

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. 1. Tytuł projektu: Ocena hepatoprotekcyjnego działania egzogenego H₂S, w modelu autoimmunologicznego zapalenia wątroby u myszy.

2. 2. Czas trwania projektu4 lata
.....

3. 3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) autoimmunologiczne zapalenie wątroby, siarkowodór, AP39.

4. 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.

Projekt naukowy otrzymał finansowanie w ramach konkursu PRELUDIUM 18 organizowanego przez Narodowe Centrum Nauki (nr decyzji: 2019/35/N/NZ7/04330).

Celem planowanych eksperymentów będzie zbadanie czy związek AP39, uwalniający H₂S w obrębie mitochondriów, hamuje proces zapalny i chroni mitochondria komórek wątroby przed zniszczeniem oraz czy zmniejsza uszkodzenie tego narządu w modelu autoimmunologicznego zapalenia wątroby (AZW) u myszy, a tym samym czy wykazuje potencjał terapeutyczny w tej chorobie. Dzięki zdolności przyłączania się do błony mitochondriów i zwiększania stężenia H₂S w obrębie tych organelli związek ten wykazywał korzystne działania w zwierzęcych modelach schorzeń, których patogeneza wiązała się z osłabieniem funkcji mitochondriów, takich jak: choroba Alzheimera, ostre uszkodzenie nerek, oparzenie, czy uszkodzenie mięśnia sercowego w wyniku niedokrwienia [Oxid Med. Cell Longev. 2016

article ID:2016:8360738; Shock 2016, 45(1), 88-97; Pharmacol. Res. 2016, 113, 348-355; Br J Pharmacol 2017, 174(4), 287-301]. W AZW na skutek intensywnego procesu zapalnego, skierowanego przeciwko komórkom wątrobowym dochodzi do stopniowego ich uszkodzania, co prowadzi do rozwoju niewydolności tego narządu. Badania ostatnich lat wskazują istotną rolę mitochondriów [L¹SEP]w postępie tej choroby, a ich ochrona przed zniszczeniem wydaje się być kluczowa w zahamowaniu śmierci hepatocytów [Gut. 2017;66(4):716-723]. Działanie hepatoprotekcyjne AP39 zostanie ocenione w dwóch schematach podania: przed wywołaniem zapalenia wątroby oraz w trakcie rozwiniętego zapalenia. Ocena działania AP39 będzie dokonana poprzez porównanie: stopnia nasilenia procesu zapalnego, integralności mitochondriów oraz wielkości uszkodzenia komórek wątroby pomiędzy grupami zwierząt chorych, poddanych działaniu AP39 a grupami chorych myszy, nie poddanych działaniu tego związku (grupy kontrolne). Osobną grupę w tych badaniach będą stanowić myszy zdrowe, otrzymujące rozpuszczalnik zamiast substancji wywołującej AZW. Dodatkowo, zostaną dołączone kolejne 2 grupy zwierząt, którym podany zostanie zamiast AP39, szybko uwalniający i nieukierunkowany na mitochondria donor H₂S – NaHS, który jest jednym z najczęściej stosowanych związków w badaniach nad mechanizmem działania H₂S. Donor ten wykazał korzystne działanie w modelu AZW podany 1 godzinę przed wywołaniem zapalenia wątroby [Drug Des. Devel. Ther. 2014,8,1277-1286] i chociaż, ze względu na swoją niestabilność i niekontrolowane uwalnianie H₂S, nie może być stosowany w leczeniu, w niniejszym badaniu będzie związkiem odniesienia. Dzięki temu możliwe będzie dokładniejsze zbadanie mechanizmów działania H₂S oraz znalezienie odpowiedzi na nurtujące nas pytanie: czy w tej jednostce chorobowej, lepsze efekty terapeutyczne przynosi zwiększenie stężenia tej gazowej cząsteczki w obrębie mitochondriów (jak zakłada nasza hipoteza) czy ogólne zwiększenie stężenia H₂S w komórkach (uruchomienie szlaków poza mitochondrialnych). Projekt zostanie podzielony na 3 etapy:

- I. I. Badania wstępne (procedura I), dzięki którym zostanie wybrana najefektywniejsza dawka związku AP39 w modelu AZW w dwóch badanych schematach podania: 1 godzinę przed oraz 1 godzinę po wywołaniu zapalenia wątroby.
- II. II. Badania farmakodynamiczne (procedura II i III), które dostarczą cennych informacji na temat działania AP39 w AZW.
- III. III. Badania farmakokinetyczne (procedura IV), które ujawnią losy badanego związku w organizmie myszy zdrowych, jak i z zaawansowanym zapaleniem wątroby (24 godziny po procedurze wywołania zapalenia).

