

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: "Określenie skuteczności nowych antagonistów receptora angiotensyny II typu 2 (AT2) w modelu bólu neuropatycznego"

2. Czas trwania projektu: 9.07.2018 -9.07.2022

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): Antagoniści AT2, ból neuropatyczny, EMA-401

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

Ból neuropatyczny powstaje wskutek uszkodzenia lub dysfunkcji obwodowego układu nerwowego i charakteryzuje się występowaniem przewlekłego bólu. Skuteczność terapii bólu neuropatycznego wynosi 30-50% ze względu na złożony patomechanizm tego schorzenia. W wyniku uszkodzenia nerwu obwodowego dochodzi do długotrwałego wzrostu ekspresji receptora angiotensyny II typu 2 (AT2). Pobudzenie receptora AT2 stymuluje patologiczny rozrost włókien współczulnych w rdzeniu kręgowym, co prowadzi do wystąpienia nadwrażliwości na bodźce niebólowe. Celem projektu jest ocena skuteczności nowych, selektywnych antagonistów receptora AT2 powstałych wskutek strukturalnych modyfikacji związku C21, będącego w fazie II badań klinicznych. Spodziewamy się uzyskania serii nowych cząsteczek o silniejszym działaniu przeciwbólowym niż jedyny antagonistą AT2 - EMA 401 będący w fazie badań klinicznych. Aktywność związków zostanie zbadana po jednorazowym podaniu dootrzewnowym w zwalidowanym mysim modelu bólu neuropatycznego powstałego wskutek luźnego podwiązania nerwu kulszowego. Korzyści płynące z zaproponowanych badań obejmują

weryfikację wpływu modyfikacji strukturalnych małowcząsteczkowych antagonistów receptora AT2 oraz ich wpływ na efektywność w bólu neuropatycznym. Projekt powoli także na rozszerzenie wiedzy na temat stopnia zaangażowania receptorów AT2 w patomechanizm bólu neuropatycznego oraz zweryfikuje słuszność kontynuacji badań w kierunku projektowania antagonistów receptora AT2 jako nowych leków w leczeniu neuropatii obwodowej. Szkody spowodowane u zwierząt obejmują możliwość odczuwania bólu pooperacyjnego pomimo zastosowania leków przeciwzapalnych. Istnieje także minimalne ryzyko upadków zwierząt podczas operacji. Zgodnie ze specyfiką modelu doświadczalnego w operowanej kończynie nastąpi rozwój nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne. U zwierząt może także wystąpić odciążanie uszkodzonej kończyny, które zazwyczaj ustępuje po 7 dniach od zabiegu.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

192 dorosłe myszy (8-10 tygodni) stada NMRI płci męskiej

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam/sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych:

__EBSCO; _X_PUBMED; _X_Google Scholar; __AGRICOLA; X ScienceDirect; __Web of Science (JCR);
__.....

Wykorzystałam/em słowa kluczowe: AT2 antagonists, neuropathic pain, allodynia, EMA401, CCI model

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:

- a) Rozwój bólu neuropatycznego związany jest z nadmierną ekspresją i aktywacją receptora AT2 w zwojach korzeni grzbietowych
 - b) Hiperalghezja i allodynia w bólu neuropatycznym związana jest ze stymulacją rozrostu neurytów i pobudzenia receptora TRPV1 wskutek aktywacji kinazy białkowej A następujących wskutek aktywacji receptora AT2.
 - c) Terapia bólu neuropatycznego stanowi wyzwanie ze względu na mnogość molekularnych celów warunkujących rozwój allodynii. Stąd konieczność poszukiwania nowych molekularnych celów terapeutycznych.
- A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:
- a) Otrzymane związki posiadają silne powinowactwo w stosunku do receptora AT2 oraz odznaczają się stabilnością w mikrosomach wątrobowych.
 - a) Antagoniści receptora AT2 wykazują efektywność w bólu neuropatycznym zarówno w badaniach na zwierzętach jak i badaniach klinicznych po podaniu dootrzewnowym i doustnym.

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

B. Brak jest danych, lub też dane są mało wiarygodne lub nie są sprawdzone w zakresie:

a) Znaczenia nowych modyfikacji strukturalnych małowcząsteczkowych antagonistów receptora AT2 oraz ich wpływu na efektywność w bólu neuropatycznym *in vivo*.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na określenie zależności struktura chemiczna-aktywność biologiczna nowych antagonistów receptora AT2.

A/ Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze lub ugruntowanie istniejącej wiedzy w kierunku skuteczności nowych antagonistów AT2 w terapii bólu neuropatycznego poprzez określenie nasilenia efektu antynocyceptywnego jak i czasu jego trwania.

B/ Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na stworzeniu zaleceń dotyczących skuteczności blokerów receptora AT2 w bólu neuropatycznym i weryfikację słuszności dalszej kontynuacji badań w kierunku projektowania antagonistów receptora AT2.

