

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „Aktywność przeciwbólowa oraz przeciwzapalna nowych amidowych pochodnych układów heterocyklicznych”

2. Czas trwania projektu - 3 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) farmakologia, efekt przeciwzapalny, efekt przeciwbólowy

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 projektu jest zbadanie aktywności przeciwbólowej oraz przeciwzapalnej nowych amidowych pochodnych układów heterocyklicznych będących analogami HC-030031 – selektywnego antagonisty kanału jonowego TRPA1 (*Transient Receptor Potential Anykrin 1*) w modelu bólu neuropatycznego – modelu neuropatii indukowanej oksaliplatyną (Procedura nr 1), w modelu bólu tonicznego indukowanego podaniem formaliny (Procedura nr 2), w teście przeciągania - Writhing Test (Procedura 3). Następnie zostaną również przeprowadzone eksperymenty, mające na celu określenie efektu przeciwzapalnego badanych związków w modelu zapalenia miejscowego po podaniu karagenu (Procedura 4), w modelu zapalenia otrzewnej wywołanego podaniem zymozanu A i oceną przepuszczalności naczyń (Procedura 5) oraz w modelu zapalenia otrzewnej wywołanego podaniem zymozanu A i oceną wpływu badanych związków na stany zapalne (Procedura 6). Aby zweryfikować poprawność uzyskanych w ww. modelach bólu wyników, planuje się również oznaczenie wpływu związków na aktywność lokomotoryczną (Procedura nr 7).

Uzyskane w testach *in vivo* dane zweryfikują zasadność poszukiwania nowych leków przeciwzapalnych i przeciwbólowych w tej grupie ligandów. Badania pozwolą też przybliżyć znaczenie receptorów TRPA-1 w patogenezie bólu przewlekłego.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa – 2128 osobników

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Dla osiągnięcia celu doświadczenia konieczne jest przeprowadzenie badań *in vivo*. Nie ma możliwości zastąpienia wnioskowanych procedur doświadczalnych inną metodą badawczą nieobejmującą wykorzystywania żywych zwierząt kręgowych. Testy *in vitro* przeprowadzone we wczesnym etapie realizacji projektu umożliwiają oznaczenie punktów uchwytu, potwierdzają mechanizm działania nowo zsyntetyzowanych substancji chemicznych o potencjale terapeutycznym, jednakże nie zastępują w pełni badań *in vivo*, które określają wpływ i siłę działania testowanych związków na żywy organizm (fizjologię poszczególnych układów). Z danych literaturowych (przegląd piśmiennictwa w bazach danych: PUBMED, ScienceDirect) wynika, że badania *in vivo* prowadzone w celu weryfikacji koncepcji biologicznie aktywnego związku chemicznego o potencjale terapeutycznym przeprowadza się najczęściej na gryzoniach. Gatunkiem powszechnie wykorzystywanym w badaniach objętych niniejszym wnioskiem jest mysz domowa. Mając powyższe na uwadze zaplanowano przeprowadzić doświadczenie na myszach – zwierzęcym modelu doświadczalnym umożliwiającym uzyskanie najlepszej odpowiedzi i powtarzalnych wyników w proponowanych testach.

Badania z wykorzystaniem modeli *in vivo* stanowią bardzo istotny element poznania właściwości nowych substancji wykazujących działanie przeciwbólowe. Stąd też nie jest możliwe zrezygnowanie z ich prowadzenia, zwłaszcza w przypadku związków dotychczas nie przebadanych, co do których istnieje szansa na wprowadzenie ich do farmakoterapii bólu, w tym neuropatycznego.

Dostępna literatura wskazuje, iż myszy są najwłaściwszym gatunkiem do wykonania planowanych doświadczeń, a planowanych procedur nie można ich zastąpić innymi, bez udziału zwierząt. W miarę możliwości będzie się dążyć do ograniczania liczby zwierząt używanych w testach behawioralnych; badania zostaną przeprowadzone przez doświadczonych eksperymentatorów w sposób wysoce humanitarny, aby zadawać zwierzętom jak najmniej cierpienia. W przypadku braku istotnej aktywności związków w najwyższej dawce, dawki niższe nie będą badane. Przy wykonywaniu badań behawioralnych będzie się postępować zgodnie z przyjętą metodyką testów, z wykorzystaniem sprzętu wysokiej klasy. Każdy z pracowników wykonujących badania behawioralne jest zaznajomiony z aktualnie obowiązującymi przepisami dotyczącymi zwierząt doświadczalnych.

