

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: **Mechanizm degradacji glikozoaminoglikanów pod wpływem resweratrolu w mysim modelu neuronopatycznej choroby z grupy mukopolisacharydoz**

2.Czas trwania projektu: **5 lat**

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **choroba Sanfilippo, resweratrol, autofagia, myszy MPSIIIB, glikozoaminoglikany**

4.Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) **B**

- 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.

Mukopolisacharydozy (MPS) należą do rzadkich chorób uwarunkowanych genetycznie, gdzie w wyniku mutacji kodującej enzym odpowiadający za rozkład związków z grupy mukopolisacharydoz (glikozoaminoglikanów, GAG), dochodzi do ich nagromadzenia w komórce. Akumulacja glikozoaminoglikanów w komórkach prowadzi do upośledzenia prawidłowego ich funkcjonowania w następstwie narządów, a w wyniku tego całego organizmu doprowadzając do destrukcyjnych objawów. Wiele objawów jest wspólnych (pogrubienie rysów twarzy, powiększenia organów) dla poszczególnych typów i podtypów MPS (11 typów i podtypów), najbardziej jednak dotkliwe są te, które dotyczą również ośrodkowego układu nerwowego, w tym MPSIIIB.

Najczęściej stosowaną terapią MPS jest enzymatyczna terapia zastępcza, polegająca na zastosowaniu aktywnej formy brakującego enzymu. Podaż brakującego enzymu nie jest jednak wystarczająca w przypadku typów MPS, których objawy wyrażane są w ośrodkowym układzie nerwowym, ponieważ enzym nie przekracza bariery krew-mózg (jest za dużą cząsteczką). Dlatego badania nad

alternatywnymi podejściami terapeutycznymi dla tego typu MPS są wysoce pożądane. Jedną z takich alternatywnych strategii jest indukcja procesu degradującego GAG bezpośrednio, nazywany jest autofagią. Jednym z najnowszych odkryć jest to, że GAG mogą być również cząsteczkami, które mogą być degradowane za pomocą procesu autofagii. Resweratrol, ze względu na pleiotropowy mechanizm indukcji autofagii, a także przekroczenie bariery krew-mózg i bezpieczeństwo jego stosowania, jest prawdziwym kandydatem na lek w neuronopatycznych postaciach MPS.

Badania wstępne wykazały, że resweratrol stymuluje degradację nagromadzonych GAG, na komórkach skóry pobranych od pacjentów z MPS. Jednak ze względu na mnogość i różnorodność procesów zachodzących in vivo, których nie sposób odtworzyć w warunkach in vitro, konieczne jest określenie wpływu resweratrolu na zwierzęcy model MPS.

**Celem tego projektu jest zatem zbadanie wpływu resweratrolu na:**

- 1) behavior myszy z genetycznie uwarunkowaną mukopolisacharydozą typu IIIB,**
- 2) stan fizjologiczny myszy,**
- 3) poziomy GAG będących przyczyną choroby (analizy post mortem).**

W pierwszym etapie eksperymentu na podstawie wyników genotypowania myszy podzielone zostaną na grupy doświadczalne. Kolejno zostanie ustalona dawka resweratrolu najlepiej degradująca GAG, dzięki czemu zostanie zbadana ona szerzej w następnym etapie, gdzie sprawdzone zostanie zostanie długoterminowy wpływ resweratrolu. Badania prowadzone będą na mysim modelu mukopolisacharydozy neuropatycznej, którym podawany będzie resweratrol lub woda (grupa kontrolna). Testy behawioralne obejmą ocenę zachowania myszy w nowym otoczeniu, ocenę koordynacji ruchowej, pomiar nasilenia lęku, pomiar zdolności do zapamiętywania oraz określenie aktywności lokomotorycznej myszy. Określony zostanie stopień degradacji GAG oraz poziom markerów degradacji lizosomalnej w obrębie ośrodkowego układu nerwowego.

Badania te pozwolą na dokładne określenie wpływu resweratrolu na organizm myszy zdrowych (WT) oraz myszy z mukopolisacharydozą typu IIIB (MPSIIIB) zarówno na poziomie behawioralnym, obwodowym jak i molekularnym, co może w przyszłości skutkować powstaniem efektywnej terapii na tę rzadką chorobę. Na korzyść resweratrolu, jako potencjalnego leku przemawia fakt, że jest to substancja nie wywierająca żadnych skutków ubocznych na zwierzęta, jak i na ludzi (bezpieczeństwo zostało potwierdzone na III fazach prób klinicznych na chorobę Alzheimera). Mimo wielu badań przeprowadzonych z użyciem resweratrolu jako potencjalnego leku to nie został zbadany wcześniej na Mukopolisacharydozach, w związku z czym pierwszą częścią eksperymentu będzie weryfikacja dawki podawanego resweratrolu.

