

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Ekspresja systemu Galp, alarin i ich receptorów w układzie podwzgórzowo – przysadkowo - nadnerczowym oraz jego rola w regulacji wzrostu, różnicowania i czynności komórek kory nadnercza szczura (*Rattus Norvegicus*).**

2. Czas trwania projektu ... **01.01.2019 - 31.12.2021**.....

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) ... **nadnercza, oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowe, bioaktywne peptydy, endokrynologia doświadczalna**.....

4. 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.

Kortyzol oraz kortykosteron są to podstawowe hormony nadnerczy, będące ważnymi regulatorami wielu procesów fizjologicznych. Szczególnie istotna jest ich rola w modulacji stresu, procesów zapalnych, jak również w utrzymaniu prawidłowych stężeń glukozy. Sekrecja wspomnianych hormonów jest regulowana poprzez aktywację osi podwzgórzowo - przysadkowo - nadnerczowej (oś HPA), a aktywacja tej osi może zachodzić poprzez czynniki zewnętrzne np. stres lub bioaktywne białka produkowane przez inne narządy, m. in. galaninę. Nasza hipoteza badawcza zakłada, że również dwa inne peptydy, Galp i alarin, należące do rodziny białek galaniny mogą wpływać na funkcje osi HPA. Hipotezę tą wzmacniają wcześniejsze publikacje, gdzie wykazano iż podany dokomorowa alarin hamuje wydzielanie hormonu kortykotropowego (CRH) przez podwzgórze. Większość danych świadczy o oreksygennym działaniu Galp i peptydu alarin. Efekt ten zachodzi prawdopodobnie poprzez aktywację neuronów NPY - pozytywnych w jądrze łukowatym podwzgórza. Istnieją dane świadczące o wpływie

Galp i peptydu alarin na wydzielanie hormonów, przede wszystkim GnRH oraz LH. W związku z czym **celem proponowanych badań będzie odpowiedź na pytanie czy i w jaki sposób peptydy Galp i alarin wpływają na aktywność osi podwzgórzowo – przysadkowo - nadnerczowej (HPA) szczura oraz funkcje nadnerczy.** Doświadczenia planuje się wykonać na dojrzałych płciowo samcach szczurów (*Rattus norvegicus*) szczepu niekrewniaczego Wistar. Analiza interakcji Galp/alarin/oś HPA zostanie zbadana poprzez jednorazowe dootrzewnowe podanie roztworu z białkiem Galp/alarin oraz dodatkowych białek, tj. galaniny, inhibitora receptora Galr2, inhibitora receptora Ntrk2. Wyniki zostaną odniesione do odpowiedniej grupy kontrolnej negatywnej, a także grupy kontrolnej pozytywnej. Po 1 godzinie oraz 2 godzinach od podania badanych substancji, zwierzęta zostaną uśmiercone poprzez dekapitację. Krew zostanie pobrana do oznaczeń hormonalnych. Planuje się również pobranie nadnerczy, przysadki oraz podwzgórza celem wykonania analizy ilościowej ekspresji genów istotnych dla aktywacji osi HPA oraz ekspresji genu Galp, alarin, galanina oraz receptory: Galr2 i Ntrk2. Ze względu na formę doświadczenia (zastrzyki dootrzewnowe), zwierzęta będą narażone na ból i stres z tym związany. Zastrzyki podawane będą przez okres dwóch tygodni jako forma przyzwyczajania zwierząt do właściwej iniekcji. Jednak, ze względu na fakt, iż będą to zastrzyki dootrzewnowe, ból będzie krótkotrwały.

Jak dotychczas w literaturze niewiele jest danych dotyczących roli Galp/alarin w regulacji czynności osi HPA, w związku z czym nie wiadomo czy białko Galp/alarin wywiera bezpośredni wpływ na aktywność kory nadnercza, czy też jego rola polegałaby na aktywacji podwzgórza lub przysadki, co w konsekwencji doprowadziłoby do stymulacji wydzielania hormonów nadnerczy.

Podsumowując, celem niniejszego projektu jest poznanie oddziaływania na funkcje nadnerczy dwóch peptydów z rodziny galaniny, szczególnie w dobie rozwoju chorób związanych z otyłością, w której nadnercza odgrywają istotną rolę.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Szczur (*Rattus norvegicus*) dojrzały płciowo, samiec, stado niekrewniacze Wistar.

Łączna liczba zwierząt = 192 osobniki

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Zasada zastąpienia:

Nie istnieje alternatywna metoda badawcza zapewniająca osiągnięcie celów badawczych bez wykorzystania zwierząt, gdyż na obecnym stadium wiedzy nie są znane modele, które odzwierciedlałyby interakcje zachodzące w obrębie osi HPA w warunkach *in vitro*. Odtworzenie specyfiki interakcji układu nerwowego oraz gruczołu nadnerczowego w ramach osi HPA jest obecnie niemożliwe do zastąpienia alternatywnymi metodami.

Potencjalne wykorzystanie samych doświadczeń *in vitro* nie przyniesie oczekiwanego rezultatu nie

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

pozwoili na pełne wyciągnięcie wniosków na podstawie celów zawartych w projekcie. Doświadczenia in vitro będą stanowiły jednak silne podparcie dla uzyskanych wyników z doświadczeń proponowanych w powyższym wniosku.

Większość dotychczas prowadzonych badań dotyczących osi wpływu osi HPA opartych jest na wykorzystaniu szczurów. Jest to podyktowane znaczącym podobieństwem reakcji organizmów tych zwierząt i ludzi oraz z uwagi na dostępność licznych nowoczesnych narzędzi badawczych (np. PCR, ELISA, mikromacierze ekspresyjne)

Zasada ograniczenia:

Zrezygnowano z prowadzenia grupy zwierząt z jednoczesnym podaniem Galp/alarin + ACTH. Całe doświadczenie ograniczono do wykorzystania tylko jednego stężenia podawanych peptydów oraz ACTH.

Zasada udoskonalenia:

Zastrzyki wykonywane są przez operatorów posiadających ponad 10 letnie doświadczenie w wykonywaniu proponowanych procedur.

W trakcie przeprowadzania doświadczeń będziemy dążyli do ograniczenia do minimum niekorzystnych skutków i odczuć zwierząt, jest to istotne nie tylko ze względu na dobrostan zwierząt, ale także ze względu specyfikę aktywacji osi HPA poprzez czynniki stresogenne. Zaplanowane procedury eksperymentalne będą wykonywane sprawnie i precyzyjnie przez grupę doświadczonych pracowników, co z powinno ograniczyć stres badanych zwierząt.

Celem poprawy warunków przeprowadzanych doświadczeń podjęto decyzje o przeprowadzaniu doświadczeń w ramach zwierzętarni CZT, której zaplecze aparaturowe wpłynie na poprawę warunków bytowych badanych zwierząt. Zwierzęta będą przebywały w normatywnych, przezroczystych klatkach na regałach klatkowych w standardzie IVC - indywidualnie wentylowane klatki z 54 krotną wymianą powietrza w klatce na godzinę, wyposażonym w filtr zewnętrzny (wcześniej przeprowadzano doświadczenia w kategorii konwencjonalnej CV-1 z wymianą powietrza na poziomie 15 wymian/godzina).

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.