

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „**Kinaza sfingozyny 1 jako modulator funkcji naczyniowej – mechanizmy i możliwości terapeutyczne**”

2. Czas trwania projektu: 3 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) Sphk1, angiotensyna II, nadciśnienie tętnicze

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

Nadciśnienie tętnicze jest jedną z głównych przyczyn śmiertelności na świecie. Celem projektu jest poznanie mechanizmów, poprzez które kinaza sfingozyny 1 (Sphk1) wpływa na funkcję naczyniową oraz ciśnienie tętnicze krwi. W szczególności, projekt ma na celu ustalenie funkcji Sphk1 specyficznie w komórkach mięśniówki gładkiej oraz śródbłonna naczyń krwionośnych *in vivo*, co pozwoli na zbadanie autokrynych właściwości Sphk1, oraz wpływu aktywności Sphk1 na kurczliwość i funkcję rozkurczową tętnic oraz produkcję wolnych rodników w mysim modelu nadciśnienia indukowanego angiotensyną II. Co ciekawe, jednym z przykładów skutecznego zastosowania wiedzy nt. aktywności produktu Sphk1-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, jednak istnieją doniesienia, że efektem ubocznym terapii fingolimodem jest wzrost ciśnienia tętniczego krwi u pacjentów. Poznanie autokrynych mechanizmów

działania całego szlaku Sphk1 w modelu nadciśnienia *in vivo*, może przyczynić się do powstania nowych terapii farmakologicznych skoncentrowanych na różnych poziomach aktywności fosforanu sfingozyny w naczyniach krwionośnych.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

1. mysz domowa (szczep C57BL/6J) – 20 szt.
2. Sphk1^{fl/fl} (tło genetyczne szczepu C57BL/6J) – 40 szt.
3. B6.Cg-Tg(Tagln-cre)1Her/J – 10 szt.
4. C57BL/6-Tg(Cdh5-cre/ERT2)1Rha – 10 szt.
5. VSMC-Sphk1^{-/-} - 40 szt.
6. EC-Sphk1^{-/-} - 40 szt.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazie MEDLINE-Pubmed. Wykorzystano słowa kluczowe takie jak „angiotensin II”, „mouse”, „hypertension”, „Sphk1”. Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzono, 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, specyficznego dla tkanek naczyniowych, usunięcia genu Sphk1 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 Sphk1 oraz fosforanu sfingozyny, będącego produktem jej aktywności. Proponowany wniosek uwzględnia zasady zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia w następujący sposób:

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

Zastąpienie

Mysi model nadciśnienia indukowanego angiotensyną II 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, serce), a także zależności obserwowanych zmian w różnych tkankach względem siebie. Ponadto, ze względu na idee funkcjonalnych badań naczyń krwionośnych ex vivo (np. miografia ciśnieniowa) nie jest możliwe użycie komercyjnych linii komórkowych bądź zastąpienie zwierząt kontrolowanym układem in vitro.

Ograniczenie

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 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 genu Sphk1 wyprowadzone zostały z różnych szczepów myszy nie jesteśmy w stanie zastosować jednej wspólnej kontroli w zaplanowanych eksperymentach. Z tego względu planowane jest zbadanie odpowiedzi na angiotensynę II także myszy szczepu dzikiego, myszy hemizygotycznych pod względem rekombinazy Cre a w szczególności myszy homozygotycznych pod względem miejsc loxP flankujących gen Sphk1.

Udoskonalenie

Zwierzęta będą przebywały w zwierzętarni, która zapewnia odpowiednie warunki hodowli zwierząt. Pomiar ciśnienia tętniczego powoduje 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.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

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