

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projekt : **Wpływ agonisty i antagonisty receptora TLR4 oraz agonisty receptora TLR3 na rozwój ostrego, doświadczalnego zapalenia trzustki u szczurów wywołanego taurocholanem sodu**

2. Czas trwania projektu: 2016-2018

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) receptory TLR- zapalenie- trzustka- szczury

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) - Badania podstawowe (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.

Z badań doświadczalnych przeprowadzonych na modelach zwierzęcych wynika, że we wczesnej fazie ostrego zapalenia trzustki dochodzi do wzrostu ekspresji receptorów Toll-like (TLR), głównie TLR4 i TLR3, co pobudza układ odpornościowy i nasila odpowiedź zapalną objawiająca się klinicznie zmianami narządowymi. Natomiast w fazie późnej, gdzie dochodzi do obniżenia ekspresji receptorów TLR następuje hamowanie układu odpornościowego objawiające się powikłaniami infekcyjnymi, co skutkuje wysoką śmiertelnością.

Zaprojektowane doświadczenie ma cel naukowy.

Celem projektu badawczego jest przeprowadzenie doświadczeń, które pozwoliłyby na określenie ewentualnego działania ochronnego zastosowanych substancji to jest agonisty i antagonisty receptorów TLR4 oraz agonisty receptorów TLR3 w stosunku do uszkodzonej trzustki. W doświadczeniu substancją uszkadzającą trzustkę i wywołującą stan zapalny jest taurocholan sodu podawany bezpośrednio do przewodu żółciowo-trzustkowego. Doświadczenie opiera się na

wystandaryzowanym modelu prowadzącym w sposób powtarzalny do powstania ostrego zapalenia trzustki porównywalnego ze stanem chorobowym ludzi. Substancje o proponowanym działaniu leczącym (agonista, antagonist receptorów TLR4 i agonista receptorów TLR3) będą podawane jednorazowo, dootrzewnowo 2 godziny przed uszkodzeniem trzustki. Następnie 24 godziny po uszkodzeniu (grupy A) lub 48 godzin (grupy B) zwierzęta będą poddawane eutanazji i pobierana będzie krew oraz tkanka trzustki do oznaczeń biochemicznych (aktywność lipazy, amylazy, stężenie TNF-alfa, IL-1, IL-6) i histo-patologicznych. Taki sam podział na grupy A i B będzie dotyczył kontroli, w której zwierzęta będą dostawały do przewodu żółciowo-trzustkowego 0.9% NaCl. Mamy nadzieję, że przeprowadzone doświadczenie pogłębi wiedzę na temat mechanizmów uszkodzenia trzustki - choroby, której patomechanizm wciąż pozostaje niejasny i która charakteryzuje się wysoką śmiertelnością pacjentów. Ponadto sądzimy, że uzyskane wyniki potwierdzą sugestię ochronnego działania badanych substancji w ostrym zapaleniu trzustki i będą mogły być szansą leczenia farmakologicznego pacjentów z chorobą tego narządu. Z drugiej jednak strony mamy świadomość, że proponowane doświadczenie może spowodować szkody u zwierząt objawiające się dolegliwościami bólowymi. Dlatego też w trakcie wykonywania doświadczenia podjęte będą wszystkie możliwe działania, które zminimalizowałyby tego rodzaju odczucia u zwierząt (postępowanie premedykacyjne, indukcja i podtrzymanie anestezji oraz opieka przeciwbólowa po operacji i w dniach następnych). Ponadto w celu zmniejszenia utraty ciepła podczas zabiegu stosowane będą lampy grzewcze i płynoterapia (5 % glukoza, 0.9% NaCl podgrzane do temperatury ciała szczurów). Po wybudzeniu zwierzęta będą przebywać w osobnym, bezpiecznym miejscu. Zespół wykonujący doświadczenia ma praktykę i umiejętności w wykonywaniu badań na zwierzętach.

