

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Wytworzenie przeciwciała poliklonalnego specyficznego względem N-Hcy-KLH

2. Czas trwania projektu 24 miesiące

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) przeciwciała poliklonalne, homocysteina, homocysteinylacja, królik, hemocjanina

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) 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.

Homocysteina (Hcy) jest aminokwasem siarkowym, który powstaje w organizmie z dostarczonej z pożywieniem metioniny. Podwyższony poziom Hcy, zwany hiperhomocysteinemią (HHcy) jest czynnikiem ryzyka choroby sercowo-naczyniowej oraz skutkuje zaburzeniami funkcji poznawczych, chorobą Alzheimera i otępieniem naczyniowym. Rosnąca liczba doniesień wskazuje, że za toksyczność Hcy częściowo odpowiedzialna jest modyfikacja białek przez reaktywny metabolit Hcy – tiolakton Hcy, czyli tzw. N-homocysteinylacja. Modyfikacja ta zmienia strukturę i zaburza funkcję białka. Hcy zidentyfikowano we wszystkich dotychczas zbadanych preparatach oczyszczonych białek dostępnych komercyjnie, jak również w kilku białkach krwi i tkanek.

Planuje się immunizację dwóch królików rasy nowozelandzkiej białej białkiem – N-

homocysteinyłowaną hemocjaniną skorupiaka morskiego (ang. *Keyhole Lymphet Hemocyanin*) Nε-Hcy-Lys-KLH. Przeciwciało specyficznie rozpoznające N-homocysteinyłowane białka jest ważnym narzędziem badania roli tych białek w patofizjologii chorób związanych z podwyższonym stężeniem homocysteiny. Po immunizacji zwierząt i wyznaczeniu miana surowicy przeciwciała anty-N-homocysteinyłowanym białkom będą izolowane z surowicy królików metodą chromatografii powinowactwa na odpowiednich kolumnach. Uzyskane przeciwciała będą następnie wykorzystane do detekcji N-homocysteinyłowanych białek w materiale biologicznym, np. surowicy krwi człowieka, myszy, tkankach myszy. Mogą być więc wykorzystane jako narzędzie w badaniu roli N-homocysteinyłowanych białek w rozwoju chorób związanych z podwyższonym poziomem homocysteiny, takich jak choroby sercowo-naczyniowe i neurodegeneracyjne.

Szkody jakie ponoszą zwierzęta: Podczas procedury zwierzęta będą odczuwały pewien dyskomfort spowodowany obecnością eksperymentatora. Powinien być on jednak zminimalizowany przez 2-tygodniowy okres osvajania zwierzęcia z obecnością i czynnościami, które wykonuje człowiek, takimi jak dotykanie, wyjmowanie z klatki, podnoszenie. Podczas immunizacji zwierzęta będą odczuwały niewielki dyskomfort i stres związany z nakłuciem i wprowadzeniem roztworu antygeny z adiuwantem. Pobieranie krwi z żyły brzożnej ucha będzie odbywało się po zastosowaniu znieczulenia miejscowego, aby wyeliminować odczucie bólu związane z nakłuciem. Wykrwawienie w znieczuleniu ogólnym zostanie przeprowadzeniu po zastosowaniu premedykacji, która ma na celu złagodzenie dyskomfortu spowodowanego podaniem środka znieczulającego stosowanego do właściwej anestezji. Użycie adiuwantu Freund'a może spowodować: zmiany wysiękowe, guzkowate, nekrozę. Możliwość wystąpienia tych zmian powinna być zminimalizowana przez zastosowanie iniekcji podskórnej w czterech miejscach w zalecanej objętości po 250 µl roztworu antygeny z adiuwantem. Kompletny adiuwant Freund'a zostanie zastosowany jedynie podczas pierwszej immunizacji, a podczas kolejnych będzie zastąpiony niekompletnym adiuwantem Freund'a.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Do produkcji surowicy odpornościowej wykorzystane zostaną dwa samce królików europejskich (*Oryctolagus cuniculus*) – rasy nowozelandzkiej białej. Króliki należą do najczęściej immunizowanych zwierząt w celu produkcji przeciwciał poliklonalnych. Są to zwierzęta łatwe w utrzymaniu, mogą być

poddane bezpiecznemu i wielokrotnemu pobraniu krwi, a przeciwciała, które produkują są dobrze scharakteryzowane i łatwe do oczyszczenia. Dodatkową zaletą stosowania królików jest większa ilość krwi, którą można z nich uzyskać niż w przypadku zwierząt małych, jak myszy, szczury czy chomiki. Uczulane będą dwa króliki, co jest minimalną liczbą w procedurach immunizacyjnych.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Konieczność posiadania przeciwciała specyficznego względem N-homocysteinylowanych białek jest uzasadniona potrzebą prowadzenia badań nad udziałem tych białek w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych. Specyficzna immunoglobulina będzie narzędziem badawczym, które umożliwi analizę mechanizmów toksyczności homocysteiny i pozwoli poszerzyć wiedzę na temat wpływu hiperhomocysteinemii na nasze zdrowie.

