

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projekt „**Badanie aktywności farmakologicznej wybranych antagonistów receptora NMDA**”

1. Czas trwania projektu 15.12.2016 – 14.12.2020.....
2. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): ketamina, tiletamina, depresja, modele in vivo
3. 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.

Według Światowej Organizacji Zdrowia zaburzenia depresyjne dotyczą około 10% populacji i stanowią obecnie czwarty najpoważniejszy problem zdrowotny na świecie. Udowodniono, że narażenie na stres jest jednym z najistotniejszych czynników predysponujących do wystąpienia depresji, co w efekcie prowadzi do poważnych zmian w ośrodkowym układzie nerwowym, takich jak atrofia neuronów, czy zmniejszenie liczby komórek nerwowych. Niestety pomimo wielu dostępnych leków przeciwdepresyjnych farmakoterapia zaburzeń nastroju jest wciąż nieskuteczna u około 30% pacjentów. Co więcej, leki przeciwdepresyjne posiadają wiele działań niepożądanych, które często obniżają komfort życia pacjenta i/lub prowadzą do przedwczesnego zakończenia terapii. W związku z tym, do leczenia zaburzeń nastroju nadal poszukuje się skutecznych substancji, które będą obciążone mniejszą ilością działań niepożądanych.

Ketamina – anestetyk dysocjacyjny, jest używana w klinice od początku lat 60-tych ubiegłego wieku jako infuzyjny środek znieczulenia ogólnego. Wiele badań wskazuje, że w dawkach subanestetycznych lek ten po podaniu jednorazowym wywołuje szybki (kilka godzin), długotrwały (ok. 7 dni) efekt przeciwdepresyjny u pacjentów z depresją, w tym również z lekooporną postacią tego schorzenia. Należy zaznaczyć, iż środków o podobnym jak ketamina mechanizmie działania (antagonizm wobec receptorów NMDA) znanych jest więcej,

jednakże, ze względu na poważne działania niepożądane, które wywołują te substancje (np. halucynacje, zaburzenia motoryczne), tylko nieliczne znalazły zastosowanie w medycynie ludzkiej (np. memantina) lub lecznictwie weterynaryjnym (tiletamina). Na szczególną uwagę zasługuje ta ostatnia substancja, jako że jej zastosowanie u zwierząt jest podobne do zastosowania ketaminy (środek usypiający, anestetyk ogólny), natomiast nie wiadomo, czy posiada ona podobne do ketaminy właściwości przeciwdepresyjne.

Celem planowanych doświadczeń jest zatem porównanie potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej oraz przeciwlękowej tiletaminy i ketaminy w zwierzęcych modelach depresji i lęku. W celu weryfikacji poprawności uzyskanych w ww. testach wyników, planuje się dodatkowo zbadać wpływ obu leków na procesy uczenia i pamięci kontekstualnej w teście biernego unikania, próg pobudliwości bólowej w teście gorącej płytki, aktywność lokomotoryczną i koordynację ruchową zwierząt eksperymentalnych.

Zaplanowane badania przyczynią się do poszerzenia wiedzy dotyczącej obu leków. Pozwolą być może wytyczyć nowy kierunek terapii depresji u ludzi.

Wyżej opisany cel badania ma charakter zarówno naukowy jak i edukacyjny, umożliwi nam jak i innym badaczom, lepiej zrozumieć funkcję receptorów NMDA oraz właściwości ketaminy i tiletaminy. Wynik eksperymentu będzie determinować kierunek naszych przyszłych badań. Ponieważ eksperyment ma charakter przekrojowy – bada wiele potencjalnych właściwości związków, jego rezultaty będą użyteczne nie tylko dla nas i naszych przyszłych badań, ale także dla wielu innych badaczy zajmujących się funkcjami układu glutaminergicznego, co umożliwi im zaniechanie niektórych badań na zwierzętach.

Większość czynności należy do umiarkowanej lub łagodnej kategorii dotkliwości, ponadto badacze dołożą wszelkich starań, aby maksymalnie ograniczyć odczuwany przez zwierzęta dyskomfort.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu planuje się wykorzystać 940 myszy szczepu CD-1 (Swiss Albino), samce, waga 18 g-22 g, wiek ok. 4 tygodnie.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Badania z wykorzystaniem modeli in vivo stanowią bardzo istotny element poznania właściwości nowych substancji wykazujących działanie biologiczne (wpływ na układ nerwowy). Stąd też nie jest możliwe zrezygnowanie z ich prowadzenia, zwłaszcza w przypadku leków, co do których istnieje szansa na wprowadzenie ich do farmakoterapii niektórych jednostek chorobowych, których terapia jest obecnie mało efektywna.

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.

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 doświadczalne.

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 samicę oraz zredukowanie ilości zmiennych (związanych z płcią) na możliwy rozrzut otrzymanych wyników.
- 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) 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 doświadczonego eksperymentatora lub osobę uczestniczącą.
- Każda z procedur będzie poprzedzona intensywnym procesem handlingu/oswojenia co pozwoli zwierzętom przyzwyczać się do eksperymentatorów i ograniczy stres odczuwany przez zwierzęta.
- 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 kręgów 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 przez nas 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 10 zwierząt.
- Czynności w obrębie jednej procedury zostaną wykonane jednocześnie lub maksymalnie w dwóch turach dla wszystkich badanych grup co pozwoli na ograniczenie ilości grup kontrolnych.
- Warunki eksperymentu są łatwe do odtworzenia, więc niniejsza praca będzie mogła stanowić odniesienie literaturowe dla innych badaczy, co pozwoli innym na ograniczenie ilości wykorzystanych zwierząt.

3. Zastąpienie

- W celu zweryfikowania hipotezy badawczej 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 leków i nie ma możliwości zastąpienia zwierząt metodami alternatywnymi.

Pomimo nieudostępniania w klatkach wzbogaconego środowiska, które mogłoby negatywnie wpływać na przebieg doświadczenia, badacze dołożą najwyższych starań, aby ograniczyć stres jaki odczuwają zwierzęta. Każda z procedur będzie poprzedzona intensywnym procesem *handlingu* tj. oswojenia zwierząt z eksperymentatorem, aby nie odczuwały stresu podczas kontaktu z nim.