

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Wpływ kwasu loganowego i morronizydu na wątrobę szczurzą poddaną niedokrwieniu i reperfuzji (IR)**

2. Czas trwania projektu **16.10.2020 – 15.12.2023**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): niedokrwienie/reperfuzja, kwas loganowy, morronizyd, wątroba, 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.

Podczas niedokrwienia i reperfuzji (IR) dochodzi do uszkodzenia wątroby obejmującego m.in. stres oksydacyjny, reakcję zapalną i zaburzenia przemiany NO. Intensywnie poszukuje się związków o działaniu ochronnym na ten narząd w warunkach IR. Kwas loganowy i morronizyd to irydoidy wyizolowane z derenia, których właściwości sugerują działanie hepatoprotekcyjne w warunkach IR. Zapobiegając m.in. nasieniu stresu oksydacyjnego, zaburzeniom przemiany NO i procesom zapalnym będą chroniły strukturę i czynność wątroby. Jak do tej pory nie badano ich ochronnego działania na uszkodzenia w wątrobie powstające w warunkach IR.

**Celem badania** jest potwierdzenie lub odrzucenie hipotezy o ochronnym działaniu kwasu loganowego i morronizydu na wątrobę szczurzą poddaną IR. Uzyskane wyniki pozwolą odpowiedzieć na pytanie, czy

zastosowanie kwasu loganowego i morronizydu zmniejszy nasilenie uszkodzeń w wątrobie szczurzej powstałych w wyniku przejściowego niedokrwienia i reperfuzji.

Badanie zostanie przeprowadzone na szczurach szczepu Wistar. Kwas loganowy lub morronizyd zostaną podane dożołądkowo przed procedurą chirurgiczną. Po uśpieniu i założeniu kaniuli żyły ogonowej wywołane zostanie częściowe niedokrwienie wątroby przez zamknięcie naczyń wątrobowych na 60 min., następnie przepływ krwi zostanie wznowiony na 24 godziny (reperfuzja). Po tym czasie wątroby zostaną wyizolowane a zwierzęta poddane eutanazji. Wątroba zostanie utrwalona celem dalszej oceny histopatologicznej oraz wykonania oznaczeń poszczególnych parametrów oceniających jej funkcję. Procedury zostały zaplanowane tak, aby w miarę możliwości ograniczyć dystres zwierząt.

Uzyskane wyniki poszerzą naszą wiedzę na temat działania kwasu loganowego i morronizydu na wątrobę poddaną IR. Planowane badanie umożliwi także ocenę mechanizmu hepatoprotekcyjnego działania tych związków.

Klasyfikacja celu doświadczenia: badania podstawowe (A) – układ żołądkowo-jelitowy z uwzględnieniem wątroby (PB5)

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

72 szczury 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: *ischemia/reperfusion*, *loganic acid*, *morroniside*, *arginine*, *oxidative stress*, *liver*, *rat*. Na podstawie analizy piśmiennictwa stwierdzam, że:

A. Wykazane w badaniach *in vitro* i *in vivo* korzystne właściwości obu irydoidów – kwasu loganowego i morronizydu – związane z ich działaniem przeciwutleniającym, przeciwzapalnym i ochronnym w zaburzeniach przemiany NO w różnych modelach eksperymentalnych sugerują, że związki te będą działać ochronnie na wątrobę poddaną niedokrwieniu i reperfuzji

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

B. Pomimo badań, których wyniki sugerują hepatoprotekcyjne działanie kwasu loganowego i morronizydu nie przeprowadzono dotychczas doświadczenia wykorzystującego model doświadczalny niedokrwienia i reperfuzji, w którym oceniano by wpływ tych związków na uszkodzoną w tym modelu wątrobę szczurzą. Fakt ten potwierdza **nowatorski** charakter planowanych badań

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

A. rozwinięcie poznawcze istniejącej wiedzy dotyczącej działania kwasu loganowego i morronizydu z uwzględnieniem jego roli w ochronie wątroby warunkach niedokrwienia i reperfuzji (IR),

B. przybliżenie potencjalnego mechanizmu hepatoprotekcyjnego działania kwasu loganowego i morronizydu poprzez analizę markerów uwalnianych podczas IR, pozwalających na ocenę nasilenia uszkodzenia wątroby szczurzej.

### **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 wątroby mamy do czynienia z bardzo złożonymi mechanizmami uszkodzenia, z obecnością m.in. ogólnoustrojowych procesów zapalnych, zaburzeń przemiany tlenu azotu, stresu oksydacyjnego i angiogenezy, 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 6 grup zwierząt. Dobrany został powszechnie akceptowany i wykorzystywany, a jednocześnie sprawdzony we wcześniejszych badaniach własnych model, pozwalający na uzyskanie powtarzalnych wyników pozwalający na uzyskanie powtarzalnych wyników. Liczba zwierząt w badaniu została ograniczona do niezbędnego minimum i jest podyktowana wiarygodnością metod analizy statystycznej

Zakładając średnią populacyjną wartość ADMA dla szczurów szczepu Wistar w 4 godzinie reperfuzji wieku 10-12 tygodni, 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 doświadczenia zastosowano takie metody zmniejszenia dystresu, jak: znieczulenie ogólne w trakcie czynności mogących wywołać dystres zwierząt – przerwanie ciągłości tkanek brzusznych, izolacja naczyń wątrobowych, niedokrwienie/reperfuzja wątroby szczurzej, wzbogacone środowisko, umiejętności eksperymentatorów/opiekunów, właściwa opieka, monitorowanie stanu zwierzęcia w zwierzętarni i w trakcie przebiegu doświadczenia, humanitarny koniec doświadczenia, właściwa eutanazja. Spośród dostępnych modeli doświadczalnego niedokrwienia wątroby wybrano opisaną w literaturze i stosowaną przez nas w poprzednich doświadczeniach 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.