

TYTUŁ PROJEKTU: Badania farmakokinetyczno-farmakodynamiczne nad nowymi inhibitorami fosfodiesterazy w zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego u myszy

1. CZAS TRWANIA PROJEKTU – **36 miesięcy**

2.SŁOWA KLUCZOWE: zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego, stwardnienie rozsiane, myszy, inhibitory PDE, farmakokinetyka.

3.CEL PROJEKTU (**A. Badania podstawowe**).

5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Stwardnienie rozsiane to przewlekła, zapalna choroba ośrodkowego układu nerwowego, w której dochodzi do demielinizacji i rozpadu aksonów tkanki nerwowej. Uważane jest za chorobę autoimmunologiczną i nieuleczalną. Na świecie zdiagnozowano 2,5 miliona przypadków zachorowań. Wśród chorych są często ludzie młodzi. W Polsce około 50 tysięcy osób cierpi obecnie na to schorzenie. Wyniki licznych badań wskazują, że selektywne inhibitory specyficznych dla cAMP fosfodiesteraz (PDE), np. PDE4 i PDE7 mogą stanowić obiecujący cel terapeutyczny w leczeniu tej choroby. Celem projektu jest ocena właściwości farmakokinetycznych i skuteczności nowych nieselektywnych inhibitorów PDE, o silnym działaniu względem PDE4 i PDE7, w zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego u myszy, które odpowiada pod względem klinicznym i immunologicznym stwardnieniu rozsianemu u ludzi. Na podstawie badań *in silico*, *in vitro* oraz badań *in vivo* w modelu endotoksemii, sposób ponad 100 otrzymanych związków, wytypowano trzy najaktywniejsze inhibitory PDE. Zapalenie mózgu u myszy zostanie wywołane podskórnym podaniem białka MOG₃₅₋₅₅. Związki podawane będą dootrzewnowo raz na dobę przez 25 dni od chwili wystąpienia objawów choroby. Nasilenie tej choroby w grupach badanych i grupie kontrolnej będzie oceniane przy pomocy odpowiedniej skali klinicznej, w stymulowanych LPS splenocytach pochodzących od chorych myszy oraz w badaniach histopatologicznych. Ponadto we krwi i mózgu myszy zostaną oznaczone stężenia wybranych biomarkerów rozwoju choroby techniką LC-MS/MS. W badaniach farmakokinetycznych związki zostaną podane zwierzętom zdrowym i z wywołanym zapaleniem mózgu celem oceny wpływu choroby na farmakokinetykę i dystrybucję do tkanek badanych związków. Ponadto planuje się ocenić potencjał wywoływania wymiotów i nudności (typowe działania niepożądane po podaniu niektórych inhibitorów PDE) przez badane związki w badaniu skrócenia czasu trwania snu wywołanego podaniem agonisty receptora α_2 -adrenergicznego u myszy. Wyniki tych badań przyczynią się do oceny wpływu równoczesnego hamowania PDEs podwyższających poziom cAMP w komórkach, w tym immunologicznych, na skuteczność leczenia stwardnienia rozsianego z zastosowaniem zwierzęcego modelu tej choroby. Określona zostanie zależność dawka-stężenie-efekt farmakologiczny dla badanych związków, a także bezpieczeństwo ich stosowania. Analiza farmakokinetyczna i PK/PD zostanie przeprowadzona w programie ADAPT 5 (BMSR, USA), a analiza statystyczna w programie STATISTICA 13 (StatSoft, Polska).

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu planowane jest wykorzystanie 124 myszy domowych, szczepu C57BL/6

oraz 64 myszy domowych szczepu CD-1.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASADY 3R, tj. ZASADY ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: EBSCO; PUBMED; ScienceDirect i Web of Science. Wykorzystałam następujące słowa kluczowe: PDE4/7 inhibitors, autoimmune diseases, animal models of autoimmune encephalomyelitis, pharmacokinetics. Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam, że przedstawione we wniosku procedury są szeroko stosowane w wielu laboratoriach na całym świecie w badaniach mających na celu poszukiwanie nowych terapii stwardnienia rozsianego i poznania właściwości farmakokinetycznych nowych związków. Liczba zwierząt planowana w eksperymencie jest najmniejsza z możliwych z punktu widzenia statystycznej oceny wyników i analizy farmakokinetycznej. Co więcej, w badaniach farmakokinetycznych testowane będą jedynie trzy, wytypowane na podstawie wyników badań *in silico* i *in vitro*, spośród ponad 100 nowo zsyntetyzowanych związków, a do badań farmakologicznych zostaną skierowane dwa z nich. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że patogenezę stwardnienia rozsianego jest bardzo złożona i nie została jeszcze dokładnie poznana. Ze względu na wielopłaszczyznowość zjawisk zachodzących w tej chorobie, badania *in vitro* dostarczają jedynie orientacyjnych danych, które należy zweryfikować w żywym organizmie. Podanie białka MOG₃₅₋₅₅ w kompletnym adiuwancie Freund'a z zawieszonymi prątkami gruźlicy w celu wywołania objawów zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego jest najczęściej stosowaną, dobrze zwalidowaną procedurą w badaniach nad stwardnieniem rozsianym na świecie.

