

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Wpływ MMP-9 na proces epileptogenezy po udarze niedokrwiennym**
2. Czas trwania projektu 5 lat
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **udar niedokrwienny, MMP-9, EEG, marimastat**
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.

Udar niedokrwienny zwany potocznie zawałem mózgu, jest schorzeniem, jest efektem zablokowania przepływu krwi w tętnicy doprowadzającej krew do mózgu. Jego przyczynami mogą być: zakrzep dużej tętnicy w efekcie zaawansowanej choroby miażdżycowej, uszkodzenia małej tętniczki w przebiegu chorób tj. cukrzyca czy nadciśnienie oraz udaru mózgu z zakrzepu pochodzącego z serca w przebiegu niektórych chorób serca. Mimo znanych przyczyn, nie ma skutecznych i uniwersalnych terapii zapobiegania udarom niedokrwiennym mózgu. Jednym z długofalowych skutków udaru niedokrwiennego jest padaczka poudarowa, której występowanie jest pozytywnie skorelowane z wiekiem pacjenta. Nie każdy pacjent, który przeszedł udar mózgu predysponuje do rozwoju padaczki poudarowej takim samym stopniu. Ryzyko zwiększa typ i wielkość udaru wiek pacjenta oraz choroby współistniejące. Dokładna patogeneza napadów i padaczek poudarowych nie została dotychczas poznana.

Badania przeprowadzone do tej pory pokazują, że enzymy zmieniające np. macierz zewnątrzkomórkową są zaangażowane w zmiany poudarowe powstałe w wyniku zamknięcia się naczyń doprowadzające krew do mózgu. Oznacza to, że nie tylko czas reakcji (zgłoszenia się do szpitala z pierwszymi objawami w celu szybkiego odblokowania przepływu krwi) jest istotny, ale również osobniczy poziom enzymów obecnych w macierzy zewnątrzkomórkowej mózgu. Brak jednak jednoznacznych danych określających na czym polega ten udział. Nie wiadomo na przykład, czy obserwowany wzrost w aktywności enzymów w mózgu prowadzi do pogłębienia się skutków udaru. Enzymem przebudowującym macierz zewnątrzkomórkową jest metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (MMP-9), której podwyższony poziom obserwuje się w modelach zwierzęcych udaru niedokrwiennego. Również u ludzi podwyższony poziom MMP-9 obserwowany jest pomiędzy 2 godzinami, a 72 godzinami po udarze. Ponadto wykazano, że myszy z brakiem ekspresji MMP-9 (MMP-9 KO) wykazywały mniejsze uszkodzenie mózgu po udarze niedokrwiennym w tym mniejsze uszkodzenie bariery krwi mózgu. Dotychczas brak jest danych korelujących ryzyko rozwoju padaczki poudarowej z aktywnością MMP-9. Jednakże dane literaturowe oraz nasze poprzednie badania wykazały, iż MMP-9 jest zaangażowane w patogenezę rozwoju padaczki w innych modelach uszkodzenia mózgu tj. urazowe uszkodzenie mózgu. Wyniki naszych badań oraz fakt, że poziom MMP-9 jest podwyższony u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu pozwoliły na wysunięcie hipotezy na której bazuje powyższy wniosek. W związku z powyższym planowany projekt ma na celu weryfikację wpływu enzymów macierzy zewnątrzkomórkowej na rozwój padaczki poudarowej w efekcie udaru niedokrwiennego. Planowane jest opisanie ryzyka rozwoju padaczki poudarowej w zależności od osobniczego poziomu enzymów macierzy zewnątrzkomórkowej oraz próba farmakologicznej modyfikacji poziomu tychże enzymów celem zapobiegania pojawieniu się drgawek.

Przewidywane szkody dla badanych zwierząt: Na każdym etapie prowadzonych doświadczeń u myszy zostanie wywołany udar niedokrwienny. W trakcie operacji zwierzęta są uśpione i znieczulone. Po wybudzeniu może im towarzyszyć objawy bólowe, niedowłady oraz inne skutki niedokrwienia mózgu osobników. W celu (1) opisanie wpływu poziomu ekspresji MMP-9 na ryzyko pojawienia się spontanicznych drgawek (2) opisanie wpływu inhibitora MMP-9 na ryzyko rozwoju padaczki poudarowej myszy przed wywołaniem udaru niedokrwiennego zostaną poddane uprzedniej implantacji elektrod korowych pozwalających na rejestrację zapisu fal mózgowych (EEG). W trakcie operacji zwierzęta są uśpione i znieczulone. Po wybudzeniu może im towarzyszyć dyskomfort i objawy bólowe. Przeprowadzona rejestracja zapisu EEG celem odnotowania obecności spontanicznych drgawek,

