

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Regulacja różnicowania i plastyczności fenotypowej komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych w warunkach fizjologicznych oraz w dysfunkcji wywołanej stanem zapalnym: rola desaturazy stearoilo-CoA.
2. Czas trwania projektu: 5 lat
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): desaturaza stearoilo-CoA, niewydolność tętnicza, miażdżycy, metabolizm komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych, zespół metaboliczny
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.

Cel i opis doświadczenia

Głównym celem projektu jest określenie roli deaturazy stearoilo-CoA (SCD)-1 i SCD4 w regulacji metabolizmu, funkcji oraz powstawania zaburzeń funkcjonowania komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych przy długotrwałym stanie zapalnym, rozwijającej się cukrzycy typu 2 oraz miażdżycy.

W celu określenia zależności pomiędzy rozwojem niewydolności tętniczej a ekspresją SCD w stanie fizjologicznym i patologicznym, zostaną wykonane badania przy użyciu myszy domowej C57bl/6J oraz myszach zmienionych genetycznie bez upośledzającego fenotypu (tabela poniżej). Myszy będą karmione dietą bogatą w tłuszcze. W trakcie trwania eksperymentów zostanie przeprowadzone badanie echokardiograficzne serca oraz test tolerancji glukozy (GTT). Do grup eksperymentalnych zostaną przygotowane odpowiednie grupy kontrolne. W celu wykonania zaplanowanych badań biochemicznych oraz histologicznych po uśmierceniu zwierząt zostaną pobrane następujące tkanki: aorta, serce, wątroba, tkanka tłuszczowa, mięśnie szkieletowe, trzustka, śledziona oraz krew.

Przewidywane szkody

Proponowane badania zostały zaprojektowane w sposób minimalizujący stres zwierząt. Kontakt z człowiekiem został ograniczony do koniecznego minimum. Dane literaturowe wskazują, że dieta bogata w tłuszcze wywołuje niewielki stres u zwierząt. Natomiast badania takie jak 1) echokardiografia (wykonana pod narkozą) oraz 2) GTT (ograniczenie do 1 nakłucia, a następnie przemywanie skrzepu, w celu dokonania pomiarów) zostały zaprojektowane w sposób minimalizujący czas eksperymentu a zatem stres jakiego doznają myszy. Aby zminimalizować szkody, poszczególnym procedurom zostanie poddana tylko część wnioskowanych zwierząt (karmienie dietą wysokotłuszczową – 675 myszy, echokardiografia – 270 myszy, GTT – 270 myszy). Kosztem jest także śmierć zwierząt, niezbędna do pobrania tkanek i wykonania badań.

W celu stworzenia przyjaznego środowiska, zarówno w klatkach bytowych jak i w czasie wykonywania procedur zostanie zastosowane wzbogacenie środowiska różnicujące teren dzięki któremu myszy będą mogły budować gniazdo, eksplorować klatkę. Po zakończeniu doświadczenia myszy zostaną humanitarnie uśmiercone w celu pobrania tkanek do dalszych badań.

Planowane doświadczenia pozwolą na określenie roli enzymu SCD na regulację fenotypu oraz metabolizmu komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych w kontekście symptomów syndromu metabolicznego. Nieocenioną wartością naukową jest identyfikacja szlaków sygnalizacyjnych regulowanych przez enzym SCD wpływających na funkcjonowanie komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Gatunek	Liczba osobników
Mysz C67Bl/6J	270
Mysz SCD1 ^{-/-}	270
Mysz SCD4 ^{-/-}	270
Mysz ApoE ^{-/-}	135
Mysz ApoE ^{-/-} ;SCD1 ^{-/-}	135
Mysz ApoE ^{-/-} ;SCD4 ^{-/-}	135
Suma	1215

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Mając na uwadze dobrostan zwierząt zastosowana zostanie zasada 3R. Ma to na celu możliwie jak największe zredukowanie liczby użytych zwierząt oraz zminimalizowanie ich cierpienia i dyskomfortu w trakcie trwania proponowanych procedur doświadczalnych.

REPLACEMENT (Zastępowanie) – Ze względu na cel badawczy nie jest możliwe pełne zastąpienie modeli mysich technikami in vitro (hodowle komórkowe czy tkankowe). Bardzo złożony układ in vivo, gdzie przebieg procesów metabolicznych / fizjologicznych warunkowany i regulowany jest pracą wielu narządów, nie jest możliwy do odzwierciedlenia przy użyciu hodowli komórkowych. Niemniej jednak zasadność naukowa wszystkich zaplanowanych analiz została potwierdzona przeprowadzonymi badaniami in vitro do projektu finansowanego z funduszy Narodowego Centrum Nauki. Oczywiście doświadczenia które pozwalają na użycie układu in vitro lub ex vivo w zastępstwie modeli zwierzęcych w celu identyfikacji mechanizmów regulujących fenotyp i metabolizm komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych będą kontynuowane.

