

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: Badanie roli białka HMGB-1 (high mobility group box protein-1) w mechanizmie gorączki wywołanej aseptyczną nekrozą tkanek

2.Czas trwania projektu: 2 lata

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): gorączka, stan zapalny, białko HMGB-1, lipopolisacharyd, szczur

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.

HMGB-1 jest obecnie jednym z najintensywniej badanych białek, którego rolę w mechanizmach immunologicznych odkryto stosunkowo niedawno. Wykazano, iż jest aktywnie wydzielane przez komórki biorące udział w reakcji zapalnej i gorączkowej pod wpływem stymulacji produktami mikroorganizmów takimi jak lipopolisacharyd (LPS). Może być również uwalniane biernie w wyniku nekrozy i rozpadu komórek. Pełni wówczas rolę cząsteczki sygnałowej informującej o uszkodzeniu. Uwolnione białko HMGB-1 rozpoznawane jest przez receptory błonowe, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji kaskady sygnałowej prowadzącej do uruchomienia mechanizmów immunologicznych, między innymi syntezy pro-zapalnych cytokin. Mimo wyników licznych badań, wciąż poszukiwany jest model doświadczalny odpowiedni do badania biologicznej roli HMGB-1 w procesach zapalnych.

Celem doświadczeń jest określenie roli białka HMGB-1 w mechanizmie gorączki wywołanej aseptyczną nekrozą tkanek, która towarzyszy między innymi uszkodzeniom mięśni lub zamkniętym złamaniom kości oraz w uwrażliwieniu na czynniki o charakterze infekcyjnym, jakie jest jej następstwem.

W ramach doświadczeń planowane jest zbadanie zmian osoczkowego stężenia białka HMGB-1 u szczura w przebiegu gorączki po podskórnej iniekcji terpentyny. Zbadany zostanie również wpływ neutralizacji tego białka za pomocą przeciwciał anti-HMGB-1 na gorączkowy wzrost temperatury po podaniu terpentyny oraz na przebieg gorączki endotoksynowej indukowanej lipopolisacharydem dwie doby po iniekcji terpentyny.

Badania dostarczą informacji o dużym znaczeniu poznawczym i praktycznym. Pozwolą odpowiedzieć na pytanie, czy białko HMGB-1 stanowi czynnik zaangażowany w genezę gorączki aseptycznej a tym samym, czy gorączka aseptyczna może stanowić poszukiwany model doświadczalny do badania biologicznej roli HMGB-1. Wykażą ponadto, czy badane białko może być markerem wewnętrznych uszkodzeń o aseptycznym przebiegu prowadzących do uwrażliwienia organizmu na działanie czynników infekcyjnych.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniach planowane jest wykorzystanie 60 szczurów rasy WISTAR Cmd : (WI)WU, samców

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED; Google Scholar; ScienceDirect;

Wykorzystałem słowa kluczowe: HMGB-1/ fever/ inflammation/ turpentine/ sterile abscess/ lipopolysaccharide/ biotelemetry/ rat/ peripheral blood mononuclear cells

A. Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że: opisywane we wniosku doświadczenia stanowią oryginalne eksperymenty i nie powielają istniejących wyników badań.

B. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: istnieją przesłanki literaturowe

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

świadczące o ważnej roli, jaką białko HMGB-1 odgrywa w procesach zapalnych. Ze względu na właściwości potęgujące odpowiedź immunologiczną, jak również na fakt, iż może być uwalniane biernie z komórek nekrotycznych, można przypuszczać, że stanowi ważny czynnik uczestniczący w genezie gorączkowego wzrostu temperatury towarzyszącemu aseptycznym urazom. Hipoteza badawcza postawiona we wniosku jest zatem zasadna.

C. Brak jest danych dotyczących: zmian osoczkowego stężenia białka HMGB-1 w modelu gorączki aseptycznej indukowanej podskórną iniekcją terpentyny. Nie badano również roli tego białka w genezie nadwrażliwości na LPS indukowanej aseptyczną nekrozą.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na rozwinięcie istniejącego zasobu wiedzy o biologicznej roli białka HMGB-1 oraz praktyczne jej zastosowanie. Doświadczenia dadzą odpowiedź na pytanie, czy gorączka indukowana aseptyczną nekrozą tkanek jest poszukiwanym modelem do badań nad rolą białka HMGB-1 w procesach zapalnych oraz czy białko to winno być rozpatrywane jako marker wewnętrznych urazów, który przyczynia się do rozwijania silniejszej reakcji gorączkowej w odpowiedzi na czynniki infekcyjne.

