

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: „**Poszukiwanie nowych celów terapeutycznych antybiotyku β -laktamowego ceftriaksonu – rola w znoszeniu głodu kokainowego i badanie mechanizmu tego zjawiska**”

2.Czas trwania projektu: **4 miesiące**

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **uzależnienie, kokaina, AMPA, mGluR1, ceftriakson**

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

Uzależnienie od substancji psychoaktywnych jest przewlekłą chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Zmiany neurobiologiczne towarzyszące tej chorobie mogą być trwałe, dlatego uzależnienie od narkotyków jest uważane za chorobę "nawrotową" – osoby pozostające w okresie abstynencji od stosowania narkotyków charakteryzuje zwiększone ryzyko powrotu do używania narkotyków nawet po wielu latach ich niestosowania z powodu odczuwania silnego głodu narkotykowego. Badania ostatnich lat z udziałem zwierząt wskazują, iż występowanie głodu narkotykowego po odstawieniu kokainy jest związane ze wzrostem m.in. ekspresji podjednostki receptora glutaminianergicznego AMPA (GluA1) w mózgu oraz że antybiotyk β -laktamowy ceftriakson może hamować nawrót głodu narkotykowego poprzez wpływ na układ glutaminianergiczny. Ponadto wykazano, że receptor mGluR1 ma zdolność negatywnej regulacji ekspresji GluA1.

Biorąc pod uwagę powyższe, celem niniejszego badania jest oznaczenie poziomu podjednostek receptora AMPA (GluA1 oraz GluA2) oraz mGluR1 w mózgu zwierząt wykazujących cechy uzależnienia od kokainy poddanych proponowanej terapii zmniejszającej głód narkotykowy przy użyciu antybiotyku ceftriaksonu.

Początkowe badania nad użytecznością ceftriaksonu w zmniejszaniu głodu narkotykowego wskazywały na wpływ tego leku na ekspresję GLT-1. Wydaje się jednak, że ceftriakson może mieć szersze działanie w obrębie receptorów glutaminianergicznych jak AMPA czy mGluR1. Prezentowane badanie może wskazać zupełnie nowy mechanizm działania ceftriaksonu.

Do wygenerowania zwierząt wykazujących cechy uzależnienia zostanie warunkowana preferencja miejsca. Metoda ta umożliwi zbadanie nagradzających właściwości substancji uzależniających oraz zbadanie wpływu leków/związków na nawrót do nałogu wywołanego środowiskiem (kontekst) u szczurów.

Projekt doświadczenia zakłada także wykorzystanie techniki Western Blot do zbadania zmian ekspresji receptora mGluR1 oraz podjednostek receptora AMPA.

5. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Eksperyment zostanie przeprowadzony na szczurach szczepu Wistar. Ilość zwierząt niezbędnych do wykonania zaplanowanych doświadczeń to 40 szczurów. Oszacowana liczba zwierząt jest związana z projektem doświadczenia. Zwierzęta zostaną poddane procedurze warunkowanej kokainą preferencji miejsca. Zaplanowano wygenerowanie 4 grup doświadczalnych zwierząt.

1) Grupa uzależniona od kokainy, która w trakcie odstawienia otrzymuje iniekcje ceftriaksonu, który może zahamować nawrót nałogu (zwierzęta otrzymują iniekcje kokainy w trakcie warunkowania, w wyniku którego nabywają preferencję miejsca indukowaną kokainą oraz otrzymują iniekcje ceftriaksonu w trakcie odstawienia w klatce bytowej; 12 osobników)

2) Grupa uzależniona od kokainy, która w trakcie odstawienia otrzymuje iniekcje solii fizjologicznej (zwierzęta otrzymują iniekcje kokainy w trakcie warunkowania, w wyniku którego nabywają preferencję miejsca indukowaną kokainą oraz otrzymują iniekcje soli fizjologicznej w trakcie odstawienia w klatce bytowej; 12 osobników)

