

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Określenie zmian w zapisie EEG hipokampalnej i korowej aktywności oscylacyjnej w szczurzym modelu choroby Alzheimera (AD) w kolejnych etapach rozwoju zmian neurodegeneracyjnych.

2. Czas trwania projektu: 2 lata (1.03.2019 - 1.03.2021)

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): choroba Alzheimera, beta-amyloid, EEG, theta, hipokamp

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): badania podstawowe, PB3 - Układ nerwowy; badania translacyjne i stosowane, PT 33 - Choroby i zaburzenia u zwierząt.

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.

Podstawowymi zjawiskami, które towarzyszą powstawaniu wszystkich wzorców EEG są ośrodkowe mechanizmy oscylacji i synchronizacji. Jednym z przykładowych wzorców o wysokim poziomie synchronizacji są fale theta. Wzorzec ten jest związany z funkcjami poznawczymi. Odchylenia w parametrach rytmu theta i innych wzorców EEG mogą korespondować z pierwszymi zmianami neurologicznymi zachodzącymi m.in. w przebiegu choroby Alzheimera (AD).

Choroba Alzheimera jest chorobą neurodegeneracyjną charakteryzującą się zanikiem pamięci i upośledzeniem zdolności poznawczych. W patologii AD jednym z głównych czynników prowadzących do neurodegeneracji i dysfunkcji synaptycznej jest akumulacja amyloidu beta ($A\beta$), peptydu

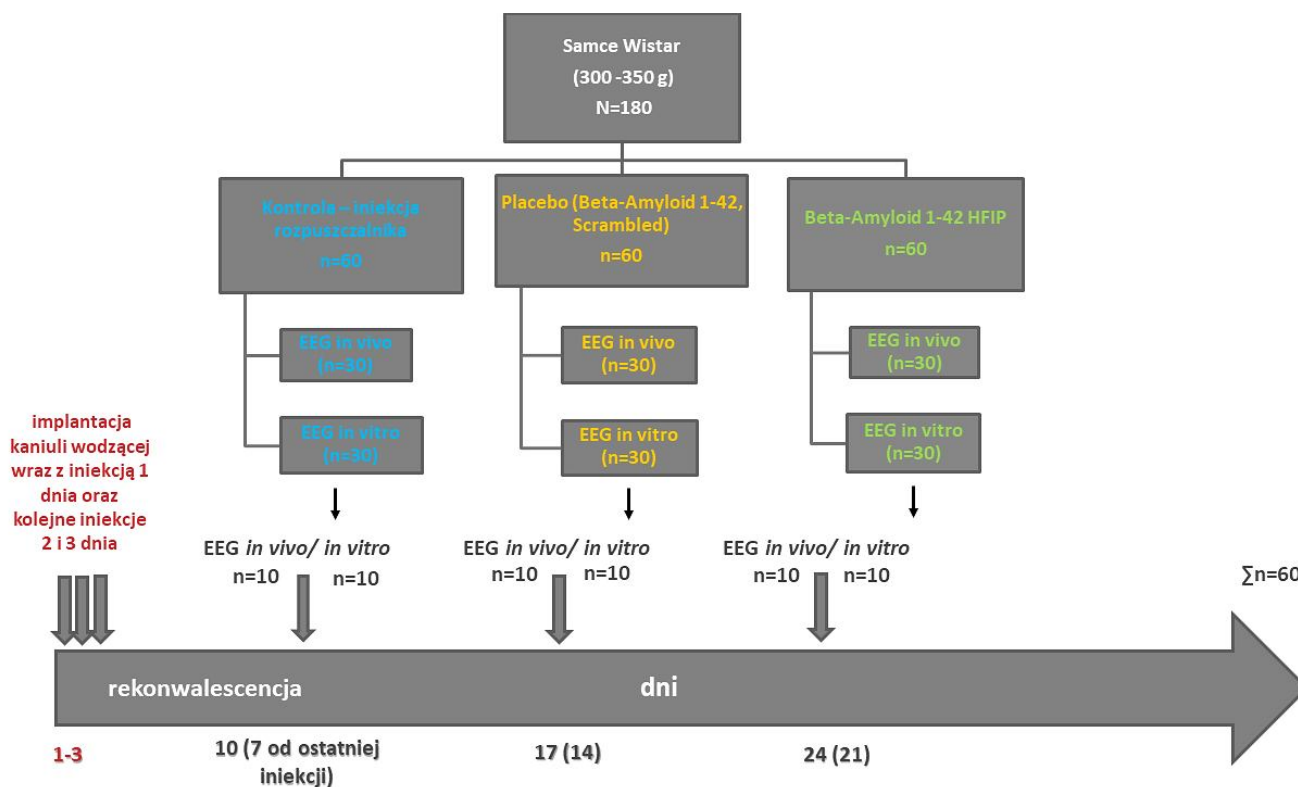
syntetyzowanego wewnątrz neuronu i wydzielanego zewnątrzkomórkowo. Podczas gdy główną przyczyną AD jest zewnątrzkomórkowa akumulacja A β , jedną z bezpośrednich przyczyn objawów behawioralnych jest zaburzenie równowagi w neuroprzekaznictwie chemicznym, co może przyczyniać się do zaburzeń w zapisie EEG. Dokomorowe podanie peptydu A β 1-42 znacząco obniża częstotliwość zapisu w hipokampie i w korze mózgowej szczurów. Nieliczne badania opisują zmiany w aktywności oscylacyjnej w zwierzęcych modelach AD. Do tej pory nie badano efektów domózgowej iniekcji A β na synchronizację zapisu EEG oraz przestrzennej korelacji pomiędzy hipokampalną i korową aktywnością, co stanowiłoby zadanie doświadczenia.

