

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Modulacja poziomu pobudzeń synaptycznych motoneuronów rdzenia kręgowego w następstwie przezrdzeniowej stymulacji prądem stałym (tsDCS) w mysim modelu stwardnienia zanikowego bocznego (ALS)
2. Czas trwania projektu5 lat.....
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): mysz, motoneuron, stwardnienie zanikowe boczne, in vivo,
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.

ALS jest śmiertelną chorobą neurodegeneracyjną dotykającą ponad 220.000 osób na całym świecie w roku 2015 i prognozowanym wzrostem występowania do 370.000 przypadków rocznie w roku 2040. Najnowsze doniesienia wskazują, że obniżenie poziomu pobudliwości synaptycznej motoneuronu jest istotnym czynnikiem warunkującym jego degenerację w przebiegu choroby. Dlatego też zwiększenie poziomu tej pobudliwości może mieć pozytywny wpływ na spowolnienie procesu patologicznego. W projekcie planujemy to uzyskać poprzez wykorzystanie nowoczesnej metody neuromodulacyjnej przezrdzeniowej stymulacji prądem stałym (tsDCS). Badania przeprowadzimy na genetycznie zmodyfikowanych myszach ze zmutowanym ludzkim genem SOD1 wykazujących fenotyp silnie zbliżony do ludzkiej postaci ALS. Eksperymenty wykorzystujące metody elektrofizjologiczne, histochemiczne i testy funkcjonalne posłużą do określenia wpływu naszej interwencji na progresję choroby. Procedury eksperymentalne zostały zaplanowane w oparciu o zasady 3R ze szczególnym uwzględnieniem zminimalizowania cierpienia i dyskomfortu zwierząt użytych w eksperymentach. Przewidywane szkody u zwierząt obejmują stres związany z podaniem dawki znieczulenia ogólnego

przed rozpoczęciem doświadczeń elektrofizjologicznych, stres związany ze znieczuleniem gazowym stosowanym przed polaryzacją, oraz stres związany z testami funkcjonalnymi. Elektrofizjologiczna część projektu będzie wykonana na myszach w znieczuleniu ogólnym, zakończonych eutanazją bez wybudzenia z narkozy. Testy funkcjonalne będą wykonywane do osiągnięcia przez zwierzęta humanitarnego punktu końcowego, po którego osiągnięciu myszy będą usypiane przez przedawkowanie środka znieczulającego. Żadna z procedur nie spowoduje długotrwałego cierpienia zwierzęcia. Wszystkie procedury zostały zaplanowane z jak najmniejszą inwazyjnością, a we wniosku został przedstawiony szczegółowy opis zasad: zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia oraz humanitarnych punktów końcowych. W wyniku tego projektu spodziewamy się znacząco pogłębić naszą wiedzę na temat wpływu tsDCS na progresję ALS.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Badania będą prowadzone na 480 myszach modyfikowanych genetycznie B6SJL.SOD1-G93A obojga płci w okresie pre-symptomatycznym P45-P55, 90 analogicznych samcach myszy B6SJL.SOD1-G93A w wieku od P30 do osiągnięcia humanitarnego punktu końcowego, oraz 60 myszach niemodyfikowanych genetycznie B6SJL obojga płci w wieku P45-55 dni. Łącznie projekt zakłada wykorzystanie 630 zwierząt. Myszy SOD1 G93A są standardowym modelem zwierzęcym stwardnienia zanikowego bocznego (ALS). Szczegółowy podział na grupy badawcze i kontrolne opisany jest w pełnej wersji wniosku

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Zasada zastąpienia

1. Zastosowanie eksperymentów elektrofizjologicznych u ludzi jest niemożliwe z powodu ich inwazyjności, powodującej nieodwracalne uszkodzenie układu nerwowo-mięśniowego. Nie jest również możliwe zastąpienie doświadczeń na zwierzętach metodami in vitro (hodowle komórkowe, tkankowe) ze względu na brak możliwości przeprowadzenia polaryzacji aktywnych sieci neuronalnych i obserwowania procesu adaptacji komórek nerwowych do zmian pola elektrycznego.
2. Zastąpienie myszy zwierzętami o niższym stopniu rozwoju ewolucyjnego byłoby nieuzasadnione ze względów metodycznych (posiadają inną strukturę układu nerwowego i unerwienia motorycznego), w związku z czym byłyby całkowicie nieprzydatne w przypadku ekstrapolacji uzyskanych wyników na ludzi. W związku z tym badania przeprowadzone na przykład na bezkręgowcach nie miałyby odniesienia do zjawisk obserwowanych u człowieka.

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

3. Myszy SOD1 G93A są standardowym modelem ALS, w związku z czym wyniki naszych badań w znacznym stopniu będą mogły zostać porównane i dyskutowane z literaturą problemu.

