

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu

Wpływ farmakologicznej inaktywacji jądra okołoramieniowego na wzorzec hipokampalnego EEG u szczurów w narkozie uretanowej

2. Czas trwania projektu: 6 miesięcy

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): hipokamp, VTA, parabrachial nucleus, PBN, theta

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.

Rytm theta reprezentuje zakres częstotliwości (3-12 Hz u szczura), z jakim neurony synchronicznie wyładowują podczas procesów takich jak operacje pamięciowe, nawigacja, czy doświadczanie nowości. Jest on obecny również podczas fazy snu paradoksalnego (REM). Sieć struktur regulujących parametry rytmu theta obejmuje zarówno pola kory mózgowej, jak struktury leżące podkorowo. Jedną z nich jest

brzusze pole nakrywki śródmózgowia (VTA). Jest ono ważnym elementem układu nagrody, którego charakterystyczną funkcją jest promowanie zachowań zwiększających szanse na przeżycie organizmu, na przykład efektywne zapamiętanie drogi do źródła wody, lub uniknięcie bodźca nieprzyjemnego w oparciu o wskazówki pochodzące ze środowiska. Mechanizm jego działania leży zatem u podstaw procesów uczenia się i warunkowania. Silna aktywacja układu nagrody i tym samym kojarzenie danej czynności z przyjemnością towarzyszy przyjęciu określonych substancji farmakologicznych, co może doprowadzić do wytworzenia uzależnień. Do prawidłowego wytworzenia wyżej wymienionych reakcji niezbędna jest niezakłócona komunikacja pomiędzy systemami pamięciowymi i limbicznymi, której węzeł wymiany informacji znajduje się w właśnie w VTA. O ile jego funkcjonowanie jest przedmiotem wielu badań, to powiązania brzuszego pola nakrywki śródmózgowia ze strukturami leżącymi w niższych piętrach ośrodkowego układu nerwowego nie są opisane w stopniu umożliwiającym wyciągnięcie jednoznacznych wniosków o charakterze ich zaangażowania w regulację pracy VTA. Jednym z takich potencjalnie istotnych centrów nerwowych jest jądro okołoramienne (parabrachial nucleus, PBN). Badania neuroanatomiczne wykazały istnienie połączeń pomiędzy PBN i VTA, a przez to z wyżej opisanymi układami, brak jest jednak prac wiążących bądź odcinających jądro okołoramienne od systemu regulującego parametry rytmu theta.

Celem niniejszych badań pilotażowych jest stwierdzenie, czy PBN pełni funkcję regulacyjną w systemie struktur związanych z rytmem theta. Zostaną przeprowadzone rejestracje aktywności elektrycznej hipokampa (EEG) u zwierząt w głębokiej narkozie uretanowej, podczas których to jądro zostanie czasowo, farmakologicznie zablokowane. Rytm theta będzie wywoływany kilkukrotną, jednodominową stymulacją sensoryczną, polegającą na założeniu klamerki na nasadę ogona szczura (przed oraz po iniekcji związku blokującego aktywność PBN). Jeśli inaktywacja spowoduje zmiany w zapisie EEG, będzie to świadczyło o wpływie PBN na proces regulacji parametrów rytmu theta.

Zwierzęta podczas trwania doświadczenia i po nim będą przez znajdowały się w głębokiej narkozie, co ograniczy odczuwany przez nie ból do ukłucia igłą przy podawaniu anestetyku.

Prowadzone doświadczenia należą do zakresu badań podstawowych. Ich głównym zadaniem jest poszerzanie wiedzy o mechanizmach działania układów nagrody i pamięci. Wyniki doświadczeń w przyszłości mogą przyczynić się do zaprojektowania nowych terapii leczących uzależnienia, lub usprawniające procesy pamięciowe u osób zdrowych, czy też dotkniętych chorobami

neurodegeneracyjnymi wieku podeszłego.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Gatunek: szczury szamce stada niekrewniaczego Wistar

Liczba: 20

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: _x_PUBMED; _x_ScienceDirect; _x_Web of Science (JCR);

Wykorzystałam słowa kluczowe: parabrachial nucleus / VTA / theta rhythm / hippocampus / tail-pinch /

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:

