

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Celowana inhibicja białek STAT jako nowa strategia terapeutyczna w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego.**

2. Czas trwania projektu: **10.06.2019 – 9.06.2024.**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **nadciśnienie, miażdżyca, inhibicja, zapalenia, STATTIC.**

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

~~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.

Choroby układu sercowo-naczyniowego, takie jak miażdżyca, stanowią główną przyczynę śmierci w państwach wysoko rozwiniętych. Progresja miażdżycy wiąże się z uszkodzeniem naczyń krwionośnych i rozwojem stanu zapalnego. W procesie tym kluczową rolę odgrywają czynniki regulujące stan zapalny, do których należą m.in. białka z rodziny aktywatorów transkrypcji i przekaźników sygnałów (STAT). Szczególnie ważnymi są białka STAT1, STAT2, STAT3, które zostały opisane jako potencjalne modulatory stanu zapalnego w komórkach odpornościowych oraz komórkach budujących naczynia krwionośne. Ostatnie doniesienia sugerują, że inhibicja szlaku sygnalizacyjnego białek STAT zachodząca wewnątrz złożeń miażdżycowych pozwoliłaby na zmniejszenie stanu zapalnego, a co za tym idzie, białka te stałyby się obiecującym celem potencjalnych strategii terapeutycznych. Wieloletnie badania pozwoliły na zidentyfikowanie wielu potencjalnych inhibitorów stanu zapalnego w miażdżycy.

Celem naszego projektu jest sprawdzenie działania inhibitorów białek STAT. Eksperymenty in silico, in vitro oraz ex vivo prowadzone na przestrzeni ostatnich 5 lat pozwoliły nam na zbadanie i wyselekcjonowanie najbardziej efektywnego inhibitora- STATTIC. Zastosowanie modeli zwierzęcych, w tym mysich modeli miażdżycowych pozwoli nam na szersze zbadanie efektywności inhibitorów STAT. Zabiegi na mysich modelach miażdżycowych zostaną przeprowadzone w znieczuleniu ogólnym, jednak mogą one wywoływać niepożądane skutki takie jak: ogólne osłabienie, zawroty głowy, reakcję

uczuleniową, zaczerwienie skóry w okolicy rany czy krwawieniem z rany. Opieka pooperacyjna od momentu operacji aż do planowanego uśmiercenia pozwoli eksperymentatorom na zaobserwowanie wyżej wymienionych szkód, które mogą być źródłem cierpienia i ewentualne podjęcie decyzji o przedwczesnym uśmierceniu myszy. Oczekuje się, że wyniki uzyskane w badaniach pozwolą na lepsze poznanie mechanizmów rozwoju miażdżycy oraz na zaproponowanie potencjalnej strategii terapeutycznej chorób układu krążenia jakim jest zastosowanie inhibitorów białek STAT.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa- 70 osobników

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

ZASTĄPIENIE:

Przed podjęciem decyzji o wykorzystaniu zwierząt w planowanych doświadczeniach, dokonano szczegółowego przeglądu dostępnej literatury naukowej dotyczącej inhibicji szlaku sygnałowego białek STAT w terapii chorób układu sercowo-naczyniowego z zastosowaniem modeli komórkowych i zwierzęcych. Wykorzystano do tego bazy danych jak: PUBMED, EBSCO oraz Web of Science. Przeanalizowano wszystkie możliwości wykorzystania niższych organizmów jak *S. cerevisiae*, *C. elegans*, czy *D. melanogaster*, które mogłyby stanowić alternatywę dla ssaków. Przed przystąpieniem do badań na zwierzętach, inhibitory białek STAT zostały sprawdzone w badaniach *in silico*, *in vitro* i *ex vivo*. Związki zablokowały migrację komórek, adhezję leukocytów do komórek śródbłonna naczyniowego, które są kluczowymi elementami rozwoju miażdżycy. Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że zastosowanie inhibitorów pan-STAT jest obiecującą strategią leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego (Plens-Gałaska et al., 2018). Dzięki powyższym badaniom liczba zwierząt biorących udział w badaniu mogła zostać mocno zredukowana. Jednakże powstawanie złożeń miażdżycowych wewnątrz ścian naczyń krwionośnych i rozwój miażdżycy są skomplikowanymi procesami zależnymi od wielu czynników i wpływającymi na różne rodzaje komórek. Na powstawanie złożeń wpływ mają takie czynniki jak ciśnienie i przepływ krwi w miejscu ich powstawania, co jest niemożliwe do odtworzenia w badaniach z wykorzystaniem linii komórkowych. Stąd istnieje duża konieczność zastosowania badań *in vivo* dla dalszego poznania i zrozumienia działania białek STAT w miażdżycy, ich wpływu na rozwój choroby. Tego rodzaju badania pozwolą na zaproponowanie potencjalnych strategii terapeutycznych chorób układu sercowo-naczyniowego.

