

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Wpływ chlorowodorku tipiracilu (chlorowodorku 5-chloro-6- (2-iminopirolidyn-1-yl) metylo-2,4 (1H, 3H) -pirymidynodionu), inhibitora fosforylasy tymidynowej na przebieg procesów niedokrwienia i reperfuzji OUN u szczurów**

2. Czas trwania projektu **20.06.2020 – 20.06.2025**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): niedokrwienie/reperfuzja, mózg, tętnice szyjne, tipiracil, szczur Wistar

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.

Fosforylaza tymidynowa (TYMP) to enzym odpowiedzialny za procesy angiogenezy i hamowanie apoptozy. Odgrywa też ważną rolę w aktywacji płytek i rozwoju zakrzepicy. Wykazuje ponadto silne działanie hamujące na komórki glejowe i jest jednym z czynników odpowiadających za przerwanie bariery krew-mózg. Wykazano, że ekspresja TYMP wzrasta w neuronach po uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym (IR).

Celem badania jest ocena wpływu selektywnego inhibitora fosforylasy tymidynowej - chlorowodorku tipiracylu (chlorowodorku 5-chloro-6- (2-iminopirolidyn-1-yl) metylo-2,4 (1H, 3H) -

pirymidynodionu) na tkankę nerwową mózgu szczurów poddaną IR.

Badanie zostanie przeprowadzone na szczurach szczepu Wistar. Po uśpieniu i założeniu kaniuli żyły ogonowej obydwie tętnice szyjne wspólne zostaną wyizolowane, a w grupach poddanych niedokrwieniu – podwiązane. Po 20 min przepływ zostanie wznowiony (reperfuzja) na 24 godziny. Podczas niedokrwienia i reperfuzji szczury w grupach badanych otrzymają chlorowodorek tipiracilu dootrzewonowo. Po reperfuzji zwierzęta zostaną poddane eutanazji, tkanka mózgowa zostanie wyizolowana i utrwalona celem dalszej oceny histopatologicznej oraz oznaczenia różnych parametrów oceniających jej żywotność. Procedury zostały zaplanowane tak, aby w miarę możliwości ograniczyć dystres zwierząt.

Uzyskane wyniki pozwolą odpowiedzieć na pytanie, czy zahamowanie aktywności fosforylasy tymidynowej zmniejszy nasilenie uszkodzeń w tkance mózgowej szczurów powstałych w wyniku przejściowego niedokrwienia i reperfuzji. Planowane badanie umożliwi także ocenę mechanizmu działania tego związku w OUN

Klasyfikacja celu doświadczenia: badania podstawowe (A) – układ nerwowy (PB3)

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

48 szczurów Wistar

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

Przygotowując niniejszy projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED, Google Scholar, ScienceDirect, Web of Science (JCR). Wykorzystałam słowa kluczowe: cerebral ischemia/reperfusion, tipiracyl, thymidine phosphorylase, rat. Na podstawie analizy piśmiennictwa stwierdzam że:

A. Wykazana w badaniach *in vitro* i *in vivo* rola fosforylasy tymidynowej w patogenezie uszkodzeń niedokrwienno-reperfuzyjnych tkanki mózgowej, a zwłaszcza w aktywacji płytek krwi i rozwoju zakrzepicy sugeruje, że selektywny inhibitor tego enzymu może posiadać właściwości neuroprotecyjne

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

w tym typie uszkodzenia

B. Dotychczas nie przeprowadzono badań oceniających chlorowodorku tipiracilu (chlorowodorku 5-chloro-6- (2-iminopirolidyn-1-ylo) metylo-2,4 (1H, 3H) -pirymidynodionu) inhibitora fosforylasy tymidynowej na tkankę nerwową mózgu szczurów poddaną niedokrwieniu i reperfuzji. Fakt ten potwierdza **nowatorski** charakter planowanych badań

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

A. rozwinięcie poznawcze istniejącej wiedzy dotyczącej działania chlorowodorku tipiracilu (chlorowodorku 5-chloro-6- (2-iminopirolidyn-1-ylo) metylo-2,4 (1H, 3H) -pirymidynodionu) z uwzględnieniem jego roli w ochronie tkanki mózgowej warunkach niedokrwienia i reperfuzji (IR)

