

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Rola kinazy mTOR w zapobieganiu skutkom neurodegeneracyjnym u dorosłych zwierząt z płodowym zespołem alkoholowym (FAS)”
2. Czas trwania projektu 01.09.2019r. - 01.09.2020r.
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) FAS, mTOR, autofagia, test labiryntu kołowego Barnes'a, odwrócone uczenie, szczury
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.

Etanol (EtOH) jest teratogeny i jego spożywanie w czasie ciąży obarczone jest poważnymi konsekwencjami. Najbardziej wrażliwy na działanie EtOH jest rozwijający się mózg. Alkohol powoduje utratę neuronów (neuroapoptozę), co prowadzi do poważnych neurokognitywnych zaburzeń u dzieci, których matki spożywały EtOH w czasie ciąży. Zaburzenia te mogą przybierać różną postać, a najcięższym z nich jest płodowy zespół alkoholowy (FAS), którego skutki mogą być widoczne zaraz po urodzeniu, w okresie dorastania lub w życiu dorosłym. Szczególnie niebezpieczne jest spożywanie EtOH przez kobiety ciężarne w czasie III trymestru

cięży, gdyż prowadzi do uszkodzenia czynności poznawczych, funkcji wykonawczych oraz procesów nauki i pamięci. Odpowiednikiem III trymestru u szczurów jest ich pierwsze 10 dni życia.

Mechanizm teratogennego działania EtOH nie jest dokładnie poznany. Aby móc przeciwdziałać negatywnym skutkom prenatalnej ekspozycji na alkohol (PAE) konieczne jest wyjaśnienie podstawowych mechanizmów i opracowanie skutecznych strategii terapeutycznych. Jednym z mechanizmów, stanowiącym ochronę dla ośrodkowego układu nerwowego (OUN) jest autofagia (proces samooczyszczania komórkowego z uszkodzonych lub niepotrzebnych składników), która redukuje proces neuroapoptozy. Ostatnie badania wykazały, że mTOR- kinaza serynowo-treoninowa jest silnym inhibitorem autofagii, a przewlekłe spożywanie EtOH nasila jej aktywność. Oznacza to, iż podczas PAE procesy naprawcze OUN są hamowane, czego konsekwencją jest m.in. FAS.

Celem naszego projektu jest przebadanie wpływu rapamycyny- głównego inhibitora mTOR na rozwój FAS, wywołany podaniem EtOH szczurom między 4 a 9 dniem życia. Skuteczność działania rapamycyny będzie oceniana w teście pamięci (Barnes-maze) u dorosłych szczurów (65 dzień życia).

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Szczury Wędrownie, stado Wistar, 15 dorosłych, ciężarnych samic oraz ich potomstwo obu płci tj. ok.150 osesków (Zaplanowana grupa doświadczalna obejmuje 12 samic i 12 samców- 6 grup x 24 = 144, osesków urodzonych od zakupionych matek)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Przygotowując projekt badawczy sprawdzona została istniejąca wiedza w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych PubMed, Web of Science (JCR) oraz Science Direct.

Wykorzystano następujące słowa kluczowe:

FAS, autofagia, etanol, mTOR, test labiryntu kołowego Barnes' a, szczur

Przeglądając istniejące piśmiennictwo dotyczące wpływu kinazy mTOR C1 na mechanizm teratogenego i neurotoksycznego działania etanolu stwierdzono, że

- A. A) Zgromadzone dane na temat wpływu autofagii oraz kinazy mTOR C1 na zaburzenia pamięci wywołane FAS są niewystarczające i uzasadniają przeprowadzenie planowanych badań.
- B. B) Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na poszerzenie wiedzy teoretycznej w zakresie mechanizmu działania kinazy mTOR C1 na zaburzenia pamięci występujące w zespole FAS.

C. C) Potwierdzenie oraz zbadanie wpływu kinazy mTOR C1 oraz autofagii na zaburzenia pamięci wywołane FAS może przyczynić się do wynalezienia nowych grup leków, które mogą być wykorzystane w leczeniu zaburzeń kognitywnych u dzieci z zespołem FAS.

D.

- Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:
 - ☐ Zbadanie roli kinazy mTOR w procesach autofagii biorących udział w powstaniu zespołu FAS
 - ☐ Wykazanie roli kinazy mTOR C1 w zaburzeniach pamięci u dorosłych szczurów z rozwiniętym zespołem FAS
 - ☐ Wykazanie nowych mechanizmów (nie związanych z mTOR) w powstawaniu zespołu FAS.
 - ☐ Wykazanie nowego kierunku terapii zaburzeń neurotoksycznych wywołanych EtOH

Przygotowując projekt badawczy zastosowałam zasadę 3R:

REPLACEMENT – zastąpienie doświadczeń na zwierzętach metodami in vitro (hodowle komórkowe, tkankowe), zastąpienie zwierzętami o niższym stopniu rozwoju ewolucyjnego;

Ze względu na zaplanowane testy behawioralne niemożliwe jest zbadanie wpływu enzymu kinazy serynowo-treoninowej1 (mTOR1) na neurotoksyczne działanie etanolu, rozwój FAS oraz zaburzenia pamięci (szczególnie widocznych w hipokampie) za pomocą techniki in vitro. Niewskazane jest także zastąpienie szczurów wędrownych zwierzętami o niższym stopniu rozwoju ewolucyjnego, z tego względu, że doświadczenia te nie dostarczą wyników tak wiarygodnych jak te, które przeprowadzone są na szczurach i które będzie można odnieść do problemów klinicznych obserwowanych u ludzi. Badania te mogą przyczynić się do rozwoju nowej terapii poalkoholowych objawów uszkodzeń płodu u dzieci.

REDUCTION – zmniejszenie liczby zwierząt poprzez lepsze wykorzystanie metod statystycznych;

W badaniach zaplanowano najmniejszą liczbę zwierząt (potomstwo 15 ciężarnych matek szczurzych) pozwalającą na uzyskanie wiarygodnych wyników behawioralnych, stwarzających możliwość analizy statystycznej. Jest to liczba zwierząt w grupie, ustalona zgodnie z wymogami stawianymi przez zasadę 3R, która jednocześnie pozwala na uzyskanie wiarygodnych, powtarzalnych, dających się opracować statystycznie wyników (analiza wariancji jedno-i dwuskładnikowa ANOVA oraz testu post-hoc Tukey'a). Przyjęto, że liczebność jednego miotu szczura wędrownego to 6 -12 osobników, w związku z tym, aby uzyskać liczbę osesków niezbędną do przeprowadzenia doświadczenia (5 grup x 24 (12 samic i 12 samców w grupie) =120) potrzebnych jest 15 ciężarnych samic.

Przy określeniu ilości zwierząt oraz grup biorących udział w eksperymentach wykorzystano informacje zawarte na stronie: <http://biomath.info/power/index.htm>. Minimalizacja liczby

zwierząt w grupie doświadczalnej była możliwa również dzięki ograniczeniu zmienności wśród zwierząt poprzez stały mikroklimat w Zwierzętarni podczas doświadczenia, jednorodność wieku, płci oraz masy ciała wśród wszystkich osobników

REFINEMENT - zmiana procedury eksperymentalnej na przysparzającą zwierzętom mniej cierpień;

Zaplanowane modele eksperymentalne mają na celu ograniczenie cierpienia zwierząt. Z tego względu używane testy znajdują się w kategorii umiarkowanych. W przypadku wystąpienia objawów niepożądanych w trakcie doświadczenia takich jak: zaburzenia oddechowe po nieprawidłowym podaniu i.g. (objawiające się między innymi świszczącym oddechem gryzoni, lub spłyconym oddechem) lub zaburzenia ruchowe po nieprawidłowym podaniu i.p. (objawiające się między innymi przykurczami kończyn lub ogólnym spowolnieniem ruchowym,) które mogłyby powodować cierpienie zwierząt, podjęte zostaną czynności zgodnie z zasadami wcześniejszego, humanitarnego zakończenia procedury. W celu zapobiegania wystąpienia dodatkowych działań niepożądanych oraz nieprzewidzianych efektów, dawki wszystkich zastosowanych substancji zostały wybrane po dokładnym przeglądzie literatury. W niniejszym projekcie nie ma możliwości uniknięcia wielokrotnych iniekcji, które poszerzą wiedzę nt. potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za zaburzenia kognitywne powstałe u dzieci po spożywaniu etanolu przez ciężarne matki. Zwierzęta przebywać będą w odpowiednich warunkach, zgodnych z wytycznymi dla tego typu doświadczeń, zatem zapewnione będą jak najlepsze warunki życia zwierząt, jak również zgodne z wymogami uśmiercanie. Środowisko, w którym będą przebywały zwierzęta zostanie wzbogacone o tunele oraz klocki drewniane w celu poprawy dobrostanu zwierząt.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną

TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy

TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

☒ NIE