

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: **Strategie terapeutyczne dla choroby Huntingtona oraz ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3**

2.Czas trwania projektu 2.01.2019 - 1.01.2024

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) choroba Huntingtona, ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3, poliQ, badania przedkliniczne

4.Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) **B. Badania translacyjne**, Zaburzenia układu nerwowego i zaburzenia psychiczne u człowieka.

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.

Medycyna translacyjna dostarcza istotnych informacji o patogenezie nieuleczanych chorób u ludzi, umożliwiając opracowanie skutecznych strategii terapeutycznych. Pomimo faktu, iż mutacje odpowiedzialne za występowanie chorób poliglutaminowych (poliQ) zostały zidentyfikowane ponad 20 lat temu, mechanizmy tej grupy chorób pozostają nadal nie do końca poznane i nie ma opracowanych metod ich leczenia. Większość badaczy podejmujących tematykę neurodegeneracyjnych chorób poliQ zakłada, iż przyczyną rozwoju tych chorób jest obecność zmutowanego białka zawierającego wydłużony ciąg poliglutaminowy.

Do najczęstszych chorób poliQ należą choroba Huntingtona (HD) oraz ataksja mózdkowo-rdzeniowa typu 3 (SCA3). Obydwie choroby są zwykle diagnozowane w 2-3 dekadzie życia, powodując m.in. silne zmiany neurodegeneracyjne w określonych regionach mózgu, a ich konsekwencje prowadzą do przedwczesnej śmierci. Na dzień dzisiejszy nie ma dostępnej terapii leczniczej dla żadnej z tych chorób.

Niniejszy projekt łączy wyzwania współczesnej medycyny molekularnej, koncentrując się na dostarczaniu do mózgu potencjalnego terapeutycznego, celującego w zmutowany gen lub jego transkrypt. Testować będziemy skuteczność obiecującej strategii hamowania ekspresji genu za pomocą terapeutyków interferencji RNA (RNAi). Ponadto wykorzystane będą unikalne i odpowiednie systemy modelowe. W trakcie realizacji całego międzynarodowego projektu w konsorcjum, część partnerów poprzez analizy w zakresie genetyki populacyjnej zidentyfikuje sekwencje o największym potencjale terapeutycznym w strategii celowania w regiony zawierające warianty SNP; podda ocenie skuteczność nowatorskich strategii terapeutycznych z wykorzystaniem antysensowych oligonukleotydów, interferencji RNA i nowoczesnej metody edycji genomu CRISPR/CAS9 w modelach *in vitro* i *in vivo*; opracuje potencjalne testy pozwalające określić poziom białek zmutowanych w mózgu; zastosuje nowe nieinwazyjne metody MRI/NMR, służące zobrazowaniu progresji choroby i oceny skuteczności terapeutycznej, jako potencjalne biomarkery.

Mysie modele wykorzystane w w/w projekcie mają różną progresję chorobową, objawiającą się głównie zaburzeniami motorycznymi i behawioralnymi. Ponadto, w obu modelach chorobowych zostanie wykonana operacja chirurgiczna wprowadzania wlewów domózgowych danego leku za pomocą pompy osmotycznej założonej na 4 tygodnie.

Możliwa szkodliwość: zakażenia rany, ropienia, niekomfortowe poruszanie głową, gdy rurki od pompy infuzyjnej będą za krótkie, pompa infuzyjna pod skórą może powodować zachwiania równowagi i dyskomfort, rana na głowie może delikatnie boleć. Miejsce wkłucia igły przy podaniu doogonowym może powodować nieznaczny ból. Test RotaRod, i siły chwytu może powodować stres. Wyciągnięcie pompy infuzyjnej związane jest z ponowną anestezją oraz ponownym nacięciem, które znów może powodować ból i dyskomfort pooperacyjny.

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu użytych zostanie 280 myszy płci męskiej.

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

Celem planowanych badań jest uzyskanie przekonujących dowodów eksperymentalnych na najbardziej obiecującą terapię chorób poliglutaminowych. Pierwszą część tego projektu stanowi eksperyment pilotażowy, którego celem jest wytypowanie najbardziej obiecującego terapeutycznego pod względem bezpieczeństwa jego zastosowania, biodystrybucji oraz efektywności terapeutycznej w mózgu.

