

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: Izolacja hepatocytów szczurzych do badań przesiewowych nowych związków przeciwnowotworowych

2.Czas trwania projektu: 2 lata

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): szczur, hepatocyty, poziom metabolizmu, onkologia

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.

W ramach projektów naukowo-rozwojowych, mających na celu opracowanie nowych leków przeciwnowotworowych, syntetyzowane są całe serie związków małowartościowych. Te z nich, które wykażą w testach *in vitro* selektywność działania i określone właściwości fizyko-chemiczne, wymagają dalszej charakterystyki związanej z ich metabolizmem. Część związków powinno bowiem docelowo działać w formie niezmienionej, inne uzyskują aktywność dopiero po modyfikacji w formę czynną. Od tempa metabolizmu, rodzaju metabolizmu i powstających metabolitów, zależy nie tylko aktywność związków, ale też ich profil toksykologiczny. Eliminacja związków niepożądanych na wczesnym etapie rozwoju leku pozwala znacznie ograniczyć liczbę zwierząt użytych na dalszych etapach badań.

Procesy metaboliczne u ssaków zachodzą głównie w wątrobie, a standardowym modelem *in vitro* do badań przesiewowych nowych związków są izolowane komórki wątroby (hepatocyty). Uzyskiwane są wyniki na temat stabilności metabolicznej związków, uruchamianych ścieżek metabolicznych i powstających metabolitów, bez konieczności prowadzenia badań *in vivo*. Tym sposobem, w miejsce użycia wielu zwierząt do analizy profilu metabolicznego pojedynczego związku *in vivo*, użyte będą do

izolacji hepatocytów dwa osobniki tygodniowo, a uzyskany materiał pozwoli przetestować wiele związków.

Do izolacji hepatocytów szczurzych, zapewniających najlepszą korelację uzyskiwanych wyników z metabolizmem wątrobowym u człowieka, planowane jest użycie samców szczepu Sprague Dawley. Otrzymany materiał zostanie użyty do wysokoprzepustowej selekcji nowo syntetyzowanych związków, o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym, do dalszych badań *in vitro* oraz *in vivo*.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

210 szczurów wędrownych (*Rattus norvegicus*)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując wniosek, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazie danych PUBMED, wykorzystując słowa kluczowe takie jak: hepatocyte isolation protocol, rat hepatocytes, primary hepatic cells. Ponadto, w trakcie przygotowywania wniosku, wzorowałem się na protokołach izolacji hepatocytów szczurzych udostępnionych przez firmy komercyjne (np. Biovit oraz Thermofisher). Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że zaplanowane czynności pozwolą na wydajną i powtarzalną izolację hepatocytów, przy równoczesnym minimalnym dystresie u zwierząt.

Ponieważ hepatocyty zostaną użyte do testów mających na celu wielostopniową, dokładną charakterystykę procesów metabolicznych dla testowanych związków małowcząsteczkowych, uzyskane dane przyczynią się do wskazania związków o pożądanych parametrach. Uzyskana wiedza pozwoli ograniczyć, już na etapie wstępnej selekcji związków, konieczność prowadzenia badań *in vivo* (farmakokinetyka, klatki metaboliczne). Dzięki temu także do dalszych badań *in vitro* oraz *in vivo* przekazywane będą wyłącznie związki spełniające najostrejsze kryteria dotyczące stabilności, uruchamianych ścieżek metabolicznych oraz powstających metabolitów.

Aktualne zapotrzebowanie na świeże hepatocyty szczurze w wielu równolegle realizowanych projektach wskazuje, że przewidziana liczba zwierząt będzie minimalna, ale wystarczająca do podtrzymania ciągłości badań *in vitro* na pobranym materiale. Żadne inne badania *in vitro* (np. w liniach komórkowych) nie są w stanie dostarczyć danych na powyższy temat, dlatego też zaplanowano regularną izolację hepatocytów szczurzych, która będzie prowadzona zgodnie z zasadami 3R.

ZASTĄPIENIE: Początkowe etapy projektowania nowych cząsteczek, będących potencjalnymi lekami, oparte jest o modelowanie z użyciem programów komputerowych *in silico*, co umożliwia uzyskanie

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

związków o odpowiedniej strukturze, zapewniającej specyficzne działanie. Dopiero po pozytywnym przejściu selekcji w testach *in vitro*, dotyczących m.in. ich aktywności czy cytotoksyczności, związki zostaną przekazane do badań związanych z ich metabolizmem. Modelami zwierzęcymi tego typu testów są badania z użyciem klatek metabolicznych oraz badania farmakokinetyczne. Nie są to jednak właściwe metody przesiewowe – metodą taką jest natomiast testowanie związków w hepatocytach szczurzych.

OGRANICZENIE: W eksperymencie przewidziano minimalną liczbę donorów hepatocytów wykorzystywanych w cyklach tygodniowych, biorąc pod uwagę możliwość ograniczenia liczebności wspólnych reakcji kontrolnych. Ilość uzyskiwanego materiału pozwoli na testowanie wielu nowych związków w kilku realizowanych projektach jednocześnie.

UDOSKONALENIE: Szczury użyte w badaniu będą pochodziły od certyfikowanych dostawców, a podczas wykonywania eksperymentów będą przebywały pod stałą opieką weterynaryjną. Przeprowadzana na nich procedura zostanie wykonana przez doświadczonych osoby, posiadające wymagane uprawnienia dotyczące pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi. W związku z tym przeprowadzenie doświadczeń odbędzie się z ograniczonym do minimum stresem czy bólem. Szczury będą przebywały w klatkach ze wzbogaconym środowiskiem (materiał gniazdowy, tunele, klocki drewniane), co przyczyni się do poprawy ich dobrostanu.

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.