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

72 osobników myszy zdrowych (NAGLU +/+) oraz 72 osobników myszy chorych (NAGLU -/-) MPSIIIB

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

Zasada 3R została uwzględniona w oparciu o zalecenia wydawane przez European Animal Research Association (EARA), a także na podstawie danych z literatury, odpowiednich dla tego typu badań.

Podczas przygotowywania niniejszego projektu przeszukano między innymi bazy danych: PUBMED, Google Scholar, Research Gate i Science Direct w zakresie tematyki objętej wnioskiem badawczym. Wykorzystano słowa kluczowe: myszy MPSIIIB, choroba Sanfilippo, resweratrol, zaburzenia neurologiczne, neurodegeneracja.

**REDUCTION:** Planuje się zastosować najmniejszą możliwą liczebność zwierząt zapewniającą minimalną ilość wyników wymaganą do przeprowadzenia wiarygodnej analizy statystycznej, ale z wzięciem pod uwagę ewentualnych przykrych wydarzeń zmniejszających liczbę osobników w danej grupie (śmierć z niewiadomego powodu lub znaczne pogorszenie stanu zdrowia wymagające uśmiercenia zwierzęcia). Liczbę zwierząt oszacowano w sposób możliwie redukujący ich ilość do wymaganego statystycznie minimum dla każdej z procedur. Ponadto, w doświadczeniu zamierza się pobrać jak największą ilość narządów i tkanek (krew obwodową, grasnicę, śledzionę, mózgowie, wątrobę) w celu wykonania oznaczeń kompleksowych. W planowanych badaniach stosowane będą nowoczesne metody badawcze w jednostce wyposażonej w odpowiednią infrastrukturę (zarówno metody immunohistochemiczne jak i analizy poziomów białek tj. Western blotting, testy ELISA)

**REFINEMENT:** Aby ograniczyć dystres zwierząt podczas wykonywania wyżej wymienionych czynności uwzględnia się staranne przeprowadzenie handlingu, mającego na celu przyzwyczajenie zwierząt do osoby eksperymentatora oraz oswojenie z procedurą. Czas trwania poszczególnych etapów doświadczenia został skrócony do niezbędnego minimum. Dodatkowo, w celu ograniczenia dyskomfortu zwierząt podczas uśmiercania, bezpośrednio przed iniekcją letalnej dawki narkozy pentobarbitalowej (Morbital) mysz zostanie dodatkowo znieczulona za pomocą narkozy wziewnej izofluranowej. Przy pobieraniu krwi stosuje się również mieszanekę ketaminy z ksełazyną w celu krótkotrwałego znieczulenia zwierzęcia, co ogranicza dyskomfort podczas pobierania.

**REPLACEMENT:** Pozytywny wpływ resweratrolu na redukcję poziomu toksycznych łańcuchów

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

cukrowych GAG, co jest przyczyną choroby Sanfilippo (MPSIIIB) został potwierdzony w badaniach wstępnych przeprowadzonych na liniach komórkowych. Uzyskanie bardzo obiecujących wyników, na które zwrócono szczególną uwagę podczas oceny wniosku grantowego w konkursie Preludium organizowanym przez Narodowe Centrum Nauki, stanowi podstawę planowanych badań na modelu mysim opisywanej choroby, co wynika z naturalnej kolejności badań przed powstaniem nowego leku (badania *in vitro* -> badania *in vivo* -> próby kliniczne). Niniejszy projekt zakłada kompleksową ocenę wpływu resweratrolu na organizm myszy z genetycznie warunkowaną MPSIIIB przy zastosowaniu możliwie jak najmniejszej liczby osobników. Badania z wykorzystaniem resweratrolu w mysim modelu MPSIIIB nie były jak dotąd prowadzone, stanowić więc będą bardzo cenne źródło informacji dla przyszłych badań prowadzonych w podobnej tematyce oraz mogą prowadzić do powstania efektywnej terapii choroby Sanfilippo.

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.