3) Grupa nie otrzymująca kokainy w czasie warunkowania, a otrzymująca ceftriakson w czasie odstawienia (zwierzęta otrzymują iniekcje soli fizjologicznej w trakcie warunkowania oraz iniekcje ceftriaksonu w trakcie odstawienia w klatce bytowej; 8 osobników)

4) Grupa nie otrzymująca kokainy w czasie warunkowania, a otrzymująca iniekcje soli fizjologicznej w czasie odstawienia (zwierzęta otrzymują iniekcje soli fizjologicznej w trakcie warunkowania oraz iniekcje soli fizjologicznej w trakcie odstawienia w klatce bytowej; 8 osobników)

Liczba zwierząt w eksperymencie wynika z konieczności pozyskania odpowiedniej ilości materiału do przeprowadzenia zaplanowanych analiz. W przypadku badań biochemicznych najmniejsza wymagana ze względu na statystykę ilość zwierząt na grupę to 6-8 osobników. Badania behawioralne wymagają większych grup badanych. Z uwagi na fakt, iż w wyniku warunkowania kokainą nie wszystkie zwierzęta nabywają preferencji

miejsca niezbędna jest zwiększona do 12 osobników liczba zwierząt w zaplanowanym badaniu w grupach, w których podawana jest kokaina w trakcie warunkowanej preferencji miejsca (grupa 1 i 2). Zwierzęta, które nie będą wykazywały preferencji miejsca zostaną poddane eutanazji przez podanie śmiertelnej dawki pentobarbitalu, a następnie zamrożone i przekazane do utylizacji termicznej

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

W trakcie przygotowania projektu badawczego sprawdzono skrupulatnie istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych PUBMED, EMBASE, Google Scholar.

Wykorzystano słowa kluczowe: cocaine addiction/ceftriaxone/GluA1/GluA2/AMPA/mGluR1/relapse

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzono, że prawdopodobnie receptor AMPA oraz mGluR1 mogą odgrywać rolę w przeciwnawrotowej aktywności ceftriaksonu.

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że ekspresja podjednostek GluA1 oraz GluA2 receptora AMPA ulega zmianie pod wpływem podawania i odstawienia kokainy u zwierząt uprzednio od niej uzależnionych. Ponadto wykazano, że receptor mGluR1 ma zdolność negatywnej regulacji ekspresji GluA1.

B. Wykazano, że podawanie ceftriaksonu może znosić objawy głodu narkotykowego u zwierząt i hamować nawrót pobierania kokainy, co jest związane z jego zdolnością do zwiększania ekspresji GLT-1 w jądrze półleżącym przegrody. Jednakże, ostatnie badania dowiodły, że podniesienie jedynie ekspresji GLT-1 (przy użyciu wektora wirusowego) nie hamuje nawrotu. Wydaje się zatem, że ceftriakson posiada inne mechanizmy działania, dzięki którym przeciwdziała nawrotowi nałogu.

Prezentowane badanie może wskazać zupełnie nowy mechanizm działania ceftriaksonu i przyczynić się do wskazania nowych kierunków poszukiwań substancji o podobnym mechanizmie działania do ceftriaksonu, pozbawionych jednakże działania przeciwbakteryjnego.

Planowane badania mogą zostać przeprowadzone jedynie *in vivo*. Alternatywne metody (hodowle tkankowe) nie mają zastosowania. Jedynie wykorzystanie zwierząt doświadczalnych może dość precyzyjnie odzwierciedlić proces nawrotu zachowań poszukiwawczych. Procedury wybrane w planowanym doświadczeniu, według aktualnego stanu wiedzy, są ogólnie stosowanymi i są możliwie najmniej dotkliwe dla zwierząt.

Szacowana w projekcie ilość zwierząt jest liczbą niezbędną do analizy statystycznej wyników projektu.

Zwierzęta po badaniach behawioralnych zostaną wykorzystane do analiz biochemicznych co pozwoli zredukować ich liczbę oraz określić korelację fenotypu z wynikami analiz.

Zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku. Metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak, aby ograniczały do minimum albo eliminowały ból, cierpienie, stres lub możliwość trwałego uszkodzenia organizmu tych zwierząt.

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