

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu: **Rola serotoniny w patogenezie zaburzeń neurorozwojowych – poszerzone badania behawioralne**

1.Czas trwania projektu: 01.04.2017 - 31.12.2019

2.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) badania behawioralne, transporter serotoninowy, hydroksylaza tryptofanu, zwierzęta transgeniczne, testy kognitywne.

3.Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych)

A. Badania podstawowe

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.

Klasyfikacja: Cel badań: badania podstawowe; Rodzaj badań: układ nerwowy

Planowane doświadczenia stanowią poszerzenie i kontynuacje badań ujętych we wniosku „Rola serotoniny w patogenezie zaburzeń neurorozwojowych” (21-04-2016, 63/2016).

Badania wskazują na wpływ czynników neurorozwojowych na powstawanie takich zaburzeń jak zespół nadpobudliwości z deficytem uwagi (ADHD), spektrum zachowań autystycznych (ASD) i schizofrenia oraz na rolę neuroprzekaźnika serotoniny w patomechanizmie tych schorzeń. Dlatego w projekcie zostaną użyte trzy szczepy genetycznie zmodyfikowanych szczurów, wykazujących zmiany funkcji dwóch najistotniejszych komponentów układu serotoninowego, takich jak TPH2 (hydroksylaza tryptofanu - enzym odpowiedzialny za syntezę serotoniny) oraz SERT (transporter odpowiedzialny na wychwyt zwrotny serotoniny). Wyciszenie genu SERT (SERT KO) prowadzi do podniesienia zewnątrzkomórkowego poziomu serotoniny w mózgu, natomiast wyciszenie genu THP2 (THP2 KO) prowadzi do obniżenia poziomu tego neuroprzekaźnika. U zwierząt TetO-shTPH2 możliwe jest wyłączenie ekspresji THP2 w dowolnym okresie życia.

W ramach części projektu zostaną przeprowadzone szczegółowe badania behawioralne mające na celu ocenę zaburzeń zachowania szczurów, charakterystycznych dla ADHD, ASD i schizofrenii. Zachowanie zwierząt będzie oceniane w zestawie testów służących do oceny m.in., aktywności

ruchowej, funkcji społecznych/komunikacji ultradźwiękowych, powtarzalności zachowań (stereotypii), sztywności poznawczej czy impulsywności. Zaplanowane testy należą do najczęściej stosowanych modeli zwierzęcych do badania charakterystycznych dla ADHD, ASD i schizofrenii zaburzeń i pozwalają na wiarygodną analizę behawioralną trzech zmodyfikowanych genetycznie szczepów szczurów z różnym rodzajem zmian w obrębie układu serotoninowego. Metody te charakteryzują się niską inwazyjnością, oparte głównie na obserwacji naturalnych zachowań szczurów.

Przeprowadzane badania pozwolą odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób zaburzenia w obrębie układu serotoninowego wpływają na zachowanie zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem zmian fenotypowych charakterystycznych dla ADHD, ASD czy schizofrenii. Wyniki te przyczynią się do poszerzenia wiedzy o roli serotoniny w patogenezie tych schorzeń.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W projekcie planowane jest użycie zmodyfikowanych genetycznie szczepów szczurów z różnymi zmianami w obrębie układu serotoninowego:

- SERT KO – wyciszenie (tj. „knock-out”) genu transportera serotoninowego (SERT)
- THP2 KO - wyciszenie (tj. „knock-out”) genu transportera hydroksylazy tryptofanu (THP2)
- TetO-shTPH2 – indukowalne wyciszenie genu transportera hydroksylazy tryptofanu (THP2); tj. wyłączenie ekspresji THP2 jest możliwe w dowolnym okresie życia.

