

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Ocena łagodzącego działania kwasu alfa-liponowego i magnezu na indukowane przez kadm procesy zapalne, stres oksydacyjny i zaburzenia metabolizmu kości u szczurów szczepu Wistar.**

2. Czas trwania projektu . **3 miesiące**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **kadm, kwas. α -liponowy, magnez, szczury**

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.

Kadm jest jednym z najgroźniejszych i jednocześnie wszechobecnych zanieczyszczeń w środowisku człowieka. Wykazuje działanie prozapalne i prooksydacyjne. Ekspozycja na Cd zwiększa ryzyko zachorowania na choroby układu krążenia i osteoporozę. Zarówno kwas α -liponowy jak i magnez wykazują pewne protekcyjne działania w stosunku do toksyczności kadmu. Mimo istniejących przesłanek, że mechanizmy działania tych substancji mogą się uzupełniać i znacząco nasilać ich protekcyjne działanie w literaturze brak jest danych na ten temat. Celem pracy będzie ocena łącznego, łagodzącego wpływu kwasu α -liponowego i magnezu na zahamowanie lub złagodzenie powodowanych przez kadm procesów toksycznych. Oczekujemy, że intoksykacja kadmem spowoduje wzrost stężenia Cd w tkankach oraz niekorzystne zmiany w obrazie histopatologicznym i badanych parametrach takich jak m.in markery obrotu kostnego, stężenie cholesterolu i trójglicerydów,

witaminy D, obniżenie potencjału antyoksydacyjnego oraz wzrost stężenia białka C-reaktywnego i aktywności enzymów wątrobowych, wskazując na zaburzenia w metabolizmie kości, funkcjonowaniu organów, nasilenie procesów zapalnych i miażdżycowych. Natomiast kwas α -liponowy i magnez złagodzą procesy zapalne, poprawią funkcjonowanie organów i znormalizują oznaczane wskaźniki, a łączne podawanie tych substancji nasili ten korzystny efekt. Zaplanowaliśmy jak najmniej inwazyjne procedury umożliwiające przeprowadzenie założonego projektu i osiągnięcie celu doświadczenia.

Badanie przyczyni się do pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów protekcyjnego działania magnezu i kwasu α -liponowego przeciw toksyczności kadmu oraz zweryfikowanie hipotezy, że substancje te mogą w sposób synergistyczny współdziałać ze sobą, znacząco łagodzić procesy zapalne i stres oksydacyjny i hamować zmiany w tkankach, przyczyniające się do rozwoju chorób kości i układu krążenia.

Wyniki uzyskane w badaniu umożliwią sformułowanie wstępnych wytycznych profilaktycznych oraz mogą stanowić przyczynek do podjęcia badań klinicznych.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W badaniu zostaną wykorzystane szczury , samce szczepu Wistar, 30 sztuk

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Uzasadnienie przeprowadzenia doświadczenia

Dokonano przeglądu fachowej literatury, przeszukano bazy m.in /EBSCO, PUBMED, Google Scholar, ScienceDirect i pakiety czasopism na stronach wydawców takie jak m.in. Informa HealthCare , LWW (Journals Ovid), The Oxford Journals Collection, Nature Journals online:, Elsevier Journals, Science Direct Freedom Collection, SpringerLink Journals, Wiley Online Library przy użyciu słów kluczowych takich jak cadmium, α -lipoic acid, magnesium, rats, bone, cardiovascular, heart, oxidative stress, inflammatory processes, cholesterol.

Wielu autorów wskazuje na prooksydacyjne i prozapalne działanie kadmu oraz toksyczny wpływ tego metalu na kości i układ krążenia. Szereg doniesień podkreśla znaczenie suplementacji magnezem w łagodzeniu toksyczności kadmu, jednak znacznie mniej prac dotyczy wpływu kwasu α -liponowego na zmniejszanie szkodliwości tego metalu. Przegląd literatury wskazuje jednak, że istnieją przesłanki o możliwym synergistycznym lub przynajmniej addytywnym działaniu magnezu i kwasu α -liponowego na złagodzenie toksycznych skutków ekspozycji na kadm. Oba składniki mają działanie

