

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu:

„Charakterystyka biochemiczna i behawioralna myszy z knock-outem transportera glutaminy SAT1”

2. Czas trwania projektu: 1 lipca 2019 r. – 31 grudnia 2020 r.

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): transporter glutaminy SAT1, Slc38a1, pamięć, padaczka

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.

Myszy transgeniczne TgH(flSAT1)xTgH(Cre-ERT) (SAT1-KO) charakteryzują się całkowitym brakiem (knock-outem) genu kodującego transporter glutaminy SAT1 (Slc38a1), który w mózgu występuje głównie na neuronach hamujących (GABAergicznym) w mózgu. Szczep powstał w laboratorium Prof. Farrukha A. Chaudhry (Institute of Basic Medical Sciences, University of Oslo) i został sprowadzony do Zwierzętarni IMDiK PAN w 2017r., w ramach wspólnego projektu badawczego NCBiR „Hepentrans”. Szczep ten został jak dotąd opisany w literaturze naukowej jeden raz, przez grupę autora myszy SAT1-KO (Qureshi et al., 2019, Cereb Cortex): wyniki wskazują na zaburzenia neurotransmisji GABAergicznej. Badania prowadzone przez Prof. Chaudhry w Norwegii oraz – po uzyskaniu zgody Komisji – w Zakładzie Neurotoksykologii będą pierwszymi na świecie badaniami z użyciem tego modelu zwierzęcego. Celem proponowanych badań jest więc scharakteryzowanie szczepu pod względem behawioralnym i biochemicznym. Z obserwacji prowadzonych podczas hodowli wynika, że myszy nie odbiegają wyglądem, zachowaniem, stanem zdrowia od myszy szczepu C57Bl, z którego się wywodzą. Zakłada się jednak, że białko SAT1, jako zaangażowane w cykl wymiany prekursorów neuroprzekazników między neuronami a astrocytami, może wpływać na neuroprzekazywanie w ośrodkowym układzie nerwowym i pełnić rolę w mechanizmach uczenia się/pamięci. Aby wyjaśnić rolę

białka SAT1 w wymienionych procesach, proponuje się przeprowadzenie następujących testów behawioralnych: basen Morrisa oraz labirynt krzyżowy podwyższony. Ponadto, proponuje się przeprowadzenie doświadczenia mającego na celu zbadanie, czy niedobór białka SAT1 wpływa na przebieg epileptogenezy, gdyż zakłada się, że niedobór transportera SAT1, skutkujący obniżeniem przewodności hamującego (GABAergicznego) (Qureshi et al., 2019), a więc uwrażliwia zwierzęta na czynnik indukujący drgawki. Od zwierząt pobrane zostaną również tkanki (mózg, krew, wątroba, mięśnie) do oznaczeń biochemicznych wybranych parametrów związanych z syntezą i transportem neuroprzekaźników: glutaminianu i GABA.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa, szczep transgeniczny TgH(flSAT1)xTgH(Cre-ERT) (SAT1-KO), 88 sztuk, 20 – 24 tygodni, samce i samice

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując przedkładany projekt badawczy, sprawdzono stan istniejącej wiedzy w zakresie objętym wnioskiem w bazach danych PUBMED, EBSCO, SCOPUS i Google Scholar, wykorzystując słowa kluczowe i frazy: glutamine transporter SAT1, Slc38a1, mice knock-out, GABAergic neurones, glutamine-glutamate cycle, pilocarpine mouse model, behavioural tests, Morris water maze, elevated plus maze.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że:

A. Nieliczny nagromadzony materiał badawczy nt. SAT1 pozwala na stwierdzenie, że rola SAT1 w funkcjach ośrodkowego układu nerwowego jest bardzo słabo poznana. Szczep ten został jak dotąd opisany w literaturze naukowej jeden raz, przez grupę autora myszy SAT1-KO (Qureshi et al., 2019, Cereb Cortex): wyniki wskazują na zaburzenia neurotransmisji GABAergicznej, co potencjalnie czyni ten model użytecznym do badania podłoża molekularnego padaczki

B. Brak jest danych dotyczących użycia proponowanego modelu w badaniu epilepsji: nie przeprowadzono dotychczas żadnych tego typu badań na myszach z knock-outem SAT1, a model ten dostępny jest jedynie w dwóch laboratoriach badawczych na świecie: w Oslo u Prof. Chaudhry oraz w Warszawie, w Zakładzie Neurotoksykologii.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

A/ Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku poznania roli SAT1 w neuroprzekaźnictwie i/lub w procesach związanych z uczeniem się i pamięcią

B/ Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na wykazaniu, że SAT1 bierze udział w mechanizmie inicjowania/przebiegu stanu padaczkowego, przyczyni się w znacznym stopniu do rozumienia patomechanizmu padaczki, która, ze względu na złożoną etiologię, postępujący charakter zmian

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

neurodegeneracyjnych oraz nierzadką lekooporność, wciąż stanowi wyzwanie dla medycyny.

Planując doświadczenia, kierowano się zasadą 3R (ang. replacement, reduction, refinement), dbając o polepszenie bytu i humanitarne traktowanie zwierząt doświadczalnych.

Replacement (zastąpienie)

Myszy z knock-outem SAT1 są modelem unikalnym. Nie istnieje żaden model zastępczy, pozwalający na ocenę wpływu deficytu SAT1 *in vivo*. Modele *in vitro* nie odwzorują złożonych funkcji wyższych, tj. poznawczych.

Reduction (redukcja)

Wobec braku odpowiednich modeli nie-zwierzęcych postanowiono zrealizować plan badawczy z wykorzystaniem najmniejszej z możliwych liczby zwierząt, która zapewni osiągnięcie celu badawczego i statystycznego. Przewidziano zastosowanie czułych i wiarygodnych testów behawioralnych, w celu zminimalizowania rozrzutu w próbach badawczych, co zmniejsza liczbę zwierząt niezbędnych do uzyskania wymaganej liczby powtórzeń. Doświadczenia zaplanowano na obu płciach zwierząt, co jest dopuszczalne w badaniach z użyciem cennych zwierząt knock-outowych – zmniejsza to liczbę hodowanych zwierząt o połowę. Ta sama grupa zwierząt zostanie wykorzystana w dwóch testach. Od zwierząt planowanych do wykorzystania pobrane zostaną nie tylko mózg, ale także krew, mięśnie, wątroba, aby maksymalnie rozszerzyć zakres parametrów biochemicznych do analizy. Ponadto, tkanki pobrane z każdego zwierzęcia będą bankowane w zamrażarce niskotemperaturowej, co pozwoli na ich wielokrotne użycie.

Refinement (udoskonalenie)

Wykorzystywane zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku, a metody badawcze zastosowane w procedurach zostały wybrane tak, aby ograniczały do minimum albo eliminowały ból, cierpienie, dystres lub możliwość trwałego uszkodzenia organizmu tych zwierząt. Doświadczenia behawioralne są dla zwierząt całkowicie bezpieczne i nie generują nadmiernego stresu – zwierzęta szybko uczą się odnajdywania platformy, więc pozostają w wodzie do kilkunastu sekund. Dołożono wszelkich starań, aby maksymalnie ograniczyć cierpienia w trakcie wykonywanych doświadczeń pilokarpinowych (procedura 2): zminimalizowano czas trwania procedury dotkliwej do 3 - 3.5 godzin (po upływie tego czasu wszystkie zwierzęta zostaną humanitarnie uśmiercone), stan zwierząt będzie monitorowany na każdym etapie doświadczenia, aby ewentualnie przerwać cierpienie i dokonać eutanazji.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

- ☒ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☐ NIE

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