

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu:

„Inhibitory kotransportera glukozowo-sodowego 2 (SGLT2) jako potencjalne czynniki terapeutyczne w leczeniu nieswoistych chorób zapalnych jelit”.

2. Czas trwania projektu 01.08.2020-31.12.2021

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): Nieswoiste Choroby Zapalne Jelit (NZJ), SGLT-2, flozyny,

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): **A. Badania podstawowe – PB5 – układ żołądkowo-jelitowy z uwzględnieniem wątroby**

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.

A. Badania podstawowe – PB5 – układ żołądkowo-jelitowy z uwzględnieniem wątroby

Głównym celem projektu jest weryfikacja hipotezy, że inhibitory kotransportera glukozowo-sodowego 2 (SGLT-2) mogą zmniejszyć nasilenie stanu zapalnego w przebiegu Nieswoistego Zapalenia Jelit (NZJ). Dodatkowo, w badaniach chcielibyśmy ocenić zmiany ekspresji białka SGLT-2 w zmienionych zapalnie tkankach jelita grubego.

NZJ to grupa schorzeń, które charakteryzują się przewlekłym stanem zapalnym przewodu pokarmowego. W przebiegu NZJ obserwuje się zmianę profilu mikroflory jelitowej oraz nadaktywność cytokin prozapalnych. Zaburzenia te stanowią cechy wspólne z inną przewlekłą

jednostką chorobową, cukrzycą. Obecnie, leczenie NZJ oparte jest na wykorzystaniu glikokortykosteroidów, pochodnych kwasu 5-aminosalicylowego oraz leków biologicznych. Niestety, żadna ze strategii terapeutycznych nie jest w pełni satysfakcjonująca, a ich ulepszanie stanowi ważny cel dzisiejszej gastroenterologii.

Inhibitory SGLT-2 (flozyny) stanowią nową grupę doustnych leków przeciwcukrzycowych. Białko SGLT-2 ulega natomiast ekspresji w kanalikach bliższych nerki a jego blokada prowadzi do wydalania glukozy wraz z moczem. Badania przedkliniczne wykazały, że flozyny wywierają dodatkowy efekt przeciwzapalny, który może być niezależny od przytoczonego mechanizmu hipoglikemizującego. Dowodzą temu wyniki badań przeprowadzonych na modelach zarówno komórkowych, zwierzęcych oraz badania kliniczne na ludziach. Co więcej, mechanizm działania przeciwzapalnego flozyn nie jest jasny i może być niezależny od interakcji z białkiem SGLT-2.

Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA) zaakceptowała i dopuściła do obrotu 3 inhibitory SGLT-2: kanagliflozynę, empagliflozynę oraz dapagliflozynę. Dostępna literatura nie dostarcza dostatecznej wiedzy o różnicach w działaniu oraz możliwościach wykorzystania powyższych leków w stanach przewlekłego stanu zapalnego, który jest niezależny od hiperglikemii.

W celu weryfikacji hipotez badawczych wykorzystamy model DSS, który jest zbliżony do obrazu NZJ u człowieka. Procedury będą wykonywane przez wykwalifikowanych i doświadczonych badaczy a stężenie DSS jest ustalane na podstawie danych literaturowych, opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz własnych doświadczeń naukowców zaangażowanych w ten projekt. Niestety, model DSS uznaje się za dotkliwy dla zwierząt, u których w efekcie występują takie objawy jak spadek masy ciała, biegunka oraz osłabienie. Co więcej, podanie badanych substancji przy pomocy sondy dożołądkowej naraża zwierzęta na dodatkowy stres. W przypadku tej procedury, użycie środków znieczulających i uspokajających jest jednak niemożliwe. Myszy przyporządkowane do grupy kontrolnej nie mogą zostać oddane do adopcji, ponieważ ich tkanki muszą zostać wykorzystane do dalszych analiz biomolekularnych jako punkt odniesienia do porównań z grupą traktowaną DSS. W efekcie, każda z myszy wykorzystanych w doświadczeniu zostanie uśmiercona w celu pobrania materiału do badań. Z drugiej strony, wyniki naszych badań mają szansę znacznie przyczynić się do rozwoju terapii NZJ, w której inhibitory SGLT-2 mogłyby stanowić terapię uzupełniającą. Badania przyczynią się także do optymalizacji leczenia osób chorych jednocześnie na cukrzycę oraz NZJ. Co więcej, uzyskane obserwacje będą przydatne dla wyjaśnienia przyczyn przeciwzapalnego efektu flozyn.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, zweryfikowałem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych:

_×_EBSCO; _×_PUBMED; _×_Google Scholar; _×_ScienceDirect; _×_Web of Science (JCR);

Wykorzystałem słowa kluczowe:

SGLT-2, inflammation, Inflammatory Bowel Disease, colitis, gliflozins

Zasada zastąpienia:

Po zapoznaniu się z istniejącą literaturą stwierdzam, że zbadanie wpływu inhibicji białka SGLT-2 w przebiegu stanu zapalnego jelit wymaga badań z użyciem organizmu żywego. Układ pokarmowy myszy posiada podobną budowę anatomiczną i fizjologię do układu pokarmowego człowieka. Użycie myszy pozwoli zatem na najlepsze odwzorowanie choroby u człowieka. Wybór badanego związku oraz jego dawek zostanie dokonany na podstawie badań *in vitro*. Dalsze procedury nie mogą jednak zostać zastąpione przez badania z użyciem linii komórkowych, a zwierzęta kręgowce nie mogą zostać zastąpione innym modelem. Z uwagi na brak danych klinicznych na temat bezpieczeństwa stosowania danego związku u chorych na NZJ, badania na ochotnikach byłyby niedopuszczalne. Podsumowując, nie istnieje inna zadowalająca z naukowego punktu widzenia metoda, w której nie używane byłyby zwierzęta laboratoryjne mogąca dostarczyć wiarygodnych wyników.

Zasada ograniczenia:

Na podstawie istniejącej literatury i zgodnie z analizą statystyczną liczba zwierząt laboratoryjnych użyta w tym projekcie została ograniczona do niezbędnego minimum.

W ramach tego projektu tak dobrano gatunek i szczep zwierząt laboratoryjnych oraz modele zapalenia jelit aby zapewnić jak największą powtarzalność wyników. Wybrane modele stanu zapalnego jelit są relatywnie proste w porównaniu do innych dostępnych w literaturze, nie wymagają przeprowadzania skomplikowanych podań substancji lub zabiegów chirurgicznych. Co ważne, wybrane do badań modele cechuje niska śmiertelność, dzięki czemu ilość zwierząt jest zredukowana do absolutnego minimum jednocześnie zachowując możliwość uzyskania wyników istotnie statystycznych.

Zasada udoskonalenia:

Podanie dozoławkowe wykonywane jest rutynowo przez wykwalifikowanych badaczy mających wieloletnie doświadczenie w pracy ze zwierzętami. Objętość stosowanych substancji została ustalona na

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

podstawie danych literaturowych, opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Wybrana objętość stosowana w podaniu dożoładkowym nie powoduje nadmiernego rozdęcia żołądka u myszy laboratoryjnej i tym samym dodatkowego cierpienia. Sonda dożoładkową nie jest ostro zakończona dzięki temu nie powoduje urazów mechanicznych jamy ustnej, gardła i przełyku zwierzęcia podczas wykonywania podania.

Stężenie DSS zostało ustalone na podstawie danych literaturowych, opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Samce myszy domowej przebywając w większej ilości w klatkach przez długi czas mogą wykazywać agresję w stosunku do innych myszy. Wybrany do badań szczep myszy domowej cechuje względnie niska agresywność wewnątrzgrupowa, tym samym dołożono wszelkich starań, aby myszy doznały jak najmniejszego cierpienia oczekując na eksperyment (Lidster, K., Owen, K., Browne, W.J. et al. Cage aggression in group-housed laboratory male mice: an international data crowdsourcing project. Sci Rep 9, 15211 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51674-z>)

Dodatkowo zwierzęta laboratoryjne przebywają w odpowiednich klatkach wzbogaconych o 2 papierowe rolki o różnych średnicach oraz długościach (wymiana min. 1 raz w tygodniu), co pozwala na obniżenie poziomu stresu zwierząt. Modele stanu zapalnego jelit zostały tak wybrane, aby dostarczyć jak najmniejszych cierpień dla zwierząt. W obrębie planowanych eksperymentów wykonuje się mało dotkliwe czynności (podania dożoładkowe i pokarmowe). Dodatkowo celem zminimalizowania cierpienia u zwierząt zrezygnowano z pobierania krwi do dalszych badań.

Niestety, podczas wykonywanych procedur nie jest możliwe zastosowania środków znieczulających (np. izofluran) i/lub przeciwbólowych (np. opioidy), gdyż uznano, że mogłyby one wpłynąć na przebieg procedur, a uzyskane wyniki mogłyby być niezetelne. Wynika to z przeciwzapalnych właściwości anestetyków (Björck S et al., Dig Dis Sci. 1997 Apr;42(4):824-32; Arlander E et al, Aliment Pharmacol Ther. 1996 Feb;10(1):73-81; Chiang N et al, PLoS One. 2008 Apr 2;3(4):e1879. doi: 10.1371/journal.pone.0001879) i analgetyków (Jirkof P, Lab Anim (NY). 2017 Mar 22;46(4):123-128. doi: 10.1038/labani.1216; Docherty MJ et al., Gastroenterol Hepatol (N Y). 2011 Sep;7(9):592-601).

Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

- ☒ X 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.