

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Wielokierunkowa analiza zmian molekularnych wywołanych uzależnieniem od morfiny u szczurów z wykorzystaniem techniką MALDI IMS
2. Czas trwania projektu: 1.06.2020 – 1.06.2021
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): uzależnienie, morfina, obrazowanie powierzchni, spektrometria
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.

W badaniach chcemy określić molekularne zmiany jakie towarzyszą uzależnieniu od morfiny na modelu szczurzym przy wykorzystaniu obrazowania powierzchni za pomocą techniki MALDI-mass spectrometry imaging (MSI). Pozwala ona zbadać dystrybucję różnego typu cząsteczek w skrawkach tkanki. Stąd możliwe jest zaobserwowanie zmian molekularnych w strukturach mózgu szczura, które do tej pory ze względu np. na brak możliwości ich wyizolowania były pomijane w klasycznych badaniach. Pragniemy skupić się na przekroju strzałkowym, aby uzyskać możliwość obserwacji zmian w jak największej liczbie struktur zaangażowanych w uzależnienie od substancji uzależniających.

MSI, po odpowiednim przygotowaniu skrawka tkanki, pozwala na analizę rozmieszczenia w niej lipidów, białek i związków niskocząsteczkowych oraz na identyfikację poszczególnych substancji w tych grupach (na podstawie wartości m/z i widm fragmentacyjnych). Porównanie wyników uzyskanych dla grupy kontrolnej i doświadczalnej pozwoli na ilościową ocenę zmian zachodzących pod wpływem

uzależnienia w każdej z obrazowanych struktur (Procedura 1).

Zbadanie zmian w lipidomie może pozwolić na wskazanie nowych mechanizmów molekularnych związanych z uzależnieniem od morfiny. Analiza białek pozwoli na zweryfikowanie wyników otrzymanych w badaniach proteomicznych oraz na uzyskanie przestrzennej informacji o zachodzących zmianach.

Bardzo ciekawym aspektem badań powinny być wyniki uzyskane w analizach małych cząsteczek (ATP, ADP, NADPH). Badania proteomiczne wskazują na zmiany w białkach związanych z metabolizmem energetycznym stąd analiza małych cząsteczek może potwierdzić wnioski płynące z badań proteomicznych.

Ponieważ wiadomo, że morfina wywiera toksyczny wpływ na wątrobę i nerki również te organy zostaną pobrane. Tu zostanie przeprowadzona analiza zmian w lipidomie, jako zabezpieczenie – gdyby bardziej subtelne zmiany np. w małych cząsteczkach nie ujawniły się w tkance mózgowej.

Projekt ma charakter badań podstawowych nad układem nerwowym (PB-3).

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Szczur wędrowny, stado Wistar, samce – 20 sztuk

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Przygotowując projekt badawczy sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych PubMed oraz Web of Science (JCR). Wykorzystałam następujące słowa kluczowe: morphine, mass spectrometry imaging, MALDI, metabolome, lipidome, proteome.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam, że:

A. A. A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:

Morfina wpływa na zmiany w proteomie i metabolomie mózgu, jednak do tej pory badania te były prowadzone klasycznymi technikami biochemicznymi. Wyjątkiem jest tu jedna praca, która techniką DESI bada zmiany w lipidomie (Bodzon-Kulakowska A, Marszałek-Grabska M. Kotlinska J. Suder P., et al (2017) Brain lipidomic changes after morphine, cocaine and amphetamine administration - DESI - MS imaging study. Biochim Biophys Acta 1862:686–691). Technika DESI posiada gorsze parametry (mniejszą czułość, mniejszą rozdzielczość przestrzenną) od techniki MALDI-MSI, którą planujemy zastosować. Technika MALDI-MSI umożliwia zobrazowanie profili lipidowych w bardziej wszechstronny sposób. W przeciwieństwie do DESI-MS daje ona również możliwości obserwacji zmian w profilach białek i małych cząsteczek. Dodatkowo w analizach planujemy skupić się na strzałkowym przekroju mózgu tak, żeby uzyskać więcej informacji w porównaniu do poprzedniej pracy, gdzie skupiono się tylko na pojedynczym przekroju czołowym (Bregma -2,04).

