

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Wpływ niskich dawek pterostilbenu na próg drgawkowy w modelach drgawek padaczkowych oraz jego oddziaływanie na proces epileptogenezy w modelu kindlingu pentetrazolowego u myszy**

2. Czas trwania projektu 15.01.2019 r. – 31.12.2020 r. (22 miesiące)

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): pterostilben, padaczka, drgawki padaczkowe, epileptogeneza, myszy

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.

Pterostilben jest dimetylowanym analogiem resveratrolu, który charakteryzuje się jednak większą biodostępnością. Dotychczasowe badania wykazały szereg jego działań farmakologicznych, które mogą być wykorzystane m.in. w leczeniu otyłości, chorób o podłożu zapalnym, chorób układu krążenia i nowotworowych. Pterostilben wykazywał również działanie ochronne w modelach chorób neurodegeneracyjnych czy udaru, stwierdzono również jego działanie przeciwbólowe i przeciwłękowe. Przeprowadzone w ostatnim czasie doświadczenia wykazały działanie przeciwdrgawkowe wysokich dawek pterostilbenu w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych. Dane literaturowe wskazują jednak, że działanie takie może występować również w przypadku bardzo małych dawek, tj. 1–20 mg/kg. Sprawdzenie tej hipotezy pozwoli na lepsze poznanie profilu działania tego związku i określenie możliwości jego zastosowania w terapii zaburzeń padaczkowych.

Celem planowanych doświadczeń jest sprawdzenie wpływu niskich dawek pterostilbenu (tj. 1–20 mg/kg) na progi drgawkowe w doświadczalnych modelach drgawek u myszy, tj. w teście progu maksymalnego wstrząsu elektrycznego, w teście progu drgawek psychomotorycznych wywoływanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz oraz w teście drgawek wywoływanych dożylnym podaniem pentetrazolu. Bezpośrednio przed testami drgawkowymi zostaną wykonane testy oceniające wpływ niskich dawek pterostilbenu na

koordynację ruchową oraz siłę mięśni szkieletowych u myszy.

W celu dokładniejszego poznania właściwości terapeutycznych pterostilbenu istotne wydają się również zbadanie wpływu tego związku na proces epileptogenezy. Wpływ ten zostanie zbadany w modelu drgawek roznieczanych (kindling) wywoływanych wielokrotnym podawaniem podprogowych dawek PTZ u myszy. Dodatkowo u zwierząt poddanych procedurze kindlingu zostanie również zbadane działanie przeciwdepresyjne i przeciwłękowe tego związku oraz jego wpływ na aktywność lokomotoryczną. W celu wykonania oznaczeń biochemicznych zostaną pobrane próbki krwi oraz mózgi.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Doświadczenia zostaną przeprowadzone na samcach myszy domowej (*Mus musculus*) stada Swiss. Przewidywana liczba zwierząt wyniesie 365 osobników.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

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

Wykorzystałam następujące słowa kluczowe: pterostilbene / epilepsy / seizure / convulsion / seizure models / epilepsy models/ PTZ kindling test / brain / central nervous system / mice / rats / human

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że pterostilben wykazuje liczne działania neurofarmakologiczne, m.in. wspomaga procesy uczenia się i pamięć, działa ochronnie w zwierzęcych modelach choroby Alzheimera i Parkinsona, wykazuje działanie przeciwłękowe oraz przeciwbólowe u zwierząt doświadczalnych.

Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że pterostilben wpływa na funkcje centralnego układu nerwowego. Wyniki naszych wcześniejszych doświadczeń wykazały jego działanie przeciwdrgawkowe przy zastosowaniu wysokich dawek. Dane literaturowe pozwalają przypuszczać, że działanie to może występować również przy zastosowaniu dawek niskich pterostilbenu, tj. 1–20 mg/kg.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

- A. Rozwinięcie teoretyczne istniejącej wiedzy w kierunku dokładniejszego poznania wpływu pterostilbenu na funkcje centralnego układu nerwowego, w szczególności pod kątem jego właściwości przeciwdrgawkowych.
- B. Lepszą ocenę możliwości zastosowania terapeutycznego tego związku u pacjentów z padaczką.
- C. Zastosowanie uzyskanej wiedzy w procesie poszukiwania nowych związków o działaniu przeciwdrgawkowym.

