

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: *Ocena roli mechanizmu kompensacyjnego zależnego od MNA/COX-2/ PGI<sub>2</sub> w mysim modelu dysfunkcji śródbłonna naczyniowego wywołanego farmakologicznie niedoborem NO*

2. Czas trwania projektu: 4 lata (marzec 2020)

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): eikozanoidy, L-NAME, prostacyklina, tromboksan, MNA

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.

Niedobór tlenu azotu (NO), jednego z najważniejszych śródbłonkowych czynników naczyniorozkurczowych oraz przeciwplatek, prowadzi do upośledzenia czynności śródbłonka naczyniowego, co z kolei jest przyczyną rozwoju wielu chorób układu sercowo-naczyniowego i zwiększoną śmiertelnością wśród pacjentów. Wczesna diagnoza niewydolności zapobiegająca progresji dysfunkcji śródbłonka zmniejsza śmiertelność wśród pacjentów, ze względu na zredukowaną liczbę występowania epizodów sercowo-naczyniowych (np. zawał serca). Dlatego też, bardzo ważne jest prowadzenie badań, które pozwolą lepiej zrozumieć mechanizmy uczestniczące w rozwoju i kompensacji dysfunkcji śródbłonka. Celem zaplanowanych doświadczeń jest zbadanie czy egzogeny 1-metylonikotynamid (MNA) jest regulatorem aktywności cyklooksygenazy-2 (COX-2), enzymu pośredniczącego w biosyntezie jednego z kluczowych mediatorów lipidowych o działaniu naczynioprotekcyjnym – prostacykliny (PGI<sub>2</sub>) oraz jak zmienia się profil innych eikozanoidów, aktywność płytek krwi w sytuacji zahamowania syntezy NO.

Nadciśnienie oraz upośledzenie czynności śródbłonka naczyniowego u myszy zostanie wywołane poprzez podawanie w wodzie do pica inhibitora syntazy tlenu azotu jakim jest N<sup>ω</sup>-L-nitroarginina (L-NAME) (czynność 2). W trakcie okresu podawania L-NAME myszy będą umieszczane w klatkach metabolicznych w celu zebrania próbek moczu (czynność 4). Zostaną przeprowadzone także pomiary ciśnienia tętniczego krwi metodą tail-cuff (czynność 5). Badania przeprowadzone będą w toku rozwoju nadciśnienia i dysfunkcji śródbłonka, jak i podaniu związków będących egzogenym źródłem MNA i NO (MNACl, MNANO<sub>2</sub>, MNANO<sub>3</sub>, c2913) (czynność 3).

Klasyfikacja doświadczenia tabela nr 2 Poz. 2.2/2a, tabela nr 4 Poz. 4.4/4a

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W zaplanowanych doświadczeniach wykorzystane zostaną myszy szczepu C57BL/6. Szczep ten jest podatny na wywołanie nadciśnienia tętniczego poprzez podawanie L-NAME, przez co jest najczęściej stosowanym szczepem myszy w badaniach in vivo w tym modelu dysfunkcji śródbłonka.

