

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: ***Porównanie poziomu neurotransmiterów u myszy dzikich i w modelu wyciszenia transportera SAT1 przy wykorzystaniu metody jednoczesnej mikrodializy jelita oraz mózgu u zwierząt swobodnie poruszających się***

2. Czas trwania projektu **17 miesięcy**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) mikrodializa jelita, mózgu, SAT1, GABA,

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.

Oś jelitowo-mózgowa jest systemem sygnalizacji biochemicznej pomiędzy przewodem pokarmowym a układem nerwowym. Niektóre badania kliniczne sugerują zależność występowania niektórych rodzin bakterii w jelicie z rozwojem choroby Parkinsona i Alzheimera. Próby wyjaśnienia mechanizmu działania drobnoustrojów na układ nerwowy są niejednoznaczne i obejmują działanie peptydów syntetyzowanych przez bakterie, które mogą wpływać na działanie układu nerwowego.

Mikrodializa jelita jest techniką umożliwiającą pobranie reprezentatywnych, wyselekcjonowanych ze względu na wielkość cząsteczki próbek z wybranej części przewodu pokarmowego. Uzyskane w ten sposób dializaty można poddać analizie chromatograficznej i oznaczyć stężenie związków np.

neurotransmiterów (glutamina, GABA, tryptofanu). Jednoczesne przeprowadzenie mikrodializy jelita oraz mózgu u myszy umożliwiłoby symultaniczną obserwację zmian stężeń związków małocząsteczkowych w obu składowych osi jelitowo-mózgowej.

W wielu schorzeniach związanych z zaburzeniami neurotransmisji uwagę zwraca się na nieprawidłową stymulację receptora GABA-ergicznego. Ważnym czynnikiem, który może wpływać na pracę tego układu jest neuronalny transporter SAT1, dostarczający glutaminę będącą substratem do syntezy m.in. GABA. Białko to potencjalnie może odgrywać istotną rolę w patogenezie wielu chorób, w tym przewlekłej encefalopatii wątrobowej czy depresji. Przeprowadzenie mikrodializy na grupie myszy ze wyciszonym białkiem SAT1 (model depresji) wykaże wpływ deficytu tego transportera na poziom aminokwasów zarówno w mózgu jak i jelicie zwierząt. Zapewni to nowatorskie podejście do badań nad osią jelitowo-mózgową w schorzeniach takich jak np. depresja.

Szkody dla zwierzęcia, które wynikają z jednoczesnej mikrodializy mózgu i jelita to ból spowodowany zastrzykami i interwencją chirurgiczną, ból wywołany raną pooperacyjną i obecnością szwów, dyskomfort spowodowany obecnością wężyków pod skórą zwierzęcia i śmierć jako szkoda ostateczna.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

12 myszy C57Bl/6J, samców oraz 12 Myszy C57BL/6J samców (szczep TgH(flSAT1)xTgH(Cre-ERT) (SAT1-KO)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując przedkładany projekt sprawdzono stan istniejącej wiedzy w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych PUBMED, SCOPUS i Google Scholar wykorzystując słowa kluczowe: Gut/colon microdialysis, brain/cortex microdialysis, Gut-brain axis, SAT1, animal models.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że: oś jelitowo-mózgowa, jako system sygnalizacji biochemicznej pomiędzy przewodem pokarmowym a układem nerwowym jest łączony z

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

rozwojem wielu zaburzeń neurodegeneracyjnych, od choroby Parkinsona (PD) i choroby Alzheimera (AD), po stwardnienie rozsiane i depresję czy otyłość. Choć dostępne są badania kliniczne sugerujące zależność występowania niektórych rodzin bakterii w jelicie z rozwojem PD i AD to dotyczą one niewielkich grup badanych i opierały się na pobieraniu próbek kału. Próby wyjaśnienia mechanizmu działania drobnoustrojów na układ nerwowy nie są jednoznaczne i obejmują działanie neuroaktywnych peptydów syntetyzowanych przez bakterie, metabolitów, które mogą obejmować neuroprzekąźniki i neuromodulatory, a także przez mediatory zapalne uwalniane lokalnie lub w wątrobie, które mogą pośredniczyć w neuro-zapaleniu.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu zapewni nowatorskie podejście do badań nad osią jelitowo-mózgową w schorzeniach takich jak depresja i otyłość oraz wykaże wpływ deficytu transportera SAT1 na profil aminokwasów w jelicie i korze czołowej myszy w dwóch punktach czasowych.

