

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Badanie właściwości terapeutycznych kurzych przeciwciał specyficznych względem *Clostridioides difficile* na mysim modelu zakażenia
2. Czas trwania projektu 01.10.2020 - 30.09 2022
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) szczepionka, *Clostridioides difficile*, epitop, przeciwciała IgY
4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) A (układ immunologiczny)

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.

Głównym celem naukowym projektu jest opracowanie nowych metod leczenia zakażeń *Clostridioides difficile*. CD jest przyczyną jednego z najczęstszych zakażeń szpitalnych, czyli biegunki poantybiotykowej, która może się rozwinąć w rzekomobłoniaste zapalenie jelit i rozdęcie okrężnicy, co w wielu przypadkach prowadzi do śmierci pacjenta. Zakażenie bakterią CD jest szczególnie niebezpieczne u osób starszych, u których wiąże się z największą śmiertelnością. Ze względu na wzrastającą oporność CD na stosowane antybiotyki, brak dostępnej szczepionki oraz coraz częstsze pojawianie się ognisk epidemicznych w polskich szpitalach badania nad nowymi rozwiązaniami są bezwzględnie konieczne.

Celem naukowym doświadczenia jest określenie właściwości terapeutycznych kurzych przeciwciał skierowanych na specyficzne epitopy CD, które w przyszłości mogą zostać zastosowane u ludzi. Szczepienie kur jest od lat stosowane do produkcji przeciwciał. Do produkcji przeciwciał IgY

potrzeba bardzo niskiej dawki antygeny rzędu miligramów lub mikrogramów, a wysokie miano przeciwciał w jaju utrzymuje się od kilku tygodni do kilku miesięcy. IgY nie reagują z systemem ludzkiego komplementu przez co unika się nieswoistej reakcji zapalnej, a w ich produkcji nie stosuje się związków toksycznych ani w czasie szczepienia ani w trakcie doczyszczania przeciwciał IgY. Zastosowanie immunizacji biernej w postaci preparatu IgY ma cały szereg dodatkowych zalet: działanie jest natychmiastowe i zogniskowane do konkretnego obszaru czyli układu pokarmowego, jest wysoko specyficzne, może być stosowane u ludzi w różnym wieku i u osób z niedoborami odporności, jest zupełnie nietoksyczne ponieważ składa się z elementów, które normalnie występują w naszej diecie. Specyficzne przeciwciała IgY zostaną pozyskane z komercyjnego źródła. Opisany wniosek dotyczy podania tych przeciwciał IgY mysim modelowi zakażenia CD. Podanie IgY myszom jest dobrze udokumentowane i bezpieczne.

Eksperymenty dotyczące właściwości terapeutycznych kurzych przeciwciał specyficznych względem CD wiążą się koniecznością zakażenia myszy patogenną bakterią. Myszy zostaną poddane eutanazji niezwłocznie po dostrzeżeniu pierwszych oznak choroby, czyli utraty masy lub apetytu i pojawieniu się biegunki.

Okres realizacji doświadczenia to od 1.10.2020 do 30.09.2022.

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

W doświadczeniu zaplanowano użycie 60 myszy C57BL/6 (6-7 tygodniowe samice). Zaplanowano trzy eksperymenty po 20 myszy, po 5 myszy w grupie. 5 myszy w grupie jest to minimalna ilość myszy, która pozwoli na zaobserwowanie statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami. Dane będą analizowane testem t-studenta lub ANOVA ( $p < 0.05$ ).

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

Planując doświadczenie przeprowadzono analizę dostępnej literatury (PUBMED, Google Scholar) celem weryfikacji czy takowe badania nie zostały już przeprowadzone. Proponowane badania są w pełni oryginalne, obejmują nowe, nie opisane w literaturze antygeny i wnoszą nową wiedzę w dziedzinie badań nad zakażeniami *Clostridium difficile*.

W projekcie zastosowano zasadę 3R:

### 1. zasada zastąpienia

Mapowanie epitopów za pomocą surowic pacjentów oraz analiza epitopów w warunkach *in vitro* pozwoliło na zawężenie liczby testowanych formułacji. Nie mniej jednak nie ma możliwości rezygnacji

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

z użycia modelu zwierzęcego, gdyż nie ma innej możliwości testowania właściwości ochronnych przeciwciał IgY jak tylko w żywym organizmie.

## 2. zasada ograniczenia

W ustalaniu liczebności grup badanych kierowano się minimalną ilością zwierząt dla osiągnięcia celu doświadczenia i wymaganej istotności statystycznej (min. 5 myszy w grupie). Co więcej, badania wstępne przeprowadzone in vitro pozwoliły na zawężenie liczby koniugatów użytych do szczepienia kur do trzech. Początkowo, do badań nad nowymi składnikami potencjalnej szczepionki wytypowano 4 białka bakterii *Clostridioides difficile*, dla których określono potencjalne epitopy (8). Następnie, w teście ELISA, określono, które z nich są immunoreaktywne (5). Wybrane epitopy (5) połączono z białkiem nośnikowym (BSA, KLH) i ponownie określono poziom immunoreaktywności z surowicami pacjentów a także przeprowadzono testy cytotoksyczności oraz sprawdzono ich potencjał immunomodulacyjny. W wyniku przeprowadzonych badań wybrano do trzy koniugaty do szczepienia kur i uzyskania specyficznych przeciwciał IgY z ich jaj. Dzięki dostępnej literaturze ustalono harmonogram eksperymentu i zawężono liczbę badanych grup do 4 w każdym eksperymencie (Pizarro-Guajardo, Marjorie, et al. "Characterization of chicken IgY specific to Clostridium difficile R20291 spores and the effect of oral administration in mouse models of initiation and recurrent disease." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7 (2017): 365). Dobrze opisany mysi model badań CD pozwala na zastosowanie w badaniach bez dodatkowych badań wstępnych (Chen X, Katchar K, Goldsmith JD, et al. A mouse model of Clostridium difficile-associated disease. *Gastroenterology*. 2008;135(6):1984-1992.).

## 3. zasada udoskonalenia

Zwierzęta będą utrzymywane w standardowych warunkach, ze swobodnym dostępem do karmy i wody. Wszystkie czynności prowadzone będą przez przeszkolonych wykonawców, posiadających wieloletnie doświadczenie w pracy ze zwierzętami. Zwierzęta będą znajdowały się pod stałą kontrolą lekarza weterynarii. Po zakończeniu procedury zwierzęta zostaną natychmiast poddane eutanazji. Eutanazja zostanie również przeprowadzona w razie wystąpienia pierwszych objawów zakażenia i związanego z nim dystresu.

## 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.