

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu *„Analiza izobolograficzna interakcji dla kombinacji wybranych nowych leków przeciwpadaczkowych w modelu drgawek psychoruchowych (6 Hz) u myszy domowej stado Swiss”*

2. Czas trwania projektu **2 lata i 8 miesięcy (rozpoczęcie 01.09.2018 - zakończenie 01.05.2021)**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) 6-Hz rogówkowy model stymulacji, drgawki psychoruchowe, myszy, analiza izobolograficzna, leki przeciwpadaczkowe

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.

Padaczka to jedna z najczęstszych chorób neurologicznych u osób dorosłych. Jest to choroba przewlekła, przebiegająca w postaci napadów utraty świadomości połączonej z objawami drgawkowymi, określanymi często mianem „napadów”. Pomimo, obecnie dostępnych 25 różnych leków przeciwpadaczkowych na rynku farmaceutycznym, wciąż około 30% pacjentów chorych na padaczkę ma postać oporną na leczenie jednym lekiem przeciwpadaczkowym i wymaga podawania wielu leków jednocześnie, co może wywoływać u nich działania niepożądane. Wielu naukowców z dziedziny farmakologii, chemii leków jak i biologii molekularnej prowadzi szereg badań poszukując nowych leków, które by wykazywały właściwości przeciwdrgawkowe i jednocześnie nie wywoływały skutków ubocznych. W ostatnich czasach, duże znaczenie w farmakoterapii mają właściwie dobrane kombinacje leków przeciwpadaczkowych wykazujące synergizm w działaniu przeciwdrgawkowym. Jednakże ogromna liczba możliwych kombinacji 2 lekowych, przy 25 różnych lekach przeciwpadaczkowych, jest niemożliwa do weryfikacji w warunkach klinicznych, dlatego też badania przedkliniczne na zwierzętach z wykorzystaniem analizy izobolograficznej pozwalają na wstępną ocenę charakteru interakcji pomiędzy lekami wskazując na najlepsze kombinacje leków. Biorąc pod uwagę, potwierdzone już przez nasz

zespół badawczy niektóre synergiczne kombinacje leków przeciwpadaczkowych w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES) u samców myszy domowej stado Swiss, postanowiliśmy poszerzyć zakres badań o określenie charakteru interakcji występujących pomiędzy wybranymi nowymi lekami przeciwpadaczkowymi w teście drgawek psychoruchowych 6 Hz. Oczekuje się, że niektóre kombinacje będą synergicznie współdziałać w hamowaniu napadów psychoruchowych w teście drgawek 6 Hz u myszy domowej stado Swiss.

Celem naukowym niniejszego projektu jest ocena charakteru interakcji zachodzących pomiędzy nowymi lekami przeciwpadaczkowymi w hamowaniu napadów psychoruchowych w teście 6 Hz u myszy domowej stado Swiss.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Dorośle samce myszy domowej stado Swiss – 480 szt.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w elektronicznych bazach danych: PubMed, Web of Science, Scopus, Ebsco. Wykorzystałem słowa kluczowe: 6-Hz rogówkowy model stymulacji, drgawki psychoruchowe, myszy, analiza izobolograficzna, leki przeciwpadaczkowe.

Na podstawie przeszukanej literatury oraz wyników uzyskanych z dotychczas prowadzonych badań przygotowany został projekt, którego zamysłem jest ocena jakościowa charakteru interakcji zachodzących pomiędzy lakozamidem, pregabalina, retigabina, lewetiracetamem i gabapentyną w modelu drgawek psychoruchowych (6 Hz) u myszy domowej stado Swiss, po ich dootrzewnym, jednorazowym podaniu w kombinacjach. Przeprowadzone będą 2 serie doświadczeń: tj. dla leków podawanych osobno (aby wyznaczyć wartości ED_{50} leków) lub dla kombinacji leków w stałej proporcji dawek 1:1 po ich podaniu dootrzewnym. Udokumentowany typ interakcji między wybranymi lekami w teście drgawek psychoruchowych 6 Hz jest niezbędnym wymogiem do opublikowania uzyskanych danych w zagranicznych czasopismach farmakologicznych.

Opisane doświadczenia zostały zaplanowane z uwzględnieniem zasady 3R.

