

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Rola akwaporyny 4 w obrzęku mózgu w mysim modelu ostrej encefalopatii wątrobowej oraz regulacja jej ekspresji i/lub lokalizacji przez kaweolinę 1 i kinazę białkową p38 MAPK”

2. Czas trwania projektu: 18 miesięcy

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) encefalopatia wątrobowa, obrzęk mózgu, akwaporyna 4, kaweolina 1, kinaza p38MAPK

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) jest schorzeniem neuropsychiatrycznym, obejmującym zaburzenia poznawcze i ruchowe. Objawy mogą wahać się od zaburzeń nastroju, snu czy koncentracji przez dezorientację i zaburzenia świadomości, aż do śpiączki i śmierci. Najpoważniejszym powikłaniem, stanowiącym bezpośrednie zagrożenie życia, jest obrzęk mózgu. Przyczyną zaburzeń układu nerwowego w przebiegu EW jest gromadzenie się we krwi i mózgu toksyn w konsekwencji uszkodzenia wątroby, co może nastąpić wskutek zatrucia toksynami, lekami, zakażenia wirusami. Mimo licznych badań, mechanizmy molekularne leżące u podstaw obrzęku mózgu w EW, nie zostały w pełni poznane.

Celem naukowym projektu (badania podstawowe nad układem nerwowym), jest zbadanie, jak akwaporyna 4 (Aqp4), białko transportujące wodę do/z komórek mózgu, może przyczyniać się do powstawania obrzęku mózgu w EW. Z wcześniejszych badań wiadomo, że ilość Aqp4 w mózgu może zmieniać się pod wpływem EW. Ponieważ nie wiadomo jednak, czy jest to przyczyną czy skutkiem patologicznych zmian, badane będzie czy w EW:

- zmienia się rozmieszczenie Aqp4 w mózgu
- białko sygnałowo-strukturalne kaweolina 1 i białko sygnałowe p38MAPK biorą udział w regulacji Aqp4.

Badania zostaną przeprowadzone na mysim modelu ostrej EW, który polega na uszkodzeniu wątroby podaniem substancji uszkadzającej wątrobę – azoksymetanu (AOM). Wnioskowane o zaakceptowanie procedury obejmują:

- wywołanie EW za pomocą AOM i pobranie tkanek (mózg, krew) do badań molekularnych, mających na celu zbadanie poziomu wymienionych białek w mózgu i sposobu ich rozmieszczenia
- wykonanie elektroencefalogramu (EEG), obrazującego aktywność neuronalną i pomiar ciśnienia wewnątrzczaszkowego (ICP), którego podwyższenie może świadczyć o powstaniu obrzęku mózgu.

Oczekuje się, że przedstawione badania przyczynią się w dalszej przyszłości do zaprojektowania terapii nakierowanej na leczenie obrzęku mózgu, przy jednoczesnym poszerzeniu ogólnej wiedzy na temat regulacji ekspresji i lokalizacji Aqp4 w mózgu.

Myszy poddane działaniu AOM początkowo są jedynie osowiałe i unikają ruchu, a od ok. 16 godz. od podania AOM postępuje spowolnienie reakcji na bodźce (test dotykania wibrysów, uszu, powieki).

Po zabiegu implantacji elektrod EEG/sondy ICP mysz wybudza się z narkozy po ok. 1 godzinie, przez kolejne kilka godzin wydaje się być oszołomiona i wyraźnie mniej ruchliwa, natomiast na drugi dzień po prawidłowo wykonanym zabiegu mysz zachowuje się normalnie, jest ciekawska, ma apetyt, implant na głowie nie utrudnia jej poruszania się, czy groomingu.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

66 samców myszy domowej szczepu C57Bl/6J

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując przedkładany projekt badawczy, sprawdzono stan istniejącej wiedzy w zakresie objętym wnioskiem w bazach danych PUBMED, EBSCO, SCOPUS i Google Scholar, wykorzystując słowa kluczowe i frazy: hepatic encephalopathy, hyperammonemia, azoxymethane, brain (o)edema, intracranial pressure, electroencephalography (EEG), neurological score, aquaporin 4, caveolin 1, p38 MAPK (kinase), hepatic encephalopathy/hyperammonemia mouse models, astrocytes.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że:

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

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:

nie podejmowano dotychczas badań dotyczących regulacji ekspresji Aqp4 przez Cav1 i/lub p38MAPK w przebiegu EW w mysim modelu azoksymetanowym i w żadnym innym, dlatego za zasadne uznaje się podjęcie badań proponowanych w przedkładanym wniosku.

B. Brak jest danych dotyczących roli Cav1 i/lub p38MAPK w przebiegu EW w mysim modelu azoksymetanowym i w żadnym innym. Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

A/ Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku poznania roli Aqp4 w powstawaniu obrzęku mózgu w przebiegu ostrej EW, na przykładzie mysiego modelu azoksymetanowego.

B/ Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na wykazaniu, że obserwowane zmiany ekspresji Aqp4 są związane z funkcją Cav1 /lub p38MAPK, pozwoli na znalezienie mechanistycznego punktu uchwytu dla potencjalnej terapii, skierowanej przeciwko formowaniu się obrzęku mózgu, m.in. u osób z ostrą dysfunkcją wątroby lub narażonych na epizody EW wskutek przewlekłego uszkodzenia detoksykacyjnych funkcji wątroby.

