

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu *„Analiza izobolograficzna interakcji 2 pochodnych 1,2,4-triazolo-3-tionu z klasycznymi lekami przeciwpadaczkowymi w teście drgawek toniczno-klonicznych u myszy domowej stado Swiss”*

2. Czas trwania projektu **2 lata i 6 miesięcy (rozpoczęcie 01.07.2018 - zakończenie 01.01.2021)**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) 1,2,4-triazolino-3-tion, maksymalny wstrząs elektryczny, maksymalne drgawki, klasyczne leki przeciwpadaczkowe, analiza izobolograficzna

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.

Padaczka to druga co do częstości występowania choroba neurologiczna (po udarach) u osób dorosłych. Jest to choroba przewlekła, przebiegająca w postaci napadów utraty świadomości połączonej z objawami drgawkowymi, określanymi często mianem „napadów”. Niestety, około 30% pacjentów chorych na padaczkę ma postać oporną na leczenie jednym lekiem przeciwpadaczkowym i wymaga stosowania najnowocześniejszych leków lub podawania wielu leków jednocześnie, co może wywoływać u nich działania niepożądane. Wielu naukowców z dziedziny farmakologii, chemii leków jak i biologii molekularnej prowadzi szereg badań poszukując nowych leków, które by wykazywały właściwości przeciwdrgawkowe i jednocześnie nie wywoływały skutków ubocznych. W ostatnich czasach, duże znaczenie w farmakologii mają nowe leki hybrydowe zsyntetyzowane z 2 różnych cząsteczek leków klasycznych. Biorąc pod uwagę potwierdzone już przez nasz zespół działanie przeciwdrgawkowe niektórych pochodnych 1,2,4-triazolino-3-tionu w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES) u samców myszy domowej stado Swiss, postanowiliśmy poszerzyć zakres badań o określenie charakteru interakcji występujących pomiędzy pochodnymi 1,2,4-triazolino-3-tionu a czterema klasycznymi lekami

przeciwpadaczkowymi, aby wskazać najskuteczniejsze kombinacje leków w hamowaniu napadów drgawkowych w teście MES u myszy domowej stado Swiss. Oczekuje się, że 2 pochodne 1,2,4-triazolino-3-tionu będą synergicznie współdziałać w hamowaniu napadów toniczno-klonicznych w teście drgawek toniczno-klonicznych u myszy domowej stado Swiss. Celem naukowym niniejszego projektu jest ocena charakteru interakcji zachodzących pomiędzy 2 pochodnymi 1,2,4-triazolino-3-tionu a 4 klasycznymi lekami przeciwpadaczkowymi w hamowaniu napadów toniczno-klonicznych w teście MES u myszy domowej stado Swiss.

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Dorośle samce myszy domowej stado Swiss – 448 szt.

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w elektronicznych bazach danych: PubMed, Web of Science, Scopus, Ebsco. Wykorzystałem angielskie słowa kluczowe: 1,2,4-triazolino-3-thione, maximal electroshock-induced seizures, maximal electroconvulsions, classical antiepileptic drugs, isobolographic analysis.

Na podstawie przeszukanej literatury oraz wyników uzyskanych z dotychczas prowadzonych badań przygotowany został projekt, którego zamysłem jest ocena jakościowa charakteru interakcji zachodzących pomiędzy badanymi pochodnymi 1,2,4-triazolino-3-tionu a 4 klasycznymi lekami przeciwpadaczkowymi w modelu drgawek toniczno-klonicznych u myszy domowej stado Swiss, po ich dootrzewnowym, jednorazowym podaniu osobno lub łącznie w kombinacjach. Przeprowadzone będą 3 serie doświadczeń: tj. dla leków podawanych osobno lub dla kombinacji leków z pochodnymi po ich podaniu dootrzewnowym, co jest wymogiem realizacji projektu ze względu na kontynuację badań i odniesienie uzyskanych wyników do wcześniej opublikowanych wyników izobolograficznych uzyskanych dla kombinacji klasycznych leków przeciwpadaczkowych. Ponadto, udokumentowany typ interakcji 2 pochodnych 1,2,4-triazolino-3-tionu z klasycznymi lekami przeciwpadaczkowymi w teście drgawek toniczno-klonicznych jest niezbędnym wymogiem do opublikowania uzyskanych danych w zagranicznych czasopismach farmakologicznych.

Opisane doświadczenia zostały zaplanowane z uwzględnieniem zasady 3R. W celu ograniczenia (REDUCTION) liczby zwierząt w teście MES, wykorzystane zostaną maksymalnie tylko 4 grupy zwierząt po 8 samców myszy domowej stado Swiss każda, aby wyznaczyć wartość  $ED_{50}$  dla klasycznych leków przeciwpadaczkowych i pochodnych 1,2,4-triazolino-3-tionu podawanych osobno oraz wartość  $ED_{50\text{ mix}}$  dla mieszaniny leków z pochodnymi podawanymi w stałych proporcjach dawek 1:1 wg metody izobolograficznej. Liczba zwierząt zaplanowanych do doświadczeń została ograniczona do niezbędnego minimum, pozwalającego na rzetelną statystyczną analizę otrzymanych wyników.