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

antyoksydacyjne i antyzapalne, co odgrywa istotną rolę w zahamowaniu procesów miażdżycowych i zmian chorobowych w kościach. Magnez jest niezbędny do syntezy glutationu de novo, natomiast kwas α -liponowy oraz jego forma zredukowana (kwas dihydroliponowy) są silnymi antyoksydantami i regenerują inne przeciwutleniacze (np. witaminy E i C oraz zredukowany glutation). Oba składniki (Cd i α -liponowy) wykazują również wpływ na metabolizm Cd i zmniejszenie jego stężenia w tkankach. Magnez jako antagonistę kadmu utrudnia jego przyswajanie i kumulację w tkankach, a kwas α -liponowy chelatując Cd ogranicza jego toksyczne działanie na komórki. Suplementacja magnezem w czasie intoksykacji kadmem obniża stężenie Cd w tkankach miękkich i kościach, nie zakłócając metabolizmu biopierwiastków takich jak Zn i Cu. Zwiększona zawartość związków magnezu w kościach podwyższa ich wytrzymałość na złamania. Również przy podawaniu kwasu α -liponowego obserwowano znaczący spadek stężenia Cd w nerkach i wątrobie - narządach biorących udział w metabolizmie i mineralizacji kości. Niedobór magnezu nasila agregację płytek krwi i zwiększa stężenie prozapalnych cytokin. Dieta uboga w magnez może prowadzić do zmian w budowie ściany tętnic, podobnych do występujących w hipercholesterolemii i hipertrójglicydemi. Z kolei kwas α -liponowy może obniżać ryzyko zachorowania na choroby sercowo-naczyniowe poprzez zapobieganie utlenianiu LDL i tworzeniu blaszki miażdżycowej, modulacji nadciśnienia tętniczego i korzystny wpływ na gospodarkę lipidową

Udokumentowany, protekcyjny wpływ zarówno magnezu jak i kwasu α -liponowego pozwala przypuszczać, że mechanizmy ich działania mogą się uzupełniać i w sposób synergiczny łagodzić indukowane kadmem zmiany toksyczne w tkankach. Jednak w literaturze brak jest badań sprawdzających łączne podawanie tych substancji na stan obrony antyoksydacyjnej, metabolizm kości, parametry lipidowe czy procesy zapalne w warunkach intoksykacji Cd. Starzenie się społeczeństwa zwiększa rozpowszechnienie osteoporozy i chorób układu krążenia. Długotrwałe narażenie na Cd dodatkowo sprzyja rozwojowi tych chorób, a nierozwiązany problem terapii zatrucia kadmem, przy stosunkowo łatwym dostępie do suplementacji magnezem i kwasem α -liponowym uzasadnia podjęcie niniejszych badań.

Oczekujemy, że intoksykacja kadmem spowoduje wzrost stężenia Cd w tkankach oraz niekorzystne zmiany w obrazie histopatologicznym i badanych parametrach takich jak m.in. markery obrotu kostnego, stężenie cholesterolu i trójglicerydów, stężenie białka c-reaktywnego, witaminy D, obniżenie potencjału antyoksydacyjnego oraz wzrost aktywności enzymów wątrobowych, wskazując na zaburzenia w metabolizmie kości, funkcjonowaniu organów, nasilenie procesów zapalnych i miażdżycowych. Natomiast podawanie kwasu α -liponowego i magnezu złagodzi zmiany w tkankach i poprawi funkcjonowanie organów, a łączne podawanie tych substancji nasili korzystny efekt.

ZASADA ZASTĄPIENIA

Wybór żywych zwierząt (kręgowców) do badań wynika z tego, że doświadczenie ma stanowić zwierzęcy model zmian w układzie krążenia, kościach i tkankach miękkich związany z ekspozycją na kadm. Wyniki eksperymentu będą podstawą do weryfikacji hipotezy, że łączne podawanie kwasu α -liponowego i magnezu może w sposób synergistyczny łagodzić zmiany toksyczne indukowane przez Cd i hamować rozwój chorób układu krążenia i zmiany w kościach związane z ekspozycją na ten metal.