Planuje się uwzględnienie następujących grup eksperymentalnych:

- 1) SERT KO +/+WT
- 2) SERT KO -/- (homozygoty)
- 3) SERT KO +/- (heterozygoty)
- 4) THP2 KO +/+
- 5) THP2 KO -/-
- 6) TetO-shTPH2 +/+
- 7) TetO-shTPH2 +/-
- 8) Szczury Wistar – grupa kontrolna- tło genetyczne dla SERT KO
- 9) Szczury Dark Aguti (DA/HanRj) - tło genetyczne dla THP2 KO

Wszystkie grupy zwierząt będą wykorzystane w procedurze pt. „Ocena behawioralna zwierząt w baterii testów - kontynuacja” i będą poddawane takim samym czynnościom.

Liczebność grupy jest szacowana na 30 osobników (daje to łącznie 270 zwierząt).

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Nie można zastosować metody badawczej zapewniającej osiągnięcie celów bez wykorzystania zwierząt. Przeprowadzając badania behawioralne dotyczące złożonych funkcji poznawczych niemożliwym jest zastąpienie zwierząt kręgowych innymi zwierzętami. Istniejące modele zwierzęce zaburzeń związanych z ADHD, ASD i schizofrenią są opracowane właśnie dla gryzoni laboratoryjnych, głównie szczurów. Dodatkowo bogaty repertuar behawioralny szczurów pozwala na wnikliwą analizę zachowań tych zwierząt.

Liczba wykorzystywanych w planowanych badaniach zwierząt została ograniczona do poziomu niezbędnego do osiągnięcia celów. Planowane testy behawioralne zgrupowane zostały w „baterię” czyli zestaw testów. Pozwala to na wykorzystanie tych samych zwierząt we wszystkich testach. Prowadzi to do radykalnego zmniejszenia liczby zwierząt wymaganych do wykonania planowanych badań. Dodatkowo procedury są tak zmodyfikowane aby uzyskać jak najwięcej informacji podczas doświadczenia. Przykładowo w teście interakcji społecznych będzie także nagrywana a następnie analizowana wokalizacja ultradźwiękowa, a podczas adaptacji do testu będzie rejestrowana aktywność lokomotoryczna.

Wykorzystywane zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku, a metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak, aby eliminowały ból, cierpienie czy dystres. Stosowane metody badawcze są w większości oparte na naturalnym repertuarze zachowań szczurów, jak na przykład interakcje socjalne, emisja wokalizacji czy naturalna tendencja do zagrzebywania nowych przedmiotów. Inne procedury zawierają elementy uczenia w oparciu o nagrodę pokarmową. Nie stosowane są modele oparte o bodźce awersyjne, które mogłyby mieć działanie stresogenne. W przypadku testu interakcji socjalnym, procedura tak została zmodyfikowana aby ograniczyć czas izolacji (niezbędny do nasilenia zachowań społecznych) do minimum, czyli 2 h przed testem w miejsce stosowanej poprzednio 5-dniowej izolacji. W procedurze instrumentalnego testu oddalonego wyboru została wprowadzona modyfikacja polegająca na zastąpieniu tradycyjnie stosowanych dźwigni otworami (ang. nosepoke). Zagłębienie do otworu jest bardziej naturalną i łatwiejszą do nauczenia reakcją niż naciskanie dźwigni. Wpływa to na skrócenie czasu testu.

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUB MED i Google Scholar; Wykorzystałam słowa kluczowe: serotonin/ schizofrenia/ TPH2/ Tryptophan hydroxylase/ Cognition/ Knockout/ Development/ ADHD/ serotonin transporter/ SERT/ autism/ social behaviour/ Prepulse inhibition

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że istnieje związek pomiędzy układem

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

serotoninowym a zaburzeniami charakterystycznymi dla ADHD, schizofrenii czy autyzmu.

B. Brak jest danych dotyczących: kompleksowej charakterystyki behawioralnej zmodyfikowanych genetycznie szczurów: SERT-KO, TPH2-KO, TetO-shTPH2. Nie ma danych dotyczących szczurów TPH2-KO i TetO-shTPH2, a badania tych zwierząt stanowią przedmiot niniejszego projektu

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

A/ Rozwinięcie poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku określenia roli serotoniny w patogenezie schorzeń neurorozwojowych .