

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Badanie roli inhibicji MMP-9 w plastyczności synaptycznej w modelu *in vivo***

Czas trwania projektu **15.04.2017 - 31.07.2021**

2. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **MMP-9, plastyczność synaptyczna, przejściowa aktywność enzymatyczna, warunkowanie klasyczne**

3. 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.

Celem naszego projektu jest przeprowadzenie badań podstawowych, dążących do pełnego zrozumienia mechanizmu działania oraz funkcji metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (MMP-9) w procesach fizjologicznej plastyczności synaptycznej do jakiej dochodzi podczas procesu uczenia w modelach *in vivo*. z wykorzystaniem specjalnie do tego celu skonstruowanego biosensora.

Wcześniejsze wyniki badań naszej grupy wskazują, że MMP-9 odgrywa kluczową rolę w regulacji strukturalnej i funkcjonalnej plastyczności synaptycznej, (która leży u podstaw uczenia się i pamięci) poprzez wpływ na strukturę i funkcję kolców dendrytycznych, tworzących synapsy. Dodatkowo, pokazaliśmy że aktywność proteolityczna MMP-9 jest kontrolowana przez jej endogenne inhibitory oraz, że kontrola ta jest niezbędna do prawidłowych procesów plastyczności synaptycznej.

W naszym laboratorium stworzyliśmy nietoksyczny, zakotwiczący się w błonie komórkowej białkowy sensor aktywności proteolitycznej MMP-9. Sensor bazuje na zjawisku FRET (Förster Resonance Energy Transfer) dlatego możliwy jest pomiar kinetyki aktywności proteolitycznej MMP-9 z dużą precyzją czasową i przestrzenną. Za pomocą tego sensora chcemy zbadać dynamikę aktywności MMP-9 *in vivo* w modelu plastyczności synaptycznej.

Aby zrealizować cele badawcze planujemy wykorzystać myszy szczepu C57Bl/6 typu dzikiego oraz zwierzęta transgeniczne. U myszy indukowany będzie proces uczenia się z wykorzystaniem modelu warunkowania klasycznego. Za pomocą planowanych procedur chcemy określić rolę aktywności proteolitycznej MMP-9 w plastyczności synaptycznej *in vivo*.

Przypuszczamy, że model uczenia się doprowadzi do aktywacji MMP-9 w przypadku zwierząt transgenicznych i/lub zwiększenia ilości aktywnego MMP-9 wydzielanego przez zwierzęta dzikie. Zbadamy wtedy substraty które tnie MMP-9. Powiązanie wyników badań behawioralnych biochemicznych jak i obrazowania pozwoli nam lepiej zrozumieć mechanizmy fizjologicznej plastyczności neuronalnej i określenia roli ścieżki sygnałowej uruchamianej przez MMP-9 i jej substraty.

Procedury zawarte w naszym wniosku, w szczególności zabiegi chirurgiczne przeprowadzane na otwartym mózgu, mogą prowadzić do mechanicznych uszkodzeń mózgu, pojawienia się stanu zapalnego w obrębie układu nerwowego czy powstawania infekcji ran pooperacyjnych. W rzadkich przypadkach powikłania pojawiające się w trakcie operacji lub po jej zakończeniu mogą prowadzić do zejścia zwierzęcia. Ryzyko jakichkolwiek uszkodzeń będzie jednak minimalizowane w trakcie i po zakończeniu procedur przez stosowanie środków farmakologicznych.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W planowanym doświadczeniu uwzględniając prawidłowości statystyczne planujemy wykorzystać 50 myszy C57Bl/6 dzikich, 50 myszy z nokautem genu MMP-9 oraz 50 myszy z nadekspresją genu MMP-9.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Opisywany powyżej projekt jest drugim etapem prowadzonych przez nas badań. W pierwszym wszystkie testy prowadzone zostały na liniach komórkowych, a następnie na neuronalnych hodowlach pierwotnych (dane nie publikowane). Dopiero po uzyskaniu pozytywnych wyników i opracowaniu wszelkich niezbędnych narzędzi zaczęliśmy planować procedury z wykorzystaniem modeli zwierzęcych.

Liczba zwierząt potrzebna do przeprowadzenia planowanych badań została ograniczona do niezbędnego minimum pozwalającego na uzyskanie rzetelnych wyników. Ponadto nasz projekt ma na celu ustalenie warunków eksperymentów z wykorzystaniem biosensora aktywności MMP-9 i w ten sposób nasze pionierskie badania przyczynią się do ograniczenia liczby zwierząt i pierwotnych hodowli neuronalnych w kolejnych projektach. Dodatkowo, opracowany w naszym laboratorium konstrukt genetyczny kodujący biosensor w wektorze wirusowym nie wymaga tworzenia genetycznie modyfikowanej linii zwierząt, ponieważ po drobnej modyfikacji można go wprowadzić w dowolny narząd lub tkankę zwierzęcia w każdym stadium rozwoju.

Aby w najwyższym możliwym stopniu ograniczyć dyskomfort oraz cierpienie zwierząt związane z prowadzonymi na nich zabiegami, podczas każdej z procedur zwracaliśmy uwagę na zapewnienie im wszelkich możliwych udogodnień.

Poważny zabieg związany z wprowadzeniem wektora wirusowego AAV z konstruktem genetycznym prowadzony będzie w pełnej narkozie wraz ze środkami znieczulającymi (pod wpływem izofluranu zwierzęta śpią, ale dalej mogą odczuwać ból dlatego na czas operacji zostanie im podany Butomidol).

Po operacji zwierzęta zostaną umieszczone w czystych klatkach i do momentu wybudzenia się, będą ogrzewane za pomocą poduszki elektrycznej. Po zabiegu zwierzę może mieć stan zapalny i bóle pooperacyjne, dlatego na koniec operacji zwierzętom podany zostanie Tolfedine, który jest lekiem przeciwzapalnym, przeciwgorączkowym i przeciwbólowym. Podawanie tego leku może zostać przedłużone na kolejne 3 dni po operacji, żeby zwierzę bezboleśnie dochodziło do siebie.

W celu wyeliminowania agresji pomiędzy osobnikami po operacji zwierzęta trzymane będą pojedynczo w klatkach domowych.