Cel badań: [PB5] (badania podstawowe) Układ żołądkowo-jelitowy z uwzględnieniem wątroby.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W ramach projektu prowadzone będą badania farmakodynamiczne i farmakokinetyczne nad związkiem AP39, nowym donorem siarkowodoru nakierowanym na mitochondria w modelu autoimmunologicznego zapalenia wątroby u myszy domowej (BALB/c). Gatunek ten został wybrany na podstawie wnikliwej analizy danych literaturowych, z których wynika, że jest on szeroko stosowany [L¹SEP]w badaniach autoimmunologicznego zapalenia wątroby indukowanego podaniem konkanawaliny A. Planuje się wykorzystanie 264 tych zwierząt: 54 myszy w badaniach wstępnych doboru najbardziej

skutecznej dawki (9 grup x 6 myszy); 140 myszy w badaniach farmakodynamicznych (7 grup x 12 zwierząt = 84 myszy do badań biochemiczno-molekularnych) oraz 56 zwierząt (7 grup x 8 zwierząt) do badań immunohistochemicznych (osobna grupa ze względu na konieczność przeprowadzenia perfuzji przed izolacją wątroby) oraz 70 myszy w badaniach farmakokinetycznych (7 punktów czasowych x 5 zwierząt x 2 grupy). Liczebność grup została ustalona w oparciu o analizę mocy testu, tak by uzyskane w danych etapach projektu wyniki odznaczały się istotnością statystyczną.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

W niniejszych badaniach przewiduje się zastosowanie metod *in vivo* z wykorzystaniem myszy szczepu BALB/c. Przedstawiony projekt dotyczy bowiem problemu autoimmunologicznego zapalenia wątroby, choroby o nie w pełni poznanej etiologii, angażującej w swój patomechanizm wszystkie rodzaje komórek wątroby, a także wiele komórek układu immunologicznego. Nie jest zatem możliwe badanie mechanizmów działania potencjalnie korzystnie działających związków w tej jednostce chorobowej

z wykorzystaniem testów *in vitro* czy modelowania *in silico*. Dostępna literatura wskazuje, że w badaniach AZW, najlepszym gatunkiem jest mysz domowa, a zwłaszcza szczepy: BALB/c bądź C57BL/6 [Hindawi 2015, article ID:189785; Drug Des Devel Ther 2014,8,1277-1286; Int J Mol Sci. 2016;17(12):2007], a model wygenerowany podaniem dożylnym konkanawaliny A w dobrym stopniu odzwierciedla zmiany obserwowane u pacjentów z AZW, a więc stanowi odpowiednie narzędzie do badań nad odkrywaniem patomechanizmów tej jednostki chorobowej [Lab Anim. 2015;49(1 Suppl):12-20].

W niniejszym projekcie liczebność zaplanowanych grup eksperymentalnych została wyznaczona w oparciu o analizę mocy testu, jest więc najmniejsza z punktu widzenia obliczeń statystycznych. Badania będą przeprowadzone przez doświadczonych eksperymentatorów w sposób humanitarny, aby zadawać zwierzętom jak najmniej cierpienia. W trakcie badań zostaną podjęte wszelkie działania mające na celu ograniczenie bólu czy stresu, np. poprzez użycie środków znieczulających (przed czynnością uśmiercania).

