

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Badanie wpływu yolkiny na nadwrażliwość kontaktową u myszy.
2. Czas trwania projektu: 6 miesięcy w roku 2018 roku
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): yolkina, oksazolon, nadwrażliwość kontaktowa, odpowiedź komórkowa
4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych):

A. Badania podstawowe

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 doświadczenia jest określenie wpływu yolkiny, białka izolowanego z jaja kurzego, na odpowiedź immunologiczną typu komórkowego u myszy, w teście nadwrażliwości kontaktowej na oksazolon.

Myszy zostaną uczulone przez naskórne podanie antygeny – oksazolonu (na skórę brzucha), po upływie 5 dni reakcja zostanie wywołana przez ponowne naskórne nałożenie oksazolonu (na skórę małżowin usznych). Po upływie 24 godzin oraz ponownie po upływie 48 godzin wynik testu będzie odczytany poprzez pomiar grubości (obrzęku) małżowin usznych oraz analizę liczby krążących leukocytów i komórek w drenujących węzłach chłonnych (tkanki pobrane *post mortem*). Przez 4 kolejne dni przed podaniem uczulającej dawki oksazolonu myszy będą otrzymywać dootrzewnowo badane białko (yolkinę) w jednej z trzech dawek: 0,1; 1 oraz 10 mg/kg m.c. Yolquina będzie rozpuszczona w 0,9% NaCl. Planuje się utworzenie, poza wymienionymi trzema grupami badanymi, dwóch grup kontrolnych: grupy „tła” (myszy nie uczulone) oraz kontroli dodatniej (myszy uczulone, otrzymujące dootrzewnowo 0,9 % NaCl). W każdej grupie planuje się użycie 5 myszy (razem 25 zwierząt w całym doświadczeniu)

Zaplanowane doświadczenie jest fragmentem szeroko zakrojonych, wielośrodkowych badań, dotyczących wpływu i zastosowania yolkiny w prewencji i terapii różnego rodzaju chorób (w tym autoimmunologicznych) u ludzi. Uzyskane wyniki będą uzupełnieniem dotychczasowych wyników badań *in vivo* dotyczących wpływu yolkiny na humoralną odpowiedź immunologiczną. Zaplanowany test ma więc na celu poszerzenie danych na temat wpływu yolkiny na humoralną odpowiedź immunologiczną danymi o jego działaniu na odpowiedź komórkową.

Wyniki planowanego doświadczenia mają duże znaczenie poznawcze, zostaną zamieszczone w przygotowywanej publikacji naukowej.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam/sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED i Web of Science (JCR)

Wykorzystałam/em słowa kluczowe: yolkin/mice/cellular immune response/in vivo/

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam, że: brak wyników badań dotyczących wpływu yolkiny na odpowiedź immunologiczną *in vivo* u myszy

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: istnieje duże prawdopodobieństwo wykazania wpływu (stymulacja) yolkiny na odpowiedź immunologiczną typu komórkowego (w jednym z testów badania takiej odpowiedzi w układach *in vivo*, tutaj zaproponowanym modelu nadwrażliwości kontaktowej u myszy)

B. Brak jest danych dotyczących: wpływu yolkiny podanej zwierzętom doświadczalnym na odpowiedź immunologiczną

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na: ustalenie wpływu yolkiny na rozwój odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego w układzie *in vivo*, co z kolei umożliwi:

A/ Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku poszerzenia wiedzy nad rolą yolkiny w rozwoju zarodka

B/ Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na zastosowaniu yolkiny w prewencji i/lub terapii pacjentów z wrodzonymi niedoborami immunologicznymi oraz wtórnym upośledzeniem odporności (np. w immunosupresji po zastosowaniu cytostatyków)

Uwzględnienie zasady Replacement (zastąpienie):

