

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Rola białka CD44 produkowanego w astrocytach w rozwoju zachowań depresyjnych

2. Czas trwania projektu: do 31.05.2021

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): CD44, astrocyty, depresja

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.

Depresja to najczęstsza choroba psychiczna na świecie. Więcej niż połowa pacjentów jest oporna na standardową terapię (1). Coraz więcej badań wskazuje na kluczowy udział komórek glejowych - astrocytów w patogenezie depresji. U pacjentów z depresją obserwuje się spadek liczby oraz zmienioną morfologię astrocytów (2). Eksperymenty na szczurach pokazują, iż zablokowanie jednej z istotnych funkcji tych komórek, tj. wychwytu glutaminianu w szczelinie synaptycznej, jest wystarczające, aby wywołać zachowania depresyjne (3). Białko CD44 jest transbłonowym receptorem hialuronianu, który stanowi główny składnik macierzy zewnątrzkomórkowej w mózgu. Jednak rola CD44 w astrocytach w mózgu pozostaje nieznaną.

Badania wykazały, że ekspresja CD44 jest zmniejszona w mózgu samobójców (4). Poziom białka CD44 jest także zmniejszony w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z epizodem depresyjnym (5). Ponadto, gen CD44 zidentyfikowano jako możliwy gen ryzyka w zachowaniach samobójczych (6). Badania z użyciem myszy CD44 „knock-out” (brak białka CD44 we wszystkich komórkach organizmu), wykazały, zwiększoną podatność na zachowania lękowe wywołane stresem u tych myszy w porównaniu ze

zwierzętami o niezmienionym genotypie (7). Uzyskane dane wskazują na ważną rolę CD44 w regulacji zachowań depresyjnych, ale nie precyzują, ekspresja CD44 w którym typie komórek w mózgu (neuronach czy gleju) jest odpowiedzialna za ten efekt.

Celem naukowym doświadczenia jest poznanie roli astrocytarnego białka CD44 w patogenezie depresji. Szczegółowym celem jest sprawdzenie, czy zwierzęta transgeniczne, wykazujące wyciszenie genu CD44 w astrocytach w hipokampie, wykazują zwiększone zachowania depresyjne (badania podstawowe, układ nerwowy). Do badań posłużymy się mysimi modelami transgenicznymi osobników z wyciszeniem genu CD44 w astrocytach, wykorzystując system Cre/lox, w którym rekombinaza Cre pod kontrolą specyficznego dla astrocytów promotora GFAP (wprowadzona egzogennie z użyciem wektora wirusowego AAV), rozpoznaje sekwencje loxP (otaczające docelowy fragment genomu) i wycina znajdujący się między nimi gen/fragment genu DNA. Tak powstaje regulowany w czasie i przestrzeni knock-out danego genu.

Na pierwszym etapie u myszy transgenicznych indukowane będzie wyciszenie (CD44-KO) białka CD44. Następnie, po okresie rekonwalescencji, za pomocą testów behawioralnych (test preferencji sacharozy, test wymuszonego pływania, test typu „Dark Light Box”) oceniany będzie poziom zachowań depresyjnych. Dodatkowo, mózgi myszy uśmierconych, po zakończeniu monitorowania poziomu depresji, zostaną poddane analizie morfologicznej w celu dokonania korelacji między zmianami behawioralnymi i strukturalnymi (na poziomie komórkowym i subkomórkowym) w mózgach badanych osobników. Uzyskane wyniki mogą wnieść znaczący wkład w poszerzenie wiedzy na temat komórkowych i molekularnych podstaw depresji.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Liczba zwierząt: 24

Gatunek: mysz, tło genetyczne C57BL/6J

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym tematem badawczym, w bazie danych PUBMED.

Wykorzystałem następujące słowa kluczowe: „rat”, „CD44”, „knock out”, „depressive behavior”, „depression”, „astrocyte”. Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam, że zgromadzone dane literaturowe uzasadniają przeprowadzenie planowanych badań, ponieważ jak dotychczas nie

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

wykazano w sposób jednoznaczny czy zachowania depresyjne u myszy u których wyciszona zostanie ekspresja genu kodującego CD44 związane są z zaburzeniem działania komórek glejowych czy neuronów.

ZASADA ZASTĄPIENIA Opisujący powyżej projekt jest drugim etapem prowadzonych przez nas badań. W pierwszym wszystkie testy prowadzone były najpierw in vitro na hodowlach komórkowych. Dopiero po uzyskaniu wyników pozwalających stwierdzić, że zmiana ekspresji genu kodującego białko CD44 w astrocytach powoduje zaburzenia działania sieci neuronalnej, zaczęliśmy planować procedury z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. Dla zbadania molekularnych mechanizmów odpowiadających za złożone zachowania niezbędne jest użycie do badań zwierząt, która mają złożony układ nerwowy, zdolny do wytworzenia reakcji na różnego rodzaju bodźce (wzbogacone środowisko, uczenie). Typ i charakter badań wykluczają możliwość zastosowania badań w warunkach in vitro z wykorzystaniem ustalonych hodowli komórek nerwowych, ponieważ brak im kontekstu tkankowego, nie prowadzą do rozwoju faktycznych struktur układu nerwowego ani złożonych mierzalnych reakcji behawioralnych. Eksperymenty, które chcemy przeprowadzić, zostaną wykonane na myszach szczepu C57BL/6(CD44fl/fl), które rutynowo stosowane są w badaniach nad lekami przeciwdepresyjnymi jak i procesami zachodzącymi podczas powstawania depresji (1).

ZASADA OGRANICZENIA Planuje się wykorzystanie minimalnej liczby zwierząt potrzebnych do otrzymania założonych w projekcie danych dotyczących zmienności w wyżej wymienionych grupach zwierząt. Zmniejszenie liczby zwierząt może skutkować brakiem wystarczających danych do analizy statystycznej, co może zaważyć na powodzeniu całego doświadczenia (ilości zwierząt zostały wyliczone zgodnie z prawidłowościami statystycznymi jak w punkcie 6).

Zastosowane testy behawioralne zaplanowane są w zakresie, który pozwala na uzyskanie maksymalnej ilości znaczących danych przy najmniejszej możliwej ingerencji w zachowania myszy.

ZASADA UDOSKONALENIA Aby w najwyższym możliwym stopniu ograniczyć dyskomfort zwierząt związany z prowadzonymi na nich procedurami, podczas każdej z nich zwracamy uwagę na zapewnienie im wszelkich możliwych udogodnień. Wszystkie czynności związane z iniekcją wirusowego wektora do mózgu przeprowadzane są w pełnym znieczuleniu z wykorzystaniem środków przeciwbólowych i przeciwzapalnych. Dodatkowo w początkowym okresie rekonwalescencji myszy otrzymują dodatkowe dawki środków przeciwzapalnych oraz przeciwbólowych w celu ograniczenia dyskomfortu towarzyszącego rekonwalescencji po zabiegu. Przed procedurami behawioralnymi zwierzęta przyzwyczajane są do pomieszczenia do chowu oraz do obecności i dotyku eksperymentatora w celu zminimalizowania mogącego pojawić się stresu. W trakcie doświadczenia zwierzęta utrzymywane będą w środowisku standardowym.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy ☐

TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.

X NIE