

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Wykorzystanie nowych niskocząsteczkowych inhibitorów w zależnym od kinazy PERK szlaku UPR dla leczenia jaskry pierwotnej otwartego kąta”.

2. Czas trwania projektu: 01.09.2020r - 01.09.2025r. (5 lat).

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): jaskra, PERK, retikulum endoplazmatyczne, inhibitory PERK

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): A (PB1)- Badanie podstawowe, Rodzaj badania: neurodegeneracja, niezależenie od badanego układu,

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.

Cel eksperymentu stanowi dokładne scharakteryzowanie roli kinazy PERK w patogenezie jaskry oraz opracowanie innowacyjnej strategii leczenia jaskry opartej na wykorzystaniu niskocząsteczkowych inhibitorów kinazy PERK. Dotychczas wykazano, iż nasilony stres retikulum endoplazmatycznego (ER) powstający w wyniku agregacji nieprawidłowo sfałdowanych białek, m.in. zmutowanej miocyliny, w lumen ER oraz późniejsza aktywacja pro-apoptotycznej drogi szlaku adaptacyjnej odpowiedzi na stres (UPR), stanowią kluczowe czynniki prowadzące do rozwoju jaskry na podłożu molekularnym. Indukcja apoptozy komórek gałki ocznej bezpośrednio skutkuje zwiększeniem oporności na odpływ cieczy wodnistej przez strukturę sieci beleczkowania w kącie przesączania oraz wzrostem ciśnienia

wewnątrzgałkowego będącego obecnie głównym czynnikiem ryzyka rozwoju jaskry, jak również celem leczenia. Zatem główna hipoteza niniejszego projektu badawczego zakłada, iż zahamowanie aktywności kinazy PERK przez działanie niskocząsteczkowych inhibitorów kinazy PERK może spowodować zmniejszenie przedłużającego się stresu ER, a tym samym ochronić komórki gałki ocznej przed apoptozą oraz uszkodzeniami powstałymi w wyniku rozwoju jaskry. Planowane badanie zostanie przeprowadzone z wykorzystaniem modelu mysiego CrePERK<sup>loxP/loxP</sup>. Wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego zostanie wywołany u myszy za pomocą 0.1% deksametazonu. Następnie analizie zostanie poddana aktywność niskocząsteczkowego inhibitora kinazy PERK pod kątem jego zdolności do redukcji zmian jaskrowych i apoptozy komórek w tkankach oka w mysim modelu jaskry. Przeprowadzenie badań w modelu *in vivo* pozwoli na potwierdzenie wyników uprzednio uzyskanych w toku przeprowadzonych analiz w modelu *in vitro*, które nie stanowią dokładnych wskaźników prognostycznych dla rozwoju jaskry. Eksploracja tego zagadnienia otwiera nowe możliwości scharakteryzowania czynników prowadzących do rozwoju jaskry na podłożu molekularnym. Obecnie w terapii jaskry stosowane jest jedynie leczenie objawowe, natomiast planowane badania stanowią pierwszą próbę opracowania terapii przeciwjaskrowej z wykorzystaniem inhibitorów PERK działającej już na podłożu molekularnym choroby. Zwierzętom zostanie również wykonana morfologia krwi w celu oznaczenia profilu cytokinowego krwi oraz określenia toksyczności ogólnoustrojowej badanego związku. Po dokonaniu eutanazji zostanie pobrany materiał do badań immunohistochemicznych (gałki oczne).

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

*Mus musculus* – mysz domowa; szczep: Eif2ak3tm1.2Drc/J (PERK loxP), 78 myszy płci męskiej

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

### **Zasada zastąpienia:**

Eksperymenty w pierwszym etapie badań zostały przeprowadzone w komórkowym modelu *in vitro*, jednak modele te nie stanowią dokładnych wskaźników prognostycznych dla procesów związanych z patogenezą jaskry. Zatem jedyną metodą badania procesów prowadzących do rozwoju i późniejszej

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

progresji jaskry są eksperymenty w modelu *in vivo* z zastosowaniem zwierząt doświadczanych. Niniejszy projekt badawczy został zweryfikowany pod kątem istniejącej wiedzy w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych ScienceDirect, Web of Science (JCR) oraz PUBMED. W celu osiągnięcia zaplanowanych celów, doświadczenia na zwierzętach laboratoryjnych są niezbędne. Eksperymenty w modelu *in vitro* na liniach komórkowych badanych związków o potencjalnym działaniu inhibicyjnym wobec kinazy PERK dostarczają jedynie informacji na temat szlaków metabolicznych komórki. Jednakże, badania te nie pozwalają na ocenę właściwości przeciwjaskrowych badanych związków bez udziału zwierząt laboratoryjnych. Ponadto ocena działań niepożądanych badanej substancji o potencjale terapeutycznym również wymaga użycia organizmów żywych.

#### **Zasada ograniczenia:**

W zaplanowanych eksperymentach zostanie użyta minimalna liczba zwierząt niezbędna do przeprowadzenia zaplanowanych badań eksperymentalnych w niniejszym projekcie. Dalsza minimalizacja grup mogłaby doprowadzić do otrzymania mało znaczących statystycznie pomiarów, co zmniejszyłoby wiarygodność otrzymanych wyników. Dla wyznaczenia niezbędnej liczebności próby do porównania średnich w dwóch próbach niezależnych przyjęto założenia: poziom istotności  $\alpha=0,05$ , docelowa moc testu 85%. Na podstawie danych literaturowych określono rząd wielkości średniego ciśnienia wewnątrzgałkowego dla zdrowej populacji myszy, wynoszące około 15,5 mmHg, a dla grupy z wywołanym wzrostem ciśnienia wewnątrzgałkowego za pomocą 0.1% deksametazonu - około 22,4 mmHg. Ustalono również wielkość rozrzutu wyników pomiarów wynoszącą 25-30%. Zatem rozrzut mierzony odchyleniem standardowym przyjęto jako wynoszący 5,45 mmHg. Przy tak określonych założeniach wyliczona niezbędna liczebność próby wynosi 13 jednostek. Określenie niezbędnej liczebności prób wykonano w programie STATISTICA wersja 10 (nr licencji: AXAP 109E735901A10-K).

#### **Zasada udoskonalenia:**

Eksperymenty na zwierzętach będą przeprowadzone przez osoby z dużym doświadczeniem w sposób, który ograniczy do minimum stres oraz dyskomfort zwierząt. Wszystkie czynności zostaną wykonane zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej. Ponadto, aby maksymalnie ograniczyć zwierzętom ból w czasie eksperymentów wszelkie procedury zostaną wykonane szybko oraz z zastosowaniem odpowiednich metod znieczulenia. Procedury będą przeprowadzane w sposób opanowany, spokojny, z

wcześniejszym oswojeniem zwierzęcia. Zwierzęta będą przetrzymywane w warunkach odpowiednich dla potrzeb gatunku w bardzo dobrze wyposażonych pomieszczeniach Zwierzętarni Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi spełniających wszelkie wymagania dotyczące zwierząt laboratoryjnych. Miejsca bytowania zwierząt zostaną wzbogacone różnorodnymi papierowymi zabawkami w celu zmniejszenia ich niepokoju. Po zakończonych pracach eksperymentalnych zwierzęta doświadczalne zostaną uśmiercone w sposób humanitarny.

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.