. Grupy po 24 godzinach od początku niedokrwienia, będą odzwierciedlały stan końcowy komórek nerwowych po dokonanych udarze niedokrwienym mózgu.