Po przeszukaniu baz danych dotyczących metod alternatywnych ograniczających liczbę zwierząt bądź całkowicie je wykluczających, postanowiono zrealizować plan badawczy z wykorzystaniem najmniejszej z możliwych liczby zwierząt, która zapewni osiągnięcie celu badawczego i statystycznego, ze szczególną dbałością o stosowanie zasad 3R.

Planując doświadczenia, kierowano się zasadą 3R (ang. replacement, reduction, refinement), dbając o polepszenie bytu i humanitarne traktowanie zwierząt doświadczalnych.

Replacement (zastąpienie)

Na etapie planowania projektu badawczego przeszukano bazy danych pod kątem metod alternatywnych, ograniczających liczbę zwierząt, bądź całkowicie je wykluczających. Badanie działania osi jelitowo-mózgowej nie pozwala na wykorzystanie organizmów prostszych lub ograniczenie się wyłącznie do hodowli komórkowych. Badanie mechanizmów i potencjalnych terapii depresji u człowieka niesie ze sobą konieczność użycia gryzoni jako organizmów modelowych. Ponadto najwyższy stopień złożoności układu nerwowego wyklucza zastosowanie hodowli komórek pierwotnych, czy tym bardziej linii komórkowych.

Reduction (redukcja)

Wobec braku odpowiednich modeli nie-zwierzęcych postanowiono zrealizować plan badawczy

z wykorzystaniem najmniejszej z możliwych liczby zwierząt, która zapewni osiągnięcie celu badawczego i statystycznego. Przewidziano zastosowanie czułych i wiarygodnych technik do badania stężeń aminokwasów (HPLC) oraz wysokiej klasy aparatury do mikrodializy, w celu zminimalizowania rozrzutu w próbach badawczych, co zmniejsza liczbę zwierząt niezbędnych do uzyskania wymaganej liczby powtórzeń. Doświadczenia zaplanowano na jednorodnej (wiek, masa ciała) grupie samców myszy, co zminimalizuje rozrzut badanych parametrów. Według przeprowadzonej analizy statystycznej mniejsza niż proponowana liczba zwierząt nie pozwoliłaby na uzyskanie wiarygodnych statystycznie wyników.

Mikrodializaty pobrane z każdego zwierzęcia będą gromadzone w zamrażarce niskotemperaturowej, co pozwoli na ich wielokrotne użycie.

W przypadku nie zastosowania opracowywanej przeze mnie procedury jednoczesnej mikrodializy jelita i mózgu myszy w okresie 4 dni, aby uzyskać ten sam zestaw wyników trzeba by wykorzystać 4 razy więcej zwierząt (oddzielna grupa do mikrodializy jelita, oddzielna grupa do mikrodializy mózgu, obie grupy mikrodializowane 1 dnia po operacji (mikrodializy na myszach uśpionych są z reguły terminalne), nowe grupy mikrodializowane po zastosowaniu środka farmakologicznego po 4 dniach).

Refinement (udoskonalenie)

Wykorzystywane zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku, a metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak, aby ograniczały do minimum albo eliminowały ból, cierpienie, dystres lub możliwość trwałego uszkodzenia organizmu tych zwierząt. Zwierzęta poddane ingerencji chirurgicznej będą otrzymywały środki przeciwbólowe, natomiast stan zwierząt będzie monitorowany na każdym etapie doświadczenia, aby ewentualnie przerwać cierpienie i dokonać eutanazji. Zwierzęta będą miały zapewnione urozmaicone środowisko, co zapobiegnie odczuwaniu przez nie nudy, stereotypiom i pozwoli złagodzić ewentualny stres. Planowane jest zastosowanie ściółki o różnej grubości wiórów, klocków drewnianych, plastikowych domków dla myszy, drabinek, płatków kosmetycznych służących jako substrat do budowania gniazd. Zwierzęta będą monitorowane pod kątem oceny parametrów określających samopoczucie i stan zdrowia. Ściółka będzie regularnie wymieniana (co 2-3 dni lub częściej w razie potrzeby).