Ponieważ modele AD z wykorzystaniem zwierząt transgenicznych odnoszą się jedynie do rodzinnej formy AD (ok. 5%), planujemy zastosowanie szczurzego modelu AD wywołanego dokomorowymi iniekcjami amyloidu A β 1-42, odzwierciedlającego sporadyczną postać AD (ok. 95% AD) o nieznanej etiologii.

Projekt ma na celu odpowiedź na pytanie, czy i w jakim stopniu hipokampalna i korowa aktywność EEG ulega modyfikacjom w szczurzym modelu AD w kolejnych etapach rozwoju zmian neurodegeneracyjnych po domózgowej iniekcji amyloidu A β 1-42 w warunkach *in vivo* i *in vitro*.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Proponowane doświadczenie będzie przeprowadzone z wykorzystaniem 180 trzymiesięcznych szczurów rasy Wistar (masa ciała 300 ± 25 g), które będą losowo przydzielone do poszczególnych grup doświadczalnych, zgodnie z procedurami opisanymi poniżej.



Ryc. 1. Schemat przedstawiający grupy doświadczalne oraz przebieg doświadczeń. Proponowany cykl doświadczalny będzie przeprowadzony z wykorzystaniem 180 trzymiesięcznych szczurów rasy Wistar (masa ciała 300 ± 25 g), które będą losowo przydzielone do poszczególnych grup doświadczalnych, zgodnie z procedurami opisanymi poniżej.

Planowany cykl doświadczalny, ze względu na kompleksowy charakter badania zmian korowego i hipokampalnego EEG po iniekcji amyloidu A β 1-42 w czasie wymaga użycia ściśle określonej liczby zwierząt w określonym wieku i o określonej masie ciała (aby zmiany neurodegeneracyjne postępowały szczury powinny osiągnąć wiek 3 miesięcy). Trzymiesięczne szczury rasy Wistar (masa ciała 300 ± 25 g) w pierwszym etapie będą poddawane narkozie w celu dokomorowego zaimplantowania kaniul wodzących służących 3-krotnemu podaniu amyloidu A β 1-42 przez 3 kolejne dni. Następnie po 7, 14 i 21 dniach od ostatniej iniekcji część zwierząt będzie wykorzystana do rejestracji EEG w warunkach *in vitro* i a część do rejestracji w warunkach *in vivo*. To razem daje 60 szczurów na każdą z grup: kontrolną (z dokomorową iniekcją rozpuszczalnika), placebo (z dokomorową iniekcją tzw. scrambled amyloid A β 1-42 o przypadkowym ułożeniu aminokwasów w łańcuchu peptydowym) oraz właściwą grupą

badawczą (z dokomorową iniekcją właściwego A β 1-42 HFIP), co daje razem 180 zwierząt (Ryc. 1). Liczności prób tj. minimalna liczba zwierząt zostały obliczone przy użyciu programu Statistica, przy założeniu że efekt jest dobrze widoczny (gdzie: moc testu = 0,9 a efekt standaryzowany RMSSE = 0,5 i 0,25). Aby wyniki uzyskane w trakcie badań niosły wiarygodną informację na temat istotności statystycznej wymagane jest użycie co najmniej po 10 szczurów na eksperyment przeprowadzony w danym protokole (n=10 *in vivo* i n=10 *in vitro*) dla trzech punktów czasowych (7, 14 i 21 dni od ostatniej iniekcji), w sumie 30 zwierząt w każdym protokole. Następnie przeprowadzona zostanie analiza wariancji lub test U Manna-Whitney'a.

