

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Badanie wpływu nowych pochodnych 6-n-butylo-3,5,7-trimetylo-6H- pirolo[3,4-d]pirydazyn-1,4-dionu z grupą 1,3,4-oksadiazol-2-ionu na miejscową odpowiedź zapalną oraz na skład mikrobioty jelitowej w doświadczalnym zapaleniu jelit u szczurów

2. Czas trwania projektu: 17.02.2020 r. – 28.02.2023 r.

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): *inflammatory bowel disease, experimental colitis, anti-inflammatory, 1,3,4-oxadiazole, pyrrolopyridazinon*/ nieswoiste zapalenia jelit, doświadczalne zapalenie jelit, aktywność przeciwzapalna, 1,3,4-oksadiazol, pirolopirydazyny

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.

Celem badania jest ocena wpływu nowych pochodnych pirolo[3,4-d]pirydazyn-1,4-dionu na przebieg doświadczalnego zapalenia jelit u szczurów. Badanie pozwoli ocenić, czy nowe substancje zapobiegają powstawaniu lub zmniejszają nasilenie zmian zapalnych tkanek jelita. Pozwoli określić wpływ nowych pochodnych na skład mikrobioty jelitowej oraz ocenić ich wpływ na wybrane cele molekularne związane z rozwojem stanu zapalnego, przywróceniem równowagi Th17/Treg oraz utrzymaniem integralności jelitowej bariery śluzówkowo-nabłonkowej w przebiegu NZJ. Badanie pozwoli określić, czy modyfikacja struktury o udowodnionej aktywności przeciwzapalnej pozwoli uzyskać związki regulujące funkcję osi Th17/Treg i wydzielanie białek nabłonka jelitowego. Poszerzenie istniejącej wiedzy dotyczącej zależności między budową a działaniem substancji przeciwzapalnych oraz wpływu podstawników na siłę i profil aktywności farmakologicznej

związków będzie cenną informacją do dalszych badań nad optymalizacją struktury nowych pochodnych i może stanowić punkt wyjścia w długotrwałym, żmudnym procesie poszukiwania kolejnych, być może bardziej efektywnych, związków zmniejszających nasilenie procesu zapalnego toczącego się nie tylko w NZJ.

Badanie przeprowadzone zostanie na 96 samcach Szczura wędrownego Wistar. Po handlingu zważone zwierzęta zostaną podzielone losowo (8 grup po 12 zwierząt każda). W 1, 8, 15, 16, 17 dniu badania pobierane będą próbki kału. Przez 16 dni raz dziennie zwierzęta otrzymają dożołądkowo przez sondę właściwą dla grupy substancję: sam rozpuszczalnik lub roztwór nowego związku. W 15 dniu po 12-godzinnym odstawieniu pokarmu szczurom zostanie podana doodbytniczo sól fizjologiczna lub kwas trinitrobenzenosulfonowy. W 17 dniu pobrane zostaną próbki krwi z żyły ogonowej (badania biochemiczne). Po wcześniejszej sedacji zwierzęta zostaną poddane eutanazji przy użyciu pentobarbitalu. Następnie do badań histopatologicznych, immunohistochemicznych, biochemicznych pobrane zostaną narządy i tkanki oraz mocz z pęcherza moczowego.

Klasyfikacja celu opisanej procedury badawczej: Badania podstawowe (A) - układ żołądkowo-jelitowy z uwzględnieniem wątroby (e).

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

96 samców Szczura wędrownego, Wistar

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

Przygotowując niniejszy projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED, Google Scholar, ScienceDirect, Web of Science (JCR). Wykorzystałam słowa kluczowe: *inflammatory bowel disease*, *experimental colitis*, *anti-inflammatory*, *pyrrolopyridazinon*, *1,3,4-oxadiazole*. Na podstawie analizy piśmiennictwa oraz wyników analiz *in silico*, *in vitro* i wcześniejszych badań własnych stwierdzam że:

A. Pomimo znacznych postępów farmakoterapia nieswoistych zapaleń jelit (NZJ) nadal nie jest satysfakcjonująca zarówno dla pacjentów, jak i dla lekarzy i stanowi duże wyzwanie dla farmakologów i klinicystów. Zalecane i uznane leczenie nie jest ani w pełni skuteczne, ani pozbawione działań niepożądanych. Część pacjentów nie toleruje środków farmakologicznych w dawkach leczniczych, część przerywa leczenie z powodu poważnych działań niepożądanych. Wobec przewlekłego przebiegu NZJ, zwiększającej się zachorowalności oraz nie zawsze skutecznej i obciążonej działaniami niepożądanymi farmakoterapii, wciąż aktualne i uzasadnione są próby poszukiwania nowych, bezpieczniejszych i skuteczniejszych substancji.

