

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Rola deaminazy AMP i wpływ zahamowania jej aktywności na funkcjonowanie mitochondriów w eksperymentalnym niedotlenieniu i niewydolności serca
2. Czas trwania projektu marzec 2019- marzec 2021
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): AMP-activated protein kinase signal transduction; coronary atherosclerosis; genetic polymorphisms; metabolism, AMP deaminase, hypoxia .
- 4.
5. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych)B...
 - 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 analizujące związek między różnorodnością genetyczną u ludzi, a chorobami serca wykazały, że pacjenci z mutacją genu AMPD1 radzą sobie lepiej z niewydolnością serca i chorobą niedokrwienną. Prowadzone dotychczas badania, które próbowały ustalić mechanizm wykazały, że aktywność enzymu deaminazy AMP jest zmniejszona w sercu, co powoduje zwiększoną produkcję adenozyiny, która chroni serce przed uszkodzeniem. Ponadto stwierdzono, że aktywowany jest inny enzym: kinaza białkowa regulowana przez AMP, jednak rola tej zmiany nie jest znana. Kinaza białkowa regulowana przez AMP kontroluje przemiany energii w sercu i innych narządach. Kluczowym elementem przemian energetycznych jest funkcja wewnątrzkomórkowych organelli nazywanych mitochondriami. Projekt ten zbada w jaki sposób funkcjonowanie mitochondriów zmienia się w sercu, gdy aktywność deaminazy AMP jest zmniejszona w niewydolnym sercu lub gdy ograniczona jest dostępność tlenu. Badanie to będzie prowadzone z zastosowaniem genetycznie zmodyfikowanych myszy, których serca są szczególnie wrażliwe na uszkodzenie podczas ograniczonego zaopatrzenia w tlen (ApoE^{-/-}LDLr^{-/-}). U myszy ApoE^{-/-}LDLr^{-/-}AMPD^{-/-}CRE⁺ wprowadzono także kolejną modyfikację: usunięcie genu deaminazy AMP, podobnie do

sytuacji występującej u ludzi z mutacją AMPD1. Eksperymenty z tymi myszami ujawnią, czy mitochondria rzeczywiście funkcjonują lepiej, jeśli rozwinie się choroba serca w sytuacji gdy niższa jest aktywność deaminazy AMP. Takie analizy nie są możliwe bezpośrednio u ludzi. Druga część projektu przetestuje inhibitory deaminazy AMP, które niedawno stały się dostępne i są potencjalnymi kandydatami do stosowania jako leki w chorobach układu krążenia. Eksperymenty prowadzone będą z zastosowaniem myszy ApoE^{-/-}LDLr^{-/-} oraz myszach z wrodzoną niewydolnością serca (Tgαq*44). Ten projekt dostarczy nowych ważnych informacji na temat mechanizmu chorób serca i sposobów ich zapobiegania. Wyniki tego projektu pomogą znaleźć nowe leki możliwe do zastosowania w chorobach serca.

