

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Określenie roli aktywacji układu dopełniacza i jej hamowania w mechanizmie regeneracji i w zaburzeniach funkcji siatkówki oka w modelu selektywnego, przemijającego uszkodzenia nabłonka barwnikowego siatkówki.**
2. Czas trwania projektu: **01.11.2017-30.10.2022**
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **degeneracja siatkówki, neuroregeneracja, układ dopełniacza, zwyrodnienie siatkówki związane z wiekiem, okulistyka eksperymentalna.**
4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): **A.**

A. Badania podstawowe - Narządy zmysłów (skóra, oczy, uszy)

- B. Badania translacyjne lub stosowane
- C. Badania wymagane przepisami lub w produkcji
- D. Ochrona środowiska naturalnego w interesie zdrowia i dobrostanu ludzi i zwierząt
- E. Badania mające na celu zachowanie gatunku
- F. Kształcenie na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych
- G. Badania z zakresu medycyny sądowej
- H. Utrzymanie kolonii stabilnych linii zwierząt zmienionych genetycznie, niewykorzystywanych do celów innych procedur
- I. Badania wymagane przepisami lub w produkcji

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.

Choroby degeneracyjne siatkówki stanowią ważny problem społeczny i ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Zwyrodnienie siatkówki dotyka około 25 milionów ludzi na świecie. Przewiduje się, że w ciągu najbliższych 25 lat liczba ta potroi się. Statystyki są alarmujące, gdyż uważa się, że około 2020 r. odsetek osób niewidomych z powodu chorób degeneracyjnych siatkówki w populacji europejskiej wyniesie 19,1%. Choroby te mają charakter progresywny, w ciągu kilku lat od momentu rozpoznania prowadzą do postępującej ślepoty i trwałego inwalidztwa. Stanowi to olbrzymi problem dla pacjentów, ich opiekunów, systemu opieki zdrowotnej oraz całego społeczeństwa. Są to schorzenia obecnie nieuleczalne ze względu na brak terapii przyczynowej, gdyż uwarunkowane są wieloma czynnikami, w tym środowiskowymi i genetycznymi. Ustalenie przyczyny, czynników ryzyka

oraz patogenezy chorób degeneracyjnych siatkówki stwarza nadzieję na wytworzenie w przyszłości skutecznych metod leczenia tych nieuleczalnych do tej pory schorzeń.

Celem naukowym niniejszego projektu jest poznanie roli aktywacji układu dopełniacza w zaburzeniach funkcji siatkówki oka w modelu selektywnego, przemijającego uszkodzenia nabłonka barwnikowego siatkówki oraz jego roli w mechanizmie „pouszkodzeniowej” neuroregeneracji siatkówki oka. Zadanie to będzie zrealizowane poprzez szczegółową ocenę kinetyki zmian funkcjonalnych i morfologicznych w obrębie uszkodzonej siatkówki oka u myszy z indukowanym zahamowaniem aktywności dopełniacza poprzez podanie do środowiska siatkówki oka egzogenego inhibitora składnika C3 układu dopełniacza.

Planowane badania należą do badań podstawowych o umiarkowanym stopniu dotkliwości, zostaną wykonane z wykorzystaniem zwierząt w obrębie dwóch procedur. Przewidywane szkody podczas planowanego doświadczenia mogą wiązać się z dystresem zwierząt (nakłucie tkanek). Doświadczenie zostało zaplanowane w oparciu o zasadę 3R, które zmniejszają prawdopodobieństwo wystąpienia szkód u zwierząt doświadczalnych.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

| |
|--|
| Mysz; szczep C57BL/6: 96 osobników obu płci (48 samic i 48 samców) |
|--|

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt doświadczenia sprawdziłem istniejącą literaturę w zakresie objętym wnioskiem projektowym w bibliograficznych bazach danych, tj. PubMed, Web of Science i EBSCO, nt. metod i wyników badań, w których **uwzględniono zasadę 3R**. Do tego celu wykorzystałem słowa kluczowe: *animal models, in vivo studies, in vitro testing, retinal degeneration, retinal regeneration, acute retinal injury, models of retinal damage, selective RPE injury, sodium iodate, complement, complement activation, exogenous inhibitors of complement, apoptosis*. Projekt doświadczenia był także omawiany w ramach konsultacji specjalistycznej z samodzielnymi pracownikami naukowymi Zakładu Patologii Ogólnej oraz Kliniki Okulistyki Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie w celu dokonania merytorycznej oceny oraz zasadności projektowanego protokołu badań.