Uwzględnienie zasady zastąpienia: Użycie zwierząt bezkręgowych w opisywanych doświadczeniach jest niemożliwe ze względu na fakt, iż ich temperatura ciała jest zmienna i zależy od temperatury otoczenia oraz zewnętrznych źródeł ciepła. Istnieje również małe podobieństwo anatomiczne i fizjologiczne z człowiekiem. W związku z powyższym uzyskane wyniki nie mogłyby być rozpatrywane w ujęciu aplikacyjnym.

Proces gorączkowy przebiegający w żywym organizmie jest złożonym mechanizmem wymagającym współdziałania układu nerwowego, endokrynowego i immunologicznego. Tym samym, badanie gorączki wymaga podejścia integracyjnego, zakładającego oznaczenie wielu różnych parametrów biologicznych. Z tego też względu doświadczenia *in vitro* skupiające się na molekularnym podłożu reakcji gorączkowej mogą stanowić jedynie uzupełnienie i nie mogą całkowicie zastąpić badań z wykorzystaniem modeli zwierzęcych.

Uwzględnienie zasady ograniczenia: Planowana we wniosku liczba zwierząt stanowi minimalną ilość podyktowaną względami statystycznym, na podstawie której można weryfikować hipotezy doświadczalne. W doświadczeniach ujęto grupy kontrolne, wyłącznie takie, jakie są konieczne do interpretacji otrzymanych wyników. W celu ograniczenia liczby zwierząt zastosowany zostanie układ

doświadczalny ograniczający zmienność warunków. Użyte zostaną zwierzęta pochodzące z tej samej hodowli, w tym samym wieku, płci i o zbliżonej masie ciała. Zapewnione zostaną stałe warunki bytowania. Używany w doświadczeniach system biotelemetryczny pozwala na prowadzenie pomiaru temperatury w sposób bezstresowy, bez obecności eksperymentatora. Dostarcza również bardzo dokładnych i powtarzalnych informacji obarczonych niewielką wartością błędu standardowego wewnątrz badanych grup doświadczalnych.

Uwzględnienie zasady udoskonalenia: Procedury chirurgiczne wykonane zostaną w znieczuleniu ogólnym. Pomieszczenie operacyjne oraz wszystkie materiały i narzędzia zostaną odpowiednio przygotowane i wysterylizowane. Użyte zostaną poduszki grzejne zapobiegające wychłodzeniu ciała, powieki oczu zostaną sklezione wazeliną w celu ochrony przed wyschnięciem. Rana pooperacyjna zabezpieczona zostanie maścią z antybiotykiem. Dobrostan zwierząt w okresie rekonwalescencji będzie monitorowany do czasu pełnego wyzdrowienia. Wszystkie iniekcje ujęte w procedurach wykonane zostaną przez doświadczonych eksperymentatorów przy użyciu odpowiednich jednorazowych igieł i strzykawek. Na czas wykonania iniekcji zwierzęta zawinięte zostaną w ręcznik, celem ograniczenia stresu. Jeśli procedura doświadczalna nie wymaga inaczej, zwierzęta umieszczone zostaną w zbiorczych klatkach. Do klatek włożone zostaną zabawki (rolki po papierze toaletowym uprzednio wysterylizowane parą wodną pod ciśnieniem). Zwierzęta będą znajdowały się również pod opieką lekarza weterynarii.

Doświadczenia zaprojektowano w ten sposób, by uzyskać możliwie największą ilość wyników z pobranego materiału biologicznego. Po wykonaniu zabiegu uśmiercenia krew zwierząt zostanie pobrana i odwirowana w celu pozyskania osocza do testów ELISA. Zawiesina komórek zostanie uzupełniona buforem PBS, komórki mononuklearne krwi obwodowej zostaną z niej wyizolowane metodą wirowania w gradiencie gęstości a następnie użyte do oznaczenia ekspresji mRNA wybranych cytokin metodą RealTime-PCR. Narządy (śledziona, wątroba) zostaną zamrożone w celu wykonania oznaczeń biochemicznych. Próbkę krwi pobranej od zwierzęcia poddana zostanie również badaniu hematologicznemu. Część doświadczeń, mających na celu określenie molekularnego podłoża badanych procesów wykonana zostanie metodami *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórkowych.