

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu EPIGENETYCZNE MECHANIZMY (METYLACJA DNA I MODYFIKACJA HISTONÓW) REGULUJĄCE GŁÓD NARKOTYKOWY I NAWROTY DO NAŁOGU KOKAINOWEGO – ANALIZY EX VIVO ORAZ IN VIVO

2. Czas trwania projektu 2 miesiące

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) uzależnienie, kokaina, epigenetyka, samopodawanie, szczur

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.

Głównym celem projektu jest poszukiwanie mechanizmów epigenetycznych odpowiedzialnych za uzależnianie od kokainy oraz nawroty zachowań poszukiwawczych. Zostaną zbadane zależności występujące pomiędzy post-transkrypcyjnymi mechanizmami regulacyjnymi w zakresie metylacji DNA oraz modyfikacji histonów w grzbietowym prążkowie szczura, a behawioralnymi konsekwencjami głodu narkotykowego i nawrotu do nałogu kokainowego. Będą również wykonane analizy przyżyciowe określające czy inhibitory enzymów odpowiadających za procesy metylacji DNA czy acetylacji histonów (stosowane oddzielnie i łącznie) podawane obwodowo lub do grzbietowego prążkowie zmieniają behawioralne efekty kokainy. Uzyskane dane mogą wskazać kluczowe biomarkery uzależnienia od narkotyków i dostarczyć ważnych informacji dla rozwoju terapii celowanych dla ludzi uzależnionych

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

26 sztuk (2 grupy po 9 osobników, 1 grupa 8 osobników); szczur, samiec, szczep Wistar Han (dostawca Charles River, Niemcy).

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzono, że:

A. Stosowany w tym projekcie model behawioralny dożylnego samopodawania kokainy jest dobrze opracowanym i sprawdzonym modelem zwierzęcym (m.in. ogranicza niepotrzebny stres zwierząt).

W dużym stopniu odzwierciedla on zmiany obserwowane u pacjentów nadużywających kokainę.

B. Brak jest danych, o badaniach przedklinicznych nad zmianami transkrypcyjnymi lub post-transkrypcyjnymi w ostrych lub chronicznych podaniach kokainy oraz ich znaczeniu epigenetycznych mechanizmów w nagradzających właściwościach tej substancji psychostymulującej.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

dokładniejsze zrozumienie mechanizmów epigenetycznych oraz pogłębi wiedzę o uzależnieniu.

Wyniki proponowanych badań będą mieć charakter poznawczy, ponieważ umożliwią określenie wpływu epigenetycznych zmian wywołanych poszukiwaniem substancji uzależniającej oraz poznanie specyficznych genów, których potranslacyjne zmiany są kluczowymi czynnikami decydującymi

o nawrocie do nałogu. Zmiany uzyskane w analizach ex vivo, zostaną zweryfikowane poprzez równoległe in vivo zastosowanie inhibitorów enzymów regulujących poziom metylacji DNA oraz acetylacji histonów - podawanych obwodowo lub lokalnie do grzbietowego prądkowia. W konsekwencji wyniki mogą przyczynić się do wyjaśnienia neurobiologicznych mechanizmów leżących u podstaw uzależnienia od kokainy i określenia potencjalnego sposobu jego leczenia.

Sposób realizacji zasady 3R

1. Udoskonalenie

Zwierzęta

- Wykorzystywane zwierzęta (szczury) są utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku.
- Jednopłciowe grupy badawcze (samce) pozwolą na uniknięcie rywalizacji samców o samice oraz zredukowanie ilości zmiennych (takich jak płeć) 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 59x38x20 cm wysokości (T4) po 5 osobników, natomiast w okresie rekonwalescencji oraz w czasie prowadzenia doświadczeń pojedynczo w kławkach o wymiarach 42x26,5x18 cm (T3) na ściółce niepalnej z małą zawartością żywic.
- 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 pomieszczeniu nie będą wykonywane pozostałe czynności (tj. iniekcje, eksperyment, uśmiercanie).
- Pomieszczenie bytowe będzie oddzielone od pozostałych pomieszczeń co pozwoli na redukcję hałasu. Pomieszczenie to jest wyposażone w stały system monitorowania temperatury i wilgotności.
- Codzienna kontrola stanu zwierząt oraz wymiana ściółki (2 razy w tygodniu) pozwolą na szybkie zidentyfikowanie wszystkich chorych lub okaleczonych zwierząt i podjęcie odpowiednich działań oraz zapewnienie higieny.
- Pomieszczenie odizolowane jest od części eksperymentalnej co pozwoli na ograniczenie prawdopodobieństwa narażenia na czynniki stresogenne.

Pomieszczenia eksperymentalne i przygotowań do eksperymentów

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

- Zaplanowane czynności (tj. iniekcje badanych substancji, anestezja, implantacja kateteru) będą wykonane w tzw. pokoju przygotowań.
- Po zabiegu implantacji zwierzęta zostaną umieszczone w cichym i ciepłym miejscu, w klatce z możliwością swobodnego ruchu aż do całkowitego wybudzenia.

Metoda

- 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.
- Przed operacją zwierzęta zostaną poddane anestezji z wykorzystaniem środka pozwalającego na iniekcję niewielkiej ilości płynu. Oczy poddanych anestezji szczurów zostaną zabezpieczone przed wysuszeniem poprzez aplikację sztucznych łez.
- Podawane zwierzętom w trakcie doświadczenia roztwory będą miały temperaturę zbliżoną do temperatury szczurów co zapewni uniknięcie szoku temperaturowego i uczucia dyskomfortu.
- Badane substancje będą rozpuszczane w soli fizjologicznej lub buforach nie indukujących podrażnienia tkanek (np. monitorowanie pH roztworu).
- Na końcu każdej procedury szczury zostaną uśmiercone przez zastosowanie odpowiedniej metody
- Opiekun zostanie szczegółowo poinformowany przez eksperymentatora o ewentualnych objawach bólu, stresu, dyskomfortu zwierząt wymagających humanitarnego zakończenia procedury.
- Eksperymentator zgłasza pełną gotowość do przeprowadzenia zabiegu uśmiercania w przypadkach nagłych przez zastosowanie humanitarnej procedury uśmiercania.

2. Ograniczenie

- Do doświadczeń wybrano szczury samce Wistar Han (Charles-River Laboratories – Niemcy) z uwagi na opracowany i stosowany model doświadczalny.
- Na ograniczenie liczby wykorzystanych zwierząt pozwalają także inne czynności minimalizujące zmienność, a zwiększające powtarzalność pomiarów (stabilna pasza, zrównoważone środowisko, jednorodność grup badanych pod względem wieku, masy ciała oraz płci (samce), równy okres kwarantanny, ten sam/znany eksperymentator, zachowanie reżimu czasowego procedur).
- Doświadczenia na szczurach dają bardziej spójne i porównywalne wyniki.
- W celu uzyskania wiarygodnie istotnych statystycznie wyników grupa doświadczalna liczyć będzie 8-9 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 mechanizmów działania badanych związków, stąd też nie ma możliwości zastąpienia zwierząt metodami alternatywnymi.