

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Rola oksygenazy hemowej-1 i czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w rozwoju i progresji tętniaka aorty brzusznej oraz analiza wpływu statyn na oksygenazę hemową-1 w aorcie i tętniaku aorty brzusznej**

2. Czas trwania projektu18 miesięcy.....

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) HO-1, Nrf2, stres oksydacyjny, statyny, tętniak aorty brzusznej

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.

Oksygenaza hemowa-1 (HO-1) jest enzymem antyoksydacyjnym, którego ekspresja zwiększa się w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych i komórkach mięśniówki gładkiej w odpowiedzi na stres oksydacyjny oraz czynniki prozapalne. Wiadomo też, że HO-1 wykazuje ochronne właściwości w przebiegu chorób układu krążenia o podłożu miażdżycowym, których powikłaniem jest tętniak aorty brzusznej (TAB). Wzrost ekspresji HO-1 w ścianie naczynia może być efektem aktywacji czynnika Nrf2. Poziom HO-1 może być regulowany przez leki stosowane u pacjentów z chorobami układu krążenia, np. statyny. Obecnie jedną z najczęściej przyjmowanych statyn jest simwastatyna. Celem projektu jest poznanie roli HO-1 w powstawaniu i rozwoju TAB oraz scharakteryzowanie zależności między HO-1 a czynnikiem Nr2 w komórkach ściany aorty. Ocenimy również wpływ statyn, leków które mogą nasilać ekspresję HO-1 w naczyniach, na rozwój tętniaka.

Realizacja projektu i uzyskane wyniki pozwolą na poznanie roli HO-1 i Nrf2 w aorcie i TAB oraz analizę wpływu powszechnie stosowanej simwastatyny na aktywność HO-1 i Nrf2 w tkance aorty w czasie rozwoju TAB. Uzyskane wyniki,

oprócz znaczenia poznawczego mogą być istotne klinicznie, gdyż pokażą czy statyny mogłyby być potencjalnie przydatne w terapii TAB.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Do weryfikacji roli HO-1 i Nrf2 w aorcie i TAB oraz analizy wpływu powszechnie stosowanej simwastatyny na aktywność HO-1 i Nrf2 w tkance aorty w czasie rozwoju TAB konieczne jest użycie modelu zwierzęcego. Ciągła, podskórna, 28 dniowa infuzja niewielkich dawek angiotensyny II u myszy na diecie wysokotłuszczowej jest powszechnie stosowaną metodą do wywoływania tętniaka aorty brzusznej i badania mechanizmów jego rozwoju.

W doświadczeniu 1, aby zbadać rolę HO-1 w mechanizmie tworzenia tętniaka aorty brzusznej oraz ocenić wpływ simwastatyny na aktywność HO-1 w tkance tętniaka, wykorzystamy myszy dzikie FVBxC57BL6, oraz z niedoborem HO-1 (szczep B6FVB- HO-1 ^{-/-}). Myszom na diecie wysokotłuszczowej (łącznie 160 myszy), będzie wszczepiona podskórnie pompa infuzyjna uwalniająca przez 28 dni niewielkie dawki angiotensyny II w celu wywołania tętniaka aorty brzusznej i oceny roli simwastatyny oraz HO-1 w tworzeniu tętniaka.

W doświadczeniu 2, aby zbadać wpływ czynnika transkrypcyjnego Nrf2, który reguluje aktywność HO-1, na proces tworzenia tętniaka aorty brzusznej oraz wpływ statyn na modulację aktywności Nrf2 w procesie tworzenia tętniaka aorty brzusznej również konieczne jest użycie modelu zwierzęcego. Myszom na diecie wysokotłuszczowej [dzikie C57BL6-Nrf2 ^{+/+}, oraz z niedoborem Nrf2 (szczep C57BL6-Nrf2 ^{-/-})], będzie wszczepiona podskórnie pompa infuzyjna uwalniająca przez 28 dni niewielkie dawki angiotensyny II w celu wywołania tętniaka aorty brzusznej i oceny statyn oraz HO-1 w tworzeniu tętniaka (łącznie 160 myszy).