Przykładowa literatura:

1. Delestrée N, Manuel M, Iglesias C, Elbasiouny SM, Heckman CJ, Zytnicki D. Adult spinal motoneurons are not hyperexcitable in a mouse model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol.* 592(7): 1687-703, 2014.
2. Leroy F, Lamotte d'Incamps B, Imhoff-Manuel R, and Zytnicki D. Early intrinsic hyperexcitability does not contribute to motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *eLife.* 3: e04046, 2014.
3. Saxena S, Roselli F, Singh K, Leptien K, Julien JP, Gros-Louis F and Caroni P. Neuroprotection through Excitability and mTOR Required in ALS Motoneurons to Delay Disease and Extend Survival. *Neuron*, 80(1), 80-96, 2013.
4. Julien JP, Kriz J. Transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys* 1762(11-12):1013-24, 2006

Zasada ograniczenia

1. Liczba zwierząt została ustalona przy wykorzystaniu programu G*Power wersja 3.1.9.2 (Franz Faul, Universität Kiel, Germany). Założone parametry analizy to: grupy A-C test RM ANOVA, ilość grup 3, ilość pomiarów 5, siła efektu średnia; grupy D-F, G-I, J-L, M-O test ANOVA, ilość grup: 3, siła efektu średnia. Zaproponowana liczebność grup badawczych (10) i kontrolnych (5) obejmująca łącznie 630 osobników, jest optymalna w kontekście minimalizacji liczby wykorzystanych zwierząt i zarazem możliwości analizy efektów zastosowania dwóch rodzajów polaryzacji (katodowej i anodowej) oraz prześledzenia efektów polaryzacji w czasie: oceny właściwości i aktywności motoneuronów w trakcie działania pola elektrycznego, po jego zakończeniu i w następstwie powtarzanej przez 2 tygodnie polaryzacji.
2. Na liczbę zwierząt konieczną do wykonania założeń projektu wpływa możliwość rejestracji tylko z jednego motoneuronu w części doświadczeń (grupy A, B, C, J, K, L) oraz średnia liczba stabilnych zapisów wewnątrzkomórkowych, które przeciętnie uzyskuje się w eksperymentach dotyczących zmian adaptacyjnych w motoneuronach u myszy (1-2 na zwierzę).
3. Należy zaznaczyć, że dla procedur 1-8 zaplanowano wykorzystanie zarówno samców jak i samic myszy SOD1, dzięki czemu hodowla nie będzie musiała być rozszerzona w celu zapewnienia odpowiedniej ilości zwierząt jednej płci. Zarówno samce jak i samice myszy SOD1 wykazują fenotyp zbliżony do ludzkiej postaci ALS.
4. Zastosowanie samców myszy w procedurach 9 i 10 wynika z faktu, iż test rotarod jest bardziej skuteczny u samców niż u samic, w związku z tym zastosowanie samców umożliwi szybsze i pełniejsze określenie deficytów funkcjonalnych co dalej przełoży się na ograniczenie ilości zwierząt w tych procedurach.
5. Należy zaznaczyć, że rejestracje wewnątrzkomórkowe z motoneuronów myszy, są bardzo skomplikowaną procedurą badawczą, obarczoną bardzo wysokim ryzykiem niepowodzenia i praktykowaną z powodzeniem jedynie w kilku miejscach na świecie. Wykonawcy projektu mają wieloletnie doświadczenie w wykonywaniu tego typu eksperymentów, jednakże właśnie to doświadczenie dyktuje konieczność zaplanowania podanej liczby zwierząt w celu realizacji planu badawczego. Nie ma możliwości wykonania kilku zadań badawczych w jednym zwierzęciu ze względu na możliwe interakcje stosowanych technik eksperymentalnych oraz spodziewane przetrwałe efekty polaryzacji zarówno tej aplikowanej przez rdzeniowo jak i przezskórnie.

Zasada udoskonalenia

Zostaną podjęte wszystkie możliwe działania mające na celu minimalizację dyskomfortu lub cierpienia zwierząt wykorzystywanych w eksperymencie.

1. We wszystkich grupach eksperymentalnych za wyjątkiem grup M-O eksperymenty zostaną wykonane w wieku P45-55 dni, czyli w okresie **presymptomatycznym**. Oznacza, to że zwierzęta nie będą wykazywać symptomów choroby co jednak nie uniemożliwia osiągnięcia celu badawczego, ponieważ polega on na analizie efektów polaryzacji w oparciu o analizę cech EPSP oraz anatomię kontaktów synaptycznych
2. W grupach eksperymentalnych w których stosuje się długotrwałą polaryzację przezskórną (D, E, G, H, J, K, M, N) zdecydowano się zastosować bezpieczną i mało inwazyjną metodę anestezji gazowej. Umożliwi to wykonanie polaryzacji bez konieczności unieruchamiania zwierzęcia lub wszczepiania elektrod polaryzujących pod skórę co spowodowałoby istotnie większy dyskomfort i cierpienie. Należy nadmienić, że zarówno metody unieruchomienia jak i wszczepienia elektrod były stosowane w innych jednostkach naukowych (Ahmed 2013).
3. W grupie testów funkcjonalnych zdecydowano się na zastosowanie testów rotarod które zgodnie z literaturą tematu są najskuteczniejsze dla określenia zmian w fenotypie zwierząt w przebiegu ALS. Test rotarod jest bezpieczny dla zwierząt i nie wywołuje trwałego uszczerbku na zdrowiu.
- 4.

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.