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. Uznano jednak, że nie istnieją odpowiednie modele nie-zwierzęce: obrzęk mózgu jest zjawiskiem złożonym, o komponentach cytotoksycznej jak i wazogennej, co jest nie do odwzorowania w warunkach *in vitro*, nawet organotypowych. Co więcej, odwzorowanie uszkodzenia wątroby przy pomocy amoniaku i cytokin jest bardzo dalekie od sytuacji natywnej i jest stosowane w bardzo ograniczonym zakresie. Ponadto, metody *in vitro* nie pozwalają na wiarygodne badanie obrzmiewania astrocytów – zakładanie hodowli astrocytów mysich lub szczurzych wymaga użycia osesków, a metoda immunohistochemiczna, na której najbardziej można polegać, jest niezwykle czasochłonna i mało ekonomiczna z punktu widzenia etycznego (dużo zwierząt dla niewielu preparatów). Alternatywna metoda, polegająca na wychwycie znakowanej glukozy do astrocytów, jest niepowtarzalna i niewiarygodna. Z tych przyczyn poświęcanie osesków/zwierząt dla optymalizacji metod *in vitro* czy *ex vivo* (np. skrawki organotypowe) wydaje się niecelowe.

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 badania poziomu badanych białek (Aqp4, Cav1, p38MAPK), w celu zminimalizowania rozrzutu w próbach badawczych, co zmniejsza liczbę zwierząt niezbędnych do uzyskania wymaganej liczby powtórzeń. Według przeprowadzonej analizy statystycznej mniejsza niż proponowana liczba zwierząt nie pozwoliłaby na uzyskanie wiarygodnych statystycznie wyników.

Od zwierząt planowanych do wykorzystania pobrane zostaną nie tylko mózgi, ale także krew, aby maksymalnie rozszerzyć zakres parametrów biochemicznych do analizy (potwierdzenie hiperamonemii). Ponadto, tkanki pobrane z każdego zwierzęcia będą bankowane w zamrażarce niskotemperaturowej, co pozwoli na ich wielokrotne użycie. Co istotne, ponieważ w Zakładzie Neurotoksykologii stosowano już ten model, badacze będą – w miarę możliwości – dalej korzystać ze

wspólnego banku tkanek, co istotnie ogranicza liczbę zwierząt. Informacje o planowanym doświadczeniu i bankowaniu mózgów i krwi zostanie zamieszczone w bazie www.bazaprobek.pl, aby inni badacze mogli pozyskać dla siebie inne tkanki. Liczebność grup wyliczona na podstawie analizy mocy testu statystycznego nie uwzględnia dostępności materiału już zbankowanego w Zakładzie Neurotoksykologii. Zostaną dołożone wszelkie starania, aby wykorzystać już dostępny materiał i zminimalizować liczbę zwierząt, szczególnie mających podlegać perfuzji. Na już zbankowanych próbkach zostanie przeprowadzony test barwień immunohistochemicznych, który może wykazać zbędność tej czynności.

Refinement (udoskonalenie)

Wykorzystywane zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku. Ponieważ po podaniu azoksymetanu (AOM) u zwierząt niemal od razu obserwuje się obniżenie aktywności lokomotorycznej, do klatki dodatkowo wkładane są namoczone pelet i woda w żelu, w celu ułatwienia przyjmowania pokarmu i wody.

Stan zwierząt będzie monitorowany na każdym etapie doświadczenia, aby ewentualnie przerwać cierpienie i dokonać eutanazji. Wszelkie manipulacje (wyjmowanie zwierząt z klatki w celu podania glukozy czy badanie odruchu wyprostnego) będą wykonywane delikatnie, z uwzględnieniem pogarszającego się stanu zwierząt, co daje się zaobserwować w postaci przykurczonej pozycji ciała mniej więcej od 14 godziny od podania AOM.

Żadne doświadczenie nie będzie trwało dłużej niż 24 godziny od podania AOM (przy czym część zostanie uśmiercona wcześniej, przed wystąpieniem poważnego pogorszenia stanu neurologicznego), przy czym, jak opisano poniżej, zwierzę zostanie humanitarnie uśmiercone w przypadku gwałtownego, przedwczesnego pogorszenia się stanu zdrowia.

Zwierzęta poddane procedurze 2 i 3, tj. implantacji elektrod/sondy ICP będą przebywać w pomieszczeniu o regulowanych przepływie powietrza i rytmie dobowym, w oddzielnych klatkach aby uniemożliwić wzajemne uszkodzanie implantów utrudniające gojenie ran. Będą monitorowane kilka razy dziennie, m.in. aby decydować o ewentualnym przedłużaniu podawania ketoprofenu. Ketoprofen będzie podawany wraz z 5% roztworem glukozy w soli fizjologicznej, aby zapobiegać odwodnieniu osłabionych po zabiegu zwierząt i usprawnić regenerację. Z tej samej przyczyny, do klatki wkładane będą namoczone pelet i woda w żelu, w celu ułatwienia przyjmowania pokarmu. Na butelkę zakładany będzie dłuższy kapsel (smoczek), aby ułatwić picie.