

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Wpływ diety o zróżnicowanym poziomie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych – omega6/3 na metabolizm wątroby myszy - analizy proteomiczne.
2. Czas trwania projektu: 09.2016– 09.2017
3. Słowa kluczowe: nutrigenomika, proteomika, omega-3, spektrometria mas, ekspresja genów
4. Cel projektu: Badania podstawowe

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.

Projekt zakłada przeprowadzenie analiz nutrigenomicznych – proteomicznych określających wpływ diety suplementowanej różnym poziomem nienasyconych kwasów tłuszczowych, w szczególności zawierającej zróżnicowany stosunek kwasów omega6/3 na metabolizm wątroby. W projekcie wykorzystany zostanie model myszy.

Główny nurt badań będzie dotyczył analiz profili proteomicznych, z wykorzystaniem zaawansowanej spektrometrii mas (MS Maldi TOF/TOF i MS ESI). Uzyskane wyniki pozwolą na weryfikację zmian w proteomie wątroby pod wpływem zróżnicowanej diety, wytypowanie białek funkcjonalnych oraz określenie wzajemnych relacji między nimi w oparciu o kompleksową analizę bioinformatyczną.

Punktem wyjścia/hipotezą dla planowanych badań jest założenie, że ekspresja genów biorących udział w procesach metabolicznych zachodzących w wątrobie jest regulowana w istotnym stopniu na poziomie translacji i post-translacyjnych modyfikacji białek.

Celem głównym projektu jest:

- kompleksowa analiza profilu białek ulegających ekspresji w wątrobie myszy w odpowiedzi na zróżnicowaną dietę;
- określenie wpływu nienasyconych kwasów omega-3 i omega-6 na profil białkowy wątroby myszy;
- zdefiniowanie białek funkcjonalnych powodujących kompleksowe zmiany w profilach białkowych wątroby i osocza krwi u myszy żywionych paszą ubogą i wzbogaconą w kwasy omega-3 i omega-6.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu zostanie użytych 100 myszy.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

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

EBSCO, PUBMED, AGRICOLA, Web of Science (JCR).

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

Wykorzystałem słowa kluczowe: nutrigenomika, proteomika, omega-3, spektrometria mas, ekspresja genów

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam, że brakuje wciąż kompleksowej informacji na temat systemowych zmian profili białkowych w wątrobie oraz regulacji ekspresji genów kodujących białka o zmienionym poziomie. W planowanym doświadczeniu wykorzystane zostaną zaawansowane techniki spektrometrii masowej do analizy proteomicznej, identyfikacji specyficznych zmian białkowych. Dla wytypowanych białek przeprowadzona będzie również weryfikacja poziomu ekspresji specyficznych transkryptów metodą real-time PCR. Wyniki zostaną opracowane bioinformatycznie dla zobrazowania systemowych zależności między białkami i genami je kodującymi.

Precyzyjne badania wymagają wystandaryzowanych danych, pod względem wieku, tła genetycznego, oraz standaryzacji dotyczącej diety, dlatego też mysz jako model zwierzęcy wydaje się być idealnym do badań podstawowych, które mogą być rozwijane i weryfikowane w przyszłości na dużych modelach zwierzęcych takich jak świnia.

Zastąpienie: Dokładne poznanie podłoża zmian metabolizmu wątroby oraz ich wpływu na funkcjonowanie organizmu wymaga zastosowania modelu in-vivo, ponieważ doświadczenia in-vitro z wykorzystaniem hepatocytów dają wybiórczy ograniczony obraz występujących zmian. Zastosowanie modelu mysiego jest w tym układzie najbardziej optymalnym rozwiązaniem, .. Należy dodać, że mysz jest typowym modelem zwierzęcym stosowanym w badaniach podstawowych, jest też punktem wyjścia dla badań na dużych modelach zwierzęcych lepiej odzwierciedlających metabolizm człowieka takich jak świnia, które mogą być planowane w przyszłości, i których zakres (liczba zwierząt) będzie wynikał z uzyskanych wcześniej wyników na modelu mysim.

