

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: *Ocena wpływu mykofenolanu mofetylu na liczebność limfocytów T i B oraz komórek NK u myszy*
2. Czas trwania projektu: 4 tygodnie (doświadczenie zostanie wykonane w okresie od 3.11.2020 do 31.12.2020)
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): mykofenolanu mofetylu, liczebność bezwzględna, limfocyty, komórki NK, węzły chłonne
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.

Mimo że mykofenolan mofetylu jest od dawna stosowany jako lek immunosupresyjny, to stosunkowo mało wiemy o jego negatywnym wpływie na układ immunologiczny, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu na limfocyty T, B i komórki NK. U człowieka badano jedynie wpływ leku na liczebność bezwzględną niektórych typów limfocytów krwi obwodowej, ale krew nie jest tkanką, gdzie w pełni może uwydatnić się limfotoksyczny wpływ leku. Właściwymi tkankami do tego typu badań są narządy limfatyczne. Oszacowanie tego parametru wymaga pobrania całych węzłów chłonnych i śledziona, stąd z natury rzeczy takie badania są niewykonalne u człowieka. Badania zostaną przeprowadzone na 12-tygodniowych myszach Balb/c. Myszy grupy eksperymentalnej będą otrzymywać przez miesiąc mykofenolan mofetylu za pomocą iniekcji dootrzewnowej, a

myszki grupy kontrolnej rozpuszczalnik leku (czynność 1). Po eutanazji zwierząt (czynność 2) pobrane zostaną węzły chłonne głowy i szyi, krezkowe oraz śledziona do badania cytometrycznego, za pomocą którego ustali się wpływ leku na odsetek i liczebność bezwzględna limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, limfocytów B i komórek NK w tych narządach.

Celem niniejszych badań jest ocena wpływu mykofenolanu mofetylu na liczebność względną i bezwzględną limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, limfocytów B i komórek NK w narządach limfatycznych myszy. Wypełnienie tej luki w wiedzy może mieć znaczenie nie tylko poznawcze, ale i aplikacyjne. Aplikacyjne, gdyż rzuci światło na to, czy przy stosowaniu leku można spodziewać się znaczącego negatywnego wpływu leku na prawidłowe limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺, limfocyty B i komórki NK, co może mieć znaczenie przy doborze przez lekarza leku immunosupresyjnego w aspekcie statusu immunologicznego pacjenta i chorób współistniejących.

Kategoria badań:

A – badania podstawowe; podkategoria: układ odpornościowy (PB7)

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu zaplanowano wykorzystanie 20 myszy (12-tygodniowych) BALB/c płci żeńskiej.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem, w następujących bazach danych: EBSCO; PUBMED; Google Scholar; AGRICOLA; ScienceDirect; Web of Science (JCR); HighWire; Springer; Wiley Online Library; DeGruyter (Versita).

Wykorzystałem słowa kluczowe: mycophenolate mofetil lub mycophenolic acid w kontekście: CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, B cells, NK cells, regulatory cells, effector cells, Th1 cells, Th17 cells, IL-17, IFN- γ , lymph nodes, spleen, apoptosis.

Na podstawie danych w dostępnej literaturze i ogólnie akceptowalnych poglądów w immunologii doświadczalnej i klinicznej stwierdzam, że:

Zasada zastąpienia: W niniejszych badaniach oceniać się będzie wpływ mykofenolanu mofetylu na liczebność bezwzględną limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, limfocytów B i komórek NK w narządach limfatycznych takich jak węzły chłonne głowy i szyi, krezkowe oraz śledziona. Tego rodzaju badania wiążą się z koniecznością pośmiertnego pobrania całych narządów limfatycznych, stąd ze swojej natury nie mogą być prowadzone na człowieku i zwierzętach towarzyszących. To właśnie mysz jest gatunkiem modelowym przy badaniach nad możliwością negatywnego wpływu leków (lub kandydatów na nowe leki) na układ immunologiczny. Narządy

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

limfatyczne myszy są małe, stąd można ocenić wpływ leku na liczebność komórek w całym pakiecie węzłów chłonnych i w całej śledzionie, co daje bardziej wiarygodne wyniki, niż gdyby to oceniano w stosunku do wycinka/biopsatu narządu (co byłoby wymuszone sytuacją, gdyby prowadzić takie badania na zwierzętach, u których narządy te są dużych rozmiarów). Należy zaznaczyć, że u zwierząt o większych rozmiarach narządów limfatycznych takie badanie (czyli obejmujące całe narządy limfatyczne) ze względów praktycznych byłoby w zasadzie niewykonalne (bądź byłoby to bardzo kosztowne i czasochłonne). Należy także dodać, że badania *in vitro* w zakresie założonych parametrów nie zastąpią w wiarygodny sposób badań *in vivo*, gdyż w warunkach *in vitro* nie dochodzi do metabolizmu leku i ekspozycja komórek na niego nie oddaje faktycznego stanu mającego miejsce przyżyciowo. Badania *in vitro* w zakresie oceny wpływu leku na liczbę bezwzględną komórek immunokompetentnych mogą stanowić rodzaj badań dodatkowych względem badań *in vivo*, ale ich nie zastępują. Podsumowując, w aspekcie założonych celów naukowych mysz stanowi jedyny gatunek do przeprowadzenia niniejszych badań.

