

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu

Ocena potencjalnego mechanizmu działania i toksyczności nowej modyfikowanej chemicznie pochodnej aminokwasowej -(R)-AS-1 u myszy.

2. Czas trwania projektu2 lata.....

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): modyfikowane chemicznie pochodne aminokwasowe, leki przeciwpadaczkowe, ocena toksyczności, test ELISA.

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.

Celem doświadczenia jest określenie/potwierdzenie potencjalnego mechanizmu działania oraz ocena toksyczności nowego związku, będącego pod względem strukturalnym syntetyczną pochodną alaniny - (R)-AS-1 u myszy.

Wcześniejsze badanie wykazały silne właściwości przeciwdrgawkowe tej substancji w kilku zwierzęcych modelach padaczki. Dodatkowo, związek ten wykazał działanie antynocycetywne w obu fazach testu formalinowego, co świadczy o jego potencjalnej skuteczności w bólu ostrym i przewlekłym bólu tonicznym. Substancje o takim profilu farmakologicznym jak (R)-AS-1 są potencjalnie skuteczne

w szerokim spektrum napadów padaczkowych u człowieka. Przeprowadzone dotychczas badania *in vitro*, którym celem była ocena mechanizmu działania związku, pokazała, iż substancja ta nie oddziałuje ze znanymi celami molekularnymi dla powszechnie stosowanych leków przeciwpadaczkowych, jak m.in. kanały sodowe, wapniowe, potasowe, czy receptory GABA, NMDA i AMPA. Co warto podkreślić ostatnie wyniki pokazały, iż związek (R)-AS-1 wiąże się z miejscami dla antagonistów transporterów dla glicyny – GlyT1 i GlyT2. Zgodnie z danymi literaturowymi, transportery te są obiecującymi celami biologicznymi dla leków przeciwpadaczkowych, i przeciwbólowych. Sugeruje się również, iż blokowni ww. transporterów może stanowić nowy mechanizm dla substancji o działaniu przeciwdrgawkowym, natomiast hipoteza ta nie została do tej pory wyczerpująco zweryfikowana. Mając na uwadze powyższe fakty wydaje się kluczowe udowodnienie, iż związek (R)-AS-1 posiada zdolność zwiększania poziomu glicyny w obrębie OUN u myszy, a uzyskane rezultaty pozwolą jednoznacznie potwierdzić proponowany mechanizm działania.

Przeprowadzona przez nas wstępna ocena neurotoksycznego działania (R)-AS-1 w szerokim zakresie dawek (0,1-100 µg/ml) w badaniach *in vitro* z użyciem linii komórkowej SH-SY5Y nie wykazała żadnych uszkodzeń komórek nerwowych.

W ramach kontynuacji badań nad (R)-AS-1, w celu sprawdzenia potencjalnego mechanizmu działania tej substancji i sprawdzenia jej toksyczności w modelu zwierzęcym, wyznaczaliśmy następujące cele:

1. Ocena wpływu (R)-AS-1 w dawce 100 mg/kg na poziom glicyny w mózgach myszy (Procedura 1).
2. Ocena stężenia (R)-AS-1 w dawkach 80 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg po jednorazowym dożoładkowym podaniu w homogenatach mózgów myszy (Procedura 2) u myszy.
3. Ocena toksycznego działania (R)-AS-1 w dawkach 80 mg/kg, 250 mg/kg, 500mg/kg, 1000 mg/kg po jednorazowym dożoładkowym podaniu u myszy (Procedura 3)

Wyniki uzyskanych badań umożliwią porównanie stężenia badanej substancji w mózgu i osoczu (Procedura 2). Ponadto, zastosowane dawki (R)-AS-1 pozwolą na ocenę toksyczności tej substancji (Procedura 3). Dodatkowo badania poziomu glicyny pod wpływem (R)-AS-1 wskażą potencjalny mechanizm działania tej substancji (Procedura 1).

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa, stado niekrewniacze Swiss Albino – **96** szt.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w elektronicznych bazach danych: PubMed, Web of Science, Scopus, Ebsco. Wykorzystano słowa kluczowe: chemically modified amino acid derivatives, antiepileptic drugs, toxicity assessment, ELISA test.

1. R-OGRANICZENIE. W celu ograniczenia (REDUCTION) liczby zwierząt zaplanowano możliwie najmniejszą liczbę grup i z każdego osobnika będzie pobrana zarówno krew jak i narządy (śledziona, nerki i wątroba) w celu wykonania jak największej ilości badań biochemicznych i histopatologicznych. Liczba zwierząt w każdej grupie została maksymalnie zredukowana z zachowaniem możliwości wykonania analiz statystycznych.

2. R-UDOSKONALENIE. Badania są zaplanowane i będą wykonywane przez wyspecjalizowany zespół badaczy, posiadających duże doświadczenie w pracy ze zwierzętami. Ponadto zwierzęta będą przyzwyczajane do eksperymentatorów tygodniowym handlingiem. Co więcej, środowisko bytowe zwierząt wzbogacone będzie poprzez tunele z celulozy, bawełniane podkładki oraz drewniane klocki do ścierania zębów, co z pewnością zredukuje stres badanych zwierząt. Krew niezbędna do badań laboratoryjnych pobrana zostanie od zwierząt pośmiertnie, aby nie stwarzać zwierzętom kolejnych czynników stresogennych.

3. R-ZASTĄPIENIE. 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. Przeprowadzone dotychczas badania in vitro, którym celem była ocena mechanizmu działania związku (R)-AS-1, pokazała, iż substancja ta nie oddziałuje ze znanymi celami molekularnymi dla powszechnie stosowanych leków przeciwpadaczkowych. Co warto podkreślić ostatnie wyniki pokazały, iż związek (R)-AS-1 wiąże się z miejscami dla antagonistów transporterów dla glicyny – GlyT1 i GlyT2. Sugeruje się, iż blokownie ww. transporterów może stanowić nowy mechanizm dla substancji o działaniu przeciwdrgawkowym, natomiast hipoteza ta nie została do tej pory wyczerpująco zweryfikowana. Mając na uwadze powyższe fakty wydaje się

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

kluczowe udowodnienie, iż związek (R)-AS-1 posiada zdolność zwiększania poziomu glicyny w obrębie OUN u myszy, a uzyskane rezultaty pozwolą jednoznacznie potwierdzić proponowany mechanizm działania. Wstępna ocena neurotoksycznego działania (R)-AS-1 w modelu in vitro wykazała, że substancja ta nie powoduje uszkodzeń komórek nerwowych, niestety badanie te nie informują o wpływie tej substancji na cały organizm, dlatego też kolejnym etapem badań jest ocena toksyczności (R)-AS-1 z wykorzystaniem zwierząt. Ponadto w chwili obecnej, mając na uwadze uzyskanie wiarygodnych wyników z badań przyżyciowych nie ma możliwości zastąpienia (REPLACEMENT) proponowanych badań w warunkach in vitro, bez udziału zwierząt laboratoryjnych.

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.