

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „Badanie skuteczności *Isatis tinctoria* L. w zmniejszaniu stresu i zaburzeń nastroju”

2. Czas trwania projektu3 lata.....

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) *Isatis tinctoria* L., depresja, lęk, stres oksydacyjny, neuroprotekcja

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.

Depresję definiuje się klinicznie jako patologiczny zespół objawów psychologicznych, neuroendokrynnych i somatycznych, których nie można odtworzyć u zwierząt, w tym u myszy. Tylko określone mierzalne zachowania (endofenotypy) mogą być uznane za istotne dla depresji u ludzi. Do chwili obecnej niewiele modeli jest powszechnie stosowanych do przesiewowego badania efektów przeciwdepresyjnych lub badania mechanizmów działania nowych cząsteczek. Do badań wybrano zatem zestaw czterech testów behawioralnych, które razem są odpowiednie do fenotypowania zachowań zwierząt, które mogą być związane z niektórymi aspektami zachowań u ludzi cierpiących na określone schorzenia psychiatryczne, takie jak schizofrenia, depresja i lęk. Aby sprawdzić czy efekt redukcji zachowań depresyjno-podobnych jest wywołany przez wpływ hamujący na NO, zaplanowano test z użyciem modulatorów NO. Jako czynnik stresogenny w testach przy jednokrotnym podaniu wybraliśmy model ostrego stonowanego stresu wywołanego przez czasowe uruchomienie w plastikowej tubie (acute resistant stress test - ARS), gdyż podczas unieruchomienia indukowany także jest stres oksydacyjny. Następnie, gdy potencjalne właściwości wyciągów z urzetu zostaną potwierdzone, zaplanowano kolejny test obrazujący działanie po przewlekłym podawaniu, biorąc pod uwagę fakty, iż: stany lękowe/depresyjne są schorzeniami wymagającymi leczenia przez jakiś okres czasu oraz działanie środków terapeutycznych przy przewlekłym podawaniu może być bardziej zauważalne lub niestety zanikać. Ten model to myśli model stresu wywołanego izolacją społeczną (SIS). Paradygmat SIS to procedura

chronicznego stresu, która może wywołać głębokie zmiany behawioralne i neurochemiczne u gryzoni oraz wywołuje zachowania depresyjne i lękowe. W żaden sposób zwierzę nie jest narażone na odczuwanie bólu i nie musi walczyć z zagrażającymi przeciwnościami środowiskowymi.

W krwi i tkankach pobranych od zwierząt zostaną przeprowadzone liczne oznaczenia biochemiczne (kortykosteron, BDNF, NO, IL-6, TNF-a, RFT, MDA, NPSH, CAT, SOD, AlaT, AspaT), które wskażą czy działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne lub neuroprotektoryjne *Isatis tinctoria* L. odgrywa rolę w jego aktywności przeciwdepresyjnej/przeciwłękowej. Zostanie zbadana też ekspresja niektórych genów.

Tak więc, projekt ten zakłada nie tylko zbadanie skuteczności działania wyciągów z *Isatis tinctoria* L. (cztery różne – dwa z rośliny dzikiej i dwa z hodowanej sztucznie w laboratorium w celu zwiększenia zawartości korzystnie działających związków), ale także co jest najistotniejsze, mechanizmów tego działania na poziomie całego organizmu, komórkowym oraz genetycznym. Nie ma możliwości zbadania tego w takim stopniu badaniami *in vitro*, ani badaniami z udziałem człowieka

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

744 , myszy domowe, samce, CD-1.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Metody wybrane do badań są najbardziej humanitarne z możliwych do zastosowania i zostały udoskonalone tak, aby ograniczyć maksymalnie ból i cierpienie zwierząt doświadczalnych. Wybrane testy umożliwiają uzyskanie powtarzalnych wyników, bez większych rozrzutów statystycznych, co przekłada się na stosunkowo niedużą liczbę zwierząt konieczną do użycia w grupach kontrolnych i badanych, dlatego liczba zwierząt w grupach oraz liczba grup są najmniejsze z możliwych z punktu widzenia statystycznej weryfikacji wyników oraz ich wiarygodności.

