

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Wyprowadzenie linii myszy ekspresujących rekombinazę CRE pod promotorem genu Nefh

2. Czas trwania projektu 1.06.2020 – 1.06.2022

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) bodźce bólowe, neurofilamenty, gen reporterowy, CRE

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.

Obwodowe neurony somatosensoryczne klasycznie klasyfikowane są na podstawie prędkości, z jaką przewodzą impulsy nerwowe. Zgodnie z dogmatem sygnał bólowy przekazywany jest znacznie wolniej niż dotyk. Szybkie przewodnictwo neuronalne jest możliwe dzięki silnie zmielinizowanym neuronom o dużej średnicy (A β). Funkcje sensoryczne, które nie wymagają szybkiego transferu informacji, takie jak temperatura i swędzenie, są sygnalizowane przez cienkomielinizowane (A δ) lub niemielinizowane (C) neurony. Rodzi to jednak wątpliwości – dlaczego odczuwanie bólu miałoby być mniej istotne niż odczuwanie zimna czy ciepła?

Niedawno zidentyfikowana została nowa klasa neuronów, które reagują na bodźce bólowe, a ich prędkość przewodzenia jest równa neuronom dotykowym. Badania nad szybkim przewodzeniem bólu są bardzo istotne zwłaszcza pod kątem zrozumienia niewyjaśnionych dotąd mechanizmów bólu neuropatycznego, potencjalnie otwiera też drogę ku nowym celom terapeutycznym.

W przedstawionym projekcie prosimy o zgodę na wyprowadzenie linii myszy wyrażającą rekombinazę CRE pod promotorem genu Nefh. Wyprowadzenie myszy Nefh-CRE jest częścią projektu mającego na celu scharakteryzowanie różnych populacji mielinowanych nocyceptorów („włókien bólu”). Gen Nefh koduje białko neurofilamentowe i jest ekspresjonowany wyłącznie w mielinizowanych neuronach czuciowych.

Po wyprowadzeniu myszy Nefh-CRE będą skrzyżowane z różnymi dostępnymi liniami LoxP, między innymi:

- liniami reporterowymi wyrażającymi białka fluorescencyjne – dzięki temu wyznakowana zostanie wyłącznie populacja komórek wyrażających gen Nefh, a więc mielinowanych nocyceptorów
- myszami z warunkową delecją niektórych genów – badany gen zostanie usunięty wyłącznie w komórkach ekspresjonujących Nefh

W tym momencie prosimy wyłącznie o zgodę na wyprowadzenie linii Nefh-CRE, o zgodę na następne doświadczenia będziemy występować dopiero po skutecznym otrzymaniu jej.

W doświadczeniach wykorzystane zostaną zygoty myszy, izolowane z układu rozrodczego samic, stymulowanych hormonalnie i uśmiercanych. Zastosowane hormony, indukujące wzrost pęcherzyków jajnikowych i owulację, są substancjami niedrażniącymi. Oba zastrzyki będą wykonywane w dolnym rejonie brzucha, w miejscu, które nie jest specjalnie uwrażliwione na ból, zatem źródłem bólu będzie jedynie ukłucie igłą. W celu uzyskania zwierząt transgenicznych zarodki będą transplantowane do jajowodów samic biorczyń, pokrytych uprzednio przez samce poddane wazektomii. Przeszczepianie zarodków u samic i wazektomia u samców będą wykonywane w znieczuleniu ogólnym, a ewentualny ból pooperacyjny będzie uśmierzany środkami przeciwbólowymi.

Samice-biorczynie nie będą uśmiercane, po odchowaniu młodych będą hotelowane lub (jeśli lekarz weterynarii wyrazi zgodę) wykorzystywane w innych doświadczeniach. Wazektomowane samce będą utrzymywane w zwierzętarni do naturalnej śmierci lub zaobserwowania niepokojących objawów; będą wykorzystywane do krycia samic-biorczyń w tym i kolejnych doświadczeniach (procedury hodowlane). Samice-dawczynie, w celu izolacji zarodków, będą uśmiercane przez dyslokację kręgow szyjnych.

6.LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mus musculus, samice C57BL6/J/cmdb – 16 osobników

Mus musculus, samice F1(C57BL6/J /cmdb x BALB/ccmdb) – 7 osobników

Mus musculus, samce F1(C57BL6/J /cmdb x BALB/ccmdb) – 5 osobników

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

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

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

Pubmed, Google Scholar, ScienceDirect, Ebsco, OMIM

Wykorzystałam/em słowa kluczowe: Nefh, Nefh-CRE, nociceptor, pain, velocity

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: zidentyfikowano grupę receptorów, które przewodzą bodziec bólowy dużo szybciej niż dotąd sądzono. *Nefh* jest genem kodującym białko będące ciężką podjednostką neurofilamentów, jest specyficznym eksprymowane w interesującej nas populacji receptorów.

B. Brak jest danych dotyczących: nie istnieje linia myszy indukowalnie eksprymująca rekombinazę Cre pod kontrolą endogennego promotora dla genu *Nefh*

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku: Wyprowadzenie linii mysiej Nefh-CRE pozwoli na przeprowadzenie szeregu eksperymentów mających na celu scharakteryzowanie nowo odkrytej populacji nociceptorów odpowiedzialnych za szybkie przewodzenie bodźców bólowych.

Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na:

Zrozumienie działania receptorów szybko przewodzących bodźce bólowe może w przyszłości pozwolić na opisanie mechanizmu działania dotychczas niewyjaśnionego bólu neuropatycznego oraz zaproponowanie nowych podejść terapeutycznych.

Zastąpienie: Ze względu na specyfikę działania układu nerwowego u ssaków, nie jest możliwe odejście od użycia modelu zwierzęcego.

Ograniczenie: Metoda CRISPR-Cas9 pozwala na znaczne zmniejszenie liczby wykorzystanych zwierząt, w stosunku to klasycznej inżynierii genetycznej opierającej się o embrionalne komórki macierzyste. Dzięki zastosowaniu tej metody modyfikacje genetyczne wprowadzane są ze znacznie większą częstością oraz dodatkowo pozwala ona na pominięcie etapu tworzenia chimer. Zastosowanie innowacyjnej mieszaniny do iniekcji zwiększa częstość wprowadzanych modyfikacji, a tym samym zmniejsza liczbę myszy niezbędnych do wyprowadzenia linii transgenicznej.

Udoskonalenie: Zarodki będą nastrzykiwane przy użyciu wysokiej klasy mikroiniektora, a zabieg będzie wykonywany przez wytrenowany personel, dzięki czemu znacznie zwiększona będzie przeżywalność zarodków. Myszy będą utrzymywane w systemie IVC, co zwiększa ich dobrobyt. Wszystkie myszy po operacjach otrzymują kompleksową ochronę przeciwbólową.

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.