

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Ocena właściwości prewencyjnych i leczniczych katelicydyny we włóknieniu płuc. Badania *in vivo* i molekularne w mysim modelu alergicznego zewnątrzpo pochodnego zapalenia pęcherzyków płucnych (AZPP)”

2. Czas trwania projektu 40 miesięcy

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): katelicydyna, *Pantoea agglomerans*, włóknienie płuc, AZPP

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.

Wraz ze starzeniem się społeczeństwa dramatycznie rośnie liczba osób cierpiących z powodu włóknienia płuc. Niestety obecnie nie jest znany żaden skuteczny sposób jego leczenia a czas przeżycia jest dramatycznie niski. Do włóknienia płuc dochodzi w przebiegu wielu chorób układu oddechowego m.in. w AZPP (alergiczne zewnątrzpo pochodne zapalenie pęcherzyków płucnych). Ponieważ u podstaw włóknienia płuc leżą zaburzenia naprawy uszkodzonego nabłonka płuc zakładamy, że usprawnienie procesu jego regeneracji poprzez podanie katelicydyny (peptyd odpornościowy) zapobiegnie, zahamuje lub odwróci rozwój niekorzystnych zmian.

Celem projektu jest określenie możliwości wykorzystania podawanej wziewnie katelicydyny w prewencji i leczeniu włóknienia płuc.

Badania zostaną przeprowadzone w mysim modelu AZPP, w którym włóknienie płuc jest indukowane przez powtarzające się inhalacje myszy szczepu C57BL/6J antygenem bakteryjnym *Pantoea agglomerans*. Badane czynniki (katelicydyna, *P.agglomerans*) zostaną wprowadzone do dróg oddechowych myszy w formie aerozolu za pomocą systemu do inhalacji. Dodatkowo w trakcie eksperymentów monitorowane będą u

myszy parametry oddechowe metodą pletyzmografii. Inhalacje i pletyzmografia są metodami nieinwazyjnymi, niemniej jednak z uwagi na konieczność unieruchomienia zwierząt w trakcie ich wykonywania oraz ze względu na będące następstwem inhalacji zmiany patologiczne w obrębie dróg oddechowych, najwyższy poziom dotkliwości zaplanowanych procedur określono jako umiarkowany.

Uzyskane wyniki pozwolą na: potwierdzenie lub wykluczenie możliwości wykorzystania katelicydyny w prewencji i/lub leczeniu włóknienia płuc; ocenę potencjału przeciwbakteryjnego i/lub regeneracyjnego podawanej wziewnie katelicydyny w obrębie płuc; analizę wpływu podawanej wziewnie katelicydyny na płuca i komponenty układu odpornościowego w warunkach fizjologicznych i patologicznych; poznanie molekularnego mechanizmu działania katelicydyny. Uzyskane wyniki przyczynią się do stworzenia skutecznej i bezpiecznej strategii zapobiegania i leczenia włóknienia płuc u ludzi.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Badania zostaną przeprowadzone na myszach szczepu C57BL/6J (predestynowane do włóknienia). W doświadczeniu zostanie wykorzystanych 108 myszy (samice w wieku 2.5-3 miesiące) podzielonych na 9 grup badanych.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziliśmy istniejący stan wiedzy w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED; Google Scholar

Wykorzystaliśmy następujące słowa kluczowe: antimicrobial peptides/ cathelicidin/ LL37/hypersensitivity pneumonitis /pulmonary fibrosis /innate immunity /animals models of pulmonary fibrosis /treatment of pulmonary fibrosis

