

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Badanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie płytek miażdżycowych na modelu zwierzęcym *Mus musculus***

2. Czas trwania projektu **5 lat**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **miażdżyca, płytki miażdżycowe, PKD2**

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.

Miażdżyca powoduje 50% wszystkich zgonów w krajach Zachodnich. Choroba ta charakteryzuje się akumulacją cząsteczek lipidów w ścianach naczyń tętniczych oraz tzw. płytek miażdżycowych. Powiększające się płytki miażdżycowe zmniejszają światło tętnic, a następnie prowadząc do trombogenezy na ich powierzchni oraz niedokrwienia narządów wewnętrznych. Dokładne zrozumienie jakie czynniki wpływają na proces powstawania płytek miażdżycowych, może przyczynić się do opracowania nowych terapii leczenia miażdżycy.

Do badań nad rozwojem miażdżycy powszechnie używa się myszy modyfikowanych genetycznie, które charakteryzuje podwyższony poziom cholesterolu we krwi, takich jak myszy z nokautem receptora lipoproteiny niskiej gęstości lub nokautem apolipoproteiny E.

Wstępne badania pokazują, że inaktywacja, delecja oraz blokowanie aktywności przy pomocy inhibitorów kinazy białkowej D2 (PKD2) prowadzi do zmniejszonej absorpcji lipidów przez jelita, oporności na otyłość i cukrzycę indukowaną dietą wysokotłuszczową oraz podwyższonego poziomu apolipoproteiny A4 (ApoA4) w osoczu krwi. APOA4 pośredniczy w transporcie zwrotnym cholesterolu z komórek piankowych a przez to zapobiega rozwojowi płytki miażdżycowej. Aktywność PKD2 reguluje limfocyty T co może wpływać na rozwój miażdżycy. Na podstawie tych wyników stawiamy hipotezę, iż inaktywacja PKD2 u myszy może zapobiegać rozwojowi miażdżycy.

W celu przetestowania hipotezy wykorzystamy myszy z globalną mutacją genu PKD2 (PKD2^{ki/ki}) oraz z tkankowo-specyficzną delecją genu PKD2 w jelicie cienkim (PKD2^{flox/flox} Villin Cre), z równoczesnym globalnym nokautem genu kodującego receptor LDL lub globalnym nokautem genu kodującego apolipoproteinę E. Równolegle myszom z nokautem receptora lipoproteiny niskiej gęstości lub nokautem apolipoproteiny E będziemy podawać inhibitor kinaz PKD w celu zbadania, czy ten inhibitor zahamuje powstawanie płytek miażdżycowych.

Zarówno globalny nokaut genu kodującego receptor LDL, apolipoproteinę E, jak i globalny knock-in genu kodującego PKD2, a także tkankowo-specyficzny nokaut genu kodującego PKD2 nie powoduje szkodliwego fenotypu u myszy. Podawanie gryzoniom inhibitora rodziny PKD (CRT0066101) nie powoduje skutków ubocznych.

W celu wywołania powstawania płytek miażdżycowych, a tym samym i indukcji miażdżycy, zwierzęta będą karmione dietą wzbogaconą w cholesterol przez 14 tygodni. W trakcie eksperymentu zaplanowano do przeprowadzenia analizy takie jak: pomiaru tempa metabolizmu w klatkach metabolicznych, badanie poziomu lipidów i białek we krwi myszy pod wpływem krótkotrwałego głodzenia, pomiar glukozy we krwi. Po upływie 14 tygodni od rozpoczęcia karmienia myszy dietą wzbogaconą w tłuszcz, zwierzęta zostaną poddane eutanazji, natomiast ich krew i tkanki (aorta, serce) zostaną pobrane w celu przeprowadzenia dalszych analiz histologicznych, biochemicznych oraz proteomicznych.

Planowane procedury wykorzystania zwierząt zaliczane są do umiarkowanej i dotkliwej kategorii dotkliwości. Klasyfikacja doświadczenia: PB10. Badania podstawowe. Układ wewnętrzwydzielniczy lub metabolizm.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa: 476 osobników.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę dotyczącą zagadnienia przedstawionego we wniosku badawczym, w takich dostępnych bazach danych jak: PUBMED; Google Scholar oraz ScienceDirect.

Wykorzystane zostały takie słowa kluczowe jak: metabolism / atherosclerosis / atherosclerosis plaques /reverse cholesterol transport / PKD2/ LDLr /ApoE/ miażdżycy / płytki miażdżycowe

Na podstawie dostępnej istniejącej literatury stwierdzam, że brak jest danych naukowych dotyczących wpływu białkowej kinazy D2 na rozwój i powstawanie płytek miażdżycowych.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmów regulujących proces powstawania płytek miażdżycowych, co może w przyszłości przyczynić się do opracowania nowych terapii w leczeniu i zapobieganiu chorobom metabolicznym, będących następstwem miażdżycy.

(Reducing) W niniejszym wniosku wnosimy o liczebność zwierząt wynoszącą 34 zwierząt/grupę eksperymentalną. Jest to minimalna ilość zwierząt pozwalająca na uzyskanie odpowiedniej ilości materiału do badań celem przeprowadzenia kompletnego zestawu zaplanowanych analiz oraz statystycznej wiarygodności wyników. Niemniej jednak, jeżeli uzyskamy odpowiednią ilość materiału do analiz bądź uzyskamy wystarczającą ilość danych eksperymentalnych przy użyciu mniejszej liczby myszy, to pozostałe zwierzęta nie zostaną przez nas wykorzystane.

(Refining) Podczas trwania doświadczeń zwierzęta będą poddawane szczegółowej obserwacji. Jeżeli którakolwiek z procedur spowoduje niepokojące objawy u zwierząt, zostanie wezwany weterynarz aby zbadać myszy, a eksperyment zostanie przerwany.

(Replacement) W projekcie dotyczącym choroby, jaką jest miażdżycy nie jesteśmy w stanie zrezygnować z modelu zwierzęcego. Powstawanie płytek miażdżycowych, jest to proces, który zachodzi

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

w żywym organizmie pod wpływem wielu czynników, m.in.: predyspozycji genetycznych czy diety bogatej w cholesterol. Nie jesteśmy w stanie stworzyć takiego modelu in vitro, który oddawał by w pełni proces powstawania płytek . Nie jesteśmy też w stanie pracować na niżej uorganizowanych organizmach, ponieważ nie oddają one wystarczająco procesu zachodzącego w organizmie ludzkim. Jednakże, w zaplanowanym projekcie istnieje szereg doświadczeń/analiz, do których nie będą wykorzystane zwierzęta. Równocześnie z badaniami na zwierzętach prowadzone będą analizy biochemiczne oraz proteomiczne przy użyciu stabilnych linii komórek mięśni gładkich aorty D-AoSMC oraz komórek śródbłonna naczyń krwionośnych HUVEC.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

X NIE

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