### ***I etap prowadzenia badań:***

Przed rozpoczęciem badania mechanizmów kompensacyjnych z zastosowaniem donorów MNA i NO przeprowadzona zostanie doświadczenie mające na celu określenie wpływu płci myszy oraz spożywanej przez nie paszy na szybkość w rozwoju i różnice w wartości wywołanego nadciśnienia. Na podstawie danych literaturowych, przeprowadzone na szczurach badania *in vivo* wskazały że ciśnienie u osobników żeńskich wzrosło szybciej niż u osobników męskich po podawaniu L-NAME, jednak osiągnęło zbliżoną wartość na końcowym etapie doświadczenia [1]. Z drugiej strony, doświadczenie przeprowadzone z wykorzystaniem myszy z usuniętym genem odpowiedzialnym za syntezę śródbłonkowego NO (eNOS<sup>-/-</sup>) wykazało, że osobniki męskie charakteryzowały się wyższym ciśnieniem tętniczym niż osobniki żeńskie [2]. W związku z faktem, iż nie jest możliwe jednoznaczne stwierdzenie, która płć myszy będzie wykazywała szybszą progresję i większą wartość nadciśnienia w naszych warunkach eksperymentalnych konieczne jest przeprowadzenie tego etapu badań. Wśród zebranych prac nie znaleziono informacji o wpływie płci myszy C57BL/6 na rozwój nadciśnienia po zastosowaniu L-NAME. Podczas przeprowadzonego doświadczenia myszy będą spożywały paszę Harlan Teklad TD99366 o obniżonej zawartości NO<sub>2</sub><sup>-</sup> oraz NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Pasza Harlan Teklad TD99366 zaspokaja wszystkie potrzeby żywieniowe zwierząt i nie wywołuje zaburzeń klinicznych.

Dodatkowo, sprawdzony zostanie wpływ paszy Altromin na stężenie NO w osoczu i moczu w trakcie karmienia myszy L-NAME. Płć myszy przeznaczonych na zbadanie wpływu standardowej paszy (Altromin) na mierzone parametry zostanie określona na podstawie wyników zebranych w trakcie badania wpływu płci na niedobór NO, co pozwoli na zredukowanie liczby zwierząt uczestniczących w badaniach. W świetle dalszych badań, bardzo istotne jest określenie typu paszy, gdyż może ona wpływać na pogłębienie dysfunkcji śródbłonka lub na jej kompensację. Stosowanie nieodpowiedniej diety wiąże się z niekontrolowanym dostarczaniem NO w postaci NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Anion ten w organizmie żywym ulega reakcjom redukcji prowadząc do powstania NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, a następnie NO [3].

Progresja rozwoju dysfunkcji śródbłonka wywołana wzrostem ciśnienia zostanie zbadana w 2, 3 i 4 tygodniu podawania L-NAME. Myszy zostaną poddane czynnością 2, 4, 5 oraz 6 procedury w każdym tygodniu prowadzonych badań. Eutanazja myszy po 2, 3 oraz 4 tygodniu podawania L-NAME na tym etapie badań jest konieczna w celu oceny wpływu tego inhibitora NOS na aktywność płytek krwi w pełnej krwi oraz profil eikozanoidów w osoczu. Zebrane wyniki i ich szczegółowa analiza pozwolą ograniczyć liczbę zwierząt w kolejnym etapie prowadzenia badań, gdzie eutanazja myszy zostanie wykonana tylko na końcu trwania doświadczenia (maksymalnie 5 tygodni). Podział myszy na grupy jest podany w Tabeli poniżej. Łącznie w I etapie prowadzenia badań zostanie wykorzystanych 180 myszy szczepu C57BL/6 – liczność każdej z grup wynosi 10 myszy. Wśród badanych grup zwierząt uwzględnione zostały zarówno grupy kontrolne myszy jak i zwierzęta otrzymujące L-NAME. Uwzględnienie w doświadczeniu myszy kontrolnych jest konieczne ze względu na uzyskanie wiarygodnych wyników i wyciągnięcie prawidłowych wniosków.

[1] Y. Wang, et al., *Chin Journal of Physiol.*, vol. 46, no. 2, pp. 91–94, 2003.

[2] A. A. Miller et al., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 289, no. 2, pp. L299–L366, 2005.

[3] E. Weitzberg et al., *Nitric Oxide*, vol. 2, no. 1, pp. 1–7, 1998.

## ***II etap prowadzenia badań:***

Na podstawie wyników z I etapu badań zostanie wybrana płeć myszy C57BL/6, która w dalszym etapie zostanie wykorzystana do zbadania wpływu donorów MNA oraz MNA i NO na mechanizm kompensacyjny MNA/COX-2/PGI<sub>2</sub>. Ponadto, na podstawie badań w I etapie zostanie ustalony czas przez który myszy powinny być karmione L-NAME w celu osiągnięcia nadciśnienia tętniczego (maksymalnie 5 tygodni). Po wywołaniu nadciśnienia tętniczego część myszy będzie karmiona MNACl, MNANO<sub>2</sub>, MNANO<sub>3</sub>, c2913 oraz mieszaniną danej substancji i L-NAME, a następnie uśmiercona na końcu trwania doświadczenia. W II etapie badań myszy zostaną podzielone na następujące grupy:

- kontrolne - spożywające tą samą paszę i wodę co myszy w grupach badanych, bez żadnych dodatków przez okres trwania doświadczenia (maksymalnie 5 tygodni)
- kontrola pozytywna - otrzymujące substancję badaną w wodzie do picia - MNACl, MNANO<sub>2</sub>, MNANO<sub>3</sub>, c2913 (maksymalnie 1 tydzień)
- badane - otrzymujące mieszaninę L-NAME z danym związkiem w wodzie do picia. Na początku myszy będą otrzymywać tylko L-NAME (kontrola negatywna, maksymalnie 4 tygodnie), a po wywołaniu nadciśnienia myszy będą dalej otrzymywać przez tydzień mieszaninę L-NAME i badanej substancji (1 tydzień) (czynność 3).

Stworzenie grup kontrolnych jest konieczne w celu uzyskania wiarygodnych wyników i wysunięcia prawidłowych wniosków o wpływie MNA na COX-2, syntezę eikozanoidów oraz zmian w aktywności płytek krwi w warunkach ograniczonej syntezy NO. W tym etapie prowadzenia badań planowane jest wykorzystanie 100 osobników myszy C57BL/6 (10 myszy/grupę).

Całkowita liczba myszy C57BL/6 planowanych do przeprowadzenia całego badania wynosi 280. Szczegółowe zestawienie wszystkich grup myszy oraz ich podział znajduje się w poniższej Tabeli.

Wszystkie grupy myszy będą umieszczane raz w tygodniu w klatkach metabolicznych w celu zebrania próbek moczu, dwa razy w tygodniu myszy będą poddawana pomiarowi ciśnienia tętniczego (czynności 4 i 5).

Podana liczba mysz (280) potrzebnych do wykonania doświadczenia jest minimalną ilością osobników potrzebną do uzyskania rzetelnych wyników oraz niezbędną do przeprowadzenia wiarygodnej analizy statystycznej.

| Szczep (płeć)     | Grupa (liczność)               | Opis  | Ilość osobników |
|-------------------|--------------------------------|---|-----------------|
| C57BL/6 (♂)       | kontrola (10)                  | czysta woda, pasza Harlan TD99366, uśmiercenie w 2, 3 i 4 tygodniu  | 10x3=30         |
| C57BL/6 (♂)       | L-NAME (10)                    | woda z L-NAME (0.43mmol/kg/dzień), pasza Harlan TD99366, uśmiercenie w 2, 3 i 4 tygodniu  | 10x3=30         |
| C57BL/6 (♀)       | kontrola (10)                  | czysta woda, pasza Harlan TD99366, uśmiercenie w 2, 3 i 4 tygodniu  | 10x3=30         |
| C57BL/6 (♀)       | L-NAME (10)                    | woda z L-NAME (0.43mmol/kg/dzień), pasza Harlan TD99366, uśmiercenie w 2, 3 i 4 tygodniu  | 10x3=30         |
| C57BL/6 (♂ lub ♀) | kontrola (10)                  | czysta woda, pasza Altromin, uśmiercenie w 2, 3 i 4 tygodniu  | 10x3=30         |
| C57BL/6 (♂ lub ♀) | L-NAME (10)                    | woda z L-NAME (0.43mmol/kg/dzień), pasza Altromin, uśmiercenie w 2, 3 i 4 tygodniu  | 10x3=30         |
| C57BL/6 (♂ lub ♀) | kontrola (10)                  | czysta woda, pasza Harlan TD99366, uśmiercenie w maks. 5 tygodniu   | 10              |
| C57BL/6 (♂ lub ♀) | L-NAME (10)                    | woda z L-NAME (0.43mmol/kg/dzień), pasza Harlan TD99366, uśmiercenie w maks. 5 tygodniu   | 10              |
| C57BL/6 (♂ lub ♀) | MNACl (10)                     | woda z MNACl (0.73 mmol/kg/dzień), pasza Harlan TD99366, uśmiercenie w maks. 5 tygodniu   | 10              |
| C57BL/6 (♂ lub ♀) | MNANO <sub>2</sub> (10)        | woda z MNANO <sub>2</sub> (0.73 mmol/kg/dzień), pasza Harlan TD99366, uśmiercenie w maks. 5 tygodniu  | 10              |
| C57BL/6 (♂ lub ♀) | MNANO <sub>3</sub> (10)        | woda z MNANO <sub>3</sub> (0.73 mmol/kg/dzień), pasza Harlan TD99366, uśmiercenie w maks. 5 tygodniu  | 10              |
| C57BL/6 (♂ lub ♀) | c2913 (10)                     | woda z c2913 (0.73 mmol/kg/dzień), pasza Harlan TD99366, uśmiercenie w maks. 5 tygodniu   | 10              |
| C57BL/6 (♂ lub ♀) | L-NAME+MNACl (10)              | przez maks. 4 tygodnie woda z L-NAME (0.43mmol/kg/dzień), następnie przez 1 tydzień woda z L-NAME (0.43mmol/kg/dzień)+ MNACl (0.73 mmol/kg/dzień), pasza Harlan TD99366, uśmiercenie maks. w 5 tygodniu               | 10              |
| C57BL/6 (♂ lub ♀) | L-NAME+MNANO <sub>2</sub> (10) | przez maks. 4 tygodnie woda z L-NAME (0.43mmol/kg/dzień), następnie przez 1 tydzień woda z L-NAME (0.43mmol/kg/dzień)+ MNA NO <sub>2</sub> (0.73 mmol/kg/dzień), pasza Harlan TD99366, uśmiercenie maks. w 5 tygodniu | 10              |
| C57BL/6 (♂ lub ♀) | L-NAME+MNANO <sub>3</sub> (10) | przez maks. 4 tygodnie woda z L-NAME (0.43mmol/kg/dzień), następnie przez 1 tydzień woda z L-NAME (0.43mmol/kg/dzień)+ MNA NO <sub>3</sub> (0.73 mmol/kg/dzień), pasza Harlan TD99366, uśmiercenie maks. w 5 tygodniu | 10              |
| C57BL/6 (♂ lub ♀) | L-NAME+c2913 (10)              | przez maks. 4 tygodnie woda z L-NAME (0.43mmol/kg/dzień), następnie przez 1 tydzień woda z L-NAME (0.43mmol/kg/dzień)+c2913 (0.73 mmol/kg/dzień), pasza Harlan TD99366, uśmiercenie maks. w 5 tygodniu                | 10              |
| <b>suma</b>       |                                |   | <b>280</b>      |

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

W celu przygotowania przedstawionego projektu badawczego został sprawdzony obecny stan wiedzy objętej niniejszym wnioskiem korzystając z baz danych takich jak ScienceDirect, PubMed, EBSCO, GoogleScholar. Wśród słów kluczowych użytych do wyszukania danych literaturowych znajdowały się między innymi: *eicosanoids*, *prostacyclin*, *NO-deficiency*, *L-NAME*, *MNA*. Na podstawie przeglądu literaturowego, można stwierdzić, że badania objęte poniższym wnioskiem nie zostały wcześniej przeprowadzone. Do chwili obecnej, brak jest informacji na temat kompensacyjnej roli szlaku MNA/COX-2/PGI<sub>2</sub> oraz zmian w aktywności płytek krwi i profilu eikozanoidów w warunkach niedoboru NO wywołanej L-NAME. Dodatkowo, nowatorskim aspektem badania jest analiza ilościowa eikozanoidów oraz zbadanie aktywności płytek krwi w badaniu *ex vivo* na podstawie zmian w syntezie TXB<sub>2</sub>, co jest bardzo istotnym zagadnieniem, gdyż stwarza możliwość lepszego zrozumienia roli tych przekazników w rozwoju dysfunkcji śródbłónka naczyniowego w warunkach niedoboru NO oraz kompensacji jego upośledzenia pod wpływem egzogennej MNA. Wczesna diagnoza upośledzenia oraz prewencja rozwoju dysfunkcji śródbłónka naczyniowego zmniejsza śmiertelność wśród pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego [4].

Wykorzystanie modelu zwierzęcego jest konieczne w celu oceny roli szlaku MNA/COX-2/PGI<sub>2</sub> w dysfunkcji śródbłónka w tak szerokim zakresie badań. W celu zredukowania ilości wykorzystywanych myszy doświadczenie zostało podzielone na dwa etapy. W I etapie prowadzonych badań zbadany zostanie wpływ płci myszy C57BL/6 oraz rodzaju spożywanej przez nie paszy na szybkość wzrostu ciśnienia tętniczego krwi oraz rozwoju dysfunkcji śródbłónka po podaniu L-NAME w wodzie do picia, co pozwoli na zmniejszenie liczby zwierząt co najmniej o połowę w dalszej części badań. Liczebność grup została ograniczona do najmniejszej ilości osobników, pozwalającej jednak uzyskać wyniki istotne statystycznie.

Ponadto, w próbkach osocza, moczu oraz narządów pobranych od jednej mysz możliwe jest między innymi:

- zmierzenie wszystkich eikozanoidów stanowiących przedmiot badań (ponad 20 związków), które pozwolą na weryfikację hipotezy czy egzogenne MNA aktywuje szlak MNA/COX-2/PGI<sub>2</sub> w warunkach niedoboru NO;
- zmierzenie stężenia metabolitów NO świadczących o jego biosyntezie oraz dysfunkcji śródbłónka naczyniowego;
- zmierzenie MNA i jego metabolitów w celu korelacji zmian w jego stężeniu ze zmianami w profilu eikozanoidów;
- pomiar aktywacji płytek krwi w oryginalnym eseju w pełnej krwi *ex vivo*

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

Myszy przeznaczone do badań będą przebywać w warunkach, które zapewniają im stały dostęp wody oraz paszy *ad libitum*. Dieta spożywana przez myszy zaspokaja wszystkie potrzeby żywieniowe tych zwierząt oraz zapewnia utrzymanie ich w zdrowiu i pełnej witalności. Ponadto, myszy będą miały zapewnioną wystarczającą przestrzeń w klatkach bytowych, właściwe wyposażenie oraz możliwość kontaktów socjalnych z innymi osobnikami w klatce. Dodatkowo, w celu udoskonalenia warunków bytowych zwierząt podczas trwania badań w każdej z klatek bytowych oraz metabolicznych umieszczone zostaną takie elementy wzbogacenia jak drewniane tunele do zabawy, drewniane gryzaki do ścierania zębów myszy odzwierciedlające warunki panujące w przyrodzie a także domki. W przypadku zachorowania, zranienia lub innego czynnika wywołującego ból, zapewniona będzie właściwa opieka weterynaryjna, szybka diagnoza oraz skuteczne leczenie. Opisane w procedurze czynności znajdują się w „Łagodnej” kategorii dotkliwości, dlatego też zwierzęta doświadczalne będą odczuwały niski dyskomfort w trakcie prowadzenia badań. Dołożone także zostaną wszelkie starania, aby odczucie strachu i stresu wyeliminować do minimum.

[4] S. Chłopicki, *Kardiol. po Dyplomie*, vol. 4, no. 3, pp. 2–11, 2005.