

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „Minocyklina jako czynnik hamujący ferroptozę w modelu doświadczalnym krwotoku podpajęczynówkowego u szczura”

2. Czas trwania projektu 60 miesięcy

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) udar krwotoczny, SAH, Minocyklina, Ferroptozę, neuroprotekcja

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

Krwotok podpajęczynówkowy stanowi istotny problem kliniczny i pozostaje przyczyną śmierci oraz kalectwa bardzo wielu chorych. Główną przyczyną choroby jest pęknięcie tętniaka, który u ludzi powstaje najczęściej w przedniej części koła tętniczego Willisa.

Celem stosowania substancji neuroprotektoryjnych jest poprawa stanu klinicznego i złagodzenie ubytków neurologicznych, które pojawiają się na skutek uszkodzenia mózgu. Wylew podpajęczynówkowy charakteryzuje się silnie zindywidualizowaną, wielosystemową i wieloaspektową patogenezą. W praktyce klinicznej nadal brakuje skutecznej metody leczenia skutków wystąpienia krwotoku u ludzi, a szczególnie późniejszych powikłań neurologicznych. Jedną z takich substancji o udowodnionych właściwościach neuroprotektoryjnych jest minocyklina, antybiotyk od lat stosowany w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Od kilku lat wskazuje się na jego terapeutyczne działanie w

schorzeniach o podłożu neuronalnym, między innymi w udarze krwotocznym. Nasze wcześniejsze doświadczenia wykazały, że wywiera działanie neuroprotekcyjne, ale nadal nie znamy mechanizmu działania minocykliny w udarze krwotocznym.

W udarze krwotocznym krew tętnicza poza naczyniami tętniczymi ulega rozkładowi i zostaje wtedy uwolniona duża ilość jonów żelaza, które inicjują produkcję reaktywnych form tlenu, RTF (potocznie wolnych rodników). Nagromadzenie RTF w komórkach mózgowia może prowadzić w ostateczności do ich śmierci, ferroptozy. Jedną z najważniejszych własności minocykliny jest jej zdolność do neutralizacji reaktywnych form tlenu i wiązania jonów żelaza. Dlatego określenie czy za maszyną śmiercią komórek w udarze krwotocznym stoi ferroptozą oraz czy podlega ona działaniu minocykliny, umożliwi nam określenie dominującej przyczyny silnych ubytków neurologicznych występujących po krwotoku oraz pomoże je ograniczać a nawet im zapobiegać. Minocyklina jest antybiotykiem od lat stosowanym w klinice, dlatego dokładne zbadanie jej działania pozwoli również na możliwie szybkie wdrożenie terapii do kliniki.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Planowane badania zostaną przeprowadzone na 120 (8-12 tygodniowych) samcach Szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*) szczepu Wistar.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Uwzględnienie zasady zastąpienia:

Eksperymenty, które mają na celu określenie roli procesu ferroptozy w patomechanizmie krwotoku podpajęczynówkowego prowadzącym do śmierci komórek mózgowia w ostrej fazie pokrwotocznej, muszą być przeprowadzane na zwierzętach ze względu na to, że oczekiwany efekt działania leku obserwowany jest w strefie uszkodzonej poprzez podanie autologicznej krwi tętniczej. Efektu tego nie sposób odtworzyć podczas korzystania z innych metod, jak choćby z hodowli komórkowej *in vitro*, ponieważ nie istnieją alternatywne metody hodowli komórkowych modelujących wpływ krwi tętniczej na komórki mózgowia, jak choćby w przypadku komórkowego modelu udaru niedokrwinnego oraz nie potrafimy syntetyzować sztucznej krwi. Dodatkowo udar krwotoczny jest chorobą układu naczyniowego

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

mózgowia, a wśród małych zwierząt doświadczalnych jedynie szczurza anatomia układu krwionośnego jest najbardziej zbliżona do ludzkiej. Co więcej zwierzęta te są na tyle duże, że możliwe jest przeprowadzenie procedury założenia domózgowego kaniuli oraz podania krwi do zbiornika podpajęczynówkowego nad skrzyżowaniem nerwów wzrokowych. Szczury Wistar są duże i bardzo spokojne oraz dobrze znoszące tego typu zabiegi.

Uwzględnienie zasady ograniczenia:

Naszym celem długoterminowym jest dokładne zbadanie udziału procesu ferroptozy w patomechanizmie udaru krwotocznego mózgu oraz wyznaczenie kluczowych markerów białkowych tego procesu w celu prognozowania wtórnych komplikacji pokrwotocznych, które są niezwykle ważnym problemem klinicznym i są najczęstszą przyczyną śmierci pacjentów lub pogorszenia stanu neurologicznego w późnej fazie poudarowej. Zastosowanie minocykliny w dwóch z sześciu grup badawczych pozwoli na weryfikację kolejnego z mechanizmów niebakteriobójczego działania minocykliny, co pozwoli na lepsze poznanie tej substancji i wyjaśnienie jej neuroprotektoryjnego wpływu na mózgowie. Ze względu na niewielką ilość doniesień naukowych i nowatorskość badań zastosujemy dotychczas wykorzystywane przez nas metody doświadczalne do weryfikacji naszego problemu badawczego.

W proponowanych badaniach zostaną zastosowane nowoczesne metody pozwalające na maksymalnie dokładną ocenę i wyciągnięcie wiążących wniosków z wyników uzyskanych na podstawie doświadczeń na najmniejszej możliwej liczbie osobników. Łączna liczba zwierząt ($n=120$), w każdej z grup eksperymentalnych po 20 osobników (grupy 1-6) jest związana z wykonywaniem oznaczeń których nie można wykonać jednocześnie. Procedury immunocytochemiczne wykonuje się tylko na utrwalonym materiale natomiast procedury biochemiczne na nieutrwalonej tkance. Liczba wykorzystywanych zwierząt w planowanym badaniu pilotażowym została ograniczona do minimum pozwalającego na zrealizowanie zamierzonego celu oraz na rzetelne przeprowadzenie analizy statystycznej i późniejsze wnioskowanie.

Uwzględnienie zasady udoskonalenia:

Katedra i Zakład Fizjologii Wydziału lekarskiego w Katowicach od 15 lat prowadzi intensywne badania nad dwiema najważniejszymi chorobami układu naczyniowego, udarem niedokrwiennym i

krwotocznym. Zespół prowadzący tego typu badania i zabiegi wywołujące wymienione wyżej choroby posiada ogromną wiedzę i doświadczenie w ich wykonywaniu. W czasie doświadczenia zwierzęta będą w znieczuleniu ogólnym co spowoduje, że nie będą odczuwały ani bólu ani stresu. Wywołanie udaru krwotocznego mózgu z uwagi na brak unerwienia czuciowego kory mózgu nie powoduje u zwierząt bólu również po zabiegu. Centrum Medycyny Doświadczalnej posiada zatrudnionego na stałe lekarza weterynarii co pozwala na ciągłe monitorowanie zdrowia i kondycji zwierząt po zabiegu i w razie potrzeby natychmiastową reakcję. Warunki w jakich będą przetrzymywane zwierzęta, to jest: standard klatek, temperatura, wilgotność powietrza oraz wzbogacone środowisko pozwalają na maksymalny komfort zwierząt uczestniczących w doświadczeniu.

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.