Zasada ograniczenia: Dotychczasowy stan wiedzy na temat tego typu badań pozwala na stwierdzenie, że wybór metod badawczych jest adekwatny do osiągnięcia zamierzonego celu i umożliwia otrzymanie wiarygodnych ze statystycznego punktu widzenia wyników (*Praktyczne aspekty szacowania liczebności próby w badaniach empirycznych – Janusz Wątroba, StatSoft Polska Sp. z o.o.*). Liczba i gatunek użytych zwierząt do badań (grupa kontrolna: 10 myszy; grupa eksperymentalna: 10 myszy) wynika przede wszystkim z ogólnie przyjętych w nauce standardów w tego rodzaju badaniach i została określona z zachowaniem minimalnych potrzeb do uzyskania wiarygodnych wyników badań. Ponadto należy zaznaczyć, że warunkiem przyjęcia do druku pracy naukowej prezentującej wyniki tego typu badań (tj. badań nad oceną możliwości negatywnego wpływu leku na układ immunologiczny) do czasopisma o zasięgu światowym (tj. z indeksowanego w bazie JCR) jest przedstawienie średnich danych uzyskanych minimum od 8-10 zwierząt/grupę. W świetle tego w niniejszym projekcie zastosowano taką właśnie liczbę zwierząt, tak więc liczba ta jest praktycznie ograniczona do minimum i dalsze ograniczenia liczebności osobników w grupie uniemożliwiłoby otrzymanie wiarygodnych wyników (analiza wielkości próby z wykorzystaniem testu analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA przy użyciu oprogramowania SigmaPlot 12.0). Użycie mniejszej liczby zwierząt/grupę skutkowałoby niską wiarygodnością uzyskanych wyników, i co się z tym wiąże, z brakiem szans na ich opublikowanie w czasopiśmie o zasięgu światowym. Tym samym doszłoby do marnotrawstwa życia zwierząt i środków zużytych do wykonania eksperymentów, nie wspominając o czasie. Należy dodać, że wyniki badań prowadzonych przez wnioskodawcę *in vivo* na myszach, na które wyraziła zgodę Lokalna Komisja Etyczna, zostały opublikowane w tak prestiżowych czasopismach, jak *European Journal of Pharmacology* czy *International Immunopharmacology*. Było to właśnie możliwe dzięki temu, że recenzenci uznali, że liczba myszy użytych w doświadczeniach była wystarczająca, aby wyniki uznać za wiarygodne, a tym samym nadające się do opublikowania w tych czasopismach.

Zasada udoskonalenia: Chociaż mykofenolan mofetylu jest od dawna stosowany jako lek immunosupresyjny (w

profilaktyce odrzucania przeszczepów, jak i do leczenia różnych chorób autoimmunologicznych), to stosunkowo mało wiemy o jego negatywnym wpływie na układ immunologiczny, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu na limfocyty T, B i komórki NK. Istnieją uzasadnione przesłanki, że taki wpływ może mieć miejsce poprzez proapoptotyczne działania leku na limfocyty. U człowieka badano jedynie wpływ leku na liczebność bezwzględną niektórych typów limfocytów krwi obwodowej, ale krew nie jest tkanką, gdzie w pełni może uwydatnić się limfotoksyczny wpływ leku. Właściwymi tkankami do tego typu badań są narządy limfatyczne. Oszacowanie tego parametru wymaga pobrania całych węzłów chłonnych i śledziony, stąd z natury rzeczy takie badania są niewykonalne u człowieka. Tak więc istotną luką w wiedzy jest brak badań w których oceniano by wpływ leku na liczebność bezwzględną limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, limfocytów B i komórek NK w narządach limfatycznych. Wypełnienie tej luki może mieć znaczenie nie tylko poznawcze, ale i aplikacyjne. Aplikacyjne, gdyż rzuci światło na to, czy przy stosowaniu leku można spodziewać się znaczącego negatywnego wpływu leku na prawidłowe limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺, limfocyty B i komórki NK, co może mieć znaczenie przy doborze przez lekarza leku immunosupresyjnego w aspekcie statusu immunologicznego pacjenta i chorób współistniejących.

Chciałbym też dodać, że prowadzę badania naukowe na myszach od 2006 roku (w tym 2 lata prowadziłem takie badania na Montana State University [USA]), dzięki czemu mam dużą wprawę w tym zakresie, co zapewnia, że wszystkie czynności dotyczące tych zwierząt będą przeprowadzone sprawnie, bez ich narażania na zbędne cierpienie i stres.

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.