Do naszych doświadczeń wybraliśmy myszy z uwagi na opracowane i stosowane przez nas modele doświadczone.

Sposób realizacji zasady 3R

1. Udoskonalenie

Zwierzęta

- Wykorzystywane zwierzęta (myszy) będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku.
- Jednopłciowe grupy badawcze (samce) pozwolą na uniknięcie rywalizacji samców o samice oraz zredukowanie ilości zmiennych (związanych z płcią) na możliwy rozrzut otrzymanych wyników.

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

- Zastosowanie właściwej diety; zwierzęta będą karmione certyfikowaną paszą bytową.
- Od pierwszego dnia procedury zwierzęta będą przetrzymywane w klatkach o powierzchni 420x265x180, 825 cm³, po 8 osobników w klatce.
- Stały kontakt i pomoc ze strony lekarza weterynarii pozwoli na zapewnienie odpowiednich warunków bytowych.

Pomieszczenie bytowe

- Zwierzęta będą przebywały w pomieszczeniu bytowym służącym tylko do tego celu, w którym nie będą wykonywane czynności tj. iniekcje, eksperyment, uśmiercanie.
- Pomieszczenie bytowe będzie oddzielone od pozostałych pomieszczeń eksperymentalnych. Pozwoli to na redukcję hałasu oraz ograniczy narażenie na czynniki stresogenne. Pomieszczenie to jest wyposażone w stały system monitorowania temperatury i wilgotności.
- Codzienna kontrola stanu zwierząt oraz wymiana ściółki (co 2 dni, a w przypadku myszy cukrzycowych codziennie) pozwolą na szybkie zidentyfikowanie wszystkich chorych lub okaleczonych zwierząt i podjęcie odpowiednich działań oraz zapewnienie higieny.

Sala eksperymentalna

- Czynności tj. iniekcje badanych substancji, będą wykonane w tzw. sali eksperymentalnej

Metoda badawcze

- Zastosowane metody badawcze zostały wybrane tak aby ograniczyć do minimum albo eliminować ból, cierpienie.
- Opracowane instrukcje postępowania zapewnią ich regularny i powtarzalny sposób wykonania co ograniczy stres zwierząt.
- Wszystkie czynności będą wykonywane przez znanego zwierzętom i doświadczonemu eksperymentatorowi lub osobę uczestniczącą.
- Podawane zwierzętom w trakcie doświadczenia roztwory będą miały temperaturę zbliżoną do temperatury ciała myszy, co zapewni uniknięcie szoku temperaturowego i uczucia dyskomfortu.
- Badane substancje będą rozpuszczane w roztworach nie indukujących podrażnienia tkanek.
- Na końcu każdej procedury myszy zostaną uśmiercone przez zastosowanie dyslokacji kręgosłupa szyjnych
- Eksperymentator zgłasza pełną gotowość do przeprowadzenia zabiegu uśmiercania w przypadkach nagłych przez zastosowanie humanitarnej procedury uśmiercania.

2. Ograniczenie

- Do doświadczeń wybrano samce myszy CD-1 z uwagi na opracowane w Katedrze Farmakodynamiki UJ CM schematy doświadczalne.
- Na ograniczenie ilości wykorzystanych zwierząt pozwalają także inne czynności minimalizujące zmienność i zwiększające powtarzalność pomiarów takie jak: stabilna pasza, jednorodność grup badanych pod względem wieku, masy ciała oraz płci (samce); równy okres kwarantanny; ten sam/znany eksperymentator, zachowanie reżimu czasowego procedur.
- W celu uzyskania wiarygodnych, istotnych statystycznie wyników każda z grup doświadczalnych liczyć będzie co najmniej 8 zwierząt.

3. Zastąpienie

- W celu zweryfikowania hipotezy badawczej (oznaczenie aktywności analgetycznej badanych związków) nie można zastosować metody wykluczającej wykorzystanie zwierząt doświadczalnych.
- Zastosowanie zwierząt w planowanym doświadczeniu pozwoli na poznanie działania badanych substancji na cały organizm i będące podstawą jego funkcjonowania tkanki, a także wzajemne interakcje między nimi. Jest to niemożliwe przy zastosowaniu procedur *in vitro*, czy *in silico*. Planowane badania należą do grupy badań

podstawowych mających na celu poznanie działania badanych związków i nie ma możliwości zastąpienia zwierząt metodami alternatywnymi.

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.