

1. TYTUŁ PROJEKTU: Ocena działania i farmakokinetyki nowych inhibitorów PDE4/7 w zwierzęcym modelu sepsy.

2. CZAS TRWANIA PROJEKTU. – **48 miesięcy**

3. SŁOWA KLUCZOWE: sepsa, fosfodiesterazy, zapalenie, inhibitory PDE

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

5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Sepsa to zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej w odpowiedzi na zakażenie i znajduje się wśród najczęstszych przyczyn zgonów wśród pacjentów hospitalizowanych na oddziałach intensywnej terapii. Wciąż poszukiwane są nowe strategie terapeutyczne, które pozwoliłyby ograniczyć wysoką śmiertelność w tej populacji chorych. Fosfodiesterazy (PDE) to enzymy hydrolizujące cykliczny adenozyno-5'-monofosforan (cAMP) oraz cykliczny guanozylo-3',5'-monofosforan (cGMP). PDE występujące u ssaków podzielono na 11 rodzin. PDE z rodziny 4 są obecne na neutrofilach, eozynofilach, monocytach i limfocytach, z kolei PDE7A występują na aktywowanych limfocytach T. W świetle tych faktów w ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na zastosowanie inhibitorów PDE należących do rodziny 4 oraz 7 w terapii chorób przebiegających z udziałem przewlekłego stanu zapalnego. Realizacja projektu pozwoli na ocenę potencjału terapeutycznego związków hamujących PDE 4 i 7 w eksperymentalnym modelu sepsy u zwierząt, wywołanej podwiązaniem i przekłuciem kątnicy (model CLP) oraz wpływu sepsy na stężenia tych inhibitorów w surowicy. Efekt farmakologiczny będzie oszacowany na podstawie wartości stężeń cytokin, takich jak: TNF- α , Il-6, Il-2 oraz HMGB1 w surowicy zwierząt, oraz parametrów takich jak CRP lub prokalcytonina. Ponadto przeprowadzone zostaną testy przeżycia. Dla związku najsilniej działającego zostanie wyznaczony profil stężeń w surowicy myszy po podaniu podskórnym.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu planowane jest wykorzystanie 250 myszy domowych (*Mus musculus*), szczepu BALB/c

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

Przygotowując projekt badawczy sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych: EBSCO; PUBMED; ScienceDirect; Web of Science. Wykorzystałem następujące słowa kluczowe: sepsis, inflammation, endotoxic shock, PDE inhibitor. W literaturze brak jest informacji na temat oceny skuteczności działania dualnych inhibitorów PDE 4/7 w modelu podwiązania i nakłucia kątnicy (CLP) u myszy. Model CLP, mimo iż dotkliwy, stanowi złoty standard w badaniach eksperymentalnych nad sepsą, szeroko stosowany przez liczne zespoły badawcze. Myszy to zwierzęta o najniższym możliwym poziomie rozwoju, dla których można przeprowadzać wiarygodne badania nad sepsą i zapaleniem. Badane parametry zapalenia charakteryzują się wysokim współczynnikiem zmienności międzyosobniczej, co ustalono na podstawie wyników badań prowadzonych w ramach wcześniejszych projektów oraz danych literaturowych, przez co grupy muszą być stosunkowo liczne. Proponowana liczebność zwierząt w grupie (testy farmakodynamiczne: $n=12$, test przeżycia $n=20$, testy farmakokinetyczne $n=5$) jest najniższą możliwą liczbą, by uzyskać wiarygodne rezultaty, co oszacowano na podstawie testów mocy statystycznej. Zwierzęta będą poddane wnikliwej obserwacji, a niezdolność do pobierania wody i pokarmu, wokalizacja, znacznie ograniczona ruchomość oraz inne objawy wskazujące na ból i niewydolność narządów będą podstawą do humanitarnego uśmiercenia. Autor wniosku posiada wieloletnie doświadczenie z pracą na zwierzętach i zamierza przeprowadzić eksperyment w sposób ograniczający zbędny ból i stres. Przed uśmierceniem zwierzęta będą znieczulane wziewnie.