Proponowane doświadczenia zostały zaplanowane z uwzględnieniem zasady 3R.

Zasada zastąpienia:

Nie można zastosować metody badawczej zapewniającej osiągnięcie celu niniejszego doświadczenia bez

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

wykorzystania zwierząt doświadczalnych. Dokładne poznanie mechanizmów działania przeciwdrgawkowego badanych substancji wymaga przeprowadzenia badań *in vivo* z wykorzystaniem zwierząt. Dostępna literatura wskazuje, że myszy są właściwym gatunkiem do wykonywania zaplanowanych doświadczeń. Badania *in vitro* czy *in silico* nie pozwolą na ocenę pełnego potencjału przeciwdrgawkowego pterostilbenu. Przy zastosowaniu tych metod nie będzie również możliwe przeprowadzenie oznaczeń biochemicznych w tkance mózgowej. Co więcej, danych takich nie dostarczą również badania kliniczne, ponieważ nie ma możliwości przeprowadzenia oznaczeń biochemicznych w mózgu pacjentów, który jest miejscem działania substancji działających przeciwdrgawkowo.

Zasada ograniczenia:

Liczba zwierząt zaplanowanych do doświadczeń została ograniczona do niezbędnego minimum, pozwalającego na rzetelną analizę statystyczną otrzymanych wyników. Próg drgawek indukowanych maksymalnym wstrząsem elektrycznym oraz próg drgawek psychomotorycznych wyznaczony zostanie tzw. metodą „up and down”, która pozwoli na zredukowanie liczby myszy w grupie do niezbędnego minimum (20 osobników) w porównaniu do alternatywnej metody log-probitowej, która wymaga wykorzystania 32–40 osobników w grupie. Z uwagi na krótki czas trwania oraz małą inwazyjność, testy oceniające działania niepożądane, tj. test komina i test siły chwytu, zostaną przeprowadzone na tych samych zwierzętach, co pozwoli na znaczne zredukowanie liczby zwierząt użytych w doświadczeniu. Dodatkowo krew oraz mózgi do badań biochemicznych zostaną pobrane od zwierząt, które wcześniej zostały wykorzystane w testach behawioralnych. Liczba zwierząt wykorzystanych w doświadczeniach może zostać zmniejszona w trakcie przeprowadzania zaplanowanych procedur.

Zasada udoskonalenia:

Wykorzystywane zwierzęta będą przetrzymywane w warunkach odpowiednich dla swojego gatunku. Klatki zaopatrzone będą w elementy wzbogacające środowisko gryzoni (domki, papierowe tunele, materiał do budowy gniazda), w celu zwiększenia ich aktywności. Przed rozpoczęciem doświadczeń, podczas 7-dniowego okresu adaptacji do warunków laboratoryjnych, stosowana będzie procedura *handlingu*, w trakcie której zwierzęta przyzwyczajane będą do obecności eksperymentatora i jego dotyku, co pozwoli na zminimalizowanie stresu zwierzęcia podczas przechodzenia kolejnych etapów procedur doświadczalnych. Przed każdym testem zwierzęta będą przechodziły 30-minutowy okres aklimatyzacji do pomieszczeń, w których przeprowadzane są doświadczenia. Niestety ze względu na możliwość interakcji pomiędzy badaną substancją a lekami uspokajającymi i/lub przeciwbólowymi nie jest możliwe ich podanie. Stosowane będzie jednak znieczulenie miejscowe w przypadku testów drgawkowych. Czas trwania poszczególnych procedur jest krótki, w związku z czym nie dojdzie do długotrwałego pogorszenia stanu zdrowia zwierząt. W planowanych testach drgawkowych aktywność drgawkowa trwa kilka-kilkadziesiąt sekund po czym zwierzęta poddawane są natychmiastowej eutanazji. Wszystkie czynności prowadzone będą przez przeszkolonych wykonawców, posiadających wieloletnie doświadczenie w pracy ze zwierzętami. Zwierzęta będą znajdowały się pod stałą kontrolą lekarza weterynarii.

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.