Udoskonalenie:

W ramach ograniczenia dystresu eksperyment będzie wykonywany codziennie przez te same osoby, z których zapachem i dotykiem zwierzęta zapoznają się na początku podczas czynności: „handling”. Wykorzystywane zwierzęta (myszy) są utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku. Jednopłciowe grupy badawcze (samce) pozwolą na uniknięcie rywalizacji samców o samicę oraz zredukowanie ilości zmiennych (takich jak płeć) na możliwy rozrzut otrzymanych wyników. Zastosowanie właściwej diety; zwierzęta będą karmione certyfikowaną paszą bytową. Karmienie nie będzie w żaden sposób wymuszane. Od pierwszego dnia procedury zwierzęta będą przetrzymywane w klatkach o powierzchni 800 cm² i odpowiedniej wysokości (min 18 cm) po 4 osobniki (poza testem SIS), na ściółce niepalącej z małą zawartością żywic. Stały kontakt i pomoc ze strony lekarza weterynarii pozwoli na zapewnienie odpowiednich warunków bytowych. Zwierzęta pochodzą ze Zwierzętarni Wydziału Farmaceutycznego UJ, w tym samym budynku będą również przeprowadzane

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

eksperymenty, zatem nie będzie konieczny transport zwierząt na znaczną odległość. Podawane zwierzętom w trakcie doświadczenia roztwory będą miały temperaturę zbliżoną do temperatury ciała myszy co zapewni uniknięcie uczucia dyskomfortu. Eksperymentator zgłasza pełną gotowość do przeprowadzenia zabiegu uśmiercania w przypadkach nagłych, przez zastosowanie humanitarnej procedury uśmiercania.

Ograniczenie:

Liczebność grup została dobrana do danych testów na podstawie dostępnej literatury. Liczba wykorzystanych zwierząt została ograniczona do poziomu niezbędnego do osiągnięcia celów, takich jak we wcześniejszych badaniach z wykorzystaniem postulowanych do wykonania procedur, w których grupy badawcze liczyły adekwatną do liczebności wskazanej w przedkładanym wniosku. W procedurach 5 i 6, gdzie badany jest mechanizm działania przeciwlękowego/przeciwdepresyjnego ograniczona została grupa zwierząt przez wykonanie wszystkich 4 testów (czynności łagodne) u tych samych myszy. Odstęp pomiędzy dwoma pierwszymi testami, a kolejnymi dwoma wyniesie 1 tydzień. Jest to odpowiedni czas do zmetabolizowania związków wchłoniętych z badanych ekstraktów. Tkanki od tych zwierząt nie będą pobierane do dalszych badań. Procedury 5, 6 i 7, 8 zostaną wykonane tylko wtedy gdy w procedurach 1-4 uzyskane zostaną znaczące wyniki. Do badań przewlekłych zostanie wybrana tylko jedna dawka (ED50), wyznaczona z testów ostrych. Zastosowany model badawczy został odpowiednio dobrany. Myszy CD-1 to szczep wsobny. Zapewnia to powtarzalność pomiarów i minimalizuje zmienność pozwalając na ograniczenie ilości wykorzystywanych zwierząt do niezbędnego minimum. Na ograniczenie ilości wykorzystanych zwierząt pozwalają także inne czynności minimalizujące zmienność i zwiększające powtarzalność pomiarów takie jak: stabilna pasza; zrównoważone środowisko; jednorodność grup badanych pod względem wieku, masy ciała oraz płci; równy okres kwarantanny; ten sam/znany eksperymentator, zachowanie reżimu czasowego procedur.

Zastąpienie:

W celu zweryfikowania hipotezy badawczej nie można zastosować metody, bez konieczności wykorzystania zwierząt. W badaniach behawioralnych, wpływu badanych ekstraktów na aktywność spontaniczną, stres, zaburzenia lękowo-podobne i depresyjno-podobne oraz w badaniach określających mechanizmy działania, nie jest możliwe zastąpienie zwierząt kręgowych innym materiałem. 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* m.in. hodowle tkankowe. W pobranych tkankach od badanych zwierząt zostaną oznaczone liczne parametry biochemiczne oraz ekspresja wybranych genów, co pozwoli na zbadanie dokładnego mechanizmu działania. Planowane badania należą do grupy badań podstawowych mających na celu poznanie wpływu ekstraktów z *Isatis tinctoria* L. na stres, zachowania depresyjno-podobne oraz mechanizmów jego działania, stąd też 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.