

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu:

**Zbadanie neuroprotektoryjnego działania 3,3'-diindolometanu w modelu asfiksji okołoporodowej 7 dniowych osesków szczurzych**

2. Czas trwania projektu: 6 miesięcy (proponowany termin: 01.04.2017 - 30.09.2017)

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): niedotlenienie okołoporodowe, hipoksja-ischemia, neuroprotekcja, receptory jądrowe

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): **A. Badania podstawowe**

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.

Okołoporodowe stany niedotlenieniowo-niedokrwienne uważane są za najczęstszą przyczynę zgonów u płodów i noworodków. Niedotlenienie towarzyszy także udarowi mózgu, trzeciej co do częstości przyczyny zgonów na świecie. Nadal jednak brakuje leków, które chroniłyby mózg przed skutkami udaru czy asfiksji okołoporodowej. 3,3'-diindolometan (DIM) jest substancją pochodzenia roślinnego występującą w roślinach krzyżowych (Brassicaceae). Dotychczas wykazano, że DIM i jego analogi chronią komórki nerwowe i astrocyty w eksperymentalnych modelach choroby Parkinsona oraz zapalenia mózgu. W związku z brakiem skutecznych oraz bezpiecznych terapii niedotlenienia czy niedokrwienia mózgu, celem tego projektu jest ocena neuroprotektoryjnego potencjału DIM w modelu asfiksji okołoporodowej u osesków szczurzych. Wykorzystanie zwierząt do planowanych badań jest niezbędne, by zweryfikować hipotezę, która zakłada, że DIM w warunkach *in vivo* działa neuroprotektoryjnie i zmniejsza uszkodzenie mózgowia wywołane hipoksją-ischemią.

Badania będą prowadzone na tygodniowych noworodkach szczura poddanych hipoksji-ischemii, którym podano DIM. Dootrzewnowe podanie DIM nastąpi krótko po hipoksji-ischemii, co jest klinicznie uzasadnione, bowiem najczęściej poród odbywa się w szpitalu, więc szybkie podanie leku noworodkowi jest możliwe. 7 dniowe oseski,

na których prowadzone będą doświadczenia, odpowiadają w rozwoju człowieka 34-36 tygodniowi ciąży, czyli noworodkom urodzonym przedwcześnie. Z literatury wiadomo, że wcześniaki są najbardziej narażone na epizody niedotlenieniowo-niedokrwienne. Realizacja projektu stwarza perspektywę zbadania neuroprotektoryjnych efektów działania 3,3'-diindolometanu w modelu hipoksji-ischemii *in vivo*. Poznanie mechanizmów neuroprotektoryjnego działania DIM może przyczynić się w przyszłości do zaprojektowania, na bazie związków naturalnych, leków chroniących mózg noworodków przed skutkami hipoksji-ischemii. Według naszej wiedzy, temat ochronnego działania DIM w modelach niedotlenienia/niedokrwienia *in vivo* nie był do tej pory podejmowany przez innych naukowców.

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

7-dniowe szczury stada Wistar -144

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

### **Uwzględnienie zasady zastąpienia:**

Przygotowując projekt badawczy, sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED; ScienceDirect; Web of Science (JCR).

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, można stwierdzić że:

Asfiksja okołourodzeniowa dotyka 2-4 noworodków na 1000 urodzeń. Aż 1 milion dzieci rocznie umiera na skutek niedotlenienia. Utrzymująca się deprywacja tlenu może prowadzić do trwałych uszkodzeń mózgu noworodka i skutkować wystąpieniem zespołu hipoksyjno-ischemicznej encefalopatii (HIE). HIE jest najgroźniejszą konsekwencją/powikłaniem asfiksji okołoporodowej z szerokim spektrum objawów takich jak: mózgowe porażenie dziecięce, drgawki, zaburzenia jedzenia, upośledzenie umysłowe i ruchowe, zaburzenia mowy, słuchu czy widzenia. Aby nie dopuścić do rozwinięcia się tego zespołu u nowonarodzonego dziecka wymagane jest jak najszybsze zastosowanie resuscytacji oraz podanie leku neuroprotektoryjnego w celu zapobiegnięcia rozwojowi HIE.

Do tej pory złotym standardem zmniejszającym indukowane asfiksją uszkodzenie mózgu jest podanie tlenu (resuscytacja) oraz umiarkowana hipotermia. Jednak wciąż nie opracowano efektywnie działającego neuroprotektoryjnego leku, który chroniłby mózg dziecka przed niedotlenieniem.