W tym celu testowane będą dwa opisane innowacyjne terapeutyki siRNA A2M i shRNA AAV-PHP.eB celujące w wydłużone ciągi CAG w modelach mysich SCA3 oraz HD. Ponadto, zastosowanie trzech różnych stężeń proponowanych terapeutyków pozwoli wytypować dawkę najbardziej efektywną i adekwatną w odniesieniu do analizowanych chorób.

**ZASTĄPIENIE:** Przed podjęciem decyzji o wykorzystaniu zwierząt w planowanych doświadczeniach, dokonano szczegółowego przeglądu dostępnej literatury naukowej w zakresie patogenezy choroby

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

Huntingtona oraz ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 z użyciem modeli komórkowych i zwierzęcych. Wykorzystano do tego bazy danych jak: PUBMED, EBSCO oraz Web of Science. Przeanalizowano wszystkie możliwości wykorzystania niższych organizmów jak *S. cerevisiae*, *C. elegans*, czy *D. melanogaster*, które mogłyby stanowić alternatywę dla ssaków. Wspomniane modele muszki owocowej, nicieni czy rybek z rodzaju *danio* są wprawdzie stosowane do modelowania chorób człowieka, jednak nie wykazują złożonych fenotypów behawioralnych, co stanowi znaczne ograniczenie w ocenie progresji choroby czy stosowanej strategii terapeutycznej. Dlatego też zastosowanie ich w prezentowanym projekcie badawczym nie zapewniłoby wiarygodnych i miarodajnych wyników, udzielających jasnej odpowiedzi na postawione pytania.

Aby w pełni scharakteryzować patomechanizm choroby Huntingtona i ataksji rdzeniowo-mózdkowej, konieczne jest użycie kręgowców o złożonym układzie nerwowym, dla których dostępne są wyspecjalizowane testy behawioralne. Pomimo, iż znane są już opracowane duże modele zwierzęce HD jak świnie czy owce, planujemy zastosować mniejsze zwierzęta, które umożliwią powodzenie eksperymentu. W odniesieniu do obecnego stanu wiedzy i hipotezy przedstawionego projektu stwierdzamy, iż nie jest możliwe zastąpienie modelu gryzoni innym. Dane literaturowe wskazują, że myszy laboratoryjne są najczęściej wykorzystywanym obiektem do testowania założeń zarówno odnośnie patogenezy jak i testowania strategii terapeutycznych w chorobie Huntingtona oraz ataksji rdzeniowo-mózdkowej. Wydają się one być również wystarczające, a zarazem niezbędne w prezentowanym projekcie. Obydwa modele są modelami biallelicznymi, niezbędnymi do testowania strategii allelo-selektywnych.

**OGRANICZENIE:** Wykorzystanie modeli Hu128/21 oraz Ki91 w projekcie jest podyktowane jednostkami chorobowymi, których te modele dotyczą. Bogate doświadczenie eksperymentatorów w pracy z tymi zwierzętami zostało wykorzystane do zminimalizowania grup osobników.

Planując eksperyment dążono do zmniejszenia do niezbędnego minimum liczby zwierząt użytych w projekcie. Proponowane grupy badane reprezentujące oba mysie modele oraz dobrze przemyślane grupy kontrolne zostały zaplanowane tak, by jak najbardziej ograniczyć dodatkowe użycie zwierząt typu WT stanowiących często stosowane grupy kontrolne. Liczba zwierząt na grupę została określona na podstawie dostępnego piśmiennictwa oraz bazując na doświadczeniu zdobytym podczas charakterystyki modelu Ki91 tak, by można było przeprowadzić racjonalne analizy statystyczne.

Ponadto, w procesie przygotowywania wniosku o finansowanie projektu powołany został ekspert do wyliczeń statystycznych (analiza G-power) w konsorcjum międzynarodowym. Co więcej, w projekcie wszystkie eksperymenty na mysich modelach zostały zaprojektowane zgodnie z wytycznymi ARRIVE, by ulepszać dobrostan zwierząt. Wszystkie aspekty są zgodne z regulacjami Komisji Unii Europejskiej i ocenione pozytywnie przez międzynarodowy panel ekspertów.

