

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Wprowadzenie i optymalizacja mysiego modelu podwiązania dróg żółciowych (ang. bile duct ligation, BDL)**

2. Czas trwania projektu **17 miesięcy**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) encefalopatia wątrobowa, neurotransmisja, BDL, SAT1

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.

Encefalopatia wątrobowa (EW) to zespół objawów neuropsychiatrycznych powstałych w wyniku uszkodzenia wątroby. Objawy choroby dotyczą zaburzeń fizycznych i psychicznych obejmując śpiączkę prowadzącą niekiedy do śmierci. Może dotyczyć ~70% pacjentów z chorobami wątroby.

Patomechanizm EW nie został dokładnie poznany, jednak głównym czynnikiem wywołującym chorobę jest wysokie stężenie amoniaku, spowodowane nieprawidłową detoksykacją w wątrobie. Objawy klinicznej w ostrej EW wynikają m.in. z nierównowagi między neurotransmisją pobudzającą i hamującą. W modelach ostrej EW główną uwagę kieruje się na nadmierną stymulację receptora glutaminergicznego, marginalizując rolę receptora GABA-ergicznego. W warunkach przewlekłej EW wypadkowa działania (netto) neurotransmisji pobudzającej i hamującej jest przesunięta w kierunku

hamującej, co tłumaczone jest nadmierną stymulacją receptorów GABA-ergicznych. Ważnym czynnikiem, który może wpływać na pracę tego układu jest neuronalny transporter SAT1, dostarczający glutaminę będącą substratem do syntezy neurotransmiterów. Białko to potencjalnie może odgrywać istotną rolę w patogenezie przewlekłej EW.

Po weryfikacji podstawowych parametrów biochemicznych w modelu BDL u myszy dzikich, podwiązanie dróg żółciowych zostanie wprowadzone u myszy z wyciszonym neuronalnym transporterem glutaminy – SAT1. Umożliwi to zbadanie wpływu braku transportera SAT1 na parametry biochemiczne dokumentujące tempo rozwoju przewlekłej EW w 2 punktach czasowych.

Szkody dla zwierzęcia, które wynikają z zabiegu podwiązania dróg żółciowych i planowanego doświadczenia to ból spowodowany zastrzykami i interwencją chirurgiczną, ból wywołany raną pooperacyjną i obecnością szwów, dyskomfort i pogorszenie stanu zdrowia spowodowane rozwijającą się żółtaczką i śmierć jako szkoda ostateczna.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

28 myszy C57Bl/6J, samców oraz 28 Myszy C57BL/6J samców (szczep TgH(flSAT1)xTgH(Cre-ERT) (SAT1-KO)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując przedkładany projekt sprawdzono stan istniejącej wiedzy w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych PUBMED, SCOPUS i Google Scholar wykorzystując słowa kluczowe: hepatic encephalopathy, chronic liver failure, bile duct ligation, SAT1 glutamine transporter.

Po przeszukaniu baz danych dotyczących metod alternatywnych ograniczających liczbę zwierząt bądź całkowicie je wykluczających, postanowiono zrealizować plan badawczy z wykorzystaniem najmniejszej z możliwych liczby zwierząt, która zapewni osiągnięcie celu badawczego i statystycznego,

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

ze szczególną dbałością o stosowanie zasad 3R.

Po analizie danych literaturowych stwierdzono, że encefalopatia wątrobowa jest zespołem zaburzeń neuropsychiatrycznych towarzyszącym ostrym oraz przewlekłym uszkodzeniom wątroby. Zaburzenie funkcji ośrodkowego układu nerwowego jest zwykle wywołane neurotoksycznym działaniem amoniaku, który zaburza między innymi przewodnictwo nerwowe oraz powoduje obrzęk mózgu. Szacuje się że marskość wątroby jest na 14 miejscu wśród przyczyn zgonów dorosłych na świecie będą przyczyną 1,03 miliona zgonów rocznie (Lozano i wsp.; Lancet. 2012;380:2095–2128), w tym w Europie odpowiada za 170,000 zgonów rocznie (Blachier i wsp., J Hepatol. 2013;58:593–608).

Planując doświadczenia, kierowano się zasadą 3R (ang. replacement, reduction, refinement), dbając o polepszenie bytu i humanitarne traktowanie zwierząt doświadczalnych.

Replacement (zastąpienie)

Na etapie planowania projektu badawczego przeszukano bazy danych pod kątem metod alternatywnych, ograniczających liczbę zwierząt, bądź całkowicie je wykluczających. Złożoność tego schorzenia, w którym niewydolność wątroby prowadzi do zmian neurologicznych nie pozwala na wykorzystanie organizmów prostszych lub ograniczenie się wyłącznie do hodowli komórkowych. Badanie mechanizmów i potencjalnych terapii encefalopatii wątrobowej u człowieka niesie ze sobą konieczność użycia gryzoni jako organizmów modelowych. Ponadto najwyższy stopień złożoności układu nerwowego wyklucza zastosowanie hodowli komórek pierwotnych, czy tym bardziej linii komórkowych.

Reduction (redukcja)

Wobec braku odpowiednich modeli nie-zwierzęcych postanowiono zrealizować plan badawczy z wykorzystaniem najmniejszej z możliwych liczby zwierząt, która zapewni osiągnięcie celu badawczego i statystycznego. Przewidziano zastosowanie czułych i wiarygodnych technik do oznaczeń biochemicznych, w celu zminimalizowania rozrzutu w próbach badawczych, co zmniejsza liczbę zwierząt niezbędnych do uzyskania wymaganej liczby powtórzeń. Doświadczenia zaplanowano na

jednorodnej (wiek, masa ciała) grupie samców myszy, co zminimalizuje rozrzut w badanych parametrach. Według przeprowadzonej analizy statystycznej mniejsza niż proponowana liczba zwierząt nie pozwoliłaby na uzyskanie wiarygodnych statystycznie wyników.

Od zwierząt w eksperymencie pobrane zostaną nie tylko mózg (do analizy wykorzystane zostaną kora mózgowa oraz hipokamp), ale także krew i wątroba, aby maksymalnie rozszerzyć zakres parametrów biochemicznych do analizy. Ponadto, tkanki pobrane z każdego zwierzęcia będą gromadzone w zamrażarce niskotemperaturowej, co pozwoli na ich wielokrotne użycie.

Refinement (udoskonalenie)

Wykorzystywane zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku, a metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak, aby ograniczały do minimum albo eliminowały ból, cierpienie, dystres lub możliwość trwałego uszkodzenia organizmu tych zwierząt. Zwierzęta poddane ingerencji chirurgicznej będą otrzymywały środki przeciwbólowe, natomiast stan zwierząt będzie monitorowany na każdym etapie doświadczenia, aby ewentualnie przerwać cierpienie i dokonać eutanazji. Zwierzęta będą miały zapewnione urozmaicone środowisko poprzez zastosowanie ściółki o różnej grubości wiórów, plastikowych domków dla myszy, płatków kosmetycznych służących jako substrat do budowania gniazd. Zwierzęta będą codziennie monitorowane pod kątem oceny parametrów określających samopoczucie i stan zdrowia. Ściółka będzie regularnie wymieniana (co 2-3 dni lub częściej w razie potrzeby).