Główną drogą przedostawania się kadmu do organizmu u osób, które nie są zawodowo narażone na ten metal jest droga pokarmowa. Aby warunki eksperymentu w jak najlepszym stopniu zbliżyć do naturalnych – zarówno kadm jak i testowane substancje protekcyjne (kwas α -liponowy i magnez) będą podawane drogą pokarmową. Wpływ tych czynników na metabolizm kości i czynniki sprzyjające rozwojowi miażdżycy /która jest czynnikiem etiologicznym ponad 90% chorób układu krążenia/ związany jest z różnymi procesami zachodzącymi w żywym organizmie takimi jak m.in: stres oksydacyjny, procesy zapalne, zmiany w układzie immunologicznym i hormonalnym, zaburzenia we wchłanianiu składników mineralnych, czy wreszcie pogorszeniem pracy nerek i wątroby prowadzące do zaburzeń metabolizmu lipidów i składników mineralnych oraz niedoboru aktywnej formy witaminy D3.

Z tych powodów wybór żywego organizmu, w którym zachodzą naturalne procesy fizjologiczne i metaboliczne wydaje się być bardziej korzystny, jeśli chodzi o osiągnięcie założonego celu projektu niż jakiekolwiek metody alternatywne na układach izolowanych.

Tylko pomiary parametrów biochemicznych w żywym organizmie pomogą rozpoznać mechanizmy poprzez które podawane substancje wywierają działanie protekcyjne przeciwko toksyczności kadmu.

Hodowle komórkowe wymagają odpowiedniego sprzętu, zaplecza, są wrażliwe na zakażenie, obumarcie, a ponadto jak wcześniej wspomniano wpływ substancji na określone linie komórkowe nie odzwierciedla rzeczywistych procesów zachodzących w żywych organizmach. Szczególnie wtedy, gdy tak jak w naszym badaniu chodzi o mechanizmy

oddziaływania substancji, na które mogą wpływać zjawiska zachodzące w różnych organach organizmu. Wydaje się, że koszty wykonania takich badań w celu sprawdzenia wspólnego działania magnezu i kwasu α -liponowego nie zrównoważyłyby ewentualnych korzyści, a uzyskane rezultaty niekoniecznie byłyby takie same jak w warunkach *in vivo*, gdzie mają miejsce naturalne procesy wchłaniania, transportu, dystrybucji i eliminacji substancji. Wiadomo ponadto, że metale ciężkie jak np. Cd wykazują znaczne większe powinowadztwo do grup tiolowych niż magnez dlatego obawy, że w obecności kadmu magnez może zostać chelatowany przez kwas α -liponowy i spowodować efekt odmienny niż oczekiwany nie wydaje się być uzasadnione. Jeśli chodzi o inne możliwe reakcje magnezu z kwasem α -liponowym, to istnieją opatentowane metody wytwarzania liponianu magnezu, jednak reakcja wymaga odpowiednich parametrów i odczynników, nie występujących w warunkach fizjologicznych, a ponadto sól ta mimo, że nie jest rozpuszczalna w wodzie, jest dobrze przyswajalna w postaci zawiesiny. W dostępnych bazach internetowych nie znaleziono informacji na temat szkodliwych skutków ubocznych łącznego podawania preparatów magnezu i kwasu α -liponowego.

W doświadczeniu zostanie dokonana także ocena histopatologiczna tkanek, pomiar stężenia kadmu w tkankach w celu oceny wpływu kwasu α -liponowego i magnezu na stężenie i dystrybucję Cd w organizmie, pomiar składników mineralnych w tkankach oraz m.in. enzymy wątrobowe i biochemiczne markery resorpcji i kościotworzenia. Uzyskanie wyżej wymienionych informacji z badań *in vitro* nie było by możliwe.

W doświadczeniu zostanie dokonana także ocena histopatologiczna tkanek, pomiar stężenia kadmu w tkankach w celu oceny wpływu kwasu α -liponowego i magnezu na stężenie i dystrybucję Cd w organizmie, pomiar składników mineralnych w kościach i krwi oraz m.in. enzymy wątrobowe i biochemiczne markery resorpcji i kościotworzenia. Uzyskanie wyżej wymienionych informacji z badań *in vitro* nie było by możliwe.