BADANIA IN VIVO:

W planowanym projekcie przeprowadzone zostaną doświadczenia na modelu anestetyzowanego szczura, który pozwala na badanie zapisu EEG, między innymi hipokamplanej polowej aktywności rytmicznej theta typu II w warunkach snu anestetycznego. Rejestracje będą prowadzone z formacji hipokampa oraz kory przedczołowej. Proponowany w projekcie model doświadczalny nie posiada odpowiednika umożliwiającego zastąpienie zwierząt kręgowych innym materiałem. W badaniach wykorzystane zostaną szczury rasy Wistar (90 zwierząt). Ze względu na charakter prowadzonych doświadczeń zwierzęta podzielone zostaną na trzy grupy doświadczałne: 7, 14 i 21 dni od ostatniej iniekcji rozpuszczalnika (grupa kontrolna), scrambled amyloidu A β 1-42 (grupa placebo) i amyloidu A β 1-42 HFIP (grupa badawcza) (Ryc. 1). U zwierząt z wszystkich trzech grup doświadczalnych prowadzona będzie rejestracja aktywności EEG przez 3 godziny.

BADANIA IN VITRO:

Omawiany cykl badawczy prowadzony będzie równolegle na modelu oscylacji rejestrowanych w skrawkach mózgowych. Model rejestracji aktywności EEG w skrawkach mózgowych pozwala na badanie procesów leżących u podstaw generowania aktywności sieci neuronalnych danej struktury mózgowia w pełnym odizolowaniu od wpływu innych obszarów ośrodkowego układu nerwowego i jako taki nie może zostać zastąpiony innymi modelami doświadczalnymi. Jest więc istotnym uzupełnieniem badań prowadzonych w warunkach *in vivo*, pozwalając na znaczące poszerzenie wiedzy o badanych zjawiskach fizjologicznych. Doświadczenia prowadzone na skrawkach zawierających hipokamp i korę mózgową przeprowadzone zostaną na preparatach pobranych od 90 szczurów, w identycznych układach doświadczalnych jak w opisywanych wyżej badaniach *in vivo* (7, 14 i 21 dni od ostatniej iniekcji). U zwierząt z wszystkich trzech grup doświadczalnych prowadzona będzie rejestracja aktywności

hipokamplanej i korowej aktywności EEG po podaniu agonisty acetylocholino (karbamylcholino w stężeniu 50 μ M naśladującej układ cholinergiczny w warunkach *in vivo*) w celu wywołania regularnych epizodów rytmu theta. W związku z faktem, iż szczury wykorzystane zostaną jedynie do pobrania materiału biologicznego (skrawków mózgowych zawierających hipokamp oraz korę), co w świetle aktualnie obowiązujących przepisów nie stanowi procedury badawczej, doświadczenia te nie zostały szczegółowo opisane we wniosku.

Dodatkowo, przewidujemy zakup zwierząt dodatkowych w liczbie do 20% zwierząt przewidywanych do wykorzystania w eksperymencie (tj. do 36 zwierząt) w przypadku, kiedy właściwe zwierzęta eksperymentalne z przyczyn niezależnych od eksperymentatora (zginą przedwcześnie, mimo iniekcji amyloidu nie wystąpią zmiany neurodegeneracyjne, konieczność wcześniejszej eutanazji), nie będą mogły być wykorzystane w eksperymencie. Zobowiązujemy się do niezakupowania i niewykorzystywania tychże dodatkowych zwierząt bez absolutnej konieczności.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

W warunkach hodowli komórkowej, nie jest możliwe pełne odtworzenie warunków panujących wewnątrz ustroju, ze względu na wielowymiarowy charakter oddziaływań poszczególnych jego elementów. Specyfika projektu wiąże się z rozpatrywaniem uzyskanych wyników badań w kontekście funkcjonowania kompletnego układu nerwowego jak i całego organizmu zwierzęcego. Proponowany w projekcie model badawczy nie posiada odpowiednika umożliwiającego zastąpienie zwierząt kręgowych innym materiałem. Jedynie szczurzy model choroby Alzheimerera odzwierciedla sporadyczną postać choroby (ok. 95% AD). Dodatkowo model uretynowanego szczura pozwala na badanie polowej aktywności theta typu II rejestrowanej w warunkach snu anestetycznego, która ściśle związana jest z procesami poznawczymi oraz plastycznością synaptyczną związaną z procesami uczenia się i zapamiętywania.

W opisywanych we wniosku badaniach wykorzystana zostanie minimalna liczba zwierząt potrzebna do uzyskania miarodajnych wyników. Zwierzęta będą przetrzymywane w warunkach odpowiednich dla gatunku, a metody badawcze zastosowane w poszczególnych procedurach zostały wybrane w taki sposób, aby ograniczyć do minimum ból, cierpienie oraz dystres.

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

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.