

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „”

2. Czas trwania projektu: 5 lat

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): nadciśnienie tętnicze, mir-214, kinaza sfingozyny 1, angiotensyna II

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

Celem projektu jest poznanie mechanizmów, poprzez które kinaza sfingozyny 1 (Sphk1) oraz mikroRNA mir214 wpływają na funkcję naczyniową oraz ciśnienie tętnicze krwi, a także zbadanie terapeutycznych możliwości modulacji aktywności szlaku Sphk1 *in vivo*. W szczególności, projekt ma na celu ustalenie funkcji Sphk1 w komórkach mięśniówki gładkiej oraz śródbłónka naczyń krwionośnych *in vivo*, co pozwoli na zbadanie autokrynnych właściwości Sphk1, oraz wpływu aktywności Sphk1 na funkcję śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) oraz produkcję anionorodnika ponadtlenkowego w mysim modelu nadciśnienia indukowanego angiotensyną II. Projekt skupi się także na potencjalnie terapeutycznym, przeciwnadciśnieniowym zastosowaniu farmakologicznych modulatorów szlaku Sphk1 oraz immunologicznych mechanizmach nadciśnienia indukowanego angiotensyną II, w których mir214 może odgrywać kluczową rolę. Co ciekawe, jednym z przykładów skutecznej modulacji aktywności szlaku fosforany sfingozyny (S1P), jest dopuszczony niedawno do terapii stwardnienia rozsianego fingolimod. Lek ten będący agonistą receptorów dla S1P blokuje wyjście

limfocytów T z węzłów chłonnych do tkanek obwodowych. Jako, że stan zapalny okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej jest jedną z cech nadciśnienia, zasadnym jest zbadanie efektów modulacji szlaku Sphk1 w proponowanym mysim modelu nadciśnienia tętniczego. Poznanie mechanizmów działania całego szlaku Sphk1 jak i mir214 w modelu nadciśnienia *in vivo*, może przyczynić się do powstania nowych terapii farmakologicznych skoncentrowanych na różnych poziomach aktywności fosforanu sfingozyny lub mir214.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

1. myszy dzikie (szczepy C57BL/6J, C57BL/6N, S129/C57) – 500 szt.
2. myszy Sphk1^{-/-} (B6N.129S6-Sphk1tm1Rlp/J) – 90 szt.
3. Sphk1f/f- myszy z genem *Sphk1* pomiędzy 2 miejscami loxP – 90 szt.
3. EC-Sphk1^{-/-} - myszy z delecją *Sphk1* w komórkach śródbłonna - 90 szt.
4. VSMC-Sphk1^{-/-} - myszy z delecją *Sphk1* w komórkach mięśniówki gładkiej - 90 szt.
5. myszy Mir214^{-/-} - 60 szt.
6. myszy S129/C57 będące szczepem wyjściowym/kontrolnym dla myszy Mir214^{-/-} - 60 szt.
7. myszy Rag1^{-/-} - 30 szt.
8. myszy MHC-II^{-/-} - 30 szt.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazie Pubmed. Wykorzystałem słowa kluczowe takie jak „angiotensin II”, „mouse”, „hypertension”, „Sphk1”, „S1P”, PF-543”, „JTE-013”, „mir214” czy „S1pr1”. 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 (np. globalny knockout *Sphk1* - *Sphk1*^{-/-}). Podobnie, dożylny transfer wybranych subpopulacji leukocytnych oraz farmakologiczne modulatory szlaku Sphk1 były testowane w modelach nadciśnienia tętniczego (np. SEW2871) i płucnego (JTE-013, PF-543, limfocyty T i B). Brak jest natomiast danych na temat tkankowo specyficznych delecji Sphk1 i ich wpływu na rozwój nadciśnienia. Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na rozwinięcie poznawcze

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

istniejącej wiedzy w kierunku mechanizmów rozwoju nadciśnienia indukowanego angiotensyną II w kontekście roli szlaków mir-214 oraz kinazy sfingozyny 1.

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.

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.

Zwierzęta będą przebywały w zwierzętarni wysokim standardzie SPF, co zapewnia odpowiednie warunki hodowli zwierząt. Pomiar ciśnienia tętniczego, podawanie leków obniżających ciśnienie, dożylny transfer komórek jak i podawanie modulatorów szlaku Sphk1 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.