Procedury związane z wywołaniem w/w choroby cechuje wysoka kategoria dotkliwości. Jednak wg danych literaturowych rozwijający się w wyniku tej procedury stan chorobowy nie wiąże się z silnym bólem czy stresem, a jedynie z poczuciem dyskomfortu. Brak jest danych dotyczących alternatywnych metod badawczych w zakresie opracowania nowych terapii stwardnienia rozsianego oraz skuteczności związków hamujących równocześnie PDE 4 i 7 w tej chorobie. Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na ocenę wpływu nowych inhibitorów PDE na przebieg stwardnienia rozsianego w modelu zwierzęcym oraz na wytypowanie nowego silnego inhibitora PDE4/7 do dalszych prac rozwojowych.

Sposób realizacji zasady 3R

1. Udoskonalenie

Myszy utrzymywane będą we właściwych dla gatunku warunkach bytowych i karmione certyfikowaną paszą bytową. W klatkach umieszczone zostaną elementy wzbogacające środowisko, np. takie jak: klocki do ścierania zębów, czy tunele poliwęglanowe. W badaniach nad stwardnieniem rozsianym zostaną użyte wyłącznie samice, o podobnym stopniu rozwoju (8-13 tygodni), co pozwoli na zredukowanie liczby zmiennych, mogących wpłynąć na rozrzut otrzymanych wyników. Podczas eksperymentów z użyciem zwierząt prowadzona będzie codzienna kontrola ich stanu zdrowia, a w przypadku zaobserwowania niepokojących objawów, zapewniona będzie pomoc ze strony lekarza weterynarii. Zwierzęta będą przebywały w pomieszczeniu bytowym, w którym nie będą wykonywane żadne eksperymenty, czy uśmiercanie, co ograniczy ich narażenie na czynniki stresogenne. Ponadto pomieszczenie, w którym będą przebywały będzie wyposażone w system monitorowania temperatury oraz wilgotności. Aby zapewnić większy komfort myszom biorącym udział w eksperymentach, podawane związki będą rozpuszczone w roztworach o temperaturze zbliżonej do temperatury ciała myszy, które nie będą powodować podrażnienia tkanek. Model zwierzęcy zostanie wykonany zgodnie z rekomendacjami dostępnymi w literaturze.

2. Ograniczenie

Liczba zwierząt planowana w poszczególnych procedurach jest minimalna z punktu widzenia prawidłowej analizy farmakokinetycznej i statystycznej oraz zakresu planowanych doświadczeń farmakologicznych. Na ograniczenie liczby wykorzystanych zwierząt pozwolą czynniki minimalizujące zmienność i zwiększające powtarzalność pomiarów takie jak: stabilna pasza, jednorodność grup badanych pod względem wieku, masy ciała i płci, ten sam/znany eksperymentator, jednakowy okres kwarantanny, czy zachowanie reżimu czasowego procedur.

3. Zastąpienie

Jak wynika z analizy danych literaturowych, w celu weryfikacji założonej hipotezy badawczej, w niniejszym projekcie nie można zastosować metod wykluczających wykorzystanie zwierząt doświadczalnych. Złożoność procesów zachodzących w patogenezie stwardnienia rozsianego, jak i nieodkryta jeszcze pełna etiologia tej choroby uniemożliwiają zastąpienie planowanych badań *in vivo* metodami *in vitro* czy *in silico*. Podobnie, brak jest metod alternatywnych pozwalających na uzyskanie wiarygodnych informacji w odniesieniu do badań farmakokinetycznych nad nowymi związkami u zwierząt zdrowych oraz z zapaleniem mózgu i rdzenia kręgowego oraz badań pozwalających na ocenę działań niepożądanych po podaniu inhibitorów PDE.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną **Punkt 8 wypełnia LKE, a nie Wnioskodawca**

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☐ NIE