

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu: **IDENTYFIKACJA POPULACJI NEURONÓW KLUCZOWYCH DLA ROZWINIĘCIA OTYŁOŚCI U MYSZY Z DYSFUNKCJĄ GENU DICER.**”

Czas trwania projektu: 3 lata

Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **miRNA, otyłość, AgRP/NPY, neuropeptydomika**

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.

Otyłość, jako zjawisko globalne, jest jedną z czołowych przyczyn śmiertelności i zapadalności na inne, współtowarzyszące jej choroby. Jej etiologia ma najczęściej charakter wieloczynnikowy, co utrudnia leczenie i wymaga systemowego podejścia. Poznanie jednego z możliwych kierunków rozwoju otyłości daje perspektywę na stworzenie celowanych rozwiązań terapeutycznych.

Opisywany projekt badawczy koncentruje się na roli neuronalnych microRNA w kształtowaniu procesu otyłości. Są to małe, niekodujące cząsteczki RNA które biorą udział w procesie regulacji translacji. Od ich obecności i działania zależy balans na przykład między czynnikami stymulującymi i hamującymi pobór pokarmu oraz regulującymi funkcje metaboliczne. Przewodnim celem opisywanego projektu jest poznanie i opisanie mechanizmu zależnej od microRNA otyłości: identyfikacja odpowiedzialnej za powstanie fenotypu grupy neuronów, kluczowego genu oraz profilu neuropeptydów potencjalnie regulowanych przez cząsteczki microRNA.

Realizacja tego projektu pozwoliłaby nam zrozumieć aspekty związane z regulacją czynników determinujących otyłość na poziomie neuronalnych microRNA.

W trakcie przeprowadzanych doświadczeń zwierzęta mogą doświadczyć stresu związanego z dootrzewnową iniekcją zarówno czynnika wywołującego rekombinację w modelu myszy CreERT2, jak i środków usypiających czy przeciwbólowych. Ponadto część zwierząt poddana będzie zabiegom operacyjnym (iniekcji rAAVs do jądra łukowatego w mózgu). Proces rekonwalescencji przebiegać będzie w pojedynczych klatkach co również może wpłynąć na poczucie dyskomfortu u badanych zwierząt.

Przeprowadzenie opisywanych doświadczeń pozwoli nam w pierwszej kolejności ustalić optymalny wzorzec eksperymentalny niezbędny do rozwinięcia i uszczegółowienia badań nad otyłością. Realizacja projektu ma potencjał na usystematyzowanie wiedzy na temat roli neuronalnych microRNA w rozwoju otyłości, udziału określonej grupy struktur w mózgu, neuronów i genów, które wydają się być kluczowe w tym procesie.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Sumaryczna liczba myszy (wszystkich 7 linii; grupa eksperymentalna oraz kontrolna): **2520 myszy**

Liczba myszy z podziałem na poszczególne linie (grupa eksperymentalna oraz kontrolna): linia transgeniczna AgRP-Cre::Cas9: **360 myszy**

linia transgeniczna Vglut2-Cre::Cas9: **360 myszy** linia transgeniczna

Dicer::AgRP-CaMKCreERT2: **360 myszy** linia transgeniczna

GadTo::DicerCaMKCreERT2: **360 myszy** linia transgeniczna Vglut2-

GFP::DicerCaMKCreERT2: **360 myszy** linia transgeniczna

GadTo::NPY-GFP::DierCaMKCreERT2: **360 myszy** linia transgeniczna

NPY-GFP::DicerCaMKCreERT2: **360 myszy**

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED; Google Scholar; Web of Science

Wykorzystałam słowa kluczowe (i ich kombinacje): miRNA, otyłość, AgRP/NPY, neuropeptydomika

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury , stwierdzam, że:

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na sformułowanie, że cząsteczki microRNA biorą czynny udział w regulacji metabolizmu. Ponadto wiadomo, że neurony AgRP/NPY stymulują pobór pokarmu poprzez syntezę i wydzielanie peptydów o charakterze oreksygenicznym. To z kolei w określonej konfiguracji molekularnych mechanizmów prowadzić może do rozwoju otyłości.

B. Brak jest danych dotyczących możliwości wykorzystania innego (niż myszy lub szczurzy) modelu do przeprowadzenia proponowanych przez mnie badań w kontekście otyłości i neuronalnej regulacji metabolizmu. Nie ma, jak dotąd, prac, które opisywałyby microRNA- zależną regulację otyłości z naciskiem na rolę podwzgórzowych neuronów AgRP/NPY, przy jednoczesnym opisie profilu neuropeptydów, które mogą być zaangażowane w ten proces.

Uzyskanie danych z proponowanego modelu pozwoli na:

A. Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku scharakteryzowania roli neuronów AgRP/NPY w rozwinięciu microRNA-zależnej otyłości.

B. Zastosowanie uzyskanej wiedzy w formułowaniu możliwych, przyszłych kierunków terapeutycznych wskazując mechanizm działania microRNA-zależnej regulacji otyłości.

Głównym celem opisywanego projektu jest poznanie i opisanie mechanizmu zależnej od microRNA otyłości: identyfikacja odpowiedzialnej za powstanie fenotypu grupy neuronów, kluczowego genu oraz profilu neuropeptydów potencjalnie regulowanych przez cząsteczki microRNA.

Zachowując wprowadzoną w 1959 roku, przez W. Russella i R. Burcha zasadę 3R uzasadniam podjęte we wniosku wybory dotyczące tematyki, modelu, procedur:

ZASTĄPIENIE

Ze względu na cel badawczy, konieczność obserwowania złożonych zjawisk metabolicznych/fizjologicznych (uwzględniających współdziałanie wielu narządów, gruczołów i tkanek) nie można zastąpić proponowanego modelu mysiego zwierzętami o niższym stopniu rozwoju ewolucyjnego, ani też metodami in vitro (hodowle tkankowe, komórkowe).

OGRANICZENIE

Spełniając “zasadę ograniczenia” zredukowana do koniecznego minimum została liczba zwierząt planowanych do wykorzystania w eksperymencie. Wielkość grupy pozwoli na wiarygodną analizę statystyczną i weryfikację postawionego problemu badawczego.

UDOSKONALENIE

Nadrzędnym celem jest ograniczenie cierpienia i stresu zwierząt, związanego z przeprowadzanymi procedurami. Czynniki, które mogą być dla zwierząt, możliwym do zredukowania, źródłem dyskomfortu, to zabieg operacyjny oraz odseparowanie od stada. Udoskonaleniem w tej materii będzie podawanie odpowiednich, zgodnych z powszechnie przyjętymi normami weterynaryjnymi, środków usypiających (Ketamina/Medetomidyna), przeciwzapalnych i uśmierzających ból śród- i pooperacyjny (Butomidor, Tolfine). Ponadto zwierzęta farmakologiczne wyprowadzane z narkozy (Revertor) przetrzymywane będą do czasu całkowitego wybudzenia na płycie grzejnej. Następnie odkładane będą do klatek o wzbogaconym środowisku, umożliwiającym budowanie gniazda (chusteczki, skompresowane bawełniane płatki/wałeczki) i zabawę (drewniane kołeczki). Dodatkowo klatki, w których zwierzęta będą przetrzymywane mają transparentne ścianki, co umożliwi kontakt wzrokowy z innymi osobnikami. Kolejnym działaniem zmniejszającym stres zwierząt będzie przestrzeganie ograniczonej, do eksperymentatora i opiekuna, liczby osób pracujących z badanymi zwierzętami.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną

NIE