A. A. B. Brak jest danych dotyczących:

Brak jest danych dotyczących przestrzennej lokalizacji wskazywanych zmian w profilach białkowych i w małych cząsteczkach reprezentujących metabolom. Klasyczne techniki biochemiczne wymagają w swoim przebiegu homogenizacji tkanki i tracą tą informację na co wskazują chociażby odmienne dane jakie uzyskujemy z badań proteomicznych całego mózgu i poszczególnych struktur. Każda technika analityczna, ze względu na swoją charakterystykę, jest w stanie wskazać również nieco inną grupę związków. Stąd, badając zjawisko uzależnienia od morfiny technikami obrazowania powierzchni za pomocą spektrometrii mas liczymy na uzyskanie nowych informacji o molekularnym działaniu i interakcjach tej substancji.

Przeglądając istniejące piśmiennictwo na temat mechanizmu działania morfiny oraz jej wpływu molekularnego na organizmy żywe, stwierdzam, że zgromadzone dane są niewystarczające i uzasadniają przeprowadzenie planowanych badań.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu:

A/ Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku:

- Uzyskanie danych z proponowanego projektu przyczyni się do poznania zmian molekularnych towarzyszących uzależnieniu od morfiny z uwzględnieniem lokalizacji tych zmian w tkance. Dotyczy to zarówno białek, lipidów jak i małych cząsteczek.
- Dodatkowo uzyskane informacje zostaną skorelowane z danymi z klasycznych eksperymentów proteomicznych dotyczących uzależnienia od morfiny i mogą stanowić potwierdzenie i rozszerzenie uzyskanych wcześniej wyników.

B/ Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na

- Proponowane badania wskażą kluczowe substancje, których ilość istotnie ulega zmianie pod wpływem działania morfiny i tym samym zaburza funkcjonowanie prawidłowego metabolizmu komórki. Po ich zidentyfikowaniu będzie można starać się podjąć takie działania, które pozwolą na przywrócenie zaburzonego metabolizmu do pierwotnego stanu równowagi i tym samym możliwe stanie się znalezienie sposobu na zniwelowanie efektów ubocznych działania morfiny. Niniejsze badania mogą przyczynić się do opracowania nowych strategii walki z poważnym problem społecznym, jakim jest nadużywanie morfiny oraz jego skutkami dla

społeczeństwa. Mogą być również bardzo cenne dla wielu dziedzin nauk medycznych np. toksykologii, farmakologii czy ochrony zdrowia, wszędzie tam, gdzie wykorzystuje się morfinę lub jej pochodne, jako analgetyki.

- Poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów uzależnień prowadzące do opracowania nowej strategii terapii przeciwuзależnieniowych lub detoksykacyjnych stanowią w tym przypadku uzasadnienie konieczności przeprowadzania badań na zwierzętach laboratoryjnych, a bilans korzyści przewyższa wartość cierpienia zwierząt poświęconych w eksperymencie

Przygotowując projekt badawczy zastosowano zasadę 3R.

Zasada zastąpienia:

Jedną z odpowiedzi jaką chcemy uzyskać na skutek przeprowadzonych badań, jest określenie przestrzennego umiejscowienia zmian molekularnych powodowanych przez morfinę w strukturach mózgu. W związku z czym zaplanowane eksperymenty ze względu na swój charakter nie mogą być zastąpione badaniami prowadzonymi w hodowlach komórkowych czy tkankowych *in vitro*. Są to zdecydowanie za proste modele, tracące w swoim przebiegu złożoność związaną z istnieniem i interakcjami struktur mózgowych. Nie pozwolą one na uzyskanie informacji przestrzennej i przyporządkowanie zmian do konkretnych struktur. Jak ważna jest to informacja pokazują chociażby badania proteomiczne, gdzie wyniki uzyskane dla homogenatu z całego mózgu, różnią się od tych uzyskanych dla struktur mózgowych.