Nieliczne dotąd prace neuroanatomiczne i neurofizjologiczne pozwalają łączyć parabrachial nucleus z układem generującym i regulującym rytm theta. Wyznakowanie dróg nerwowych uwidocznilo silne połączenia zarówno z VTA, jak i z częścią zbitą istoty czarnej i, co więcej, pozwoliło na powiązania funkcjonalne z systemem dopaminergicznym. W pracy Coizet i wsp. z 2009 Podskórna stymulacja prądem elektrycznym o niskim natężeniu tylnej łapki szczura powodowała krótkotrwałe wzbudzenie neuronów PBN, przy jednoczesnej inhibicji w dopaminergicznym komórkach nerwowych istoty czarnej, z której prowadzono rejestracje EEG. Niestety, nie implantowano w tej pracy elektrod do VTA. Kolejnych danych dostarczają badania Qiu i wsp. (2016). Chemogenetyczna aktywacja PBN spowodowała zmiany we wzorcu zapisu EEG podczas indukowanego farmakologicznie czuwania (zwiększona moc w zakresie pasma theta) i snu wolnofalowego (spadek mocy sygnału w zakresie pasm delta i theta), ale nie wpłynęła na parametry sygnału EEG podczas fazy REM. Wyniki innej publikacji z zakresu neuroanatomii sugerują istnienie eferentnych połączeń pola CA1 hipokampa z brzuszным polem podlimbicznym (ventral infralimbic area, VI, część kory przedczołowej) oraz dwukierunkowych połączeń pomiędzy VI oraz częścią przyśrodkową parabrachial nucleus.

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

W badaniach niezbędne będzie wykorzystanie zwierząt, które będą traktowane z poszanowaniem i troską należną wszystkim organizmom żywym. Z uwagi na fakt, że badania prowadzone są na złożonym układzie (badane struktury, parabrachial nucleus i hipokamp, zależne są od działania wielu innych struktur mózgowych), planowane badania nie mogą być wykonane z zastosowaniem metod in vitro (metody te mogą stanowić tylko uzupełnienie dla wyników uzyskanych metodą in vivo). Zostaną podjęte wszelkie środki, aby zminimalizować zarówno liczbę zwierząt wykorzystanych w badaniach, jak również jakikolwiek dyskomfort zwierząt (**REPLACEMENT**).

Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że zaplanowano najmniejszą możliwą liczebność zwierząt zapewniającą minimalną ilość wyników wymaganą do przeprowadzenia wiarygodnej analizy statystycznej dla badań tego rodzaju – w ten sposób wnioskodawca planuje realizować zasadę **REDUCTION**. Ze względu na dużą zmienność międzyosobniczą występującą podczas rejestracji czynności elektrycznej mózgu, brak bazy publikacji zapewniających doświadczalną konfirmację miejsc implantacji oraz rozrzut w lokalizacji iniekcji przy wykorzystaniu dostępnych technik stereotaktycznych liczebność grupy doświadczalnej nie powinna być mniejsza niż 10 osobników. W przypadku wcześniejszego uzyskania wiarygodnych wyników doświadczenia zostaną zakończone przy użyciu mniejszej liczby zwierząt. Badania dotyczące czynności mózgu muszą być wykonane na zwierzętach kręgowych. Rejestracji EEG u zwierząt dokonuje się poprzez implantowane domózgowo elektrody. Jest to metoda standardowa i nie istnieją dla niej działania alternatywne. Ucisk ogona to powszechnie stosowana procedura uzyskiwania rytmu theta u szczura w narkozie uretanowej. Kierując się zasadą **REFINEMENT** zdecydowano, że zwierzęta nie będą wybudzane z pełnej narkozy przez cały okres trwania doświadczenia, co pozwoli na minimalizację jakiegokolwiek dyskomfortu zwierząt. Za wyjątkiem kilkusekundowego podania środka usypiającego (zastrzyk), zwierzęta nie będą narażone na ból i cierpienie. Głębokość narkozy będzie stale monitorowana przez przeszkolone osoby, które posiadają odpowiednie uprawnienia i doświadczenie w pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi. Uśmiercenie zwierząt po zakończeniu doświadczenia jest podyktowane koniecznością weryfikacji miejsca implantacji elektrod i oznaczenia okolicy mózgu poddanej mikroiniekcji, co sprowadza się do wyjęcia mózgu z czaszki i poddania go standardowym procedurom histochemicznym.