REDUCTION (Ograniczenie) – Starano się ograniczyć liczbę zwierząt do absolutnego minimum wymaganego do prawidłowej analizy statystycznej uzyskanych wyników (z uwzględnieniem konieczności replikacji danych na potrzeby publikacji). Z wykorzystaniem tych samych zwierząt przeprowadzone zostaną różnorodne analizy (badania przyżyciowe a następnie pobranie tkanek do analiz: histologia, ekspresja białek, analiza lipidów). W niniejszym wniosku wnosi się o liczebność zwierząt wynoszącą 15 zwierząt/ grupę eksperymentalną/ zaplanowaną analizę.

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

Wyjątek stanowi jedna grupa której aorty zostaną przeznaczone na analizę lipidów w tkance gdzie liczebność zwierząt wynoszącą 30 zwierząt/ grupę eksperymentalną. Powodem powiększenia grupy jest ilość materiału potrzebna do wykonania pojedynczej analizy (dwie aorty na jedną analizę). Tym niemniej analiza ta pozwala na uzyskanie dużej ilości wyników (zawartość triacylogliceroli, diacylogliceroli, wolnych kwasów tłuszczowych, cholesterolu, ceramidów, sfingolipidów oraz składu poszczególnych kwasów tłuszczowych w tych lipidach), co uzasadnia jej wykonanie.

Wielkość grupy została zaprojektowana w taki sposób, aby możliwe było wyciągnięcie naukowo i matematycznie (kryterium istotności statystycznej) znaczących wniosków. Zrezygnowano z przeprowadzenia badania echokardiograficznego oraz testu tolerancji glukozy na wszystkich osobnikach w eksperymentach. Dlatego też, tylko część z wnioskowanej liczby myszy zostanie poddana echokardiografii (270 myszy) oraz testowi tolerancji glukozy (270 myszy).

W teście tolerancji glukozy zaplanowano punkty czasowe 15, 30, 60, 90, 120 minut. Z opublikowanych danych wynika, że poziom glukozy we krwi zwierząt karmionych dietą bogatotłuszczową utrzymuje się na zbliżonym poziomie pomiędzy 30 a 60, dlatego też odstąpiono od dodatkowego pobierania krwi po 45 minutach, pozostając przy punktach 30 minut (osiągnięcie maksymalnego poziomu glukozy) oraz 60 minut (obserwowane pierwsze spadki stężenia glukozy we krwi).

Często w tych samych badaniach / modelach badawczych wykonuje się także dootrzewnowy test tolerancji insuliny (ITT), w którym pobiera się próbki krwi a następnie za pomocą metody ELISA dokonuje się pomiaru stężenia insuliny. W proponowanych badaniach odstąpiono od tego testu w celu nie poddawania zwierząt nadmiernemu cierpieniu.

Stan zapalny, jako jeden z symptomów zespołu metabolicznego, zostanie wywołany równolegle z cukrzycą, przy użyciu diety bogato-tłuszczowej. Czas trwania procedury wynika z okresu niezbędnego do rozwinięcia się kolejno występujących komplikacji stanu zapalnego i cukrzycy (insulinooporność, hiperglikemia, negatywny wpływ wysokiego stężenia glukozy na naczynia krwionośne) oraz długotrwałego stanu zapalnego (rozwój dysfunkcji komórek śródbłonna oraz komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych, patologiczna przebudowa ścian tętnic). Zgodnie z danymi literaturowymi, u myszy karmionych dietą bogato-tłuszczową jako standardowego modelu eksperymentalnego dla cukrzycy indukowanej otyłością obserwujemy tzw. stan przedcukrzycowy w okresie 6-8 tygodnia karmienia, spadek adaptacji wysp trzustkowych około 12 tygodnia, natomiast pełna cukrzyca typu drugiego wywołana zostaje w 16-20 tygodniu trwania diety.

W zaplanowanych eksperymentach czas karmienia dietą wysokotłuszczową został skrócony do minimum niezbędnego do wywołania określonych objawów metabolicznych. Wg literatury przeprowadza się także długotrwałe (nawet ponad 50 tygodni) eksperymenty z karmieniem dietą wysokotłuszczową, niemniej jednak przez wzgląd na zasadę 3R, w proponowanych badaniach zdecydowano się na najkrótszy czas diety po którym wystąpią oczekiwane.

REFINEMENT (Udoskonalenie) – Wszystkie proponowane procedury eksperymentalne zaprojektowano tak aby przysporzyć zwierzętom jak najmniej cierpienia. Zwierzęta będą przenoszone w tubach (a nie za ogon) a kontakt z człowiekiem będzie ograniczony do koniecznego minimum. Echokardiografia przeprowadzana będzie w pełnej narkozie. Kilkukrotne pobieranie krwi konieczne do wykonania testu tolerancji glukozy będzie związane z tylko jednokrotnym nakłuciem igłą a następnie przemywaniem skrzepu. Stanowi to mniejszy stres dla myszy niż wielokrotne nakłuwanie mysiego ogona.

Natomiast uśmiercenie, przez przerwanie rdzenia kręgowego zostanie poprzedzone uśpieniem myszy z wykorzystaniem CO₂ co bardzo skraca czas utraty świadomości i wykonania czynności do 3-5 sekund.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

X TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

☐ NIE

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