

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „**Rola układu odpornościowego i tkanki okołonaczyniowej w patogenezie nadciśnienia tętniczego – mechanizmy i możliwości terapeutyczne**”

2. Czas trwania projektu: 2 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) Limfocyty T pamięci, nadciśnienie tętnicze, mir214, kinaza sfingozyny 1, okołonaczyniowy stan zapalny

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

- 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.

Głównym celem proponowanego projektu jest poznanie mechanizmów, poprzez które kinaza sfingozyny 1, mikroRNA 214, IL15ra oraz limfocyty T pamięci wpływają na modulację eksperymentalnego nadciśnienia tętniczego. Ponadto projekt ma na celu ustalenie roli IL15, mir214 oraz kinazy sfingozyny w indukcji limfocytów T pamięci pod wpływem działania czynników pro-nadciśnieniowych, a także ich roli w patomechanizmie nadciśnienia tętniczego i okołonaczyniowego stanu zapalnego. Planowane jest również podawanie przeciwciał monoklonalnych w celu poznania roli cytokin w rozwoju pamięci immunologicznej, jak również ich wpływ na inne parametry układu immunologicznego będących następstwem nadciśnienia tętniczego.

W badaniach przy użyciu cytometrii przepływowej zostanie oceniony udział limfocytów T i B, komórek NK, makrofagów w mediacji okołonaczyniowego stanu zapalnego towarzyszącego indukcji nadciśnienia tętniczego. Ponadto, zbadanych zostanie szereg markerów pro-zapalnych na powierzchni rezydujących w tkankach oraz krążących limfocytów T, jak również wybrane cytokiny o charakterze pro- i przeciwzapalnym. Zbadany zostanie poziom limfocytów T pamięci na podstawie markerów (CCR7, CD62L, CD44, CD103, CD69). Duże i oporowe naczynia krwionośne zostaną przeanalizowane pod kątem potencjału skurczowego oraz rozkurczowego przy użyciu łaźni narządowej. Przy użyciu chemiluminescencji zbadany zostanie stres oksydacyjny w naczyniach krwionośnych. Natomiast ekspresja szeregu genów istotnych dla nadciśnienia tętniczego i stanu zapalnego oznaczona zostanie z wykorzystaniem metod biologii molekularnej (qPCR).

Wyniki uzyskane dzięki przeprowadzeniu zaplanowanych procedur pozwolą na określenie okołonaczyniowego stanu zapalnego, stresu oksydacyjnego, dysfunkcji naczyń krwionośnych oraz poziomu ciśnienia tętniczego krwi u myszy pozbawionych genów kodujących IL15ra, CD8, mir214 oraz sphk1. Pozwoli to na poznanie nowych immunologicznych mechanizmów nadciśnienia tętniczego, jak również nowych możliwych aspektów terapeutycznych np. poprzez modulację poziomu cytokin prozapalnych.

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

W doświadczeniu będą wykorzystane:

- I. myszy dzikie (szczepy C57BL6) – 92 szt.
- II. myszy CD8KO (B6.129S2-Cd8atm1Mak/J) – 12 szt.
- III. myszy B6;129X1-II15ratm1Ama/J – 48 szt.
- IV. myszy B6129SF2/J (stanowiące kontrolę do myszy B6;129X1-II15ratm1Ama/J) – 48 szt.
- V. myszy Sphk1 KO (B6N.129S6-Sphk1<sup>tm1Rlp</sup>/J) – 12 szt.
- VI. myszy Mir214 KO - 12 szt.

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

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazie Pubmed. Wykorzystałem słowa kluczowe takie jak „angiotensin II”, „mouse”, „hypertension”, „Sphk1”, „mir214”, „IL15”, „IL15ra”, „T cell”, „CD8+ cell”, czy „memory T cell”. Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam, że badania na mysim modelu nadciśnienia indukowanego angiotensyną II są standardowym modelem badania tej choroby zarówno w szczepach myszy dzikich jak i myszy typu knockout. Brak jest natomiast danych na temat wpływu delekcji IL-15ra na rozwój nadciśnienia tętniczego. Uzyskanie danych

z proponowanego projektu pozwoli na rozwinięcie poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku mechanizmów rozwoju nadciśnienia indukowanego angiotensyną II w kontekście roli komórek pamięci układu immunologicznego. Jak również brak jest danych dotyczących roli mir214, IL15ra oraz sphk1 w tworzeniu limfocytów T pamięci zależnej od czynników pro-nadciśnieniowych.

Mysi model nadciśnienia indukowanego angiotensyną II lub noradrenaliną jest uznanym i powszechnie stosowanym modelem badawczym tej choroby. W odróżnieniu od np. hodowli komórkowych in vitro pozwala on na zbadanie jednocześnie wielu organów dotkniętych dysfunkcją spowodowaną czynnikiem nadciśnieniowym

per se i wysokim ciśnieniem (nerki, naczynia krwionośne, okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa), a także zależności obserwowanych zmian w różnych tkankach względem siebie. Ponadto, ze względu na idee badania limfocytów T infiltrujących okołonaczyniowe tkanki tłuszczowe i inne organy docelowe nie jest możliwe użycie komercyjnych linii komórkowych bądź zastąpienie zwierząt kontrolowanym układem in vitro.

Badania prowadzone w naszym laboratorium wskazują, że obserwacja dyskretnych, jednak statystycznie znaczących zmian, na poziomie 15mmHg, w ciśnieniu skurczowym krwi pomiędzy np. myszami dzikimi a myszami typu knockout wymaga użycia około 10-20 myszy w każdej grupie badawczej. Dwu lub trzykrotne powtórzenie danego doświadczenia jest niezbędne do wyciągnięcia miarodajnych wniosków nt. obserwowanych zmian. Ograniczona ilość badanych organów oraz fakt, że poszczególne organy mysie służą do przeprowadzenia często wielu eksperymentów (badanie poziomu RNA, białka, poziomu produkcji wolnych rodników, nacieków zapalnych czy funkcji naczyniowej ex vivo) powoduje, że dana procedura może być przeprowadzona wielokrotnie, aby można przeprowadzić wszystkie niezbędne eksperymenty.

Również z uwagi na fakt, że zaproponowane w eksperymentach myszy pozbawione limfocytów CD8 oraz receptora dla IL15 wyprowadzone zostały z różnych szczepów myszy nie jesteśmy w stanie zastosować jednej wspólnej kontroli w zaplanowanych eksperymentach.

Zwierzęta będą przebywały w zwierzętarni o standardzie SPF (ang. specific pathogen free), co zapewnia odpowiednie warunki hodowli zwierząt. Pomiar ciśnienia tętniczego, a także dootrzewnowe podanie rekombinowanych białek powodują niewielki dystres u zwierząt, a dawki użytych substancji są zgodne z danymi literaturowymi potwierdzającymi zasadność przeprowadzenia takich doświadczeń. Wszczepieniu minipomp osmotycznych towarzyszą odpowiednie środki znieczulające jak i przeciwbólowe. Doświadczenie naszego zespołu w przeprowadzaniu tej czynności, jak i odpowiednio dobrany czas i dawka substancji indukującej nadciśnienie dodatkowo skracają czas operacji, a co za tym idzie cierpienie zwierząt do minimum.

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