Porównanie zmian metabolizmu nukleotydów i funkcji mitochondriów wykonane będzie w eksperymentalnym modelu niedotlenionego serca u myszy ApoE^{-/-}LDLr^{-/-}AMPD^{-/-}CRE⁺, ApoE^{-/-}LDLr^{-/-} oraz AMPD^{-/-}CRE⁺. W drugim etapie eksperymentów planuje się wykonanie farmakologicznego modelu inhibicji deaminazy AMP u myszy ApoE^{-/-}LDLr^{-/-} i Tgαq*44. Do każdej z grup badanych, zaprojektowano odpowiednią grupę kontrolną złożoną z myszy typu dzikiego C57BL/6. Badania zaplanowane w projekcie mają charakter badań translacyjnych, stanowią one oryginalne prace badawcze mające na celu przede wszystkim zdobywanie nowej wiedzy w tematyce, z którą związany jest projekt. Realizacja projektu może znacząco przyczynić się do poszerzenia wiedzy z zakresu patologii niewydolności serca. Uzyskane wyniki mogą pomóc w zastosowaniu nowych leków u pacjentów z niewydolnością serca.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Ocena rozwoju niewydolności serca oraz jej wpływu na zmiany metabolizmu nukleotydów na jej przebieg zostanie zbadana *in vivo* z użyciem myszy genetycznie zmodyfikowanych ApoE^{-/-}LDLr^{-/-}AMPD^{-/-}CRE⁺, ApoE^{-/-}LDLr^{-/-}, AMPD^{-/-}CRE⁺ i Tgαq*44. Grupy kontrolne będą stanowić myszy nieobciążone modyfikacją, zastosowane zostaną myszy typu dzikiego C57BL/6, ponieważ to stado jest powszechnie wykorzystywane do modyfikacji genetycznych. Łącznie użytych zostanie 168 myszy.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Zastąpienie: Na chwilę obecną nie istnieje model rozwoju niedotlenienia i niewydolności serca, który mógłby w najbliższym czasie zastąpić model zwierzęcy. Pierwszym problemem jest niemożność utrzymania pracującego serca przez okres dłuższy niż kilka dni. W tak krótkim okresie serce nie może rozwinąć niewydolności nawet jeżeli symuluje się zaburzenia hemodynamiczne. Proces ten może zajść tylko w żywym organizmie zwierzęcym. Drugi Problem badań związany z biochemią niewydolnego i niedotlenionego serca polega na tym, że chociaż dysponujemy tkankami ludzkimi uzyskanymi od biorców po przeszczepach, to w ten sposób uzyskana tkanka nie dostarcza informacji o drodze na jakiej doszło do rozwoju niewydolności. Niestety nie ma możliwości pobrania takich próbek od pacjentów, raz z powodów etycznych, dwa – na ogół na wczesnym etapie rozwoju choroby pacjenci nie są zdiagnozowani. Zdefiniowany model zwierzęcy taki jak myszy ApoE^{-/-}LDLr^{-/-}AMPD^{-/-}CRE⁺, ApoE^{-/-}LDLr^{-/-},

AMPD-/-CRE+ i Tgαq*44, pozwala na próbę określenia roli nukleotydów, przemian energetycznych i funkcji mitochondriów we wszystkich fazach rozwoju niedotlenienia i niewydolności serca. Przegląd piśmiennictwa z wykorzystaniem słów kluczowych „heart failure” AND „nucleotides” OR „heart failure” AND mitochondria OR AMPD w bazie PUBMED pokazał, że nauka obecnie nie dysponuje wiedzą na temat przemian nukleotydów w sercu rozwijającym niewydolność.

Ograniczenie: Starano się w sposób maksymalny ograniczyć liczbę zwierząt poprzez skalkulowanie ich liczby z użyciem metod statystycznych, co opisano szczegółowo w części poświęconej Uzasadnieniu Wykorzystania Zwierząt.

Doskonalenie: Zamiast indukcji niewydolności metodami farmakologicznymi lub chirurgicznymi, co jest wyborem tańszym, zdecydowano się na model znacznie droższy, oparty o zwierzęta rozwijające spontanicznie niewydolność serca, w sposób bardzo podobny tego obserwowanego u człowieka lub pod wpływem oddychania powietrzem o obniżonej zawartości tlenu. Do oceny niewydolności zastosowane zostanie EKG ze skonstruowaną myszom elektodą oraz USG ze specjalnie dedykowaną głowicą do badania małych gryzoni. Badanie będzie wykonywane przez osobę, która przeszła szkolenie w ośrodku, w którym od wiele lat utrzymywane są zwierzęta do badania energetyki mitochondriów. Pomimo niemożności uzyskania niektórych danych uznano, że dla poprawy komfortu zwierząt zachowany zostanie chów grupowy. Wszystkie metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak, aby ograniczały do minimum albo eliminowały ból, cierpienie, dystres oraz możliwość trwałego uszkodzenia organizmu zwierząt. Aparatura badawcza wykorzystana w projekcie to obecnie jeden z najnowocześniejszych w Polsce system chromatografii cieczowej sprzężony ze spektrometrem masowym i analizator metabolizmu energetycznego komórek i mitochondriów Seahorse. Wniosek ten oparty jest o wnikliwą analizę piśmiennictwa i wszelkich innych źródeł informacji, jak również o wieloletnie doświadczenie zespołu badawczego.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną

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