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

Planowane doświadczenia będą przeprowadzane na szczurach, samcach, szczepu Wistar o początkowej masie ciała 200-220 g. Ogólna liczba zwierząt użyta w doświadczeniu będzie wynosić 128 osobników podzielonych na 16 grup doświadczalnych (2 grupy kontrolne i 14 grup badanych po 8 zwierząt w każdej grupie). Badane grupy zwierząt będą różniły się czasem zakończenia doświadczenia, który będzie równoznaczny z czasem eutanazji szczurów: to jest: w grupach A doświadczenie będzie zakończone po 24 godzinach a w grupach B po 48 godzinach od momentu podania odpowiednio: 0.9% NaCl lub taurocholanu sodu.

W zaplanowanym doświadczeniu zastosowano liczbę zwierząt optymalną dla wykonania procedury polegającej na przeprowadzeniu zabiegu chirurgicznego celem podania do przewodu żółciowo-trzustkowego taurocholanu sodu. Zaproponowana ilość jest odpowiednia dla uzyskania z otrzymanych wyników badań wiarygodnych prawidłowości statystycznych. Jednym z badanych parametrów będzie pomiar stężenia mediatorów zapalenia, które pojawiają się w różnym czasie

od momentu uszkodzenia trzustki. W związku z tym, żeby zbadać pojawiające się różnice stężeń mediatorów doświadczenie zostało zaprojektowane w ten sposób, że każda grupa doświadczalna została podzielona na 2 grupy: A i B różniące się czasem zakończenia doświadczenia.

Podział grup doświadczalnych, rodzaj podawanych substancji i sposób ich podawania oraz procedury i ilość wykorzystanych w procedurze zwierząt przedstawiono w Tabeli nr 1. i na Wykresie nr 1.

Tabela 1. Podział grup doświadczalnych. (rec. - receptor)

Nr grupy	Podawane substancje	Sposób podawania	Procedury	Liczba zwierząt w procedurze
kontrola I A	0.9% NaCl (usypianie po 24 h)	do przewodu trzustkowego	umiarkowana	8
I B	0.9% NaCL (usypianie po 48 h)	do przewodu trzustkowego	umiarkowana	8
II A	taurocholan sodu (usypianie po 24 h)	do przewodu trzustkowego	dotkliwa	8
II B	taurocholan sodu (usypianie po 48 h)	do przewodu trzustkowego	dotkliwa	8
III A	agonista rec. TLR4 (usypianie po 24 h)	dootrzewnowo	łagodna	8
III B	agonista rec. TLR4 (usypianie po 48 h)	dootrzewnowo	łagodna	8
IV A	agonista rec.TLR4 + taurocholan sodu (usypianie po 24 h)	dootrzewnowo  do przewodu trzustkowego	łagodna  dotkliwa	8
IV B	agonista rec. TLR4 + taurocholan sodu (usypianie po 48 h)	dootrzewnowo  do przewodu trzustkowego	łagodna  dotkliwa	8
V A	antagonista rec. TLR4 (usypianie po 24 h)	do przewodu trzustkowego	łagodna	8
V B	antagonista rec. TLR4 (usypianie po 48 h)	do przewodu trzustkowego	łagodna	8
VI A	antagonista rec. TLR4 + taurocholan sodu (usypianie po 24 h)	dootrzewnowo  do przewodu trzustkowego	łagodna  dotkliwa	8
VI B	antagonista TLR4	dootrzewnowo	łagodna	8

	+ taurocholan sodu (usypianie po 48 h)	do przewodu trzustkowego	dotkliwa	
VII A	agonista rec. TLR3 (usypianie po 24 h)	dootrzewnowo	łagodna	8
VII B	agonista rec. TLR3 (usypianie po 48 h)	dootrzewnowo	łagodna	8
VIII A	agonista rec. TLR3 + taurocholan sodu (usypianie po 24 h)	dootrzewnowo  do przewodu trzustkowego	łagodna  dotkliwa	8
VIII B	agonista rec. TLR3 + taurocholan sodu (usypianie po 48 h)	dootrzewnowo  do przewodu trzustkowego	łagodna  dotkliwa	8

Razem 128 zwierząt

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Przygotowując projekt badawczy sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazie danych PUBMED. Wykorzystałam następujące słowa kluczowe:

- zapalenie trzustki - antagonistę receptora TLR4 - szczury
- zapalenie trzustki - agonista receptora TLR4 - szczury
- zapalenie trzustki - agonista receptora TLR3 - szczury

