

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: **Porównanie wpływu bisfenolu A (BPA) i bisfenolu S (BPS) na jelitowy układ nerwowy ze szczególnym uwzględnieniem przekąźnictwa cholinergicznego na terenie zwoju mięśniowego okrężnicy**

2.Czas trwania projektu **1.09.2019-31.08.2022 (trzy lata)**

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **bisfenol A, bisfenol S, jelitowy układ nerwowy**

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.

Celem planowanego eksperymentu jest określenie wpływu bisfenolu A (BPA) i bisfenolu S (BPS) na komórki nerwowe położone w ścianie przewodu pokarmowego. Obydwie substancje są powszechnie wykorzystywane w produkcji tworzyw sztucznych. Do niedawna uważano, iż BPS jest neutralny dla organizmów żywych. Jednakże najnowsze badania wykazały, że BPS może działać podobnie do BPA na receptory estrogenowe i powodować niekorzystne zmiany w narządach wewnętrznych. Należy podkreślić, iż wiedza na temat oddziaływania BPA na jelitowy układ nerwowy jest wysoce ograniczona, a wpływ BPS na ten układ nie był dotychczas badany. Uzyskane wyniki pozwolą odpowiedzieć na pytanie czy BPS jest rzeczywiście neutralnym dla organizmu zamiennikiem BPA. Ma to duże znaczenie ponieważ wiele przedmiotów oznaczonych jako „wolne od BPA” i przeznaczonych dla dzieci i niemowląt (butelki,

smoczki) zawiera BPS. W doświadczeniu użyte zostaną niskie dawki bisfenoli - 5 mg/kg masy ciała (wg wcześniejszych badań jest to poziom niewywołujący obserwowalnych skutków – NOAEL dla BPA u myszy) lub 50 mg/kg masy ciała (wg wcześniejszych badań jest to najniższa dawka BPA, przy której obserwuje się pierwsze objawy niepożądanego działania - poziom LOAEL dla BPA u myszy). W związku z tym, w przypadku stosowania pierwszej z wymienionych dawek nie przewiduje się wystąpienia żadnych klinicznych objawów zatrucia ponieważ zmiany w produkcji substancji aktywnych w neuronach jelitowych mogą być pierwszą oznaką działania bisfenoli. Natomiast druga dawka wg dotychczasowych badań może powodować zaburzenia cyklu płciowego, dojrzewania jajników i zmiany w układzie odpornościowym, które to zmiany nie wiążą się z bólem u zwierząt eksperymentalnych.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Myszy laboratoryjne, szczep C57BL6/J/CMDB, 140 sztuk

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

W trakcie planowania eksperymentu sprawdzono aktualny stan wiedzy dotyczący wpływu BPA i BPS na organizmy żywe, a w szczególności na jelitowy układ nerwowy i aktywność neuronów jelitowych. W tym celu przejrano zawartość baz danych: PUBMED, Google Scholar, Web of Science (JCR), przy użyciu słów kluczowych: bisfenol A, bisfenol S, mysz, jelitowy układ nerwowy, neurochemiczna charakterystyka neuronów. Wykazano, iż badań dotyczących oddziaływania niskich dawek BPA na ekspresję substancji aktywnych w neuronach jelitowego układu nerwowego u myszy dotychczas nie przeprowadzono. Z kolei zarówno wpływ BPS na neurony w ścianie przewodu pokarmowego oraz porównanie oddziaływania BPS i BPA nie były dotychczas przedmiotem badań u żadnego gatunku ssaków. Świadczy to o nowatorskim charakterze planowanych badań. Należy ponadto podkreślić, iż planowane badania mają charakter „in vivo”, czyli badane substancje będą podawane do organizmu myszy tą samą drogą (drogą pokarmową), którą mogą dostawać się w przypadku „naturalnej” ekspozycji ludzi i zwierząt na toksyny znajdujące się w środowisku i żywności. Doświadczenie takie odzwierciedla skutki spożywania bisfenoli

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

wypłukiwanych z tworzyw sztucznych do wody i pożywienia. Ze względu na te założenia przyjęty model zwierzęcy nie może być zastąpiony hodowlami komórkowymi. Uwzględniona w badaniu ilość zwierząt jest niezbędna do przeprowadzenia planowanego eksperymentu i uzyskania statystycznie wiarygodnych wyników. Czynności eksperymentalne zaplanowano w ten sposób, aby zminimalizować cierpienie zwierząt, które w trakcie badań będą pod stałą kontrolą weterynaryjną.

