

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „Określenie roli miRNA w przeciwdziałaniu demineralizacji i zmniejszeniu wytrzymałości kości u myszy z osteoporozą indukowaną diklofenakiem”

2. Czas trwania projektu 15.06.2020 r. – 14.06.2022 r.

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) myszy, diklofenak, mineralizacja, miRNA, lizosomy

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.

Obecnie na rynku farmaceutycznym ogólnie dostępne są niesteroidowe leki przeciwzapalne, stosowane do leczenia stanów zapalnych, do uśmierzania bólu czy obniżania gorączki. Obserwacje wskazują również na wpływ tego leku na procesy kostnienia, a co za tym idzie, wzrost ryzyka złamań, obniżoną mineralizację kości oraz rozwój osteoporozy. Wykazaliśmy takie działanie diklofenaku realizując pierwsze zadanie projektu badawczego.

Zgodnie z harmonogramem badań, kolejnym celem projektu jest podawanie mikropęcherzyków (lizosomów) zawierających syntetyczne miRNA myszom z osteoporozą indukowaną diklofenakiem, co ma stymulować mineralizację i wytrzymałość kości, przeciwdziałając rozwojowi osteoporozy. Badania te pozwolą na poznanie mechanizmów patogenezы tych powikłań oraz umożliwią wykazanie czy istnieje terapeutyczny wpływ mikropęcherzyków z miRNA. Podawane będą trzy rodzaje miRNA: miR-29a, miR-15a oraz miRNA o losowej sekwencji (miR neg.). Podawanie miRNA ma na celu ustalenie, czy wpływa ono na mineralizację i wytrzymałość kości u zwierząt z osteoporozą indukowaną diklofenakiem. Jeżeli

tak, to czy istnieją różnice pomiędzy efektywnością poszczególnych rodzajów miRNA.

Wniosek zakłada przeprowadzenie szeregu doświadczeń mających na celu weryfikację postawionej tezy o przeciwdziałaniu negatywnym skutkom zażywania leków (diklofenaku) na procesy mineralizacji kości poprzez zastosowanie miRNA podawanego w lizosomach. W doświadczeniu planuje się 4 tygodniowe podawanie samicom myszy szczepu C57BL/6 diklofenaku. W trakcie doświadczenia 4-krotnie, co siedem dni począwszy od pierwszego dnia podawane będzie miRNA umieszczone w lizosomach. Następnie przeprowadzone zostaną analizy określające strukturę i właściwości mechaniczne kości. We krwi oznaczone zostaną związki, pozwalające na ocenę stopnia uszkodzenia kości.

W związku z zastosowaniem niskich dawek wybranych leków oraz relatywnie krótkiego czasu trwania doświadczenia (wszystkie procedury są łagodne) nie przewiduje się szkód, jakie może spowodować eksperyment u zwierząt. Przewidywane szkody podczas proponowanego doświadczenia mogą wiązać się z dystresem zwierząt podczas podawania leku, jednak wszystkie procedury zostały zaplanowane z jak najmniejszą możliwą inwazyjnością. Do dodatkowych szkód, które doznają zwierzęta zaliczamy również śmierć.

Doświadczenie to może być zakwalifikowane do badań podstawowych, jednakże uzyskane wyniki mogą przyczynić się do nowego spojrzenia na terapię i przeciwdziałanie skutkom zażywania leków przeciwzapalnych (korzyści naukowe doświadczenia).

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Do doświadczeń wybrano samice Myszy Domowej *Mus Musculus* Szczep C57BL/6 , jako gatunek najczęściej stosowany do tego rodzaju badań. Planuje się wykorzystanie 96 zwierząt.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Projekt doświadczenia uwzględnia zasadę 3R (zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia) i pozwala na zastąpienie i ograniczenie liczby oraz zminimalizowanie cierpienia zwierząt wykorzystywanych w

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

doświadczeniach.

ZASADA ZASTĄPIENIA

Konieczność wykorzystania zwierząt laboratoryjnych w tych doświadczeniach podyktowana jest niemożliwością odtworzenia warunków doświadczenia (badania kości) *in vitro* przy użyciu izolowanych komórek, czy też linii komórkowych.