Na podstawie przeszukanej literatury stwierdzam, że badania na zwierzętach we wczesnej fazie ostrego zapalenia trzustki wykazały wzrost ekspresji receptorów TLR, co powoduje nasiloną odpowiedź zapalną. Natomiast w fazie późnej dochodzi do obniżenia ekspresji receptorów TLR i hamowania układu odpornościowego prowadząc do powikłań infekcyjnych i dużej śmiertelności. Wśród receptorów TLR na szczególną uwagę zasługują receptory TLR4 i TLR3. W przeszukanym materiale nie znalazłam informacji dotyczących wpływu agonistów i antagonistów powyższych receptorów na stan uszkodzonego narządu. W związku z tym określenie roli tych substancji w doświadczalnym modelu zapalenia trzustki wydaje się być interesujące.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pogłębi wiedzę na temat mechanizmów uszkodzenia trzustki (pozwoli określić wpływ agonistów i antagonistów receptorów TLR4, TLR3 na stężenia cytokin zapalnych oraz na stan uszkodzonej trzustki i ewentualną poprawę

parametrów zapalnych). Ponadto badane substancje być może będą szansą dodatkowej terapii farmakologicznej u pacjentów ze stanem zapalnym trzustki.

#### 1 zasada ( zastąpienie)

W prezentowanych doświadczeniach nie można stosować metody badawczej zapewniającej osiągnięcie zaplanowanych celów bez wykorzystania zwierząt. Metody alternatywne sprawdzane w bazach danych (PUBMED) opierające się na hodowlach komórkowych nie są liczne , ale nawet wówczas konieczna jest ich weryfikacja in vivo. Z danych literaturowych wynika, że szczury są głównym gatunkiem zwierząt stosowanym w modelu doświadczalnego zapalenia trzustki polegającym na bezpośrednim podaniu taurocholanu sodu (substancja indukująca zapalenie) do przewodów żółciowych. Użycie tego modelu prowadzi w sposób powtarzalny do uzyskania oczekiwanych zmian zapalnych. Należy podkreślić, że eksperymentalne modele ostrego zapalenia trzustki okazały się użyteczne i nadal są podstawowym narzędziem umożliwiającym badanie patogenezę tego schorzenia i nowych koncepcji terapeutycznych.

#### 2 zasada ( redukcja)

W prezentowanym badaniu zastosowano 128 zwierząt. Liczba ta została ograniczona do niezbędnego minimum koniecznego do osiągnięcia wyznaczonych celów (uzyskanie wiarygodnych wyników do opracowań statystycznych). Badanie opiera się na sprawdzonej metodzie pozwalającej uzyskać w sposób powtarzalny stan zapalny narządu . W realizacji doświadczenia uczestniczą osoby przeszkolone i mające doświadczenie w pracy ze zwierzętami.

#### 3 zasada ( doskonalenie)

Zwierzęta od momentu dostarczenia przez hodowcę przez okres aklimatyzacji i wykonywania doświadczeń przebywać będą w bardzo dobrych warunkach- nowoczesnych pomieszczeniach Ośrodka Medycyny Doświadczalnej, który spełnia wszystkie wymagane warunki dotyczące zwierząt laboratoryjnych (zgodne z wytycznymi dla danego gatunku). Przygotowanie personelu zajmującego się zwierzętami jest odpowiednie. Wszystkie zwierzęta przechodzą aklimatyzację i handling. W doświadczeniu stosowany jest powtarzalny model pozwalający na uzyskanie założonego celu. Ponieważ model opiera się przeprowadzeniu operacji celem podania induktora zapalenia (taurocholan sodu) zastosowano pełne postępowanie premedykacyjne, indukcję i podtrzymanie znieczulenia oraz działanie pooperacyjne (leki przeciwbólowe w dawkach powtarzanych, płynoterapia: 0.9% NaCL, 5% glukoza podgrzane do temperatury ciała zwierząt, zapewniono również bezpieczne miejsce do wybudzenia). Zwierzęta po zabiegu operacyjnym będą przebywały w klatkach pojedynczo (grupy A) a następnie będą łączone (grupy B). Po

zakończeniu doświadczenia szczury będą poddawane planowemu uśmiercaniu,