

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „Antybakteryjne właściwości i wydajność działania naturalnych substancji pochodzenia roślinnego, izotiocyjanianów (ITC), względem patogennych szczepów bakterii *Escherichia coli*”
2. Czas trwania projektu 24 miesiące
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) *Escherichia coli*, mitomycyna C, streptomycyna, izotiocyjaniany (ITC)
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 naukowym, jaki planuje się osiągnąć w wyniku przeprowadzenia doświadczenia jest sprawdzenie efektywności zwalczania ostrego zakażenia enterokrwotocznymi *E. coli* O157:H7 EDL933W (EHEC) za pomocą naturalnych substancji pochodzenia roślinnego- izotiocyjanianów (ITC).

W badaniach *in vitro* wykazano efektywność sulforafanu SFN (zw. alifatyczny) oraz izotiocyjanianu fenetylu PEITC (zw. aromatyczny) w redukcji toksyczności EHEC.

Pierwszy etap eksperymentu będzie polegał na ustaleniu przebiegu i parametrów zakażenia po podaniu dożołądkowym zwierzętom dawki infekcyjnej *E. coli* oraz dodatkowo dootrzewnowym podaniu mitomycyny C (jako induktora ekspresji toksyny Shiga). Następnie zwierzęta będą infekowane *E. coli* H7 EDL933W (EHEC) oraz potraktowane SFN oraz PEITC lub ich mieszaniną (SFNxPEITC), przez 3 dni co 12 h w celu wyznaczenia minimalnej dawki działającej. Przed zakażeniem zwierzęta otrzymają streptomycynę w wodzie do picia w celu zniszczenia flory bakteryjnej. Na 8 h przed zakażeniem nie będą otrzymywały pożywienia, natomiast dwie godziny przed podaniem inokulum odstawiona zostanie woda. Pokarm zostanie podany *ad libidum* ponownie po 2 godzinach od zakażenia.

Do przedstawionego eksperymentu dobrane zostaną odpowiednie grupy kontrolne. Codziennie od momentu rozpoczęcia doświadczenia odbywać się będzie monitorowanie masy ciała zwierząt (waga laboratoryjna, dokładność do 0,01g). W przypadku spadku masy ciała o ponad 20% od masy wyjściowej zwierzęcia lub widocznego cierpienia, zostanie ono humanitarnie uśmiercone za pomocą CO<sub>2</sub>, a następnie dyslokacji kręgów szyjnych. W dniu trzecim od zakażenia zwierząt pobrana zostanie krew z policzka w objętości 100 µl do probówki zawierającej heparynę. Z pełnej krwi zostanie oznaczona morfologia. Po zwirowaniu i oddzieleniu surowicy zostaną wykonane oznaczenia biochemiczne (poziom kreatyniny, mocznika, białka całkowitego, albuminy, ALT, AspAT)

Drogi podania: inokulum *E. coli*- dożołądkowo; ITC- dożołądkowo; mitomycyna C- dootrzewnowo; streptomycyna-w wodzie pitnej

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

Mysz domowa, 320 sztuk

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

### 1) Zasada Zastąpienia:

Przed zaplanowaniem eksperymentu sprawdzono dostępną, istniejącą już wiedzę dotyczącą tematyki poruszanej we wniosku. Informacji szukano w bazie danych takich jak: PUBMED, Google Scholar, Science Direct, Web of Science/ICR

Zastosowano słowa kluczowe: *E.coli*, mitomycyna C, streptomycyna, izotiocyaniany (ITC)

Zastosowanie mysich modeli jest konieczne w celu przeprowadzenia oceny skuteczności aktywności izotiocyanianów przeciw zakażeniom bakteriami EHEC. Dotychczasowo przeprowadzone testy na ssakach w tym ludzkich liniach komórkowych (HeLa, Vero) są niewystarczające do prawidłowej oceny efektywności ITC jako potencjalnych terapeutów, ze względu na złożony mechanizm patogenezы enterokrwotocznych *E. coli*. Wykorzystanie modelu zwierzęcego jest niezbędne do analizy wpływu metabolizmu badanych związków na ich aktywność przeciwbakteryjną w układzie infekcyjnym *in vivo*. Proponowane eksperymenty będą oryginalne w zakresie zastosowania ITC przeciw zakażeniom EHEC. Istnieje brak danych dotyczących antybakteryjnych właściwości izotiocyanianów (ITC), względem patogennych właściwości *Escherichia coli* potwierdzonych na modelu zwierzęcym.

### 2) Zasada Udoskonalenia:

W eksperymencie z udziałem myszy uwzględniono wszelkie warunki bytowe oraz dobrostan zwierząt, w tym elementy wzbogacające środowisko bytowania zwierząt (gryzaki, materiał do budowy gniazd i legowisk). Myszy będą przebywały w klatkach zbiorowych, indywidualnie wentylowanych, na regałach IVC. Zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku, z nieograniczonym dostępem do wody i pożywienia, (oprócz jednego dnia przed zakażeniem *E.coli* bądź podaniem 10% sacharozy w PBS) z niezmiennym cyklem dostępności światła (12h/12h), w stałej temperaturze 21°C oraz przy wilgotności powietrza 55%. Eksperyment zaplanowano w sposób maksymalnie redukujący

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

cierpienie zwierząt. Przed rozpoczęciem eksperymentu myszy będą oswajane. Eksperymentatorzy posiadają wieloletnie doświadczenie w pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi, dzięki temu wybrane metody przeprowadzenia eksperymentu pozwolą zminimalizować i złagodzić ból i cierpienie oraz postępować ze zwierzętami tak by zapewnić im jak najlepszy standard życia. Po zakończeniu eksperymentu myszy będą uśmiercane zgodnie z opisanymi wytycznymi.

### **3) Zasada Ograniczenia:**

W myśl zasady redukcji, w doświadczeniu zredukowano liczbę zwierząt do wymaganego statystycznie minimum 5 zwierząt w grupie. Liczbę tę oszacowano stosując narzędzia statystyczne do oceny liczebności grup badawczych. W planowaniu doświadczenia uwzględniono liczebność grup umożliwiającą uzyskanie satysfakcjonujących wyników z niskim odchyleniem standardowym. Według dostępnej obecnie wiedzy niemożliwe jest wykorzystanie w tym celu zwierząt o niższym stopniu rozwoju. Aby osiągnąć skuteczność badań muszą być one przeprowadzone i sprawdzone na modelu zwierzęcym.

Powyższe argumenty umacniają zasadność wykorzystania zwierząt laboratoryjnych (myszy) w kierunku badania efektywności zwalczania ostrego zakażenia E.coli za pomocą izotiocyjanianów ITC (SFN) i (PEITC) oraz ich mieszaniny (SFNxPEITC)

#### **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.