

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: *Wpływ pterostilbenu na aktywność drgawkową oraz aktywność wybranych leków przeciwpadaczkowych w modelach drgawek padaczkowych u myszy*

2. Czas trwania projektu: 12.02.2018 – 30.06.2021, 28 miesięcy

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): pterostilben, modele drgawek padaczkowych, leki przeciwpadaczkowe, 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.

Padaczka jest schorzeniem neurologicznym o bardzo niejednorodnej etiologii. Pomimo dostępności wielu leków przeciwpadaczkowych (LPP), u ok. 30% pacjentów z padaczką nie udaje się uzyskać satysfakcjonujących rezultatów terapii. Istnieje potrzeba opracowywania efektywniejszych i bezpieczniejszych substancji przeciwdrgawkowych, a ich dobrym źródłem mogą być związki pochodzenia naturalnego. Przykładem takiego związku jest pterostilben – dimetylowany analog resveratrolu. Związek ten jest składnikiem wielu suplementów diety, które mogą być również przyjmowane przez chorych na padaczkę. Dotychczasowe badania wykazały szereg działań pterostilbenu, które mogą być wykorzystywane w leczeniu m.in. otyłości, chorób o podłożu zapalnym, chorób układu krążenia i nowotworowych. Pterostilben wykazywał również działanie ochronne w doświadczalnych modelach chorób neurodegeneracyjnych czy udaru, stwierdzono również jego działanie przeciwbólowe i przeciwłękowe.

Celem planowanych doświadczeń jest zbadanie wpływu pterostilbenu na próg drgawkowy w doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych u myszy, tj. w teście drgawek indukowanych dożylnym podaniem pentetrazolu, teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego oraz teście progu

drgawek psychomotorycznych wywołanych prądem o częstotliwości 6 Hz. Aby sprawdzić bezpieczeństwo równoczesnego przyjmowania pterostilbenu i LPP, zostanie zbadany wpływ tego związku na aktywność wybranych LPP w trzech wymienionych powyżej testach drgawkowych u myszy. W przypadku stwierdzenia istotnych statystycznie zmian aktywności LPP zostanie określony charakter tych interakcji farmakologicznych. Działania niepożądane samego pterostilbenu oraz jego kombinacji z LPP związane z wpływem na koordynację ruchową i siłę mięśni szkieletowych zostaną ocenione w teście komina i siły chwytu u myszy.

Wyniki uzyskane w planowanym projekcie mogą pomóc w procesie poszukiwania nowych LPP, mogą być również wskazówką dla pacjentów przyjmujących jednocześnie LPP i suplementy diety zawierające w swoim składzie pterostilben.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Doświadczenia zostaną przeprowadzone na myszy domowej - samcach szczepu Swiss. Przewidywana liczba zwierząt wynosi 1503 osobniki.

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 / resveratrol / epilepsy / seizure / convulsion / seizure models / antiepileptic drugs / 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 przeciwlękowe oraz przeciwbólowe u zwierząt doświadczalnych.

Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że pterostilben wpływa na funkcje centralnego układu nerwowego, może więc oddziaływać też na aktywność drgawkową.

Brak jest danych dotyczących wpływu pterostilbenu na próg aktywności drgawkowej w doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych u myszy. Pomimo tego, że pterostilben jest składnikiem diety człowieka oraz może być przyjmowany jako suplement diety w połączeniu z lekami przeciwpadaczkowymi, dotychczas nie zbadano wpływu tego związku na aktywność leków przeciwpadaczkowych.

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 na procesy związane z aktywnością drgawkową oraz działaniem leków przeciwpadaczkowych.

B. Zastosowanie uzyskanej wiedzy w procesie poszukiwania nowych związków o działaniu przeciwdrgawkowym.

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

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 wpływu pterostilbenu na próg drgawkowy ani aktywność leków przeciwpadaczkowych w organizmie. Przy zastosowaniu tych metod nie będzie również możliwe zbadanie zmian stężenia leków w organizmie. Co więcej, danych takich nie dostarczą również badania kliniczne, ponieważ ocena stężeń leków przeciwpadaczkowych możliwa jest jedynie we krwi pacjentów, a nie w tkance mózgowej, która jest miejscem ich działania.

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 (20 osobników) w porównaniu do alternatywnej metody log-probitowej, która wymaga wykorzystania 32-40 osobników w grupie. Jeżeli możliwe będzie rzetelne wyznaczenie dawki ED₅₀ badanego leku na podstawie wyników uzyskanych z trzech lub czterech 8-osobnikowych grup zwierząt, nie będzie potrzeby podawania leku kolejnym grupom, co również ograniczy liczbę zwierząt wykorzystanych w doświadczeniu. Dodatkowo część testów oceniających działania niepożądane, tj. test komina oraz test siły chwytu, zostanie przeprowadzonych na zwierzętach wykorzystanych w testach drgawkowych, 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 dla gryzoni, 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.