Doświadczenie jest tylko niewielką, choć niezbędną, częścią projektu dotyczącego immunotropowego działania yolkiny, którego większa część została już wykonana kilka lat temu. Ma na celu uzupełnienie wiadomości na temat wpływu białka na humoralną odpowiedź immunologiczną danymi o jego działaniu na odpowiedź komórkową. Wyniki takie można uzyskać jedynie w teście *in vivo*, gdyż tylko w żywym organizmie można odzwierciedlić wielokierunkowe działanie wielu różnych składowych układu immunologicznego, które uczestniczą w rozwoju badanej odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego (udział różnorodnych komórek prezentujących antygen, limfocytów B i T – elementów odpowiedzi wrodzonej i nabytej). Wiedzy, którą pozwolą uzyskać wyniki tego testu nie można uzyskać metodami alternatywnymi (modelowanie komputerowe, badania *in vitro* na ustalonych liniach komórkowych czy komórkach i tkankach ludzkich oraz izolowanych od zwierząt, użytych wyłącznie jako źródło takich tkanek). Część badań wstępnych oraz uzupełniających większego projektu badania aktywności yolkiny przeprowadzono już lub prowadzi się w układach *in vitro*, bez użycia żywych zwierząt.

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

Uwzględnienie zasady Reduction (ograniczenie):

Zaproponowany test kontaktowej nadwrażliwości na oksazolon u myszy jest adekwatnym modelem badawczym, określającym aktywność badanego związku w modulacji komórkowej odpowiedzi immunologicznej ustroju, stosunkowo mało inwazyjnym dla zwierząt i krótko trwającym. Jest powszechnie znany od ponad 40 lat, uznany i do dziś często stosowany w badaniach odpowiedzi immunologicznej [Asherson GL, Zembala M: Contact sensitivity in the mouse. IV. The role of lymphocytes and macrophages in passive transfer and the mechanism of their interaction. J. Exp. Med. 1970; 132: 1-15; Jung Y, Kim JC, Park NJ, et al: Eupatilin, an activator of PPAR α , inhibits the development of oxazolone-induced atopic dermatitis symptoms in Balb/c mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018; 496: 508-514]. Liczba zwierząt użytych w teście (po 5 osobników w grupie) została ustalona jako minimalna dla uzyskania wiarygodności statystycznej testu (według [Wątroba J. (2013): Praktyczne aspekty szacowania liczebności próby w badaniach empirycznych. źródło: statsoft.pl/czytelnia.html]). Ustalając taką liczbę zwierząt w poszczególnych grupach badawczych bazowaliśmy także na naszych poprzednich doświadczeniach (dość duża powtarzalność uzyskiwanych wyników w obrębie danej grupy, dobra ogólna kondycja i brak upadków zwierząt podczas trwania testu) oraz danych literaturowych. W planowanym teście zostanie uzyskana większa liczba danych (liczebność komórek immunologicznie kompetentnych w tkankach izolowanych *post mortem* od zwierząt uczestniczących wcześniej w teście). Zwierzęta użyte w teście nie mogą być ponownie wykorzystane w badaniach immunologicznych ze względu na zmiany w aktywacji układu immunologicznego pod wpływem zastosowanego antygeny.

Uwzględnienie zasady Refinement (udoskonalenie):

W teście tylko część procedur (dootrzewnowe podanie badanego związku) cechuje większa inwazyjność (konieczność ukłucia i wstrzyknięcia płynu powodująca ból/dystres), pozostałe procedury (naskórna aplikacja antygeny, pomiar obrzęku małżowin usznych za pomocą mechanicznej suwmiarki) cechują się mniejszą inwazyjnością. Niezwłocznie po zakończeniu pomiarów zwierzęta będą uśmiercone poprzez dyslokację kręgów szyjnych, a tkanki do dalszych analiz pobrane *post mortem*. Przed rozpoczęciem procedury doświadczalnej zwierzęta przejdą okres aklimatyzacji do warunków w zwierzętarni i kontaktu z eksperymentatorami (handling). Warunki utrzymywania zwierząt w zwierzętarni spełniają wszystkie wymagane standardy (wilgotność, temperatura, wymiana powietrza, klatki, utrzymywanie zwierząt po kilka w klatce, wzbogacanie środowiska, stała kontrola weterynaryjna), co znacząco korzystnie wpływa na dobrostan zwierząt. Wszyscy eksperymetatorzy prowadzący planowane badania mają co najmniej kilkunastoletnie doświadczenie w pracy ze zwierzętami, wielokrotnie także przeprowadzali planowany test nadwrażliwości kontaktowej, co gwarantuje sprawną pracę ze zwierzętami oraz uzyskanie wiarygodnych wyników testu.

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.