Na podstawie analizy istniejącej literatury, stwierdziliśmy że z uwagi na postępujący proces starzenia się społeczeństwa włóknienie płuc jest coraz częstszą patologią. Niestety, jest to zaburzenie źle rokujące: obecnie nie jest znany żaden skuteczny sposób jego leczenia a czas przeżycia jest dramatycznie niski (3-5 lat). Do włóknienia płuc dochodzi w przebiegu wielu chorób układu oddechowego a jedną z najczęstszych jego przyczyn jest alergiczne zewnątrzpochodne zapalenie pęcherzyków płucnych (AZPP). Ponieważ u podstaw włóknienia płuc leżą zaburzenia naprawy uszkodzonego nabłonka oddechowego zakładamy, że usprawnienie procesu jego regeneracji poprzez podanie naturalnego stymulatora tego procesu katelicydyny (peptyd odpornościowy) zapobiegnie, zahamuje lub odwróci rozwój niekorzystnych zmian. Słuszność takiej koncepcji potwierdzają wyniki badań, które wykazały zmniejszenie stężenia endogennej katelicydyny we włóknieniu płuc oraz po ekspozycji na pył organiczny (m.in. antygen *P. agglomerans*). Pomimo tych doniesień nikt do tej pory nie podjął się weryfikacji tej hipotezy. Należy podkreślić, że będzie to pierwsza próba użycia katelicydyny w prewencji i leczeniu włóknienia płuc oraz pierwsza próba jej wziewnej aplikacji. Uzyskane wyniki przyczynią się do stworzenia skutecznej i bezpiecznej strategii zapobiegania/leczenia włóknienia płuc u ludzi.

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

Realizacja zasady ograniczenia

- Liczbę zwierząt w poszczególnych grupach badanych ograniczono do wymaganego uzyskaniem wiarygodnych wyników minimum statystycznego.
- Zbieranie jak największej ilości informacji z punktu widzenia założonego celu: analiza parametrów oddechowych, szczegółowa analiza histopatologiczna, immunologiczna, biochemiczna i molekularna.
- Wykorzystanie w doświadczeniu sprawdzonego modelu badawczego - myszy model włóknienia płuc w przebiegu AZPP.
- Wykorzystanie najnowocześniejszej aparatury naukowo-badawczej (wieża inhalacyjna, pletyzmograf).
- Praca ze sprawdzonym i dobrze przeszkolonym personelem.

Realizacja zasady zastąpienia

- Złożoność procesu włóknienia płuc jak również brak danych literaturowych o wpływie podawania egzogennej katelicydyny na układ oddechowy w warunkach fizjologicznych oraz toczącego się stanu zapalnego czy rozwijającego się włóknienia uniemożliwia wykorzystanie metod alternatywnych (badania *in vitro*, analizy *in silico* czy też „organ on chips”) wymuszając konieczność prowadzenia badań na zwierzętach.
- Wybór do doświadczenia myszy szczepu C57BL/6J uwarunkowany jest przede wszystkim wcześniejszymi wynikami badań, w których uzyskano wyraźne oznaki włóknienia u myszy szczepu C57BL/6J inhalowanych antygenem *P. agglomerans* co umożliwiło stworzenie nowego zwierzęcego modelu AZPP, który zostanie wykorzystany w prezentowanym projekcie.

Realizacja zasady doskonalenia

- Kompetentny i dobrze wyszkolony personel gwarantujący właściwą opiekę nad zwierzętami w trakcie eksperymentu jak również wykonania wszystkich zaplanowanych procedur zgodnie z zasadami etyki i dobrej praktyki laboratoryjnej.
- Doświadczenia zostaną przeprowadzone w mało inwazyjnym modelu włóknienia płuc (w porównaniu z innymi powszechnie stosowanymi modelami np. z wykorzystaniem podawanej dotchawiczo bleomycyny). Najwyższy poziom dotkliwości zaplanowanych procedur ustalano jako „umiarkowany” co związane jest z ograniczeniem swobody ruchu zwierząt jak również z będącymi następstwem inhalacji zmianami patologicznymi w obrębie płuc.
- Wykorzystanie w procedurach technik (nieinwazyjna pletyzmografia; ważenie) pozwalających na bezbolesny i bezstresowy pomiar zaplanowanych parametrów.
- Humanitarne zakończenie procedur metodą dyslokacji kręgów szyjnych z przerwaniem rdzenia kręgowego lub dekapitacji (z uwagi na charakter prowadzonych badań niemożliwym jest wykorzystanie wziewnych metod eutanazji).