**UDOSKONALENIE:** Spełniając zasadę udoskonalenia, nasze doświadczenia zostały zaplanowane tak, by maksymalnie ograniczyć dyskomfort zwierząt. Podczas realizacji zaplanowanych procedur myszy będą utrzymywane w warunkach laboratoryjnych odpowiednich dla tego gatunku. W klatkach zastosowane zostaną elementy wzbogacające środowisko bytowania jak: papierowe tulejki, materiał do gniazdowania i zgryzania. Zastosowanie tego typu urozmaiceń środowiska poszerzy zakres czynności, jakie mogą wykonywać zwierzęta redukując stres. Posiadamy już doświadczenie oraz zaawansowany warsztat badawczy, który został opracowany podczas charakterystyki mysiego modelu SCA3, wygenerowanego w naszym Zakładzie. Czynności w procedurach zostały zaplanowane tak, aby zmniejszały do minimum lub eliminowały ból, cierpienie oraz dystres. Były one także z powodzeniem stosowane u myszy laboratoryjnych wykorzystywanych w tego typu analizach przez inne zespoły badawcze. Planowane w projekcie testy behawioralno-motoryczne, zabiegi oraz ogólne obserwacje zwierząt stanowią dobrze scharakteryzowane, jak również łatwo wykonywalne czynności w pracy ze

zwierzętami. Posiadane doświadczenie członków zespołu badawczego, umożliwi przeprowadzenie wymienionych czynności sprawnie i szybko, przez co zwierzęta objęte procedurami nie będą narażone na stres czy ból. Pojedyncza iniekcja do żyły ogonowej również będzie wykonana pod znieczuleniem, choć można wykonać ją bez, w celu zminimalizowania stresu zwierząt.

Wykorzystanie wektora AAV-PHP-eB eliminuje konieczność wstrzykiwania domózgowego danego terapeutyka, co znacznie redukuje dystres zwierząt.

Dodatkowo, wykorzystanie modeli Hu128/21 oraz Ki91 wprowadza kolejny element udoskonalenia, czyli redukcję wykorzystywania zwierząt ze dotkliwym fenotypem, takich jak: R6/2 oraz N171-82Q.

Podczas aplikacji wlewu dokomorowego mysz zostanie pozbawiona sierści za pomocą kremu depilującego lub golarki, a nie ostrza skalpela czy brzytwy. Rana zostanie zaszyta nićmi rozpuszczalnymi. Na ranę zostanie nałożony antybiotyk, by nie wdało się żadne zakażenie. Mysz będzie przebywać na macie grzewczej, by zapobiec hipotermii i będzie kontrolowana temperatura za pomocą rektalnego termometru. W trakcie operacji na oczy zostanie nałożony lubrykant oraz podana zostanie analgezja (w postaci podskórnej iniekcji niesterydowego leku przeciwzapalnego Meloxicam), by czas pooperacyjny był bezbolesny. Po wybudzeniu mysz będzie miała dostęp do jedzenia i picia na płytce na położonej na ściółce, by nie musiała wstawać oraz klatka umieszczona będzie na regale grzewczym.

Do testu siły chwytu zostanie wykorzystany specjalistyczny sprzęt, a nie jak można również badać ten parametr na odwróconej pokrywie klatki i licząc czas, po którym mysz spadnie. To samo dotyczy testu otwartego pola, w którym wykorzystamy specjalistyczny ActiMot, skracając czas i umożliwiając zebranie bardziej precyzyjnych danych, co z kolei wykluczy wielokrotne powtarzanie tego samego testu, by otrzymać statystycznie znaczące dane.

Do testu rotarod myszy będą uprzednio przyzwyczajane i trenowane, aczkolwiek w formie udoskonalenia protokół zostanie skrócony do trzech podejść po 3-6 minut.

Wprowadziliśmy do zakresu badań nowoczesny sprzęt oceny kognitywnej – IntelliCage. Zamierzamy nim przebadать nasze grupy badane z naciskiem na wartość porównawczą do grupy typu dzikiego. Ma to na celu opisanie obu modeli z nowej perspektywy behawioralnej, której do tej pory nikt nie opisał. IntelliCage jest dla myszy bezstresowy, gdyż jest to system typu „Home cage”. Umożliwi to odkrycie innych statystycznie różnych parametrów behawioralnych, które później można będzie używać, jako biomarkera w ocenie efektywności terapii bądź jakiegokolwiek ingerencji w te modele.

#### 8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

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

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.