

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Rola wybranych procesów patofizjologicznych w niewydolności serca z zachowaną frakcją wyrzutową (HFpEF)”.

2. Czas trwania projektu: 36 miesięcy

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): HFpEF, modele zwierzęce, procesy patofizjologiczne, biomarkery.

4. 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.

Celem projektu jest poszerzenie wiedzy na temat patofizjologii niewydolności serca z zachowaną frakcją wyrzutową (heart failure with preserved ejection fraction - HFpEF). Badania mają charakter translacyjny (kategoria B, podkategoria c - zaburzenia układu sercowo-naczyniowego u człowieka). HFpEF jest jednym z najważniejszych problemów współczesnej kardiologii, ponieważ nadal nie wypracowano skutecznego leku w tym schorzeniu. Obecnie funkcjonuje kilka myślnych modeli HFpEF, gdzie w wyniku zróżnicowanych procesów patologicznych dochodzi do rozwoju wspólnego fenotypu HFpEF.

Aktualnie uważa się, że dysfunkcja śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS) pełni centralną rolę w patofizjologii HFpEF. Podczas dysfunkcji eNOS dochodzi do niedoboru tlenku azotu (NO) oraz do nadmiernej produkcji wolnych rodników tlenowych (ROS) i do aktywacji stanu zapalnego (SZ) w układzie sercowo-naczyniowym. Ponadto wiele innych procesów patofizjologicznych tj.: aktywacja układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA), infiltracja mięśnia sercowego przez leukocyty (iL), zaawansowane końcowe produkty glikacji (AGEs), toksyny (Tx) mogą niezależnie prowadzić do rozwoju

HFpEF. Niestety wpływ innych czynników na rozwój HFpEF nie został zbadany.

W pracy tej zostaną zbadane 4 klasyczne modele mysiego HFpEF, które odnoszą się to najczęstszych procesów patofizjologicznych u ludzi. Porównanie wpływu czynników sprawczych HFpEF tj.: ROS, SZ, RAA, iL, AGEs, Tx na proponowane przez nas biomarkery HFpEF pozwoli nam zbadać jak silnie dany proces patofizjologiczny przyczynia się do rozwoju HFpEF. Dlatego chcielibyśmy zbadać u myszy rozwijających HFpEF następujące parametry: mechaniczna funkcja serca, gęstość płuc, zdolność do wykonywania wysiłku fizycznego, molekularne biomarkery HFpEF w osoczu i w miokardium, molekularne wykładniki stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego we krwi i w komórkach miokardium, aktywność mitochondriów.

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

W doświadczeniu weźmie udział 81 myszy (*Mus musculus*).

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

**Zastąpienie:** Na chwilę obecną nie istnieje model niewydolności serca, który mógłby w najbliższym czasie zastąpić model zwierzęcy. Pierwszym problemem jest niemożność utrzymania pracującego ex vivo serca przez okres dłuższy niż kilka dni. W tak krótkim okresie nie może rozwinąć się niewydolności serca, nawet jeżeli symuluje się zaburzenia hemodynamiczne. Proces ten może zajść tylko w żywym organizmie zwierzęcym. Drugi problem badań związany z biochemią niewydolnego 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 wymienione w procedurach 4-7, pozwala na próbę określenia roli różnych procesów patofizjologicznych w rozwoju HFpEF. Przegląd piśmiennictwa w bazie PUBMED pokazał, że nauka obecnie nie dysponuje wystarczającą wiedzą na temat. Wyszukiwanie na podstawie słów kluczy (comparison) AND (hfpef mice models) wykazało brak prac które porównują modele HFpEF do siebie. Chcielibyśmy podkreślić, że tylko w taki sposób można wykazać najważniejsze mechanizmy tej choroby. Wyszukiwanie w bazie danych PUBMED słów kluczy tj.: ((biomarkers) AND (translational)) AND (hfpef mice models) również nie wykazało żadnych prac z zakresu porównania biomarkerów pomiędzy modelami mysimi a HFpEF u ludzi. Wykazanie wspólnego biomarkera HFpEF dla myszy i ludzi jest kluczowe w kontekście translacji wyników zwierzęcych na wyniki leczenia HFpEF u ludzi.

**Ograniczenie:** Starano się w sposób maksymalny ograniczyć liczbę zwierząt poprzez skalkulowanie ich liczby z użyciem metod statystycznych. Do prognozowania wielkości grup wykorzystano zmienność parametru echokardiograficznego E/e' (wykazuje największą zmienność spośród wszystkich parametrów w doświadczeniu), który jest wskaźnikiem funkcji rozkurczowej serca, gdzie zmienności wewnątrzgrupowe mierzone odchyleniem standardowym kształtują się w granicach

---

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

10%. Ze względu na konstrukcję doświadczenia (4 modele HFpEF i 3 grupy kontrolne), zakładamy że do oceny istotności statystycznej między grupami zostanie wykorzystana jedno- i wieloczynnikowa analiza wariancji. Przy założeniu wykorzystania 7 grup doświadczalnych, oczekiwanej różnicy średnich między grupami wynoszącej ~20%, mocy testu na poziomie co najmniej 0,80 oraz poziomie istotności różnic między średnimi  $\alpha=0.05$ , grupy nie powinny być mniejsze niż 12 zwierząt (SigmaPlot 11.0). Ze względu na bezpieczeństwo doświadczenia (ryzyko wzrostu zmienności wewnątrzgrupowej, bądź też wykluczenia zwierzęcia z doświadczenia) oraz grupowe rozmieszczenie myszy w klatkach (po 4 zwierzęta w klatce) zwiększono liczebność do 16 zwierząt w każdej grupie, w której będzie wykonywana interwencja w celu wytworzenia HFpEF (4 grupy po 16 myszy - łącznie 64 myszy). Grupy kontrolne będą mniej liczne ze względu na mniejszą zmienność wewnątrzgrupową. Liczebność w każdej grupie kontrolnej będzie wynosiła 8 zwierząt (3 grupy po 8 myszy – 24 myszy).

**Doskonalenie:** Zamiast indukcji nadciśnienia tętniczego metodami chirurgicznymi polegającymi na torakotomii i podwiązaniu aorty piersiowej lub jednostronnej nefrektomii, zdecydowano się na modele ograniczające odczuwanie bólu czy stresu przez zwierzęta. Modele takie jak opisane w procedurze 4 i 7 są zupełnie nieinwazyjnymi modelami HFpEF. Model DOCA opisany w procedurze nr 5 przewiduje podskórne wszczepienie pelety (tabletki) w celu równomiernego uwalniania substancji aktywnej. Dzięki takiemu podejściu unikniemy codziennych dootrzewnowych iniekcji tej substancji. Model opisany w procedurze nr 6 przewiduje cykliczne podania dootrzewnowych iniekcji doksorubicyny przez 5 kolejnych tygodni i jest modelem HFpEF wtórnym do cyklicznie podawanej chemioterapii. Wszystkie ww modele skutkują rozwinięciem się niewydolności serca o identycznym morfologicznym fenotypie HFpEF i odnoszą się do różnych procesów patofizjologicznych, które mają miejsce u ludzi. Dzięki zastosowaniu ww modeli ograniczymy wszelkie procedury inwazyjne jedynie do podskórnych implantacji pelet oraz do iniekcji dootrzewnowych, które są typowymi zabiegami podczas doświadczeń na myszach. Do oceny niewydolności zastosowane zostanie 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 stanowi obecnie w Polsce najnowocześniejsze stanowisko do przeprowadzania doświadczeń w zakresie kardiologii eksperymentalnej. 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<sup>2</sup>

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