

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **“Opracowanie nowej metody znakowania aktywności enzymatycznej metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej typu 9 (MMP9) w mózgu gryzoni”**
2. Czas trwania projektu: **3 lata**
3. Słowa kluczowe: **ekspresja MMP-9, neuroplastyczność, STSH-1, PNIPAM-SMNPs, obrazowanie fluorescencyjne**
4. Cel projektu (art. 3 ustawy): **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

Zmiany w sile połączeń między komórkami nerwowymi zachodzące w wyniku osobniczego uczenia się i zapamiętywania nazywane są neuroplastycznością. Istnieje wiele dowodów wskazujących na to, że enzym metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej typu 9 (ang. *matrix metalloproteinases 9*, MMP9) może pełnić ważną rolę w tym procesie. Obecnie jedną z największych przeszkód stojących na drodze poznania roli MMP9 w regulacji zmian neuroplastycznych jest brak specyficznych znaczników fluorescencyjnych, które po związaniu się z enzymem w miejscu jego działania, emitowałyby sygnał fluorescencyjny o sile odzwierciedlającej aktywność enzymatyczną. Dlatego też celem niniejszego doświadczenia jest zbadanie zaprojektowanego przez nas znacznika fluorescencyjnego (STSH-1), pod kątem jego selektywności do aktywności MMP9 w mózgu gryzoni. Dzięki temu, przy obecnym braku skutecznych związków znakujących aktywność MMP9, nasze badanie pozwoli na lepsze i dokładniejsze poznanie roli tego enzymu w neuroplastyczności.

W doświadczeniu zwierzętom podany zostanie dootrzewnowo STSH-1 połączony z nanocząsteczkami magnetycznymi. Następnie zwierzęta zostaną wprowadzone i utrzymane w stanie anestezji, podczas której do głowy zwierzęcia zostanie przyłożone zmienne pole magnetyczne w celu zatrzymania STSH-1 w mózgu.

W ostatniej fazie eksperymentu badane zwierzę zostanie uśmiercone za pomocą perfuzji, a następnie zostanie pobrana tkanka mózgowej, która ostatecznie będzie analizowana za pomocą mikroskopu konfokalnego.

W związku z tym, że główna część eksperymentu oraz uśmiercenie zwierząt będzie wykonane podczas ich anestezji, przewiduje się, że jedyny stres u zwierząt związany będzie z wykonaniem iniekcji dootrzewnowej. Ponadto, użyte w doświadczeniu wartości pola magnetycznego oraz czas ekspozycji są zbyt małe by mogły wywołać fizyczny ból czy uszkodzenie tkanek.

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

W doświadczeniu planuje się użyć 48 zwierząt (24 myszy oraz 24 szczurów), podzielonych na cztery grupy badane, po 12 osobników każda:

- genetycznie zmodyfikowane szczury Wistar z nadekspresją MMP9 (Grupa 1),
- szczury Wistar typu dzikiego (Grupa 2),
- genetycznie zmodyfikowane myszy C57Bl/6 z delecją MMP9 (Grupa 3),
- myszy C57Bl/6J typu dzikiego (Grupa 4)

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Powyższy projekt badawczy został przygotowany w oparciu o aktualną wiedzę literaturową, zgromadzoną w bazie danych PubMed. W gromadzeniu danych literaturowych wykorzystano następujące słowa kluczowe: ekspresja MMP-9, neuroplastyczność, STSH-1, PNIPAM-SMNP, sieciowanie UV i obrazowanie fluorescencyjne. Na tej podstawie stwierdzono, że pomimo wielu dowodów świadczących o udziale MMP9 w neuroplastyczności, dotychczas brak jest selektywnych metod znakowania aktywności tego enzymu *in situ*. W niniejszym doświadczeniu planuje się użyć selektywny znacznik fluorescencyjny MMP9, w celu wizualizacji poziomu aktywności enzymu. Pozwoli to na pogłębienie wiedzy na temat udziału tego enzymu w procesach neuroplastycznych.

Ze względu na to, że tematem badań są zmiany neuroplastyczne, które zachodzą u zwierząt z wysoko rozwiniętym układem nerwowym, do eksperymentu wybrano myszy i szczury. Ponadto, wybór dwóch gatunków zwierząt kierowany jest koniecznością posiadania osobników o różnym profilu ekspresji MMP9. W związku z tym, że nie mamy dostępu do szczurów z delecją MMP9, ani myszy z nadekspresją tego enzymu, grupy badane zostały poszerzone o zwierzęta drugiego gatunku z pożądaną aktywnością MMP9.

Jednocześnie procedury i metody badawcze dobrano tak, aby zminimalizować stopień dyskomfortu i cierpienia wykorzystanych zwierząt. Mianowicie planuje się:

- zmniejszyć do minimum liczbę zwierząt koniecznych do przeprowadzenia doświadczenia i uzyskania istotnych statystycznie, wiarygodnych wyników, poprzez wykonywanie różnych oznaczeń i pomiarów na pobranych *post mortem* dwóch półkulach mózgów;
- prowadzić doświadczenie przez pracownika z wieloletnim stażem i bogatym doświadczeniem w pracy ze zwierzętami, oraz posiadającego odpowiednie kwalifikacje

## 8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną

- TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- **NIE**