Planując doświadczenie i przygotowując projekt badawczy, dokładnie sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: EBSCO, PUBMED, AGRICOLA, Web of Science (JCR). Istniejąca wiedza zgromadzona w bazach danych nie obejmuje złożoności problemu jakim jest kompleksowa zmiana metabolizmu wątroby w ujęciu proteomicznym. Ponadto, dla dokładności porównań niezbędna jest standaryzacja systemów utrzymania i diety. W porównaniach in-silico weryfikacja wyników zmian metabolicznych oraz związanych z tym zmian ekspresji genów i białek jest bardzo trudna, ponieważ wyniki pochodzą z różnych doświadczeń zawsze obciążone są błędem wynikającym z wpływu zróżnicowanego środowiska. Dlatego też, dla podniesienia wiarygodności badań wymagane są wystandaryzowane dane, zarówno pod względem wieku, tła genetycznego, jak i diety.

Ograniczenie: Założony plan badań był opracowywany z uwzględnieniem maksymalnego ograniczenia liczby zwierząt w doświadczeniu, jednocześnie uwzględniając minimalną liczbę zwierząt w grupie niezbędną dla wiarygodnego statystycznie wnioskowania a tym samym do potwierdzenia założonej hipotezy badawczej. Minimalną liczebność grupy oszacowano na podstawie danych literaturowych zakładając przewidywane wartości dotyczące średnich poziomów nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych w wątrobie.

Wielkość próby (30szt) oszacowano wg wzoru $n = Z_{1-\alpha/2} * p(1-p) / d^2$, gdzie: Z Standardowa zmienność przy 5% błędzie typu 1; p - oczekiwana proporcja wartości obserwacji w populacji, d dokładność szacowania na poziomie 0.05 <https://www.dssresearch.com/KnowledgeCenter/toolkitcalculators/samplesizecalculators.aspx>.

Prezentowany projekt zakłada głównie badania proteomu wątroby, jednakże w trakcie doświadczenia zostanie pobrany materiał obejmujący inne tkanki i organy, które będą wykorzystywane w dalszych analizach molekularnych transkryptomicznych i proteomicznych w przyszłych projektach. Tak więc przedstawione doświadczenie na zwierzętach laboratoryjnych ograniczy konieczność zakładania podobnych doświadczeń na zwierzętach laboratoryjnych w przyszłości.

Udoskonalenie: W ramach doświadczenia nie przewiduje się stosowania inwazyjnych zabiegów, które mogłyby wpływać na dobrostan zwierząt, ponadto zastosowane zostaną elementy urozmaiconego środowiska. Prezentowane badania mają charakter badań nutrigenomicznych określających szerokie spektrum oddziaływań żywienia na „globalną” ekspresję genów/ białek w wątrobie. Dotychczas prowadzone badania ze względu na możliwości analityczne obejmowały w większości przypadków jedynie wybiórcze analizy określonych białek bez analizy tła genetycznego – odzwierciedlonego w szeroko ujętych profilach proteomicznych. W planowanym doświadczeniu przewidziane są wielkoskalowe analizy proteomiczne. Zastosowane zostaną najnowsze wysokoczułe systemy analiz spektrometrii masowej (Maldi Tof/Tof i Ion Trap). Połączenie nowoczesnych technologii analitycznych z kompleksową analizą bioinformatyczną umożliwi bardziej precyzyjne opisanie systemowych zależności między białkami oraz genami je kodującymi. Należy podkreślić, że w prezentowanych badaniach jednym z ważnych celów jest określenie poziomu zmian potranslacyjnych białek, tego typu analizy dotychczas również miały ograniczoną skalę. Możliwość realizacji założonych badań wynika z faktu stworzenia w IGHZ PAN nowoczesnego Laboratorium Proteomiki, wyposażonego w wysokoczułe systemy spektrometrów mas Nano LC MALDI-TOF MS/MS (ultrafleXtreme BrukerTM) i UHPLC ESI MS (amaZon speed ETD -BrukerTM).

Utworzenie, transformacja i przechowywanie bazy danych jest istotnym etapem planowanego projektu, ponieważ tak pozyskana cenna baza danych będzie stanowić obszerne źródło wiedzy nie tylko w obecnym projekcie ale w dalszych badaniach, w przyszłych projektach naukowych zarówno krajowych jak i w ramach projektów europejskich.