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

Wykazane w badaniach *in vitro* i *in silico* właściwości przeciwzapalne, przeciwbólowe i antyoksydacyjne nowych związków, pochodnych pirolo[3,4-d]pyridazyn-1,4-dionu, jak również ich skuteczność w eksperymentalnych modelach *in vivo* z toczącym się stanem zapalnym wskazują, że substancje te mogą zapobiegać wystąpieniu lub zmniejszać zmiany zapalne tkanek jelita w przebiegu NZJ.

B. Dotychczas nie przeprowadzono badań będących przedmiotem niniejszego wniosku. Fakt ten potwierdza nowatorski charakter planowanych badań.

Podczas planowania doświadczenia uwzględniono zasadę 3R:

Zasada zastąpienia – W świetle wykazanej w modelowaniu *in silico* i w badaniach *in vitro* aktywności przeciwzapalnej nowych związków kolejne badania *in vitro* nie mogłyby skutkować nowymi wnioskami. W badaniach *in vitro* można ocenić mechanizm działania nowej, potencjalnie korzystnej substancji. Jednak modele te nie uwzględniają niestety złożoności procesów chorobowych występujących w żywym organizmie, nie pozwalają ocenić skuteczności działania substancji w organizmie żywym, nie pozwalają ocenić wpływu nowej substancji na powikłania wielonarządowe, nie pozwalają też na makroskopową i mikroskopową ocenę wpływu badanej substancji na zmiany narządów prowadzące z jednej strony do łagodzenia objawów chorobowych (w tym na ocenę zdolności substancji do odtworzenia integralności bariery śluzówkowo-nabłonkowej), a z drugiej – do wystąpienia działań niepożądanych. Wymienione ograniczenia i niedostępność metod alternatywnych sprawiają, że ocena skuteczności działania i bezpieczeństwa stosowania nowej substancji jest możliwa jedynie podczas zastosowania modelu doświadczalnego z wykorzystaniem zwierząt kręgowych i wyizolowaniu narządu. Nie można zastąpić zwierząt w niniejszym badaniu, ponieważ nie można osiągnąć celu bez wykorzystania zwierząt.

Zasada ograniczenia – Liczba zwierząt w niniejszym badaniu została ograniczona do poziomu niezbędnego dla osiągnięcia celów. Aby zrealizować wymienione wyżej cele w niniejszym badaniu zaplanowano 8 grup zwierząt. Dobrany został powszechnie akceptowany i wykorzystywany model, pozwalający na uzyskanie powtarzalnych wyników. Liczba zwierząt w badaniu została ograniczona do niezbędnego minimum i jest podyktowana wiarygodnością metod analizy statystycznej. Liczba zwierząt może ulec zmniejszeniu, ponieważ przy braku aktywności nowych związków podanych w większych dawkach, mniejsze dawki nie będą badane. Dla 8 porównywanych grup, przy założeniu maksymalnego prawdopodobieństwa błędu I rodzaju  $\alpha=0,05$ , mocy docelowej testu  $\beta=0,70$  i  $RMSSE=0,39$  wymagana liczebność grupy ( $n$ ) wynosi 12 (obliczenia wykonano przy pomocy STATISTICA Software ver 13.1, StatSoft, Inc.). Ponadto, **celem zmniejszenia liczby zwierząt wykorzystywanych w badaniach do minimum niewykorzystane tkanki i/ lub narządy zostaną przekazane do Bazy Próbek Biologicznych-Banku Próbek Rozproszonych.**

Zasada udoskonalenia – Przy planowaniu niniejszego badania uwzględniono utrzymywanie zwierząt w optymalnych warunkach dostosowanych do ich gatunku, zapewniających dobrostan zwierząt oraz wykonanie poszczególnych czynności przez doświadczony i dobrze przeszkolony personel stale podnoszący swoje kwalifikacje. Czynności zaplanowano tak, by ograniczyć do minimum ból, cierpienie, dystres lub możliwość

uszkodzenia organizmu zwierząt. W metodyce doświadczenia zastosowano takie metody zmniejszenia dystresu jak znieczulenie ogólne w trakcie czynności mogących wywołać dystres zwierząt (podczas jednorazowego podania kwasu trinitrobenzenosulfonowego), wzbogacone środowisko, umiejętności eksperymentatorów/opiekunów, właściwa opieka, monitorowanie stanu zwierzęcia w zwierzętarni i w trakcie przebiegu doświadczenia, humanitarny koniec doświadczenia, zastosowanie środka uspokajającego przed eutanazją, właściwa eutanazja. Spośród dostępnych modeli doświadczalnego zapalenia jelit wybrano procedurę o najmniejszej dotkliwości. Dodatkowo, przy planowaniu niniejszego badania uwzględniono udoskonalenie metody badawczej prowadzące do zmniejszenia cierpienia zwierząt przez złagodzenie dotkliwości wybranych procedur.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☒ NIE

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.