

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Wyprowadzenie linii myszy z delecjami genów RAGE oraz Diaph1 służących do badania patogenezy neuropatii cukrzycowej

2. Czas trwania projektu 2 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) neuropatia cukrzycowa, cukrzyca, stan zapalny, Diaph1, RAGE

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

Neuropatia cukrzycowa jest najczęstszym powikłaniem cukrzycy, jej objawy polegające na uszkodzeniu nerwów i zmniejszeniu zdolności motorycznych występują nawet u 25% chorych na cukrzycę. Liczbę osób cierpiących na neuropatię cukrzycową ocenia się na 130 milionów. Jest to przyczyna zdecydowanej większości amputacji kończyn niezwiązanych z nagłymi wypadkami.

Jak dotąd, pomimo intensywnych badań, nie udało się stworzyć spójnego obrazu przyczyn tej choroby. Obecnie uważa się, że zmiany neurodegeneracyjne wynikają z wielu nakładających się procesów, takich jak zwiększone zapalenie, zwiększony stres oksydacyjny, glikacja białek i upośledzenie transportu aksonalnego i wskazują na Diaph1 i RAGE jako potencjalne czynniki przyczyniające się do powstania neuropatii, a także potencjalne cele w leczeniu tego schorzenia. Diaph1 bierze udział w formowaniu cytoszkieletu, natomiast RAGE jest transmembranowym receptorem przeciwciał.

Celem proponowanego doświadczenia jest wyprowadzenie dwóch linii myszy z delecjami odpowiednio genu

*Diaph1* i *RAGE*. Proponowane doświadczenie obejmuje wyłącznie wyprowadzenie dwóch linii heterozygotycznych. Wnioski na kolejne doświadczenia z wykorzystaniem myszy z delecją *RAGE* i *Diaph1* oraz wyprowadzenie myszy z podwójną mutacją zostaną złożone po udanym wyprowadzeniu linii.

## 5. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mus musculus:

C57BL6/J/cmdb; samice – 18

F1(C57BL6/J /cmdb x BALB/ccmdb) samice – 8

F1(C57BL6/J /cmdb x BALB/ccmdb) samce – 2

Łącznie 28 myszy.

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

**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:** *Diaph1*, *RAGE*, mouse models, diabetic neuropathy

**Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:**

**A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:** neuropatia cukrzycowa jest bardzo poważnym problemem dotyczącym dużą część społeczeństwa, a jej przyczyny na poziomie molekularnym wciąż nie są określone. Linia z mutacją genu *RAGE* została wcześniej wyprowadzona w innym laboratorium, jednak niedawna publikacja wykazała, że ta **linia wykazuje duplikacje w obrębie jednego z chromosomów**, co sprawia, że duża część badań wykorzystujących ją przedstawia wyniki artefaktyczne, związane z nadekspresją kilku genów, a nie delecją *RAGE* (Bartling et al., 2019). Zgodnie z danymi dotyczącymi fenotypów myszy, myszy heterozygotyczne względem delecji genu *Diaph1* lub *RAGE* **nie będą wykazywały szkodliwego fenotypu.**

**B. Brak jest danych dotyczących:** nie istnieje linia z delecją *RAGE*, która mogłaby zostać użyta do doświadczeń, nie ma również linii z delecją *Diaph1* w tle genetycznym umożliwiającym późniejsze skrzyżowanie z wyprowadzoną przez nas linią z delecją *RAGE*.

**Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:**

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

**Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku:** wyprowadzenie linii myszy z delecjami RAGE i Diaph1 pozwoli na zbadanie poziomu ekspresji Diaph1, RAGE, białek cytoszkieletowych oraz markerów stresu zapalnego i oksydacyjnego na poziomie tkanek w określonych punktach czasowych w przebiegu schorzenia, natomiast w drugiej fazie przetestujemy naszą hipotezę w pierwotnych hodowlach komórkowych obserwując zmiany w strukturze i funkcjonowaniu neuronów w przebiegu eksperymentu. Uważamy, że podwójna rola Diaph1 - jako modulatora białek cytoszkieletu i partnera wiążącego RAGE, czyni tę cząsteczkę szczególnie interesującą w badaniach nad zmianami neuronalnymi związanymi z cukrzycą.

**Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na:**

Rozszyfrowanie dokładnej roli przekazywania sygnałów przez Diaph1 w neuropatii cukrzycowej może stać się kamieniem milowym w naszym podstawowym rozumieniu mechanizmów regulujących procesy neurozwyrodnieniowe, pomagając nam określić nieznane wcześniej molekularne powiązania między złożonymi szlakami sygnałowymi zaangażowanymi w dysfunkcję neuronalną u pacjentów z cukrzycą i stawiając pierwszy krok w kierunku skutecznej profilaktyki i zapobiegania tego i podobnych zaburzeń neurodegeneracyjnych.

**Zastąpienie:** Neuropatia cukrzycowa jest schorzeniem o złożonej etiologii, w którym zasadniczą rolę odgrywa poziom glukozy we krwi, stąd niemożliwe jest badanie jego patofizjologii bez użycia modelu zwierzęcego.

**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.

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 retrospektywną<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.

☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy ☐

TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

☒ **NIE**