podczas której myszy będą przebywać w specjalnie do tego celu przygotowanych klatkach bytowych, myszy będą podłączone do sprzętu rejestrującego, może przyczynić się do powstania dyskomfortu psychicznego. W trakcie jednego z etapów doświadczeń zwierzętom jest podawany lek hamujący aktywność enzymu MMP-9. Procedura podania (zastrzyk) może wiązać się z dyskomfortem. Końcowy etap planowanych badań stanowią analizy histologiczno-molekularne, które można przeprowadzić jedynie post mortem. W tym celu zwierzęta poddane zostaną znieczuleniu ogólnemu, po którym nastąpi uśmiercenie przez dekapitację lub perfuzję.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu zostaną wykorzystane:

1. myszy fenotypu dzikiego C57BL6/WT – **136 sztuk**
2. linia myszy z zahamowaną ekspresją MMP-9 (C57BL6/MMP-9 KO) oraz mysz o fenotypie dzikim (C57BL6/MMP-9 WT) – **96 sztuk**
3. linia myszy ze zwiększoną ekspresją MMP-9; jest to mysz z wprowadzoną dodatkową kopią genu kodującego MMP-9 (C57BL6/MMP-9 OE) oraz mysz o fenotypie dzikim (C57BL6/MMP-9 OE-WT) – **96 sztuk**

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

W ramach planowania projektu badawczego sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazie danych PubMed. Wykorzystano słowa kluczowe: animal models AND stroke, stroke AND epilepsy, extracellular matrix AND stroke, matrix metalloproteinase-9 AND post-stroke epilepsy.

Na podstawie przeszukanej literatury badawczej stwierdzono, że mimo postępującej wiedzy i dostępności technik badawczych brak jest istotnych postępów w zrozumieniu roli enzymów macierzy zewnątrzkomórkowej w rozwoju skutków udaru niedokrwiennego jaką jest padaczka poudarowa. Udar niedokrwienny dotyczący jednej z półkul mózgowych powoduje zmiany degeneracyjne związane z brakiem dopływu krwi do tkanki mózgowej. Nie ma dotychczas doniesień opisujących korelację zmian w aktywności enzymów macierzy zewnątrzkomórkowej a ryzykiem rozwinięcia padaczki poudarowej.

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

Ponadto korelacja powyższych czynników (wzrost poziomu enzymów macierzy zewnątrzkomórkowej oraz rozwój padaczki poudarowej) oraz zastosowanie terapii polegającej na chemicznym modyfikowaniu ilości aktywnych enzymów macierzy zewnątrzkomórkowej w mózgu, pozwoli nam na podjęcie terapeutycznej próby zapobiegania drgawkom. Planowany projekt ma na celu sprawdzenie wpływu enzymu metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP-9) na ryzyko rozwoju padaczki poudarowej oraz farmakologicznej próby zapobiegania pojawieniu się spontanicznych drgawek o podłożu epileptycznym.

Projekt zakłada przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach o rozwiniętym układzie nerwowym, a więc myszach. Badanym narządem będzie mózg. Nie jest możliwe zastąpienie narządu, którego funkcjonowanie nie jest do końca poznane. Konsekwencje udaru niedokrwinnego są procesem złożonym opartym na aspekcie fizycznym związanym z przebudową połączeń wewnątrz mózgu, jak i zjawiskiem neurodegeneracji. Nie jest możliwe zatem, zastąpienie gryzoni niższymi kręgowcami. Myszy ponadto są często stosowanym i dobrze zwalidowanym pod względem behawioralnym modelem w neurobiologii. Pozwala to na odniesienie wyników bieżących badań od istniejącej już literatury i dzięki temu wzbogacenie naszej wiedzy.

Zwierzęta laboratoryjne w hodowli są przyzwyczajane do kontaktu z człowiekiem i późniejszy kontakt z eksperymentatorem nie powoduje u nich dużego dystresu. Zastosujemy też dobrze opracowane i opisane procedury, co pozwoli uniknąć przeprowadzania doświadczeń testowych.

Dane uzyskane z proponowanego projektu pozwolą na rozwinięcie teoretyczne i poznawcze istniejącej wiedzy w zakresie modeli doświadczalnych uszkodzeń mózgu jakimi jest m.in. udar niedokrwieny, a także wykorzystanie uzyskanej wiedzy w badaniach aplikacyjnych.

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.