

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu . Wyprowadzenie linii myszy z mutacją w genie *GPR39* przy pomocy metody CRISPR/Cas9

2. Czas trwania projektu 20.02.2019-20.02.2022

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) padaczka, drgawki, GPR39, receptor, cynk

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.

Celem proponowanego doświadczenia jest wyprowadzenie linii myszy z delecją genu *GPR39*.

Padaczka należy do najczęstszych chorób neurologicznych. Najnowsze dane wskazują, że choruje na nią ponad 65 milionów osób na świecie, a liczbę nowych zachorowań szacuje się na 2,4 miliona/rok. Około 30% chorych cierpi na padaczkę lekooporną, na którą nie działają żadne z dostępnych leków. Stąd opracowanie nowych leków przeciwpadaczkowych jest niezwykle istotną kwestią w kontekście zdrowia publicznego.

Receptor GPR39 należy do nadrodziny receptorów związanych z białkami G, które stanowią cel dla ponad jednej trzeciej spośród stosowanych obecnie leków. Wyniki badań *in vitro* wskazują, że receptor ten może mieć kluczowe znaczenie dla utrzymania równowagi pomiędzy pobudzającym układem glutaminianergicznym a hamującym układem GABA-ergicznym, do zachwiania której dochodzi w chorobach ośrodkowego układu nerwowego, m.in. w padaczce.

Podstawowym celem projektu jest stworzenie modelu do testowania nowych potencjalnych leków przeciwdrgawkowych. W proponowanym wniosku prosimy o zgodę na wyprowadzenie linii myszy z mutacją w genie *GPR39* w mieszanym tle genetycznym. Po skutecznym wyprowadzeniu tej linii poprosimy o zgodę na przeprowadzenie doświadczenia w celu określenia podatności na drgawki ostre wywołane bodźcem elektrycznym u myszy z tą mutacją oraz wpływu tej mutacji na przebieg epileptogenezy. Wyprowadzenie linii GPR39 KO, a w dalszej kolejności przeprowadzenie planowanych doświadczeń, przyczyni się wyjaśnienia roli GPR39 w zaburzeniach drgawkowych oraz może doprowadzić do wskazania nowej strategii terapeutycznej.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mus musculus, samice F1(C57BL/6/TarxCBA/Tar) – 16

Mus musculus, samce F1(C57BL/6/TarxCBA/Tar) – 2

Łącznie 18 myszy.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam/sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych:

Pubmed, Google Scholar, ScienceDirect, Ebsco

Wykorzystałam/em słowa kluczowe: GPR39 knockout, seizures, epilepsy, genetic background animal models epilepsy, genetic background knockout epilepsy

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

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: receptor GPR39 jest jednym z najbardziej obiecujących celów dla leków przeciwpadaczkowych nowej generacji. Linia GPR39 KO jest kluczowa dla zbadania efektu terapeutycznego selektywnych agonistów tego receptora. Tło genetyczne myszy ma niewrażliwe znaczenie dla eksperymentów padaczkowych.

B. Brak jest danych dotyczących: nie jest dostępna linia myszy GPR39 KO umożliwiające przeprowadzenie ostrego testu drgawkowego, który jest niezbędny do potencjalnej implementacji nowych leków. Nie jest znany wpływ związku TC-G 1008 na hamowanie występowania drgawek w organizmach ssaczych.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

- A. Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku:** poznanie dokładnej roli receptora GPR39 w przebiegu epileptogenezy.
- B. Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na:** rozwoju związków z grupy agonistów/antagonistów GPR39 jako kandydatów na leki przeciwdrgawkowe/przeciwpadaczkowe

Proponowane doświadczenie zostały zaplanowane z uwzględnieniem zasady 3R.

Zastąpienie:

Nie można zastosować metody badawczej zapewniającej osiągnięcie celu niniejszego doświadczenia bez wykorzystania zwierząt doświadczalnych. W badaniach oceniających wpływ mutacji w genie na ośrodkowy układ nerwowy, w tym na próg drgawkowy, zastąpienie zwierząt doświadczalnych innym materiałem doświadczalnym (np. hodowlą komórkową lub tkankową) jest niemożliwe. Dostępna literatura wskazuje, że myszy są najbardziej właściwym gatunkiem do takich doświadczeń. Badania z zakresu fizjologii mózgu nie są możliwe na zwierzętach bezkręgowych, ponieważ wykształcany u nich układ nerwowy (jeśli obecny) jest zbyt prosty i nie daje odniesienia do układu zwierząt kręgowych.

Ograniczenie:

Wedle naszej wiedzy jesteśmy pierwszym i jedynym zespołem w Polsce wyprowadzającym myszy transgeniczne metodą CRISPR-Cas9. Metoda ta pozwala na znaczne zmniejszenie liczby wykorzystanych zwierząt, w stosunku to klasycznej inżynierii genetycznej opierającej się o embrionalne komórki macierzyste. Modyfikacje wprowadzane są ze znacznie większą częstością oraz omijamy etap chimer. Zastosowanie innowacyjnej mieszaniny do iniekcji zwiększa częstość wprowadzanych modyfikacji, a tym samym zmniejsza liczbę myszy niezbędnych do wyprowadzenia linii transgenicznej. Używamy hybryd F1(C57BL/6/TarxCBA/Tar), które bardzo dobrze odpowiadają na stymulację hormonalną, dzięki czemu zmniejszamy liczbę niezbędnych dawczyń zarodków.

Udoskonalenie:

Zarodki będą nastrzykiwane przy użyciu wysokiej klasy mikroiniektora, a zabieg będzie wykonywany przez wytrenowany personel, dzięki czemu znacznie zwiększona będzie przeżywalność zarodków. Wszystkie myszy po operacjach otrzymują kompleksową ochronę przeciwbólową. Zastosowane będą innowacyjne mieszaniny reakcyjne wykazujące wysoką skuteczność wprowadzania mutacji. Użyte zostaną myszy w optymalnym dla przyszłych eksperymentów tle genetycznym.

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.