

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Ocena funkcjonalności i bezpieczeństwa stosowania enkapsulowanego glutationu w nowych nanokapsułkach chitozanowo-furcelleranowych**

2. Czas trwania projektu: **12 miesięcy**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **glutation, chitozan, furcelleran, enkapsulacja, status antyoksydacyjny**

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.

Glutation to tripeptyd, będący bardzo silnym antyoksydantem – zwalcza wolne rodniki, chroniąc organizm przed skutkami stresu oksydacyjnego. Jego niedobory, pojawiające się u osób starszych, z chorobami neurodegeneracyjnymi, nowotworowymi, czy u sportowców, wymagają uzupełnienia z zewnątrz. Wyniki badań wskazują, że glutation podany w formie doustnej, bardzo szybko ulega rozkładowi i traci swoje korzystne właściwości. Inną formą podania, szczególnie sportowcom, jest wlew kroplowy, ale metoda ta jest na liście zabronionych przez World Anti-Doping Agency.

Zamknięcie glutationu w biopolimerowej nanokapsułce (chitozan-furcelleran (CHI-FUR)), której warstwy będą wzbogacone w hydrolizat żelatynowy pozyskiwany ze skór ryb (HGEL), może pozwolić ochronić go przed działaniem enzymów trawiennych, dzięki czemu dotrze do jelit w niezmienionej formie. To pozwoli na zachowanie i wykorzystanie jego właściwości, a więc zwiększenie biodostępności. Zastosowanie nanokapsulek może pozwolić więc na kontrolowane uwalnianie

składników aktywnie czynnych, poprzez stopniową degradację warstw powłok. Proponowane nanokapsułki są odpowiedzią na preferencje nie tylko środowiska farmaceutycznego, ale również konsumentów, gdyż składają się wyłącznie ze składników pochodzenia naturalnego, co minimalizuje występowanie działań niepożądanych i zwiększa skuteczność stosowanej substancji aktywnej. Nanokapsułki na bazie polisacharydów są obiecującą alternatywą dla bezpiecznego i kontrolowanego podawania substancji aktywnie czynnych. Potwierdzenie założonej funkcjonalności stosowanych nanokapsulek w organizmie żywym, pozwoli na skuteczne i bezpieczne uzupełnianie niedoborów glutationu u osób chorujących na choroby neurodegeneracyjne, choroby nowotworowe czy u sportowców, u których najczęściej występują niedobory tego składnika.

Naukowcy, biorący udział w projekcie badawczym finansowanym przez NCBiR, którego ten projekt doświadczenia na zwierzętach jest częścią, są jedynymi na świecie zajmującymi się wytwarzaniem nanokapsulek CHI-FUR. Nie przeprowadzono dotąd żadnych badań nad ich skutecznością w warunkach *in vivo*.

Celem doświadczenia z udziałem szczurów Wistar jest ocena funkcjonalności i bezpieczeństwa stosowania nanokapsulek jako nośników glutationu. Ocenie zostanie poddana aktywność antyoksydacyjna glutationu dostarczonego z pożywieniem w postaci proszku (kontrola) oraz nanokapsulek biopolimerowych CHI-FUR, a także ich wpływ na pracę wątroby i nerek.

Doświadczenie obejmuje 5 grup zwierząt, po 8 osobników w każdej. I grupa będzie otrzymywać dietę podstawową AIN-93G (grupa kontrolna). Pozostałe grupy będą otrzymywać diety eksperymentalne (przygotowane na bazie diety AIN-93G) z 2% i 4% dodatkiem glutationu w formie proszku (grupa II i III) oraz enkapsulowanego w postaci nanokapsulek (grupy IV i V).

Po zakończeniu doświadczenia ocenie zostaną poddane wybrane parametry biochemiczne związane z statusem antyoksydacyjnym organizmu (w tym ekspresja genów kodujących enzymy antyoksydacyjne) oraz pracą wątroby i nerek.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Albinotyczny szczur wędrowny Wistar, czterdzieści (n=40) szczurów

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

W czasie planowania eksperymentu, dokonano przeglądu literatury dotyczącej właściwości glutationu, jego metabolizmu w organizmie, a także właściwości biopolimerów i enkapsulacji, jako metody wprowadzania czynników biologicznie aktywnych do organizmu (bazy danych: PUBMED, Science Direct, Google Scholar, Web of Science, EBSCO). Wykorzystano następujące słowa kluczowe:

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

glutation/ metabolizm glutationu/ suplementacja glutationem/ dodatek glutationu do diet szczurów/ biopolimery/ chitozan/ furcelleran/ enkapsulacja/ mikrokapsułki/ nanokapsułki/ dodatek mikro/nanokapsulek do diet szczurów.

Na podstawie analizy literatury stwierdzono, iż dotychczas nie przeprowadzono żadnych badań, których celem była ocena skuteczności i bezpieczeństwa stosowania glutationu enkapsulowanego w nanokapsułkach chitozanowo-furcelleranowych.

Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że glutation jest szeroko rozpowszechniony w żywych systemach i bierze udział w wielu kluczowych procesach komórkowych. Jest bardzo silnym antyoksydantem - zwalcza wolne rodniki, chroniąc organizm przed skutkami stresu oksydacyjnego. Jego niedobory, pojawiające się u osób starszych, z chorobami neurodegeneracyjnymi, nowotworowymi, z zespołem chronicznego zmęczenia, autyzmem, przewlekłymi infekcjami, astmą, chorobami nerek i wątroby czy u sportowców, wymagają uzupełnienia z zewnątrz. Dane literaturowe wskazują, że glutation podany w formie doustnej, bardzo szybko ulega rozkładowi i traci swoje korzystne właściwości. Inną formą podania, szczególnie sportowcom, jest wlew kroplowy, ale metoda ta jest na liście zabronionych przez World Anti-Doping Agency. Enkapsulacja czynników biologicznie aktywnych, takich jak glutation, pozwala na ich kontrolowane dostarczanie do organizmu. Biopolimerowa nanokapsułka, zbudowana z warstw chitozanu i furcelleranu (które naturalnie występują w żywności), może pozwolić ochronić glutation przed działaniem enzymów trawiennych, dzięki czemu dotrze do jelit w niezmienionej formie. To pozwoli na zachowanie i wykorzystanie jego właściwości, a więc zwiększenie biodostępności. Zastosowanie nanokapsulek może pozwolić więc na kontrolowane uwalnianie składników aktywnie czynnych, poprzez stopniową, enzymatyczną degradację warstw powłok.

Brak jest natomiast danych dotyczących skuteczności stosowania nanokapsulek z glutationem w organizmie. Nie przeprowadzono dotąd żadnych badań w warunkach *in vivo*, w których oceniano by ich wpływ na aktywność antyoksydacyjną organizmu (w tym na ekspresję genów związanych z aktywnością enzymów przeciwutleniających) oraz bezpieczeństwo stosowania, a więc wpływ na pracę nerek i wątroby.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na: potwierdzenie założonej funkcjonalności zastosowanych nanokapsulek w organizmie żywym. To z kolei pozwoli na skuteczne i bezpieczne uzupełnianie niedoborów glutationu u osób chorujących na choroby neurodegeneracyjne, choroby nowotworowe czy u sportowców, u których najczęściej występują niedobory tego składnika.

Uwzględniając **zasadę zastąpienia** zdecydowano o wykorzystaniu albinotycznych szczurów wędrownych Wistar. Gryzonie te są obecnie najlepszym, wiarygodnym i powszechnie stosowanym w badaniach żywieniowych modelem zwierzęcym. Gryzonie są zwierzętami o najniższym stopniu rozwoju, których wykorzystanie pozwoli zweryfikować postawione hipotezy badawcze i osiągnąć założone cele doświadczenia. Planowane badania, ze względu na konieczność wyjaśnienia skomplikowanych, współzależnych mechanizmów i procesów biochemicznych zachodzących w

organizmie żywym, nie mogą być przeprowadzone w warunkach *in vitro*.

Liczba zwierząt planowanych do użycia w doświadczeniu została określona na podstawie znajomości odchylenia standardowego wybranych parametrów, które zostało oszacowane na podstawie poprzednich doświadczeń własnych oraz danych literaturowych. Wykorzystanie takiej liczby zwierząt ma na celu zminimalizowanie wpływu zmienności międzyosobniczej na wyniki planowanego badania, a także uzyskanie wiarygodnych wyników eksperymentu oraz rzetelnego sprawdzenia postawionej hipotezy badawczej (**zasada ograniczenia**).

Kierując się **zasadą udoskonalenia** doświadczenie zostanie przeprowadzone przez wykwalifikowanych naukowców, posiadających kilkuletnie doświadczenie w pracy z zwierzętami oraz odpowiednie kwalifikacje i uprawnienia. Zwierzęta po przetransportowaniu do zwierzętarni zostaną poddane tygodniowej aklimatyzacji, w celu zminimalizowania stresu oraz oswojenia się z osobami biorącymi udział w doświadczeniu (noszenie, głaskanie oraz przenoszenie zwierząt z klatki do klatki).

Zwierzęta będą przebywać po trzy/dwa osobniki w klatce, w optymalnych dla szczurów warunkach świetlnych, temperaturowych itp. W klatkach zastosowane zostaną elementy wzbogacające środowisko, tj. klocek drewniany/materiał gniazdowy, a także tunele, które służą aktywizacji zwierząt. Co więcej, w klatkach zostaną umieszczone domki/platformy, które dodatkowo zapewniają schronienie, przez co zmniejszają lęk i możliwe agresywne zachowania szczurów. Elementy wzbogacające będą wymieniane każdorazowo podczas wymieniań ściółki lub w momencie gdy ulegną zniszczeniu. Zwierzęta będą miały nieograniczony dostęp do wody i pożywienia, które będą wymieniane każdego dnia, o stałej porze.

Uśmiercanie zwierząt laboratoryjnych przez przedawkowanie środka znieczulającego Izofluran wraz z podaniem środka przeciwbólowego Butorfanol jest minimalizującą stres metodą, ogólnie znaną i dopuszczoną do stosowania przez ustawodawcę. Pozwala ona na prawidłowe pobranie materiału biologicznego. Na podstawie wcześniejszej praktyki wybrano tą metodę uśmiercania. W celu ograniczenia stresu zwierzęcia planuje się zastosowanie następujących metod łagodzących: uśmiercanie zwierząt pojedynczo, w osobnym, przeznaczonym do tego celu pomieszczeniu. Zaobserwowanie jakiegokolwiek objawu wskazującego na wystąpienie u danego osobnika znacznego stresu, bólu lub zbliżającej się śmierci przed osiągnięciem założonego harmonogramu końcem doświadczenia, będzie wskazaniem do wczesnego, humanitarnego zakończenia procedury. Zwierzęta, przez cały czas trwania doświadczenia będą miały zapewnioną opiekę weterynaryjną. Szczury, sprzęt oraz wyposażenie zwierzętarni będzie pod codziennym nadzorem osób przeprowadzających doświadczenie.

W przekonaniu eksperymentatorów to wszystko sprawia, iż wszystkie zwierzęta w eksperymencie będą miały zapewniony odpowiedni dobrostan przez cały okres trwania badania.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☐ NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.