Szczury, myszy i króliki są najczęściej stosowanym modelem zwierzęcym wykorzystywanym do badań nad procesami metabolicznymi i biochemicznymi zachodzącymi w organizmie.

Zdecydowaliśmy się na wykorzystanie szczurów, ze względu na to, że mamy większe doświadczenie w pracy z tymi zwierzętami i warunki w których będzie przeprowadzone doświadczenie są lepiej do nich przystosowane. Ponadto, w dostępnej literaturze jest znacznie więcej badań na szczurach niż innych zwierzętach, co znacznie ułatwi interpretację i dyskusję wyników uzyskanych w doświadczeniu. Zwierzęta te są również tańsze i mniejsze niż króliki, łatwiej przystosowują się do różnych sytuacji /np. wprowadzanie sady dożołądkowej/ dlatego wykonywanie różnych procedur z ich użyciem może być sprawniej przeprowadzone. Jednocześnie jednak ich rozmiary /większe niż myszy/ pozwalają na uzyskanie odpowiedniej ilości materiału biologicznego /głównie chodzi o krew, surowicę/ potrzebnego do wykonania zaplanowanych oznaczeń. Dostępność na rynku testów immunoenzymatycznych ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), z których będziemy korzystać podczas wykonywania niektórych oznaczeń biochemicznych np. markerów kościotworzenia jest większa i bardziej różnorodna dla tego gatunku zwierząt (*Rattus norvegicus*). Jest to istotne ponieważ metody oznaczania parametrów biochemicznych za pomocą testów ELISA opierają się na wykorzystaniu przeciwciał specyficznych tylko dla danego gatunku.

ZASADA OGRANICZENIA

5 grup doświadczalnych, 30 szczurów (po 6 w grupie) stanowi minimalną liczbę zwierząt umożliwiającą uzyskanie wiarygodnych wyników (efektu biologicznego w warunkach doświadczenia) i statystycznie istotnych różnic między grupami szczurów pozwalających na właściwą interpretację rezultatów eksperymentu. Wnioski te wynikają z naszych wcześniejszych doświadczeń, literatury i ustaleń za pomocą metod statystycznych (program Statistica, analiza mocy testu -ustalenie liczności próby).

ZASADA UDOSKONALENIA

Podawanie paszy zawierającej kadm, a także magnez i kwas α -liponowy jest konieczne do uzyskania efektu biologicznego w postaci mierzalnych zmian w obrazie histopatologicznym tkanek, stężeniu kadmu i parametrach biochemicznych. Jest to potrzebne do lepszego rozpoznania mechanizmów toksycznego działania kadmu, a także oceny na ile podawanie magnezu i/lub kwasu α -liponowego przyczyni się do normalizacji powodowanych przez Cd, zmian w organizmach zwierząt. Procedury te potrzebne są do uzyskania materiału biologicznego do dalszych analiz.

Kadm, magnez i kwas α -liponowy będą podawane z dietą LD 101, firmy TestDiet, która jest jest znormalizowaną paszą

podawaną w postaci płynnej, stosowaną do intoksykowania szczurów różnymi substancjami drogą pokarmową. Zastosowanie płynnej paszy ułatwia monitoring spożytej substancji i pokarmu.

W czasie doświadczenia zwierzęta będą przebywać pod opieką przeszkolonego, doświadczonego personelu zwierzętarni. Obiekt jest po remoncie, pomieszczenia są przestronne, dobrze wentylowane i klimatyzowane, Żeby zaspokoić potrzeby społeczne zwierząt w każdej klatce będą przebywały po 2 osobniki.

Zespół badawczy przeprowadzający doświadczenie ma również wieloletnie doświadczenie w prowadzeniu eksperymentów z wykorzystaniem zwierząt, na podstawie których powstało szereg publikacji m.in [1-8]

Staraliśmy się zastosować jak najmniej inwazyjne metody np. przy podawaniu kwasu α liponowego, który ze względów ekonomicznych nie będzie podawany z paszą zrezygnowaliśmy z podawania go sondą dożołądkową na rzecz łagodniejszej metody doustnego podawania strzykawką. Dyskomfort zwierząt związany ze spożywaniem paszy płynnej będzie łagodzony wzbogaceniem środowiska, przez umieszczenie w klatkach drewnianych klocków, służących do ścierania zębów.