Planowane po 12 myszy na grupę badawczą i 8 myszy kontrolnych na grupę, to liczba konieczna do przeprowadzenia rzetelnej statystyki.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

TAB powstaje najczęściej w osłabionym miejscu ściany aorty. Osłabienie to jest często wynikiem zmian miażdżycowych (Sakalihasan et al. 2005) i/lub nadciśnienia tętniczego (Kristensen et al. 2015). W modelach mysich kilkunastodniowe podawanie Ang II prowadzi do rozwoju TAB (Cheng et al. 2014). Te właściwości Ang II wykorzystamy w doświadczeniach na mysim modelu TAB.

Zaplanowane badania pozwolą na rzetelną ocenę udziału HO-1 oraz szlaku sygnałowego Nrf2 w patogenezie tętniaka aorty brzusznej oraz pozwolą ocenić rolę simwastatyny w modulacji aktywności HO-1 i Nrf2 w tkance aorty i tętniaku aorty

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

brzuszej.

Materiał od zwierząt (aorta oraz krew obwodowa) będzie wykorzystany do szeregu analiz, takich jak analizy cytometryczne poszczególnych subpopulacji komórek prozapalnych, analizy histologicznej i immunohistochemicznej pozwalającej określić komórkową lokalizację HO-1 i Nrf2 w tkance aorty, oraz analizy ekspresji genów i białek uczestniczących rozwoju tętniaka aorty brzusznej. Tkanki będą również udostępniane innym badaczom.

Dostępne metody badań in vitro z wykorzystaniem aortalnych komórek śródbłonna i mięśniówki gładkiej aorty dają jedynie częściową informację o wpływie badanych czynników na aktywność oksygenazy hemowej-1. Jednocześnie jak dotąd nie możliwe jest wywołanie w komórkach aorty zmian przypominających te w komórkach tętniaka. Ponadto, niedostępne są linie komórkowe komórek tętniaka aorty brzusznej, a hodowla pierwotna wymaga odpowiednio dobranych dawców i jest kosztowna oraz czasochłonna przy niewielkiej szansie powodzenia hodowli. Dlatego w badaniach nad patogenezą tętniaków aorty brzusznej powszechnie wykorzystuje się modele zwierzęce [Kurobe et al. (2013), Cheng et al. (2014)]. Wybrany model doświadczenia wykorzystuje myszy na diecie wysokotłuszczowej, którym przez podskórną wszczepioną infuzyjną pompę osmotyczną podawana będzie angiotensyna II. Zastosowanie pompy infuzyjnej ogranicza dyskomfort zwierząt w trakcie wywoływania tętniaka. Pompa infuzyjna pozwala na precyzyjne kontrolowanie dawki podawanego leku i dzięki niej nie ma potrzeby kilkunastodniowego nastrzykiwania zwierząt. Ponadto metoda ta w krótkim czasie (ok. 28 dni) pozwala wywołać tętniaka aorty brzusznej, co skraca czas doświadczenia. Tak krótki czas wywoływania tętniaka pozwala także na wprowadzenie do modelu związków o potencjalnie terapeutycznym działaniu (np. statyn). Ponieważ tętniak aorty brzusznej częściej występuje u mężczyzn, oraz u osób starszych powyżej 60 roku życia, u których ściana naczynia krwionośnego jest osłabiona, w zaplanowanych doświadczeniach wykorzystamy samce myszy 7-8 miesięcznych.

Wykorzystane zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla myszy, a metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak aby ograniczyć do minimum ból i stres zwierząt. Dodatkowo w badaniu wykorzystane zostaną myszy transgeniczne z wyciszoną ekspresją HO-1 lub Nrf2, co zastąpi farmakologiczną inhibicję HO-1 lub Nrf2, która ma ograniczoną skuteczność, wiąże się z wprowadzeniem dodatkowych procedur w doświadczeniu (m.in. kilkukrotnym nastrzykiwaniem zwierząt). Zatem wykorzystanie myszy z niedoborem HO-1 lub Nrf2 pozwoli na uzyskanie wiarygodnych wyników przy minimalnej liczbie zwierząt w doświadczeniu.

Opisane procedury wywołania TAB są ogólnie przyjęte na świecie (patrz m.in. publikacje Kurobe, et al. (2013), Cheng et al. 2014) i jednocześnie pozwalają na rzetelne porównanie otrzymanych wyników opublikowanych przez różne jednostki badawcze.