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

Projekt doświadczenia został zaplanowany w oparciu o zasadę 3R. Zgodnie z zasadą zastąpienia (**ang. Replacement**), w celu określenia cytotoksyczności różnych dawek jodanu sodu, zostały przeprowadzone badania przedwstępne z wykorzystaniem linii komórek nabłonka barwnikowego ARPE-19. Zastosowanie modelu komórkowego umożliwiło wybór odpowiedniej dawki jodanu sodu do indukcji uszkodzenia w określonym zakresie i nasileniu. Jednakże uzyskane wyniki wymagają dalszego potwierdzenia na poziomie całego organizmu. Stąd też konieczność zastosowania odpowiedniego modelu zwierzęcego. Na podstawie przeszukiwania istniejącej literatury stwierdziłem, że niniejszy projekt badawczy najlepiej będzie wykonać na myszach C57BL/6. Myszy szczepu C57BL/6 o umaszczeniu czarnym to wielofunkcyjny model powszechnie wykorzystywany w badaniach związanych z eksperymentalną degeneracją siatkówki oka. Siatkówki myszy C57BL/6 zawierają dużą ilość pigmentu w nabłonku barwnikowym, co jest szczególnie uzasadnione w przypadku indukcji uszkodzenia siatkówki na określonym poziomie jego nasilenia za pomocą określonej dawki substancji uszkadzającej. W tym przypadku inne czynniki uszkodzenia pochodzące ze środowiska zewnętrznego, jak światło dzienne, nie mają istotnego wpływu na stan siatkówki u badanych myszy i nie występuje zjawisko sumacji czynników uszkadzających. Zastosowanie tych myszy w naszym doświadczeniu umożliwi kontrolowaną indukcję uszkodzenia siatkówki z następczą detekcją siatkówkowej regeneracji pod wpływem endogennych mechanizmów ochronnych i naprawczych. Procedury mniej inwazyjne jak również użycie mniejszej liczby zwierząt mogłyby spowodować niepowodzenie całego doświadczenia i konieczność jego powtórzenia.

Aby dodatkowo zminimalizować współczynnik zmienności do doświadczenia zostaną wykorzystane zwierzęta w tym samym wieku i o zbliżonej masie ciała. Do określenia liczebności próby wykorzystałem narzędzie multimedialne ze strony: www.biomath.info pozwalające wyliczyć niezbędną, najmniejszą liczbę osobników przy największym prawdopodobieństwie uzyskania wiarygodnych wyników (**zasada ograniczenia, ang. Reduction**). Użycie mniejszej liczby zwierząt mogłoby spowodować niepowodzenie całego doświadczenia i konieczność jego powtórzenia.

Zgodnie z zasadą udoskonalenia (ang. Refinement), w trakcie realizacji procedur badawczych stosowane będą przyżyciowe, nieinwazyjne metody, pozwalające na ocenę morfologii (OCT) oraz funkcji bioelektrycznej (ERG) siatkówki oka. Również **zgodnie z zasadą udoskonalenia (ang. Refinement)** utrzymanie zwierząt nastąpi w warunkach środowiskowych odpowiednich do ich gatunku i potrzeb oraz zastosowane będą metody ograniczające do minimum albo eliminujące ból i dystres. Ze

względu na planowany czas trwania doświadczenia oraz konieczność całkowitego unieruchomienia zwierząt podczas każdego badania przewiduje się konieczność zastosowania krótkotrwale działających środków przeciwbólowych i znieczulających, a także nawilżających gałkę oczną i stanowiących osłonę antybiotykową. Nie przewiduje się konieczności wcześniejszego humanitarnego zakończenia eksperymentu. Niemniej jednak przez cały okres trwania eksperymentu prowadzony będzie zeszyt, w którym zapisywane będą obserwacje wyglądu i zachowań zwierząt. W przypadku stwierdzenia nietypowego zachowania, podejrzenia odczuwania bólu, cierpienia lub dystresu po konsultacji z lekarzem weterynarii niezwłocznie zastosowane zostaną odpowiednie środki farmakologiczne.

Podczas całego eksperymentu zwierzętom zapewniony będzie najlepszy standard życia. Zwierzęta będą miały zapewniony stały dostęp do urozmaiceń wzbogacających środowisko bytowe, tj. drewniane klocki do ścierania zębów i tunele z celulozy. Opiekę nad nimi będą sprawować wyłącznie osoby do tego celu specjalnie przeszkolone, posiadające odpowiednie certyfikaty. Aby wykluczyć dodatkowy stres u zwierząt liczba personelu zostanie ograniczona do niezbędnego minimum.