Zwierzęta będą utrzymywane w optymalnych warunkach, zgodnie z zasadami zgodności warunków bytowania i przeprowadzania doświadczeń na zwierzętach, zawartymi w traktacie UE nr 123 (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes CETS No.:123). Warunki: 12 godzinny cykl dobowy (12 godzin jasnych, 12 godzin ciemnych), temp. 20-24°C, wilgotność 55% (+/- 10%), 15-20 wymian powietrza na godzinę (przepływ powietrza: 0,3 m/s), wolny dostęp do wody i pokarmu. Będą utrzymywane w standardowych, zgodnych z przepisami klatkach. Materiał gnieźdzący będzie stanowiła ściółka wykonana z kilkumilimetrowych ścinków drewnianych wysuszona poprzez ogrzanie do temperatury 550°C. W klatkach umieszczone zostaną elementy wzbogacające środowisko, takie jak domki drewniane, klocki do ścierania zębów, tunele poliwęglanowe, wstążki papierowe etc. Elementy wzbogacające środowisko będą cyklicznie wymieniane przy każdej zmianie ściółki w taki sposób, aby za każdym razem do środowiska wprowadzany był inny typ tego materiału. Osoba wykonująca eksperymenty będzie

odpowiedzialna za kontrolę dobrostanu zwierząt. Warunki bytowania zwierząt będą zgodne z wytycznymi zawartymi w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14.12.2016 r.

Sposób realizacji zasady 3R:

1. Udoskonalenia

Zwierzęta

Myszy będą utrzymywane w odpowiednich warunkach bytowych oraz karmione certyfikowaną paszą bytową. W badaniach zostaną użyte jedнопłciowe grupy badawcze, o podobnym stopniu rozwoju (6-8 tygodni), co pozwoli na zredukowanie ilości zmiennych mogących wpłynąć na rozrzut otrzymanych wyników. Dodatkowo, podczas eksperymentów z użyciem zwierząt będzie prowadzona codzienna kontrola ich stanu zdrowia, a w razie zauważenia niepokojących objawów będzie zapewniony kontakt oraz pomoc ze strony lekarza weterynarii wchodzącego w skład zespołu ds. Dobrostanu Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

Pomieszczenie bytowe

Zwierzęta będą przebywały w pomieszczeniu bytowym służącym tylko do tego celu, w którym nie będą wykonywane czynności tj. iniekcje, eksperyment czy uśmiercanie, co ograniczy narażenie zwierząt na czynniki stresogenne. Ponadto pomieszczenie będzie wyposażone w system monitorowania temperatury oraz wilgotności.

Sala eksperymentalna

Czynności tj. iniekcje dożylnie, operacje chirurgiczne, czy uśmiercanie zwierząt będą wykonywane w tzw. sali eksperymentalnej

Metoda badawcza

Model zwierzęcy zostanie wykonany zgodnie z rekomendacjami dostępnymi w literaturze. Aby zapewnić większy komfort myszom biorącym udział w eksperymentach, podawane związki będą rozpuszczone w roztworach nieindukujących podrażnienia tkanek, o temperaturze zbliżonej do temperatury ciała myszy.

2. Ograniczenie

Na ograniczenie ilości wykorzystanych zwierząt pozwalają czynniki minimalizujące

zmienność i zwiększające powtarzalność pomiarów takie jak: stabilna pasza, jednorodność grup badanych pod względem wieku, masy ciała, płci; równy okres kwarantanny; znany eksperymentator, zachowanie reżimu czasowego procedur.

3. Zastąpienie

Proponowana metodyka badawcza jest zgodna zaleceniami literaturowymi. Nie ma alternatywy dla modelu CLP w badaniach in vitro, z kolei inne metody wywoływania endotoksemii in vivo (jak na przykład podanie lipopolisacharydu bakteryjnego) nie spełniają kryteriów wiernego odwzorowania sepsy u człowieka. Inny zalecany model: CASP (wstawienie zastawki w jelicie) jest równie, jeśli nie bardziej obciążający dla zwierząt. Opisany projekt ma charakter badań podstawowych dlatego brak opisanych metod alternatywnych na podstawie analizy baz danych.

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