

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Zależność między syntezą NAD, metylacją nikotynamidu a sirtuinami w śródbłonku naczyniowym”

2. Czas trwania projektu: 3 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): dinukleotyd nikotynoamido-adeninowy, dysfunkcja śródbłonka, sirtuina 1, N-metylotransferaza nikotynamidu

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

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.

Śródbłonek naczyniowy jest najbardziej wewnętrzną warstwą wyściełającą naczynia krwionośne, a utrzymanie śródbłonka we właściwej funkcji jest kluczowe dla zdrowia całego układu sercowo-naczyniowego. Jednym z czynników wpływających na śródbłonek jest dinukleotyd nikotynoamido-adeninowy (NAD), ważna cząsteczka biorąca udział w reakcjach bioenergetycznych. Jest również wykorzystywana przez sirtuiny aktywujące mechanizmy przeciwzapalne. NAD, produkowany z mononukleotydu nikotynamidu (NMN) i rybozydu nikotynamidu (NR), w toku zużycia jest rozkładany do nikotynamidu, który jest ponownie wykorzystywany do syntezy NAD, lub w połączeniu z resztą metylową tworzy 1-metylnikotynamid (MNA) w reakcji katalizowanej przez N-metylotransferazę nikotynamidu (NNMT). Przez długi czas rola MNA była nieznana, niedawno stwierdzono zależność między NNMT, MNA i sirtuinami, gdzie MNA uwalniany przez NNMT wpływał korzystnie na aktywność i stabilność sirtuin.

Niniejszy projekt skupia się na zależnościach między syntezą NAD, aktywnością NNMT i wpływem sirtuin na śródbłonek naczyniowy. Zgodnie z hipotezą, równowaga i zależność między produkcją NAD z NMN lub NR a metylacją nikotynamidu są konieczne to zachowania aktywności sirtuiny 1, uruchamiającej mechanizmy przeciwzapalne w przebiegu dysfunkcji śródbłonka.

Do zbadania w/w zależności niezbędne są mysie modele niedoboru NAD, które traktowane będą substratami NAD oraz inhibitorami NAD, NNMT i SIRT1. Przeprowadzona będzie analiza znaczników dysfunkcji śródbłonka w aorcie i osoczu, pomiar rozkurczu aorty zależny od śródbłonka, a także zależny od NNMT efekt na aktywność sirtuin. Badania, wymagające pobrania próbek biologicznych będą miały charakter terminalny. Projekt pozwoli na zbadanie mechanizmów działania NMN i NR na śródbłonek, co może mieć w przyszłości zastosowanie w terapii chorób układu sercowo-naczyniowego za pomocą łatwo przyswajalnych substratów NAD.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa (*Mus musculus*): 300 myszy.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt dokonano przeglądu piśmiennictwa w tematyce wniosku, korzystając z bazy danych Pubmed, wpisując słowa kluczowe: „nicotinamide riboside”, „nicotinamide mononucleotide” i „cardiovascular system”. Uzyskane dane wskazały na korzystny wpływ NMN na naczynia mózgowe w mysich modelach starzejących się zwierząt. Podawanie NR zwiększało przeżywalność szczurów po indukcji sepsy. Badania na makrofagach suplementowanych NR wykazały zmniejszoną produkcję wolnych rodników przez te komórki. NR i NMN efektywnie zwiększały stężenie NAD u ludzi i myszy. Brak jest danych dotyczących efektów długotrwałej suplementacji NMN i NR na śródbłonek naczyniowy i specyficzne dla niego parametry; tlenu azotu, endotelialnej syntazy tlenu azotu, trombomoduliny (CD141) oraz prostacykliny (PGI₂), stanowiących czynniki przeciwzapalne i przeciwzakrzepowe, wpływające na homeostazę układu sercowo-naczyniowego. Nieznany jest poziom aktywności i ekspresji N-metylotransferazy nikotynamidu (NNMT) u zwierząt przyjmujących NMN lub NR, jak również aktywność SIRT1.

Zasada zastąpienia: Badania z wykorzystaniem mysich modeli są istotnym elementem umożliwiającym zrozumienie mechanizmów dysfunkcji śródbłonka, stanowiącej podłoże większości chorób układu sercowo-naczyniowego. Wybrany myszy model jest najlepiej naśladującym choroby układu krążenia typowe dla populacji ludzkiej, dzięki czemu stanowią podłoże do tworzenia wielu zmodyfikowanych genetycznie modeli miażdżycy, dyslipidemii i nadciśnienia. Badania na modelu zwierzęcym stanowi niezbędny wstęp do opracowania skuteczniejszych metod leczenia chorób układu krążenia, u podstawy

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

których leży dysfunkcja śródbłonna. Pozwolą one na oszacowanie biodostępności i skuteczności testowanych substratów NAD w złożonym systemie fizjologicznym, który nie może być w pełni zastąpiony przez hodowle komórkowe.

Zasada ograniczenia: planując eksperyment, liczbę i dotkliwość procedur starano się ograniczyć do niezbędnego minimum w celu zmniejszenia stresu zwierząt. Zrezygnowano z pomiarów przeżyciowych, pobierania krwi w trakcie eksperymentów i pomp implantowanych, ograniczając podawanie inhibitorów NNMT i SIRT1 do ostatniego tygodnia przed uśmierceniem. Główne pomiary zmiennych będą przeprowadzane po uśmierceniu zwierząt, *ex vivo*. Liczebność grup została ograniczona do wartości minimalnej, która powinna jednak przynieść wyniki istotne statystycznie. Dawki podawanych substancji zostały oszacowane na podstawie danych literaturowych.

Zasada udoskonalenia: zwierzęta będą przetrzymywane w klatkach o odpowiednio dużej ilości przestrzeni, stale wentylowanych filtrowanym powietrzem, wyposażonych w elementy redukujące stres (kryjówki, gryzaki), ze stałym dostępem do wody i karmy. Wykorzystane będą wyłącznie samice ze względu na agresję samców względem siebie, co stanowiłoby dodatkowe źródło stresu. Procedury stosowane w projekcie są mało uciążliwe dla zwierząt i dotyczą głównie końcowego etapu eksperymentu. Projekt będzie oparty o wieloparametryczne pomiary wykorzystujące liczne techniki i zróżnicowaną metodykę: mikroskopię fluorescencyjną i konfokalną (obrazowanie śródbłonna naczyniowego), Western-Blot (analiza ekspresji enzymów szlaku syntezy NAD), chromatografię połączoną ze spektroskopią masową LC/MS/MS (pomiar stężenia metabolitów NAD), miograf do badania czynności śródbłonna w izolowanych naczyniach, pomiary ELISA.

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.