

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Oligopeptydowe analogi takryny jako potencjalne neuroprotektoryne inhibitory cholinesteraz o znaczeniu klinicznym w terapii choroby Alzheimera. Synteza i badania biologiczne”

2. Czas trwania projektu 4 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) choroba Alzheimera, neuroprotekcja, analogi takryny, inhibitory cholinesteraz

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

A. Badania podstawowe

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 projektu badawczego jest poszukiwanie nowych skutecznych leków niezbędnych w terapii choroby Alzheimera (AD). Choroba Alzheimera (AD) dotyka w większości ludzi starszych i objawia się postępującym spadkiem sprawności intelektualnej, wywołanej degeneracją i zanikiem komórek nerwowych a istniejące leki na rynku farmaceutycznym nie są w pełni skuteczne.

Takryna jest pochodną akrydyny, która w 1993 roku została zatwierdzona w postaci chlorowodoru jako lek do stosowania w AD w celu poprawy transmisji cholinergiczej w mózgu. Podobnie jak rywastygmina, skutecznie hamuje aktywność zarówno AChE jak i BChE. Została ona jednak wycofana z użycia ze względu na swoje działania niepożądane, przede wszystkim hepatotoksyczność oraz niską biodostępność po podaniu doustnym. Ze względu na udokumentowaną wcześniej skuteczność kliniczną i korzystny profil farmakokinetyczny (penetracja przez barierę krew-mózg) i farmakoterapeutyczny (hamowanie AChE i BChE), takryna posiada znaczny potencjał aplikacyjny, który naszym zdaniem warto eksplorować w poszukiwaniu jej skuteczniejszych i bezpieczniejszych analogów. W związku z powyższym proponujemy syntezę nowo funkcjonalizowanych analogów połączeń takryny z estrami metylowymi i z wolną grupą karboksylową oligopeptydów będących pochodnymi karnozyny, które pozbawione będą działania hepatotoksycznego obserwowanego przy przyjmowaniu takryny, hamować będą zarówno aktywność AChE jak i BChE dzięki czemu będą mogły być stosowane również w zaawansowanej postaci choroby Alzheimera oraz dodatkowo wykazywać będą działanie neuroprotektoryne (chroniąc między innymi przed toksycznym działaniem β -amyloidu i glutaminianu). Należy podkreślić, że po raz pierwszy proponujemy syntezę oligopeptydowych analogów takryny, które poza działaniem objawowym charakteryzuje aktywność neuroprotektoryna.

Pierwszy etap projektu będzie obejmował badania toksyczności nowo zsyntetyzowanych związków na modelu komórkowym. W ramach eksperymentów prowadzonych na hodowlach komórkowych

wyberzemy związki o najkorzystniejszym profilu aktywności biologicznej (najwyższej skuteczności hamowania aktywności enzymów: AChE i BChE, wykazujące działanie neuroprotekcyjne i pozbawione działania hepatotoksycznego).

W kolejnym etapie planujemy przeprowadzić badania na zwierzętach aby sprawdzić w jaki sposób wytypowane związki przechodzą przez barierę krew-mózg.

Uzyskane wyniki będą stanowiły podstawę do badań na myszach transgenicznym, będących modelem choroby Alzheimera (w kolejnym projekcie). Uzyskane wyniki w kolejnym projekcie będą stanowiły podstawę do badań na myszach transgenicznym, będących modelem choroby Alzheimera.

Planowane badania mogą w przyszłości doprowadzić do zastosowania klinicznego nowych leków stosowanych w leczeniu choroby Alzheimera opartych na oligopeptydowych analogach takryny. Te nowe potencjalne leki mogą w przyszłości stanowić cenne uzupełnienie terapii choroby Alzheimera.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

30 myszy BALB/c po 10 samców na grupę

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

1) Dostarczone zwierzęta z [REDAKTOWANE] będą aklimatyzowane w pokoju bytowym przez 5 dni w warunkach opisanych w punkcie C. Codziennie będzie dokonywany pomiar temperatury (termometr na podczerwień) i wagi zwierząt „handlingowane” 10 minut dziennie. Dodatkowo prowadzona będzie obserwacja stanu zdrowia i zachowania zwierząt oraz prowadzona będzie karta rejestracji. Zwierzęta będą przebywały w kontrolowanych, stałych warunkach w pomieszczeniu o temperaturze $23 \pm 2^\circ\text{C}$, wilgotności względnej $53 \pm 2\%$, z zachowaniem 12 / 12 cyklu oświetleniowego oraz o odpowiedniej wentylacji dostosowanej do potrzeb zwierząt (klimatyzacja). Klatki plastikowe przeznaczone dla myszy o dwóch różnych wymiarach: 345(G)x 180(S)x 140(W) mm, powierzchnia podłogi 533m^2 oraz 382(G)x 267(S)x 150(W) mm, powierzchnia podłogi 840m^2 , opisane numerami doświadczeń, gatunkiem zwierzęcia, wiekiem, płcią, użytym związkiem w doświadczeniu oraz datą przywozu. W trakcie całego eksperymentu myszy będą otrzymywały paszę laboratoryjną (mieszanka Labofeed H) i wodę kranową *ad libitum*. Pasza zakupiona w firmie: Wytwórnia Pasz „Morawski”, Kcynia o standardowym składzie, zgodna z wymaganiami z przeznaczeniem do żywienia gryzoni.

2) Myszy są akceptowanym i wykorzystywanym gatunkiem zwierząt w badaniach nad oceną zdolności przenikania leków przez barierę krew-mózg. Konieczność wykorzystania zwierząt jest podyktowana podobną przepuszczalnością bariery krew-mózg u myszy i człowieka. Ponadto brakuje adekwatnego sztucznego modelu, który mogły zastąpić badania z wykorzystaniem zwierząt. Dostępny model *in vitro* bariery krew-mózg jest

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

powszechnie krytykowany z uwagi na niepowtarzalność wyników. Wobec powyższego nie może być wykorzystany w badaniach związków o potencjalnym znaczeniu klinicznym. Wybór gatunku zwierząt: myszy BALB/c jest również podyktowany względami ekonomicznymi. Wykorzystanie małych zwierząt w badaniach przenikania bariery krew-mózg pozwoli na stosowanie małych ilości (niskich stężeń) badanych związków co w początkowym etapie doświadczenia nad potencjalnymi lekami stosowanymi w chorobie Alzheimera ma ogromne znaczenie.

Planowana liczba zwierząt (30 myszy po 10 na grupę) jest niezbędna do otrzymania wyników z akceptowanym błędem statystycznym, czyli istotne z punktu widzenia naukowego.

3) Zaproponowane badania nie były nigdy wcześniej przeprowadzane na zwierzętach, ponieważ zaplanowane do syntezy związki są nowymi, jeszcze nie ocenianymi biologicznie analogami takryny związanej kowalencyjnie z di- i tripeptydami będącymi pochodnymi karnozyny, naturalnego dipeptydu (β -Ala-His) o właściwościach antyoksydacyjnych. Informacja o braku identycznych badań została potwierdzona za pomocą wyszukiwania w naukowych przeglądarkach internetowych : PubMed, Google Scholar. Użyte słowa kluczowe: chlorotakryna i neuroizoprostany, oligopeptydowe analogi takryny i beta-amyloid, 2,5-dimetylometoksyfenylotakryna i penetracja bariery krew-mózg.