

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: **Zastosowanie techniki MALDI-TOF w identyfikacji biomarkerów narażenia i efektu po podaniu szczurom ochratoksyny**

2.Czas trwania projektu: 2019.06.03-2020.06.30

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): ochratoksyna, nerka, nefrotoksyczność, kancerogenność, MALDI-TOF

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.

Ochratoksyna (OTA) jest jedną z najczęściej występujących mykotoksyn, obecną m.in. w zbożu i produktach zbożowych, roślinach strączkowych, kawie i suszonych owocach. Ma działanie neurotoksyczne oraz nefrotoksyczne. Według klasyfikacji IARC (Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem, ang. International Agency for Research in Cancer) OTA należy do grupy 2B – czynniki przypuszczalnie rakotwórcze dla ludzi. Szczególnie często podnoszona jest rola ochratoksyny w rozwoju raka nerki. Nie wiadomo jednak, czy OTA działa bezpośrednio genotoksycznie, czy też wystąpienie raka nerki jest wtórne do uszkodzenia narządu i ma związek z działaniem cytotoksycznym ochratoksyny.

Badania zostaną przeprowadzone na 10 szczurach Wistar. Po okresie aklimatyzacji zwierzętom z grupy badanej podawana będzie per os ochratoksyna codziennie przez 7 dni. Następnie zwierzęta zostaną uśmiercone oraz pobrane zostaną nerki, wątroba, mózg i osocze. Narządy zostaną przebadane

nowoczesną techniką obrazowania ze spektrometrią mas (MALDI-TOF). Zostaną w nich określone biomarkery narażenia (ochratoksyna i jej metabolity) oraz biomarkery efektu (niskocząsteczkowe i białkowe czynniki, m.in. zapalne i prozapalne, markery cytotoksyczności). Dodatkowo, materiał genetyczny wyizolowany z narządów zostanie przebadany w kierunku adduktów kwasu deoksyrybonukleinowego oraz stopnia metylacji DNA. Także do tych badań będzie zastosowana technika MALDI-TOF.

Przeprowadzone badania pozwolą powiązać miejsce kumulowania się ochratoksyny z siłą działania toksycznego. Dzięki temu możliwe będzie ustalenie roli OTA i jej metabolitów w wywoływaniu określonych efektów. Wyniki zweryfikują proponowane podejście badawcze, wykorzystujące technikę MALDI-TOF, ze szczególnym uwzględnieniem obrazowania MS w badaniach toksyczności ochratoksyny oraz zostaną wykorzystane przy opracowaniu projektu badawczego na ten temat.

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Liczba zwierząt: 10

Gatunek: szczur wędrowny (*Rattus norvegicus*) Wistar

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED; ScienceDirect, Google Scholar. Wykorzystałam słowa kluczowe: ochratoxin (ochratoksyna), rat (szczur), MALDI-TOF, nephrotoxicity (nefrotoksyczność), carcinogenesis (nowotworzenie).

Ochratoxyna jest szeroko badanym związkiem, zarówno w doświadczeniach na zwierzętach, jak i przy wykorzystaniu modeli *in vitro*. Wciąż jednak nie jest wiadomo, czy jej działanie pronowotworowe jest wynikiem działania genotoksycznego. Brak jest także prac wiążących narażenie ze specyficznymi efektami działania tego ksenobiotyku. Nowoczesne narzędzie badawcze, jakim jest spektrometria mas MALDI-TOF dotychczas było w niewielkim stopniu wykorzystywane w badaniach nad toksycznością OTA. Uzyskanie w jednym doświadczeniu dużej liczby danych, które następnie zostaną ze sobą skorelowane pozwoli na postawienie hipotez na temat związków przyczynowo skutkowych w działaniu ochratoksyny na nerkę.

### Zastąpienie

Celem projektu jest powiązanie biomarkerów narażenia (określenie miejsc i stopnia kumulacji ochratoksyny i jej metabolitów) oraz biomarkerów efektu (określenie miejsc występowania czynników prozapalnych i pronowotworowych oraz markerów cytotoksyczności). Ponieważ ważnym wynikiem doświadczenia będzie określenie biodystrybucji ochratoksyny oraz identyfikacja narządów i tkanek, w

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

których biomarkery efektu występują w największym natężeniu, nie jest możliwe przeprowadzenie doświadczenia w inny sposób niż poprzez podanie OTA zwierzętom. W związku z tym nie jest możliwe zastąpienie modelu eksperymentalnego z użyciem zwierząt innym.

### **Ograniczenie**

Biorąc pod uwagę uwarunkowania metodyczne oraz wymogi testów statystycznych, w zaplanowanym doświadczeniu liczba zwierząt została ograniczona do minimum uzasadnionego statystycznie. Pobrane narządy zostaną przebadane w wielu kierunkach tak, żeby optymalnie wykorzystać materiał i nie powtarzać doświadczenia. Jednocześnie zdecydowano o pobraniu szerokiej gamy tkanek i narządów (mózgi i nerki jako narządy docelowe działania toksycznego, wątroba jako główny organ detoksykujący oraz osocze jako tkanka określająca systemowe narażenie i efekt). Dzięki temu nie wystąpi konieczność powtórzenia doświadczenia, nawet jeśli w trakcie badań pojawią się nowe hipotezy.

### **Udoskonalenie**

Wykorzystywane zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku. Będą poddane okresowi aklimatyzacji do nowych warunków. Prowadzona będzie stała kontrola stanu zdrowia zwierząt i ich aktywności. Przed rozpoczęciem doświadczeń podczas 14-dniowego okresu adaptacji do warunków laboratoryjnych stosowana będzie czynność handlingu, w trakcie której zwierzęta przyzwyczajane będą do obecności eksperymentatora i jego dotyku, co pozwoli na zminimalizowanie stresu zwierząt podczas dalszych etapów procedury doświadczenia. W celu urozmaicenia warunków bytowania szczurów w trakcie eksperymentu wykorzystana zostaną następujące elementy wzbogacenia środowiska: drewniane klocki oraz kolby, rurki kartonowe oraz niewielki kamień w celu ścierania pazurów. Nie przewiduje się wystąpienia jakichkolwiek niepożądanych reakcji w trakcie doświadczenia, jednak lekarz weterynarii będzie przygotowany na taką ewentualność. Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta zostaną poddane eutanazji w humanitarny sposób.

## 8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☒ NIE

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.