Zwierzęta będą utrzymywane w standardowych/optimalnych warunkach, zgodnie z zasadami zgodności warunków bytowania i przeprowadzania doświadczeń na zwierzętach, zawartymi w traktacie UE nr 123 (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes CETS No.:123). Warunki: 12 godzinny cykl dobowy (12 godzin jasnych, 12 godzin ciemnych), temp. 20-24°C, wilgotność 55% (+/- 10%), 15-20 wymian powietrza na godzinę (przepływ powietrza: 0,3 m/s), wolny dostęp do wody i pokarmu. Będą utrzymywane w standardowych, zgodnych z przepisami klatkach. Materiał gnieźdzący będzie stanowiła ściółka wykonana z kilkumilimetrowych ścinków drewnianych wysuszona poprzez ogrzanie do temperatury 550°C. W klatkach umieszczone zostaną elementy wzbogacające środowisko, takie jak domki drewniane, klocki do ścierania zębów, tunele poliwęglanowe, wstążki papierowe etc.). Elementy wzbogacające środowisko będą cyklicznie wymieniane przy każdej zmianie ściółki w taki sposób, aby za każdym razem do środowiska wprowadzany był inny typ tego materiału. Osoba uczestnicząca w eksperymentach będzie odpowiedzialna za kontrolę dobrostanu zwierząt. Warunki bytowania zwierząt będą zgodne [L]^[1] z wytycznymi zawartymi w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14.12.2016..

Opis sporządzono na podstawie przeglądu literatury w bazie Pubmed używając słów autoimmune hepatitis, concanavalin A, H₂S oraz zgodnie z ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych.

Sposób realizacji zasady 3R

1. 1. Udoskonalenia

Zwierzęta

Myszy będą utrzymywane w odpowiednich warunkach bytowych oraz karmione certyfikowaną paszą bytową. W badaniach zostaną użyte jedнопłciowe grupy badawcze, o podobnym stopniu rozwoju (6-8 tygodni), co pozwoli na zredukowanie ilości zmiennych mogących wpłynąć na rozrzut otrzymanych wyników. Dodatkowo, podczas eksperymentów z użyciem zwierząt będzie prowadzona codzienna kontrola ich stanu zdrowia, a w razie zauważenia niepokojących objawów będzie zapewniony kontakt oraz pomoc ze strony lekarza weterynarii wchodzącego w skład zespołu ds. Dobrostanu Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

Pomieszczenie bytowe

Zwierzęta będą przebywały w pomieszczeniu bytowym służącym tylko do tego celu, w którym nie będą wykonywane czynności tj. iniekcje, eksperyment czy uśmiercanie, co ograniczy narażenie zwierząt na czynniki stresogenne. Ponadto pomieszczenie będzie wyposażone w system monitorowania temperatury oraz wilgotności.

Sala eksperymentalna

Czynności tj. iniekcje dożylnie, czy uśmiercanie zwierząt będą wykonywane w tzw. sali eksperymentalnej

Metoda badawcza

Model zwierzęcy zostanie wykonany zgodnie z rekomendacjami dostępnymi w literaturze. Aby zapewnić większy komfort myszom biorącym udział w eksperymentach, podawane związki będą rozpuszczone w roztworach nieindukujących podrażnienia tkanek, o temperaturze zbliżonej do temperatury ciała myszy.

1. 2. Ograniczenie

Na ograniczenie ilości wykorzystanych zwierząt pozwalają czynniki minimalizujące zmienność [SEP] i zwiększające powtarzalność pomiarów takie jak: stabilna pasza, jednorodność grup badanych pod względem wieku, masy ciała, płci; równy okres kwarantanny; ten sam/znany eksperymentator, zachowanie reżimu czasowego procedur.

3. Zastąpienie

W celu zweryfikowania hipotezy badawczej nie można zastosować metody wykluczającej wykorzystanie zwierząt doświadczalnych. Złożoność procesów zachodzących w patogenie AZW, jak i nieodkryta jeszcze jego pełna etiologia uniemożliwiają zastąpienie badań *in vivo* metodami *in vitro* czy *in silico*.

Ponadto, planowane badania należą do grupy badań podstawowych mających na celu poznanie działania donorów siarkowodoru (AP39 i NaHS) w tej złożonej jednostce chorobowej, co dodatkowo utrudnia możliwość zastąpienia zwierząt metodami alternatywnymi.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną

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

•

NIE