Zasada zastąpienia

Według aktualnego stanu wiedzy, mysz (gatunek standardowo wykorzystywany w eksperymentach toksykologicznych) jest optymalnym gatunkiem ssaków do przeprowadzenia planowanego doświadczenia. W przypadku zaplanowanych badań nie ma możliwości zastąpienia myszy innym gatunkiem ssaków wykazującym niższy poziom rozwoju filogenetycznego. Kierując się zasadą zastąpienia zrezygnowano z wykorzystania do planowanych badań innych gatunków ssaków używanych do badań toksykologicznych, takich jak szczury, króliki, kawy domowe czy świny domowe. W przypadku badań kompleksowych podejmujących określenie wpływu substancji toksycznych na żywy organizm i mających za zadanie odzwierciedlenie sytuacji zachodzących przy „naturalnej” ekspozycji na BPA i BPS (a taki właśnie charakter ma planowany eksperyment) nie ma możliwości użycia metod alternatywnych, które umożliwiłyby uzyskanie wiarygodnych wyników.

Zasada ograniczenia

Liczba zwierząt planowanych do użycia w eksperymencie jest minimalną liczbą niezbędną do otrzymania wiarygodnych wyników i ich właściwego opracowania statystycznego. Zmniejszenie liczby zwierząt uniemożliwiłoby wykonanie wszystkich przewidzianych w projekcie badań, a wyniki uzyskane przy zmniejszonej liczbie zwierząt byłyby niewiarygodne, mogłyby prowadzić do wyciągnięcia niepełnych lub co gorsza błędnych wniosków i nie przyczyniłyby się do rozwoju wiedzy na temat toksycznego oddziaływania bisfenoli. Została ona ustalona w oparciu o literaturę naukową dotyczącą doboru liczby próbek w doświadczeniach biomedycznych oraz w oparciu o jeden z programów statystycznych do obliczania liczebności próbek w doświadczeniach biologicznych. Podczas ustalania liczby zwierząt w grupie wzięto pod uwagę następujące parametry statystyczne: różnice pomiędzy grupami przyjęte za istotnie statystycznie 2, przypuszczalne odchylenie standardowe w poszczególnych grupach 1.2, moc testu 0.8 oraz na poziomie istotności $\alpha=0.05$. Jako, że do tej pory wpływ niskich dawek bisfenoli na ekspresję substancji aktywnych w jelitowym układzie nie przeprowadzano powyższe wartości

ustalono na podstawie wcześniejszych badań dotyczących zmian w neurochemicznej charakterystyce neuronów jelitowych pod wpływem innych czynników patologicznych.

Zasada udoskonalenia

Podczas wykonywania planowanych badań szczególny nacisk zostanie położony na ograniczenie do minimum stresu i cierpienia zwierząt. Stosując się do zasady doskonalenia i kierując się dobrem zwierząt eksperymentalnych w planowanym doświadczeniu zdecydowano się na podawanie bisfenoli z wodą pitną zamiast podawania ich przy pomocy sondy dożołądkowej (co niewątpliwie naraziłoby zwierzęta na stres i dyskomfort). Ponadto w planowanych badaniach tkanki do oznaczeń immunofluorescencyjnych utrwalane będą po śmierci zwierzęcia i pobraniu. Tym samym zrezygnowano z konieczności wykonywania zabiegu perfuzji przezsercowej. Zwierzęta zostaną poddane eutanazji w sposób ogólnie przyjęty dla myszy poprzez dekapitację przy użyciu przeznaczonej do tego celu gilotyny. Wyniki uzyskane podczas planowanego doświadczenia mogą przyczynić się do rozwoju wiedzy dotyczącej szkodliwego oddziaływania bisfenolu A i bisfenolu S na organizmy żywe, a w szczególności na struktury nerwowe zlokalizowane w ścianie przewodu pokarmowego. Obserwacje przeprowadzone podczas planowanego eksperymentu będą podłożem do rozwoju badań z zakresu gastroenterologii, neurologii i toksykologii i mogą mieć znaczenie nie tylko poznawcze, ale także przyczynić się do zmniejszenia ryzyka ekspozycji ludzi i zwierząt na bisfenole zawarte w tworzywach sztucznych.

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.