B. przybliżenie potencjalnego mechanizmu neuroprotektoryjnego działania chlorowodorku tipiracilu poprzez analizę różnych parametrów oceniających nasilenie uszkodzenia tkanki mózgowej

### **Podczas planowania doświadczenia uwzględniono zasadę 3R**

**Zasada zastąpienia** – nie można zastąpić zwierząt w tym badaniu (nie da się osiągnąć celu bez wykorzystania zwierząt)

W badaniach *in vitro* można ocenić mechanizm działania nowej, potencjalnie korzystnej substancji. Jednak modele te nie uwzględniają niestety złożoności procesów chorobowych występujących w żywym organizmie. Ze względu na fakt, że podczas niedokrwienia i reperfuzji mózgu mamy do czynienia z bardzo złożonymi mechanizmami uszkodzenia, z obecnością m.in. ogólnoustrojowych procesów zapalnych i stresu oksydacyjnego, przerwaniu bariery krew-mózg, zaburzeń krzepnięcia nie można przeprowadzić weryfikacji hipotez badawczych bez wykorzystania zwierząt

**Zasada ograniczenia** – liczba zwierząt w niniejszym badaniu została ograniczona do poziomu niezbędnego dla osiągnięcia celów. Aby zrealizować wymienione wyżej cele w niniejszym badaniu zaplanowano 4 grupy zwierząt. Dobrany został powszechnie akceptowany i wykorzystywany model, pozwalający na uzyskanie powtarzalnych wyników. Liczba zwierząt w badaniu została ograniczona do niezbędnego minimum i jest podyktowana wiarygodnością metod analizy statystycznej

Zakładając średnią populacyjną jednego z parametrów oznaczanego dla szczurów szczepu Wistar w 4 godzinie reperfuzji wieku 2-3 miesięcy wynoszącą  $0,73 \pm 0,17 \mu\text{mol/l}$  (założenia oparte o wcześniej

wykonywane badania – zgoda LKE 21/2008, 12/2010, 47/2011, 80/2012) oraz zakładaną minimalną różnicę wynoszącą 0,21 przy maksymalnym prawdopodobieństwie błędu I rodzaju  $\alpha=0,05$  i zakładanej mocy docelowej testu  $\beta=0,8$  wymagana liczebność grupy (n) wynosi 12 (obliczenia wykonano przy pomocy STATISTICA Software, version 13.1, from StatSoft, Inc.)

**Zasada udoskonalenia** – przy planowaniu niniejszego badania uwzględniono utrzymywanie zwierząt w optymalnych warunkach dostosowanych do ich gatunku oraz wykonanie poszczególnych czynności przez doświadczony i dobrze przeszkolony personel stale podnoszący swoje kwalifikacje. Metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak, aby ograniczały do minimum albo eliminowały ból, cierpienie, dystres lub możliwość trwałego uszkodzenia organizmu. W metodyce doświadczania zastosowano takie metody zmniejszenia dystresu, jak: znieczulenie ogólne w trakcie czynności mogących wywołać dystres zwierząt – przerwanie ciągłości tkanek szyi, izolacja naczyń szyjnych, niedokrwienie/reperfuzja tkanki mózgowej i jej izolacja, wzbogacone środowisko, umiejętności eksperymentatorów/opiekunów, właściwa opieka, monitorowanie stanu zwierzęcia w zwierzętarni i w trakcie przebiegu doświadczania, humanitarny koniec doświadczania, właściwa eutanazja. Spośród dostępnych modeli doświadczalnego niedokrwienia mózgu wybrano opisaną w literaturze procedurę o najmniejszej dotkliwości.

W trakcie trwania badania szczury będą przebywały w warunkach zapewniających dobrostan zwierząt. Szczury będą przebywały po dwa w klatce (wysokość klatki 18 cm, powierzchnia podłogi 0,5 m<sup>2</sup>) ze wzbogaceniami, z wolnym dostępem do wody i paszy, z zachowaniem cyklu dobowego (12 godzin dzień, 12 godzin noc), w stałej temperaturze otoczenia (21-24°C). Osoby, które będą opiekowały się zwierzętami mają doświadczenie w opiece nad szczurami.

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.