

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projekt „Określenie mechanizmów i potencjalnych punktów uchwytu dla terapii bólu neuropatycznego poprzez zbadanie interakcji farmakologicznych pomiędzy substancjami modulującymi aktywność gleju a lekami opioidowymi”

2. Czas trwania projektu: **3 lata**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **receptory opioidowe, receptory chemokinowe, komórki glejowe, neuropatia**

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

Badania przeprowadzone przez Międzynarodowe Towarzystwo Badania Bólu wykazały, że co piąty Europejczyk cierpi na ból przewlekły, a jednemu na trzech pacjentów stan ten uniemożliwia prowadzenie dotychczasowego i niezależnego stylu życia. Pomimo licznych badań zarówno klinicznych jak i doświadczalnych, mechanizm powstawania i utrzymywania się bólu neuropatycznego u ludzi i zwierząt wciąż nie jest dokładnie poznany. Ból neuropatyczny powstaje w wyniku uszkodzenia nerwów obwodowych, nowotworów, cukrzycy, stwardnienia rozsianego, niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego czy zawału mózgu. Uszkodzenie powoduje hiperalgezę, czyli wzrost wrażliwości na bodźce bólowe oraz alodynię, czyli nadwrażliwość na słabe niebólowe bodźce mechaniczne np. dotyk. Rozwijający się ból neuropatyczny nie jest łagodzony przez typowe środki przeciwbólowe, dlatego też staje się często dolegliwością, bez perspektyw na znaczną poprawę. Obecnie stosowane metody leczenia bólu neuropatycznego są wciąż niesatysfakcjonujące, a określenie skutecznej terapii, w celu poprawy jakości życia osób cierpiących z powodu bólu pozostaje wyzwaniem. Celem projektu jest szczegółowe zbadanie roli receptorów GPCR, takich jak receptory chemokinowe/opioidowe zlokalizowane na powierzchni komórek glejowych oraz analiza zmian poziomu czynników endogennych, powstałych w wyniku uszkodzenia nerwu kulszowego, które inicjują i regulują rozwój neuropatii. Co ważne, planujemy w naszych badaniach wykorzystać również hodowle pierwotne mikrogleju i astrocytów, co pozwoli lepiej określić rolę tych komórek w patologii bólu. Analizę biochemiczną przeprowadzimy w badaniach in vivo i in vitro celem określenia zmian w poziomie receptorów (CCR5, CXCR3, μ) i mediatorów probólowych (np. CCL2-5,11,13,21, CXCL4,9-11, IL-1 β , IL-6, IL-18), które przyczyniają się do powstawania bólu neuropatycznego, a także endogennych mediatorów przeciwbólowych (IL-1RA, IL-18BP, IL-10). Ponadto, projekt zakłada farmakologiczną modulację bólu poprzez zastosowanie antagonistów receptorów dla chemokin i inhibitorów szlaków wewnątrzkomórkowych (m. in. p38MAPK, ERK1/2), ocenę ich aktywności przeciwbólowej oraz wpływu na równowagę między czynnikami pro- i antynocyceptywnymi. Wykorzystanie w badaniach minocykliny, marawiroku oraz partenolidu, leków stosowanych w klinice, jednak nie w leczeniu bólu neuropatycznego, może dostarczyć nowych dowodów dotyczących ich terapeutycznego działania. Wynikiem naszych badań będzie stwierdzenie, który z mechanizmów działania substancji/leków modulujących interakcje neuroimmunologiczne mógłby być korzystny w terapii

bólu neuropatycznego. Schemat doświadczeń będzie realizowany w zadaniach badawczych nr 1-5 (Nr procedur 1-17). Cel procedur planowanych do wykonania w ramach doświadczenia został zakwalifikowany na podstawie rozporządzenia o sprawozdawczości jako badania podstawowe, układ nerwowy.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Myszy rasy Albino Swiss – 200 szt. (ogółem)
Szczury Wistar – 200 szt. (ogółem)
Szczur Wistar (samica ciężarna) – 9 szt. (ogółem)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Opis zasad 3R:

ZASTĄPIENIE

Głównym celem naszego projektu jest szczegółowe zbadanie roli receptorów GPCR takich jak receptory chemokinowe/opioidowe zlokalizowanych na powierzchni komórek glejowych w patomechanizmie leżącym u podstaw bólu neuropatycznego oraz analiza zmian poziomu czynników endogennych powstałych w wyniku uszkodzenia nerwu kulszowego i uwalnianych przez komórki glejowe, które inicjują i regulują rozwój neuropatii w wyniku dysfunkcji układu nerwowego. Takie postawienie pytania wymaga całego organizmu i wszystkich elementów związanych z transmisją nocyceptywną. W badaniach zostaną zastosowane również pierwotne hodowle komórkowe mikrogleju i astrogleju, co pozwoli lepiej określić rolę tych komórek w patologii bólu na których przeprowadzimy badania wspomagające oraz dające możliwość przebadania np. szeregu leków/immunomodulatorów, co zostanie potem wykorzystane w badaniach na modelach zwierzęcych. Hodowle komórkowe stanowią skuteczne narzędzie do badań interakcji szlaków wewnątrzkomórkowych oraz pozwalają ograniczyć ilość wykorzystywanych zwierząt w badaniach. Stosowane w badaniach linie komórkowe wywodzące się ze szczurzego mikrogleju (HAPI) charakteryzują się nieograniczonym czasem życia i proliferacji, jednak nie są odzwierciedleniem warunków fizjologicznych. Dlatego też w swych badaniach postanowiliśmy wykorzystać hodowle pierwotne, które najlepiej odzwierciedlają fizjologię komórek mikrogleju, a nie mając zdolności nieskończonej proliferacji, nie wykazują zmian w swym fenotypie i mogą być podstawą do dalszej analizy.

OGRANICZENIE

W metodach doświadczalnych zostaną wykorzystane grupy zwierząt z odpowiednią liczebnością wymaganą do analizy testów statystycznych i weryfikacji wyników, która została ograniczona do poziomu niezbędnego do osiągnięcia zamierzonych celów terapeutycznych oraz ustalona w oparciu o literaturę naukową i wieloletnie doświadczenie badaczy. Zastosowany model badawczy został odpowiednio dobrany. Szczury Wistar, myszy Albino Swiss to szczepy wsobne. Zapewnia to powtarzalność pomiarów i minimalizuje zmienność pozwalając na ograniczenie liczby wykorzystywanych zwierząt do niezbędnego minimum.

UDOSKONALENIE

W przypadku modelu CCI zostanie zastosowane jednostronne luźne podwiązanie nerwu kulszowego u szczura i myszy prowadzące do rozwoju objawów neuropatii, która jednak nie jest procesem długotrwałym i stopniowo po

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

upływie ok 18 dni prowadzi do powrotu funkcji motorycznych do wartości sprzed operacji. W naszych badaniach nie występuje trwałe uszkodzenie organizmu zwierząt, a badania prowadzimy najdłużej do 7 dnia. Zwierzęta wykorzystywane w doświadczeniach będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku, a metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak, aby ograniczyć stosowany bodziec do bodźca progowego, czyli mierzymy reakcję na bodziec narastający co pozwala na reakcje przy pierwszym najsłabszym odczuciu bólu. W ten sposób ograniczamy ból, cierpienie i dystres.