Zasada zastąpienia – nie jest możliwe uzyskanie surowicy odpornościowej bez użycia zwierząt. Królik został wybrany na podstawie naszych wcześniejszych doświadczeń. W przeszłości uzyskaliśmy frakcję specyficznych immunoglobulin i wykorzystaliśmy je do identyfikacji N-homocysteinylowanych białek, co zostało udokumentowane publikacjami. Próba uzyskania monoklonalnych przeciwciał w myszach zakończyła się niepowodzeniem. Przeciwciała królicze są bardzo dobrze scharakteryzowane i opracowane są metody ich oczyszczania. W naszym laboratorium dysponujemy odczynnikami służącymi do oczyszczania i detekcji immunoglobulin króliczych (białko A-agaroz, drugorzędowe przeciwciała anti-IgG królicze). Immunoglobuliny IgY produkowane przez immunizację kur, ze względu na bardziej skomplikowane metody oczyszczania i trudności w usuwaniu lipidów, nie byłyby odpowiednią alternatywą. Ponadto przeciwciała produkowane w kurach nie nadają się do immunoprecypitacji z użyciem standardowych roztworów. Immunoprecypitacja N-homocysteinylowanych białek jest jednym z planowanych przez nas zastosowań króliczych IgG.

Zasada redukcji – ograniczenia zostanie spełniona przez wykorzystanie do immunizacji jedynie dwóch zwierząt (ze względu na zmienność osobniczą w odpowiedzi immunologicznej dobrze jest immunizować dwa króliki, daje to możliwość wyboru surowicy o wyższym mianie), dobór odpowiedniego modelu (króliki są najczęściej wybierane do produkcji przeciwciał ze względu na

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

łatwość w utrzymaniu i pobieraniu krwi oraz duża ilość materiału, która może być uzyskana z jednego zwierzęcia), użycie sprawdzonych metod badawczych (podobną procedurę produkcji przeciwciał poliklonalnych wykonaliśmy w przeszłości, kiedy to uzyskaliśmy frakcję specyficznych immunoglobulin), pracę ze sprawdzonym i dobrze przeszkolonym personelem (osoba planująca i wykonująca immunizację ma doświadczenie w produkcji przeciwciała poliklonalnego udokumentowane publikacjami; pozostałe osoby z zespołu wykonującego mają wieloletnie doświadczenie w pracy ze zwierzętami).

Zasada udoskonalenia – wykorzystanie zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla swego gatunku. W klatce będzie znajdowała się połka z częścią w postaci domku/schronienia. Codzienne będzie prowadzona szczegółowa kontrola dobrostanu zwierząt. Metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak, aby ograniczały do minimum ból i cierpienie. Czynności będą wykonywane przez doświadczony i przeszkolony personel. Podczas wykonywanych wszystkich czynności zostaną zastosowane metody, których celem będzie ograniczenie stresu i bólu odczuwanego przez zwierzęta. Okres przed rozpoczęciem immunizacji i pobierania krwi, czyli oswojanie będzie prowadzone, aby przyzwyczaić królika do obecności człowieka i do czynności takich jak chwytanie, podnoszenie, dotykanie. Pobieranie krwi poprzedzone będzie owinięciem królika w grupy ręcznik, co da zwierzęciu poczucie bezpieczeństwa. Króliki nie lubią bycia w otwartych przestrzeniach. Użycie miejscowego znieczulenia (krem EMLA) uśmierzy ból spowodowany nakłuciem ucha. Zastosowanie środka uspokajającego i znieczulenia ogólnego wyeliminuje ból stres związany z terminalnym wykrwawieniem i śmiercią. Do immunizacji zastosowany zostanie adiuwant Freund, który nasila i przyspiesza odpowiedź immunologiczną, co zredukuje czas trwania procedury i zmniejszy ilość iniekcji potrzebnych do uzyskania zadawalającego poziomu specyficznych immunoglobulin. Adiuwant Freund używany jest do produkcji emulsji antygeny typu woda w oleju (ang. water-in-oil). Antygeny przygotowane w ten sposób stymulują wysoką i długotrwałą odpowiedź immunologiczną, co spowodowane jest powolnym uwalnianiem antygeny z emulsji. Mykobakterie zawarte w kompletnym adiuwancie Freund przyciągają makrofagi i inne komórki do miejsca iniekcji, co wzmacnia odpowiedź immunologiczną. Z tego względu kompletny adiuwant Freund używany jest do pierwszej immunizacji, podczas gdy niekompletny adiuwant Freund do następnych.

Adiuwant Freund jest nadal powszechnie stosowany do immunizacji królików co potwierdzają dane literaturowe. Adiuwant Freund nie jest tak problematyczny jak wcześniej sugerowano, jeśli zminimalizuje się nastrzykiwane objętości. Obserwowane w przeszłości problemy z użyciem tego adiuwantu spowodowane były dużymi objętościami wstrzykiwanymi w niezalecane obecnie miejsca. Dodatkowo wcześniej używane adiuwanty Freund charakteryzowały się niższą czystością i były bardziej toksyczne przez co wywoływały reakcje

immunologiczne o ostrzejszym przebiegu.

Z naszych wcześniejszych doświadczeń wynika, że użycie adiuwantu Freund'a, umożliwiło uzyskanie wysokiego miana surowicy i oczyszczenie przeciwciała specyficznego względem N-Hcy-KLH, przy czym nie wywołało zmian behawioralnych królików, wskazujących na ból lub dyskomfort. Obserwowane były jedynie miejscowe zmiany na skórze w miejscu nakłucia w postaci zaczerwienienia i zgrubienia skóry. Próba zmiany stosowanego adiuwantu na inny, wprowadziłaby dodatkowe ryzyko niepowodzenia, co w przypadku nieuzyskania specyficznego przeciwciała, skutkowałoby koniecznością przeprowadzenia immunizacji dodatkowych zwierząt.

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.