ZASADA OGRANICZENIA

Przygotowując niniejszy projekt badawczy zapoznano się z istniejącą wiedzą w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych: Google Scholar, ScienceDirect oraz PUBMED. Przy wyszukiwaniu informacji wykorzystano słowa kluczowe takie jak: mouse, diclofenac, bone, osteoporosis, lysosomes, miRNA (odpowiednio: mysz, diklofenak, kość, osteoporoza, lizosomy, miRNA).

Uwzględnienie zasady ograniczenia zawiera się w zminimalizowaniu liczby zwierząt na grupę doświadczalną (n=12). Proponowana liczba zwierząt pozwoli na osiągnięcie istotnych statystycznie wyników. Liczbę zwierząt w grupie dobrano z wykorzystaniem doświadczenia z poprzednich przeprowadzanych eksperymentów oraz wiedzy literaturowej zdobytej podczas przygotowań projektu badawczego. Dodatkowo wykorzystanie 12 zwierząt na grupę podyktowane jest spełnieniem wymagań dotyczących tego typu eksperymentów – badanie skutków ubocznych leków, ilością potrzebnych kości do badań etc. Ponadto wnioskodawcy podejmą wszelkie starania, aby wykorzystać maksymalnie tkanki pochodzące od zwierząt w proponowanych eksperymentach, tj. tkanki, które nie będą analizowane w ramach proponowanych eksperymentów, będą wykorzystane do celów dydaktycznych (ćwiczenia z fizjologii zwierząt, biochemii, patofizjologii). Na podstawie przeanalizowanej literatury, stwierdzono, iż proponowany projekt ma charakter innowacyjny (docelowo wyniki uzyskane w trakcie realizacji opisanego doświadczenia zostaną wykorzystane do opracowania. Oszacowanie negatywnego wpływu diklofenaku będzie stanowiło podstawę do dalszych badań które zakończyć się mają wytworzeniem mikropęcherzyków (lizosomów) zawierających syntetyczne miRNA stymulujące mineralizację i zwiększające wytrzymałość kości. Ponadto w zasadę ograniczenia wpisuje się również fakt zredukowania liczby rodzajów miRNA. Do badań *in vitro* przeprowadzonych przed częścią *in vivo*, wstępnie (na podstawie literatury) wytypowano 10 rodzajów miRNA. Jednakże analizy z wykorzystaniem linii komórkowej pozwoliły na ograniczenie rodzajów miRNA w doświadczeniu *in vivo* do 2 (miR29a, miR15a).

ZASADA UDOSKONALENIA

Podczas trwania eksperymentów zwierzęta utrzymywane będą w pomieszczeniach dostosowanych do wymagań tych gatunku gryzoni (odpowiednia temperatura, wymiana powietrza, wilgotność, natężenie hałasu), zostanie obliczona i dostosowana do wielkości zwierząt powierzchnia klatek, zwierzęta będą miały zapewnione urozmaicenia (zgodnie z Ustawą). Zwierzęta będą otrzymywały paszę oraz wodę ad libitum. Dodatkowo zastosowany będzie „handling” polegający na oswojaniu zwierząt z eksperymentatorami, w celu zmniejszenia odczuwania stresu. Zwierzęta utrzymywane będą na trocinach mających zapewnić im suche, czyste i wygodnie miejsce bytowania, ponadto w klatkach umieszczone zostaną skrawki papieru by umożliwić budowę gniazd, a także papierowe tuby i drewniane klocki służące do zabawy i schronienia. Ponadto zasada udoskonalenia zastosowana została do użycia niskiej dawki wybranych leków, co redukuje dotkliwość tej metody i minimalizuje możliwość uszkodzenia innych organów, wywołania bolesnych zmian, a pozwalającej otrzymać wiarygodne wyniki. Ponadto jeśli u któregoś ze zwierząt wystąpią objawy dyskomfortu lub bólu zwierzę zostanie uśmiercone w humanitarny sposób. W procedurach zawartych we wniosku inwazyjność czynności została ograniczona do minimum (tylko iniekcje), a wszystkie zaplanowane w eksperymencie procedury należą do kategorii łagodnej. Ma to na celu złagodzenie cierpienia zwierząt użytych do doświadczeń.

Zdobyte podczas doświadczeń wyniki pozwolą wzbogacić wiedzę na temat wpływu diklofenaku, co z kolei zostanie wykorzystane do wytworzenia w komórkach mezenchymalnych myszy lizosomów zawierających syntetyczne miRNA stymulujące mineralizację i wytrzymałość kości.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

X NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.