W celu ograniczenia (REDUCTION) liczby zwierząt w teście drgawek psychoruchowych 6 Hz, wykorzystane zostaną maksymalnie tylko 15 grup zwierząt po 32 samców myszy domowej stado Swiss każda, aby wyznaczyć wartość ED_{50} dla leków przeciwpadaczkowych podawanych osobno oraz wartość $ED_{50\text{ mix}}$ dla mieszaniny leków podawanymi w stałych proporcjach dawek 1:1 wg metody izobolograficznej. Liczba zwierząt zaplanowanych do doświadczeń została ograniczona do niezbędnego minimum, pozwalającego na rzetelną statystyczną analizę otrzymanych wyników. Zaplanowana liczba samców myszy domowej stado Swiss wykorzystanych w doświadczeniu może zostać zmniejszona

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

w trakcie przeprowadzenia zaplanowanej procedury. 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. Jednakże, ustalenie zarówno nowych strategii leczenia jak i oceny charakteru interakcji zachodzących pomiędzy lekami przeciwpadaczkowymi wymaga wprowadzenia eksperymentalnych modeli drgawkowych w warunkach badań *in vivo* u zwierząt. W chwili obecnej, mając na uwadze uzyskanie wiarygodnych i rzetelnych wyników z badań przyżyciowych nie ma możliwości zastąpienia (REPLACEMENT) proponowanych badań w warunkach *in vitro*, bez udziału zwierząt laboratoryjnych. Dostępne piśmiennictwo wskazuje, że myszy domowe stado Swiss są właściwym gatunkiem zwierząt laboratoryjnych do przeprowadzenia zaplanowanych doświadczeń. W celu udoskonalenia (REFINEMENT), zwierzęta będą przetrzymywane w warunkach odpowiednich dla swojego gatunku, a podczas 7-dniowego okresu adaptacji do warunków laboratoryjnych myszy domowe stado Swiss poddawane będą procedurze handlingu, w trakcie której zwierzęta przyzwyczajane będą do obecności badacza i jego dotyku, co pozwoli zminimalizować stres myszy domowej stado Swiss podczas kolejnych etapów procedury doświadczalnej, tj. podawania dootrzewnowego 5 leków przeciwpadaczkowych zarówno osobno jak i łącznie w kombinacjach oraz wywoływania drgawek psychoruchowych (6 Hz). Niestety, ze względu na możliwość wystąpienia interakcji farmakokinetycznych pomiędzy badanymi lekami a lekami uspakajającymi, znieczulającymi i przeciw-bólowymi, nie będzie możliwe podanie tych leków. Jednakże czas trwania poszczególnych etapów procedury jest krótki, zatem nie dojdzie do długotrwałego pogorszenia stanu zdrowia myszy domowej stado Swiss. W planowanym teście drgawek psychoruchowych, aktywność drgawkowa będzie trwać tylko kilkanaście sekund, po czym zwierzęta będą poddawane natychmiastowej eutanazji. Wszystkie etapy procedury będą prowadzone przez doświadczonych eksperymentatorów, posiadających długoletnie doświadczenie w pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi. Ponadto, zwierzęta będą znajdowały się pod stałą opieką lekarza weterynarii. Oprócz tego, zgodnie z Dyrektywą Unijną 2010/63/EU, humanitarnymi punktami końcowym (humane endpoints) w zaplanowanym doświadczeniu będą oznaki działania leków przeciwpadaczkowych manifestujące się u myszy domowej stado Swiss objawami takimi jak: śpiączka, wystąpienie zwiększonej częstości oddechów (>250 / min.), wystąpienie znacznego wysiłku oddechowego z silną komponentą oddychania brzuszego, silne odwodnienie zwierząt. W celu wykrycia pojawienia się wymienionych objawów, samce myszy domowej stada Swiss będą obserwowane w klatkach doświadczalnych co 15 min, po podaniu dootrzewnowym (i.p.) leków przeciwpadaczkowych. W przypadku stwierdzenia wystąpienia opisanych wyżej objawów humanitarnych punktów końcowych u zwierząt zastosowana będzie natychmiastowa eutanazja z użyciem CO₂ poprzez stopniowe wysycanie komory CO₂ do 70% (Procedura 1, Czynność 4). Zgodnie z Dyrektywą Unijną 2010/63/EU ustanowienie humanitarnych punktów końcowych przed rozpoczęciem eksperymentu pozwala zapobiec niepotrzebnemu bólowi zwierząt i cierpieniu, zapewniając jednocześnie dokładne i rzetelne uzyskanie wyników.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na ocenę charakteru interakcji wybranych leków przeciwpadaczkowych w teście drgawek psychoruchowych (6 Hz) u myszy domowej stado Swiss.

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.