Zasada ograniczenia: W planowanych badaniach została osiągnięta głównie poprzez przeprowadzenie wstępnych badań radioizotopowych określających powinowactwo nowych związków do receptora AT2. Podejście to dało możliwość wyselekcjonowania kilku najbardziej aktywnych cząsteczek. Ponadto, określono, iż wyselekcjonowane związki wykazują zadowalającą stabilność mikrosomalną, co zwiększa szansę uzyskania długotrwałego efektu analgetycznego *in vivo*. Wcześniejsze badania nad referencyjnym antagonistą AT2 - EMA401 pozwoliły na ustalenie wielkości różnic między grupami badanymi a grupą kontrolną oraz wartości odchylenia standardowego, co pozwoliło na obliczenie minimalnej liczby zwierząt niezbędnej do uzyskania celu doświadczenia. Ponadto, liczebność grup kontrolnych przyporządkowanych do każdego testowanego związku została zredukowana do 6 zwierząt, ponieważ jak wynika z wcześniejszych obserwacji, różnice w odpowiedzi pomiędzy zwierzętami kontrolnymi są zdecydowanie mniejsze w porównaniu do zwierząt z grup doświadczalnych.

Zasada udoskonalenia: Dzięki zastosowaniu narkozy wziewnej (izofluran) zamiast narkozy iniekcyjnej (mieszanina ketaminy i ksylazyny) pozwala na zmniejszenie ryzyka upadków zwierząt w trakcie operacji poprzez zwiększenie kontroli nad głębokością znieczulenia. Zastosowanie izofluranu ogranicza również ryzyko komplikacji pooperacyjnych wynikających z hipotermii. Szybkie wybudzenie zwierząt z narkozy izofluranowej daje możliwość szybszego rozpoczęcia pobierania płynów oraz paszy, co wpływa korzystnie na rekonwalescencję zwierząt. Zastosowanie Rimadylu (karprofen), jako niesteroidowego środka przeciwzapalnego i przeciwbólowego przed operacją minimalizuje ból pooperacyjny i przyczynia się do ograniczenia cierpienia zwierząt. Przeprowadzone wcześniej badania pilotażowe nie wykazały wpływu przedoperacyjnego podania Rimadylu na rozwój bólu neuropatycznego. Zastosowanie systemu metalowych klipsów zamiast szwów zamykających ranę pooperacyjną, znacznie skraca czas trwania zabiegu oraz jest metodą mniej inwazyjną. Zastosowanie ściółki z drobno zmielonych trocin o nieostrych krawędziach minimalizuje dyskomfort zwierząt związany z nadwrażliwością operowanej kończyny na bodziec mechaniczny wywołany kontaktem ze ściółką.

Ponadto, procedury badawcze zakładają ograniczenie do minimum dyskomfortu fizycznego i psychicznego poprzez:

1. czynność osławania z eksperymentatorem, pomieszczeniami doświadczalnymi i aparaturą do badań behawioralnych.
2. zapewnienie myszom warunków bytowych charakterystycznych dla gatunku oraz umożliwiających przejawianie naturalnych zachowań. Każde zwierzę będzie miało zapewniony dostęp do kryjówki (w postaci tekturowej rolki celulozowej o średnicy ok. 5 cm) oraz materiału do budowy gniazda (makulaturowy papier pakowy oraz płatki bawełniane lub motki wiórowe).
3. monitorowanie masy ciała, ogólnego stanu zwierząt oraz ewentualnych symptomów nadmiernego dyskomfortu i bólu po operacji lub podaniu badanego związku.
4. wykonywanie czynności przez osoby wykwalifikowane, posiadające stosowną wiedzę oraz zdolności manualne.

4.1 Przyporządkowanie czynności technicznych na zwierzętach planowanych dla poszczególnych osób umieszczonych w Tabeli punktu 7 wniosku przypisane wg. posiadanych umiejętności, które mogą wpłynąć na dobrostan zwierząt oraz uzyskanie rzetelnych wyników:

- Anna Leśniak: osławanie zwierząt, przeprowadzenie operacji CCI, podanie badanych związków, przeprowadzenie testu von Frey'a, uśmiercenie zwierząt
- Mariusz Sacharczuk: osławanie zwierząt, podanie badanych związków, przeprowadzenie testu von Frey'a, uśmiercenie zwierząt
- Renata Wolińska: osławanie zwierząt, podanie badanych związków, przeprowadzenie testu von Frey'a, uśmiercenie zwierząt
- Karolina Pawlik: osławanie zwierząt, podanie badanych związków, uśmiercenie zwierząt

Zasada zastąpienia: W planowanym projekcie, zastosowano metody alternatywne w postaci symulacyjnych badań dokowania molekularnego określających in silico wiązanie badanych związków do receptora AT2. Następnie przeprowadzono badania radioizotopowe oraz badania stabilności w mikrosomach, które posłużyły do wstępnego wyodrębnienia najbardziej aktywnych związków o wysokiej stabilności, które zostały wytypowane do dalszych badań in vivo. Powyższe podejście przyczyniło się to do ograniczenia liczby zwierząt użytych w doświadczaniu poprzez wytypowanie najbardziej obiecujących związków.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.