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

Jeżeli będzie możliwe wyznaczenie wartości  $ED_{50}$  i  $ED_{50\text{ mix}}$  dla badanych leków i pochodnych na podstawie wyników z 3 grup zwierząt po 8 samców myszy domowej stado Swiss, nie będzie potrzeby podawania leków lub ich mieszanin kolejnej grupie zwierząt, co również ograniczy liczbę zwierząt wykorzystanych w doświadczeniu. Zaplanowana liczba samców myszy domowej stado Swiss wykorzystanych w doświadczeniu może zostać zmniejszona w trakcie przeprowadzenia zaplanowanej procedury. Ponadto, ocena działania przeciwdrgawkowego klasycznych leków przeciwpadaczkowych i pochodnych 1,2,4-triazolino-3-tionu (podawanych osobno w teście drgawek toniczno-klonicznych – seria 1) została zaplanowana do przeprowadzenia tylko 1 raz, a wyniki z niej otrzymane posłużą do izobolograficznego określenia charakteru interakcji dla 2 różnych pochodnych 1,2,4-triazolino-3-tionu. W związku z tym nie będzie potrzeby ponownego wyznaczania wartości  $ED_{50}$  dla klasycznych leków przeciwpadaczkowych podawanych osobno w teście MES, co również ograniczy liczbę zwierząt wykorzystanych w doświadczeniu.

Badania *in vitro* stosowane w przypadku substancji o potencjalnym działaniu przeciwdrgawkowym dostarczają jedynie informacji na temat mechanizmów ich działania w odniesieniu do receptorów, enzymów lub kanałów jonowych. Jednakże, ustalenie zarówno nowych strategii leczenia jak i oceny charakteru interakcji pomiędzy klasycznymi lekami przeciwpadaczkowymi a pochodnymi 1,2,4-triazolino-3-tionu wymaga wprowadzenia eksperymentalnych modeli drgawkowych w warunkach badań *in vivo* u zwierząt. W chwili obecnej, mając na uwadze uzyskanie wiarygodnych i rzetelnych wyników z badań przyżyciowych nie ma możliwości zastąpienia (REPLACEMENT) proponowanych badań w warunkach *in vitro*, bez udziału zwierząt laboratoryjnych. Dostępne piśmiennictwo wskazuje, że myszy domowe stado Swiss są właściwym gatunkiem zwierząt laboratoryjnych do przeprowadzenia zaplanowanych doświadczeń.

W celu udoskonalenia (REFINEMENT), zwierzęta będą przetrzymywane w warunkach odpowiednich dla swojego gatunku, a podczas 7-dniowego okresu adaptacji do warunków laboratoryjnych myszy domowe stado Swiss poddawane będą procedurze handlingu, w trakcie której zwierzęta przyzwyczajane będą do obecności badacza i jego dotyku, co pozwoli zminimalizować stres myszy domowej stado Swiss podczas kolejnych etapów procedury doświadczalnej, tj. podawania dootrzewnowego 4 klasycznych leków przeciwpadaczkowych i 2 pochodnych 1,2,4-triazolino-3-tionu zarówno osobno jak i łącznie w kombinacjach oraz wywoływania drgawek toniczno-klonicznych w teście MES. Niestety, ze względu na możliwość wystąpienia interakcji farmakokinetycznych pomiędzy badanymi lekami a lekami uspakajającymi, znieczulającymi i przeciwbólowymi, nie będzie możliwe podanie tych leków. Jednakże czas trwania poszczególnych etapów procedury jest krótki, zatem nie dojdzie do długotrwałego pogorszenia stanu zdrowia myszy domowej stado Swiss. W planowanym teście drgawek toniczno-klonicznych, aktywność drgawkowa będzie trwać tylko kilka sekund, po czym zwierzęta będą poddawane natychmiastowej eutanazji. Wszystkie etapy procedury będą prowadzone przez doświadczonych eksperymentatorów, posiadających długoletnie doświadczenie w pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi. Ponadto, zwierzęta będą znajdowały się pod stałą opieką lekarza weterynarii.

Oprócz tego, zgodnie z Dyrektywą Unijną 2010/63/EU, humanitarnymi punktami końcowym (humane endpoints) w zaplanowanym doświadczeniu będą oznaki działania klasycznych leków przeciwpadaczkowych i pochodnych 1,2,4-triazolino-3-tionu, manifestujące się u myszy domowej stado Swiss

objawami takimi jak: śpiączka, wystąpienie zwiększonej częstości oddechów (>250 / min.), wystąpienie znacznego wysiłku oddechowego z silną komponentą oddychania brzuszego, silne odwodnienie zwierząt. W celu wykrycia pojawienia się wymienionych objawów, samce myszy domowej stada Swiss będą obserwowane w klatkach doświadczalnych co 15 min, po podaniu dootrzewnowym (i.p.) klasycznych leków przeciwpadaczkowych oraz pochodnych 1,2,4-triazolino-3-tionu. W przypadku stwierdzenia wystąpienia opisanych wyżej objawów humanitarnych punktów końcowych u zwierząt zastosowana będzie natychmiastowa eutanazja z użyciem CO<sub>2</sub> poprzez stopniowe wysycanie komory CO<sub>2</sub> do 70% (Procedura 1, Czynność 4). Zgodnie z Dyrektywą Unijną 2010/63/EU ustanowienie humanitarnych punktów końcowych przed rozpoczęciem eksperymentu pozwala zapobiec niepotrzebnemu bólowi zwierząt i cierpieniu, zapewniając jednocześnie dokładne i rzetelne uzyskanie wyników.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na wskazanie czy 2 pochodne 1,2,4-triazolino-3-tionu synergistycznie nasilają przeciwdrgawkowe działanie 4 klasycznych leków przeciwpadaczkowych w teście drgawek toniczno-klonicznym u myszy domowej stado Swiss.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

☒ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy

☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

☐ NIE

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.