Zasada ograniczenia:

- W naszych eksperymentach planujemy wykorzystać 10 szczurów w grupie kontrolnej i 10 szczurów w grupie uzależnionej od morfiny. Z każdego mózgu planujemy pobrać materiał dla co najmniej 5 różnych rodzajów analiz (lipidy, białka, cholesterol, małe cząsteczki, stres oksydacyjny). Pozwoli nam to, poświęcając jedno zwierzę, uzyskać niespotykaną dotychczas, ogromną liczbę informacji. Żeby to było możliwe planujemy wcześniej przeprowadzić optymalizację wszystkich procedur na tkankach dodatkowych, którymi dysponujemy w naszym laboratorium.
- W czasie eksperymentu musimy liczyć się z możliwością utracenia zwierząt na skutek procedur związanych z podawaniem morfiny. W czasie pobierania materiału możliwe są również trudne do przewidzenia i tym samym do uniknięcia sytuacje, takie jak nieprzewidywalne zachowanie tkanki w czasie mrożenia w ciekłym azocie (przypadkowe pęknięcie zamrażanej tkanki), co uniemożliwia jej dalsze wykorzystanie. Niestety zdarza się czasem uszkodzenie samego materiału podczas pobierania – pomimo wysokich kwalifikacji osób pobierających materiał. 10 szczurów kontrolnych i 10 szczurów uzależnionych od morfiny pozwoli nam uzyskać odpowiednią liczbę powtórzeń nawet w przypadku utracenia pojedynczych próbek.
- Dodatkowo zostaną pobrane również inne narządy (wątroba i nerki). W ich przypadku zostanie przeprowadzona analiza zmian w lipidomie, jako swego rodzaju

zabezpieczenie w projekcie – gdyby bardziej subtelne zmiany w stężeniach, dystrybucji lub profilach małych cząsteczek związanych z przemianami energetycznymi nie ujawniły się w tkance mózgowej. Pobrany materiał może również pozwolić na uzyskanie wstępnych wyników dla zmian w profilach białek i małych cząsteczek. Pozwoli to na wykorzystanie w eksperymencie mniejszej ilości zwierząt przy uzyskaniu dużej ilości danych na temat molekularnych zmian towarzyszących uzależnieniu od morfiny

Zasada udoskonalenia:

- Niniejszy projekt badań obejmuje eksperymenty, które zaplanowano tak by maksymalnie ograniczyć cierpienie zwierząt. W celu zminimalizowania cierpień zwierząt harmonogram badań nie uwzględnia procedur z kategorii „dotkliwe”. Wprawdzie w zaplanowanych eksperymentach nie jest możliwe uniknięcie wielokrotnych iniekcji (sól fizjologiczna, morfina), ale wykonywanie ich przez wykwalifikowany personel, stosowanie takich czynności jak habituacja oraz przeprowadzenie wszystkich procedur zgodnie z europejskimi standardami prowadzenia badań na zwierzętach doświadczalnych, przyczynia się do znacznego ograniczenia cierpienia zwierząt. Dodatkowo w eksperymencie zdecydowano się na model uzależnienia, w którym morfina jest podawana raz dziennie, co dodatkowo zmniejsza stres zwierząt.
- Zwierzęta będą utrzymywane w optymalnych warunkach hodowlanych, zapewnionych przez wykwalifikowany personel Ośrodka Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Zatem zapewnione będą możliwie najlepsze warunki życia zwierząt, jak również ich zgodne z wymogami prawnymi, ich uśmiercanie.
- Dodatkowo, żeby zmniejszyć stres zwierząt w czasie trwania doświadczenia w klatkach, w których utrzymywane będą zwierzęta umieszczane będą drewniane klocki oraz tunele, co ma na celu wzbogacenie środowiska szczurów i otrzymanie bardziej wiarygodnych wyników.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną

- TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

☒ NIE