Badanie przyczyni się do pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów protekcyjnego działania magnezu i kwasu α -liponowego przeciw toksyczności kadmu oraz zweryfikowanie hipotezy, że substancje te mogą w sposób synergistyczny współdziałać ze sobą, znacząco łagodzić procesy zapalne i stres oksydacyjny i hamować zmiany w tkankach, przyczyniające się do rozwoju chorób kości i układu krążenia.

Wyniki uzyskane w badaniu umożliwią sformułowanie wstępnych wytycznych profilaktycznych oraz mogą stanowić przyczynek do podjęcia badań klinicznych.

Przykładowe doniesienia członków zespołu na podstawie badań na zwierzętach:

1. Iwona Markiewicz-Górka, Krystyna Pawlas, Lidia Januszewska, Jolanta Tracz, Zbigniew Jethon, Piotr Dzięgiel.: Indukcja stresu oksydacyjnego w wątrobach szczurów pod wpływem izolowanej i złożonej ekspozycji na miedź i wysiłek fizyczny Adv.Clin.Exp.Med. 2002 Vol.11 no.4; s.457-466

2.Iwona Markiewicz-Górka, Krystyna Pawlas, Lidia Januszewska, Zbigniew Jethon, Piotr Dzięgiel.: Wpływ intoksykacji miedzią na poziom stresu oksydacyjnego w mięśniach szkieletowych szczurów poddanych wysiłkowi fizycznemu i nieaktywnych fizycznie Adv.Clin.Exp.Med. 2004 Vol.13 no.3; s.401-410

3.Iwona Markiewicz-Górka, Jolanta Antonowicz-Juchniewicz, A[nna] Luty-Frąckiewicz, K[rystyna] Pawlas.: Influence of physical training on oxidative damages and metals concentration (Cd, Zn) in tissues of rats chronically intoxicated with cadmium Pol.J.Envirion.Stud. 2006 Vol.15 no.2B; s.450-454

4.Iwona Markiewicz-Górka, Lidia Januszewska, Aleksandra Michalak, Anna Kielbaska, Marcin Zawadzki, Krystyna Pawlas.: Magnesium alleviates alcohol induced haematological disorders and oxidative stress in heart of rats. Monografia: Styl życia na różnych etapach rozwoju człowieka a jakość życia w zdrowiu ; red. nauk. Grażyna Nowak-Starz, Agnieszka Strzelecka, Edyta Laurman-Jarząbek; Kielce : Uniwersytet Jana Kochanowskiego, 2016; s.262-274

5.Iwona Markiewicz-Górka, Marcin Zawadzki, Lidia Januszewska, Katarzyna Hombek-Urban, Krystyna Pawlas.: Influence of selenium and/or magnesium on alleviation alcohol induced oxidative stress in rats, normalization function of liver and changes in serum lipid parameters Hum.Exp.Toxicol. 2011 Vol.30 no.11; s.1811-1827

6.Artur Niedźwiedz, Hieronim Borowicz, Lidia Januszewska, Iwona Markiewicz-Górka, Zbigniew Jaworski.: Serum 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a marker of DNA oxidative damage in horses with recurrent airway obstruction Acta Vet.Scand. 2016 Vol.58; art.38 [4 s.]

7.Iwona Markiewicz-Górka, Lidia Januszewska, Aleksandra Michalak, Adam Prokopowicz, Ewa Januszewska, Natalia Pawlas, Krystyna Pawlas.: Effects of chronic exposure to lead, cadmium, and manganese mixtures on oxidative stress in rat liver and heart Arh.Hig.Rada Toksikol. 2015 Vol.66 no.1; s.51-62

8.Iwona Markiewicz-Górka, Marcin Zawadzki, Lidia Januszewska, Iwona Pirogowicz, Krystyna Pawlas.: Korzystny wpływ selenu i magnezu na obniżenie stresu oksydacyjnego w mózgach szczurów zatrutych alkoholem Med.Śr. 2012 T.15 nr 2; s.55-63