Związek proponowany do przebadania jego właściwości neuroprotektoryjnych - DIM jest substancją pochodzenia roślinnego występującą w roślinach krzyżowych (*Brassicaceae*). W badaniach klinicznych DIM wykazuje działanie przeciwnowotworowe, zaś w badaniach eksperymentalnych DIM i jego analogi chronią komórki nerwowe oraz astrocyty w modelach choroby Parkinsona oraz zapalenia mózgu.

Według opublikowanego przez Agencję ds. Żywności i Leków (w USA) przewodnika, dawka 10 mg/kg DIM u szczura odpowiada dawce 1.6 mg/kg czyli 112 mg na 70 kg u człowieka. W badaniach klinicznych, DIM w dawkach 100 mg i 200 mg podawany zdrowym wolontariuszom 2 razy dziennie przez 14 dni nie wywoływał żadnych poważnych efektów ubocznych. Obserwowane dotychczas pozytywne efekty działania DIM uzasadniają jego zastosowanie w proponowanych badaniach.

### Uzasadnienie wykorzystania danych gatunków zwierząt.

Hipoksja-ischemia (H-I) mózgu siedmiodniowego szczura jest szeroko stosowana na świecie jako model asfiksji okołoporodowej.

Wiek szczurów - 7 dni po urodzeniu, jest optymalny i odpowiada rozwojowi mózgu terminowego noworodka

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

ludzkiego. Zwierzęta bardzo dobrze znoszą zabieg związany z modelem, a rany pooperacyjne goją się szybko i bez powikłań. Z oczywistych względów odrzucamy alternatywny model na prosiętach.

Podawanie zwierzętom substancji farmakologicznych po H-I jest procedurą przyjętą powszechnie.

We wszelkich eksperymentach nad neuroprotekcją w niedokrwieniu mózgu nie do ominięcia są modele in vivo. Wynika to ze złożoności patomechanizmów uruchamianych w niedokrwieniu mózgu, obejmujących nie tylko neurony, ale i komórki glejowe oraz naczynia. W tej pracy stosowany będzie model hipoksji/ischemii u noworodków szczurzych ze względu na wybiórcze wycelowanie badań na asfiksję okołoporodową. Specyfika ośrodkowego układu nerwowego w rozwoju powoduje, że na badania asfiksji okołoporodowej nie można rozciągać doświadczeń nabytych, lub uzyskanych z literatury, dotyczących różnych modeli doświadczalnych niedokrwienia i niedotlenienia u zwierząt dorosłych. Zagadnienia będące przedmiotem proponowanych badań są nowe i dalekie od poznania także u zwierząt dorosłych. Nie do zastąpienia metodami alternatywnymi są też projektowane badania użycia środków farmakologicznych.

**Uwzględnienie zasady ograniczenia:**

Niezbędna do przeprowadzenia badań liczba zwierząt została ograniczona do minimum, z uwzględnieniem nieudanych doświadczeń oraz liczby danych niezbędnych do prawidłowej statystyki wyników. Liczebność grup badawczych została wyliczona przy pomocy analizy mocy testu z zastosowaniem programu Graph Pad Prism. Użyto testu: one-way ANOVA followed by post-hoc Dunnett's test).

**Uwzględnienie zasady udoskonalenia:**

Doświadczenia na zwierzętach wykonane będą przy użyciu nowoczesnego sprzętu i technik badawczych umożliwiających uzyskanie wiarygodnych danych. Metoda eksperymentalnej asfiksji okołoporodowej proponowana w przedstawionych badaniach jest w naszym laboratorium stosowana od dawna, eksperymenty przeprowadzane będą przez doświadczonych pracowników posiadających odpowiednie kwalifikacje i wiedzę, ze szczególnym nastawieniem na minimalizację stresu czy bólu zwierząt. Wszelkie zabiegi w uśpieniu ogólnym wykonywane będą ze szczególnym staraniem o dobry stan zwierząt. Objętości podawanych iniekcji dobrane zostały w sposób rekomendowany dla danego gatunku. Zwierzęta w czasie eksperymentu będą trzymane w warunkach odpowiednich dla tego gatunku, a ze względu na bardzo młody wiek zwierząt będą cały czas pod opieką matki.