

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu: ***Aktywność przeciwdrgawkowa palmatyny w doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych indukowanych stymulacją elektryczną u myszy***

Czas trwania projektu 20.10.2020 r. – 01.03.2021 r. (4 miesiące)

1. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): palmatyna, padaczka, MES/MEST test, test drgawek psychomotorycznych

2. 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

3. 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.

Palmatyna jest składnikiem ekstraktów pochodzących z korzenia *Berberis siberica*. Dotychczasowe badania wykazały szereg korzystnych działań farmakologicznych tego związku związanych z wpływem na funkcjonowanie centralnego układu nerwowego, m.in. jej działanie przeciwdrgawkowe w teście drgawek pentetrazolowych u larw danio pręgowanego. Dotychczas nie zbadano jednak wpływu palamatyny na próg drgawkowy w modelach drgawek padaczkowych wywołanych stymulacją elektryczną, nie podjęto również próby wyznaczenia jej dawek ED₅₀ w tych testach. Test maksymalnego wstrząsu elektrycznego oraz test drgawek psychomotorycznych indukowanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz są standardowymi modelami wykorzystywanymi w badaniach przedklinicznych związków o działaniu przeciwdrgawkowym.

Celem projektu będzie zbadanie wpływu palamatyny na próg maksymalnych drgawek elektrycznych (test MEST) oraz drgawek psychomotorycznych wywołanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz u myszy. W toku tych doświadczeń oceniony zostanie również wpływ badanych związków na koordynację ruchową (test komina) i siłę mięśni szkieletowych (test siły chwytu) u myszy. Jeżeli palmatyna będzie powodowała istotny wzrost progu drgawkowego, to zostaną również wyznaczone jej dawki ED₅₀ (dawka związku, która chroni 50% zwierząt przed wystąpieniem drgawek) w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego (test MES) oraz w teście

drgawek psychomotorycznych indukowanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz przy natężeniu 32 i 44 mA u myszy.

Wyniki planowanych doświadczeń będą uzupełnieniem dotychczasowego stanu wiedzy na temat właściwości przeciwdrgawkowych palmatyny i pozwolą ocenić bezpieczeństwo jej stosowania. Mogą się one również przyczynić do opracowania nowych sposobów terapii zaburzeń padaczkowych.

4. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Doświadczenia zostaną przeprowadzone na samcach myszy domowej (*Mus musculus*) stada Swiss. Liczba zwierząt wynosi 360 osobników.

5. 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: *palmatine / Berberis siberica extract / epilepsy / seizure / convulsion / seizure models / epilepsy models / MES test / MEST test/ 6 Hz psychomotor seizure test / brain / central nervous system / mice / rats / human*

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że ekstrakty z berberysu, a także ich składnik – palmatyna, wykazują liczne korzystne działania w doświadczalnych modelach zaburzeń neurologicznych i psychiatrycznych. Nagromadzony materiał badawczy pozwala również na stwierdzenie, że palmatyna wykazuje działanie przeciwdrgawkowe w doświadczalnym modelu drgawek padaczkowych u larw danio przegowanego.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

- A. Rozwinięcie teoretyczne istniejącej wiedzy w kierunku dokładniejszego poznania wpływu palmatyny na funkcje centralnego układu nerwowego, w szczególności pod kątem jej właściwości przeciwdrgawkowych.
- B. Lepszą ocenę możliwości zastosowania terapeutycznego palmatyny 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 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 palmatyny.

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

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. metoda „up and down”, która pozwoli na zredukowanie liczby myszy w grupie do niezbędnego minimum (tj. 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. 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.