Badania nad inhibitorami białek STAT prowadzone w naszej grupie badawczej wykazały że związki te mogą zostać użyte do inhibicji: migracji komórek śródbłonna (EC), adhezji leukocytów do komórek EC, upośledzenia kurczliwości naczyń (procesy wywołane stanem zapalnym towarzyszącym rozwojowi miażdżycy) (Plens-Gałaska et al., 2018; Johnson et al., 2013). Przeprowadzone badania pozwolą na zminimalizowanie ilości zwierząt biorących udział w badaniu, przy zachowaniu wielkości grup

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

zapewniającej istotność statystyczną.

Pomimo, że istnieją modele miażdżycowe na niższych kręgowcach (danio pręgowany; *Danio Rerio*; duża część szlaku białek STAT nie została poznana w tym modelu zwierzęcym. (Hou et al., 2002[13]). Dlatego też zastosowanie ich w prezentowanym projekcie badawczym nie zapewniłoby wiarygodnych i miarodajnych wyników, udzielających jasnej odpowiedzi na postawione pytania. Eksperymenty prowadzone będą do momentu osiągnięcia poziomu istotności statystycznej- pozwoli to na ograniczenie ilości zwierząt biorących udział w eksperymencie.

OGRANICZENIE

Planując eksperyment dążono do zmniejszenia do niezbędnego minimum liczby zwierząt użytych w projekcie. Proponowane grupy badane reprezentujące oba mysie modele oraz dobrze przemyślane grupy kontrolne zostały zaplanowane tak, by jak najbardziej ograniczyć dodatkowe wykorzystanie zwierząt typu WT stanowiących często stosowane grupy kontrolne. Liczba zwierząt na grupę została określona na podstawie wyliczeń statystycznych (analiza G-power) tak, by można było przeprowadzić racjonalne analizy statystyczne, bez narażania na stres zbyt dużej liczby osobników. Pozwoliło to na stworzenie możliwie jak najmniejszej grupy zwierząt przy zachowaniu istotności statystycznej badań.

Ze względu na fakt, iż niektóre przewidziane w projekcie zabiegi przeprowadzane zostaną na organizmie żywym w znieczuleniu ogólnym, mogą one wywoływać niepożądane skutki takie jak: ogólne osłabienie, zawroty głowy, apatie, reakcje uczuleniową na zastosowane leki, zaczerwienienie skóry głowy w okolicy rany, zakażenie mogące objawiać się powstaniem ropienia i podwyższoną temperaturą ciała, czy krwawieniem rany. Opieka pooperacyjna od momentu operacji aż do planowanego uśmiercenia pozwoli eksperymentatorom na zaobserwowanie wyżej wymienionych szkód, które mogą być źródłem cierpienia i ewentualne podjęcie decyzji o przedwczesnym uśmierceniu myszy.

UDOSKONALENIE:

Spełniając zasadę udoskonalenia, nasze doświadczenia zostały zaplanowane tak, by maksymalnie ograniczyć dyskomfort zwierząt. Podczas realizacji zaplanowanych procedur myszy będą utrzymywane w warunkach laboratoryjnych odpowiednich dla tego gatunku. W klatkach zastosowane zostaną elementy wzbogacające środowisko bytowania jak: papierowe tulejki, materiał do gniazdowania i zgryzania. Zastosowanie tego typu urozmaiceń środowiska poszerzy zakres czynności, jakie mogą wykonywać zwierzęta redukując stres.

Wybrane do doświadczeń mysie modele miażdżycowe są od wielu lat wykorzystywane w badaniach dzięki czemu zostały zoptymalizowane co obecnie pozwala na zminimalizowanie stresu i dyskomfortu myszy podczas wykonywanych procedur. Posiadane doświadczenie członków zespołu badawczego, umożliwi przeprowadzenie wymienionych czynności sprawnie i szybko, przez co zwierzęta objęte procedurami nie będą narażone na stres czy ból.

Podczas aplikacji pompy osmotycznej mysz zostanie pozbawiona sierści za pomocą kremu depilującego lub golarki, a nie ostrza skalpela czy brzytwy. Rana zostanie zaszyta nićmi rozpuszczalnymi. Mysz będzie przebywać na macie grzewczej, by zapobiec hipotermii i będzie kontrolowana temperatura za pomocą rektalnego termometru. W trakcie operacji na oczy zostanie nałożony lubrykant oraz podana zostanie analgezja (w postaci podskórnej iniekcji niesterydowego leku przeciwzapalnego buprenorfina), by czas pooperacyjny był bezbolesny. Po wybudzeniu mysz będzie miała dostęp do jedzenia i picia na płytce na położonej na ściółce, by nie musiała wstawać oraz klatka umieszczona będzie na regale grzewczym.

Pobrania krwi przeprowadzimy metodą która pozwala na zmniejszenie dyskomfortu, a wybór punktów czasowych (3 pobrania w ciągu 8 tygodni) umożliwia monitoring repopulacji przy ograniczeniu do minimum liczby pobrań.

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.