

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Badanie przeciwnadciśnieniowych właściwości flawonoidów w rozwoju nadciśnienia tętniczego indukowanego ciążą - badania in vivo**

2. Czas trwania projektu **12.08.2019-01.02.2020**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **nadciśnienie w ciąży, model zwierzęcy, flawonoidy.**

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): **A - Badania podstawowe**

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 badań będzie poznanie działania metyldopy (lek przeciwnadciśnieniowy u kobiet w ciąży) w połączeniu ze związkami pochodzenia roślinnego z grupy flawonoidów z wyciągu z tarczycy bajkalskiej u ciężarnych szczurów z indukowanym nadciśnieniem.

Przewidywane szkody u zwierząt. Szkody dla zwierząt mogą wynikać z odczuwania dystresu w związku z podawaniem dożołądkowym badanych substancji oraz pomiarem ciśnienia i tętna. Stres z tym związany zostanie ograniczony przez wcześniejszy handling. Stosowane substancje nie wywołują u zwierząt bólu, lęku, uszkodzenia tkanek, mogą wpływać jedynie na zmniejszenie podwyższonego ciśnienia krwi i indukację fizjologicznego porodu. Zwierzęta zostaną uśmiercone w sposób nie wywołujący cierpienia i stresu (dekapitacja) w celu pobrania tkanek.

Zastosowana metoda badawcza/metodyka. Szczury - samice (n=100) ciężarne z utrwalonym nadciśnieniem tętniczym (SHR) oraz ich odpowiedniki bez nadciśnienia (WKY) będą otrzymywały w trakcie ciąży (14 dni) 2x dziennie, 2 związki flawonoidowe (wybrane z wcześniej prowadzonych przez nas badań in vitro) (100 mg/kg masy ciała) lub ekstrakt (500 mg/kg masy ciała) z tarczycy bałkańskiej razem z metyldopą (200 mg/kg masy ciała), a następnie zostanie przeprowadzony codzienny pomiar ciśnienia tętniczego oraz tętna (trzy razy na dobę przy użyciu aparatu do nieinwazyjnego pośredniego pomiaru ciśnienia – sfigmomanometru, składającego się z mankietu z komorą powietrzną na ogon oraz elektronicznego systemu rejestrującego). Po dekapitacji zostaną pobrane tkanki (krew, aorta, serce, łożysko) do dalszej analizy.

Wpływ spodziewanych rezultatów na rozwój nauki. Zostanie określone miejsce działania i molekularny mechanizm wybranych flawonoidów oraz bezpieczeństwo ich stosowania w modelu nadciśnienia indukowanego ciążą u zwierząt (SHR). Dalekosiężnym celem będzie potencjalne zastosowanie tych flawonoidów jako leków przeciwnadciśnieniowych do podawania podczas ciąży.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Łącznie planowane jest wykorzystanie 100 zwierząt (samic, szczur wędrowny *Rattus norvegicus*, stado niekrewniacze), zakupionych w 3 partiach w odstępie 1,5 miesiąca w celu zapewnienia stosowania zwierząt równowiekowych podczas całego doświadczenia. Zwierzęta będą pochodzić z linii z utrwalonym nadciśnieniem (SHR/Clr; n=50) oraz w celach porównawczych bez nadciśnienia (WKY/Clr; n=50).

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt eksperymentalny sprawdzono stan wiedzy w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED; MEDLINE, wykorzystując słowa kluczowe: SHR, WKY, pregnancy, rats, flavonoids, placenta, animal models of hypertension, methyl dopa, antihypertensive agents. Nie znaleziono podobnych badań obejmujących eksperymenty związane z wykonywaniem przedstawianego projektu.

Zasada zastąpienia:

Zgodnie z istniejącym stanem wiedzy nie jest możliwe zastąpienie planowanych badań *in vivo* z wykorzystaniem zwierząt z nadciśnieniem w ciąży innym modelem naśladującym ten stan np. modelem komórkowym *in vitro* czy modelem informatycznym.

Zasada ograniczenia:

Wstępne badania właściwości biologicznych flawonoidów prowadzono w oparciu o model *in vitro* (linie komórkowe HUVEC, JEG3, cytotrofoblasty) a dopiero w drugim etapie będą wykonane w oparciu o przedstawiany we wniosku model *in vivo* (model zwierzęcy - zwierzęta w ciąży). Wstępny etap badań *in vitro* przeprowadzono na 25 grupach uwzględniających różne dawki flawonoidów (badanie dawkozależności, MTT) oraz 32 grupach połączeń związków. Na podstawie tych badań wytypowano tylko 2 flawonoidy tj. chryzynę i bajkaleinę. Dzięki temu liczbę grup zwierząt przewidzianych w badaniu ograniczono do niezbędnego minimum. Liczba zaplanowanych grup badawczych (10) i liczby wykorzystywanych w nich zwierząt (po 10 w każdej grupie) została ograniczona do poziomu niezbędnego do osiągnięcia celów wynikających z zastosowanych metod statystycznych przy uwzględnianiu zmienności występującej w populacji szczurów i stosowaniu do wyznaczenia różnic między grupami (ANOVA, ewentualnie odpowiednie testy nieparametryczne, testy post-hoc, $p < 0,05$).

Zasada udoskonalenia:

Badane zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku, a metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak, aby ograniczały do minimum ból, cierpienie, dystres lub możliwość trwałego uszkodzenia organizmu poza założonym farmakologicznym działaniem badanych substancji tj. obniżanie ciśnienia tętniczego krwi zwierząt. Nie ma informacji naukowych, mówiących o tym, że substancje użyte w badaniu mogą się przyczyniać do zwiększonego odczuwania bólu, cierpienia i dystresu, poza stresem wywołanym podawaniem związków. Stosowana w zwierzętarni zasada wprowadzenia „chipa” (identyfikatora) każdemu osobnikowi pozwala jednoznacznie weryfikować nr szczura i jego przynależność do danej grupy badawczej. Pozwoli to tym samym sprawnie, zgodnie z założonym harmonogramem, codziennie przez 14 dni, bez zbędnego stresu u zwierzęcia podawać dożołądkowo badane związki (metyldopę, chryzynę i bajkaleinę czy wyciąg z tarczycy) w dawkach wybranych na podstawie dostępnego piśmiennictwa [Hai Nguyen Thanh i wsp. 2015, Moura i wsp. 2006, Ożarowski i wsp. 2019, Waisundara i wsp. 2008] i w objętościach nieprzekraczających 5 ml, jak i przeprowadzać sposób nieinwazyjny przy pomocy sfigmomanometru pomiary ciśnienia tętniczego oraz tętna u szczurów.

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

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy

☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

xNIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.