

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Wpływ stresu separacji od matki na procesy związane z dojrzewaniem bariery krew-mózg w tym, jej przepuszczalność i integralność

2. Czas trwania projektu 2 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): stres we wczesnym okresie życia, separacja od matki, bariera krew-mózg, choroby psychiczne, choroby neurodegeneracyjne

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

Według dostępnych danych klinicznych, stres we wczesnym okresie życia (z ang. *early-life stress*, ELS), zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia przewlekłych zaburzeń zdrowotnych w życiu dorosłym. Wśród nich wyszczególniono choroby układu sercowo-naczyniowego, cukrzycę, jak i choroby neurodegeneracyjne oraz psychiczne. Schorzenia te często ujawniają się w późniejszym okresie życia, pomimo iż wiele z nich ma swoje początki w trakcie rozwoju mózgu. Badania dowodzą, że dysfunkcje bariery krew-mózg (z ang. *blood brain barrier*, BBB) są ściśle zaangażowane w etiologię, rozwój i progresję wspomnianych chorób. Powyższe fakty oraz obserwowane w stosowanym przez nas modelu ELS liczne zaburzenia rozwoju wybranych struktur mózgu, spowodowały, że celem tego wniosku jest zbadanie, czy ELS w trakcie okresu krytycznego dla rozwoju mózgu, wpływa na dojrzewanie i funkcjonowanie BBB. W projekcie wykorzystamy stosowany w naszym laboratorium od lat model ELS, oparty o procedurę separacji osesków szczurzych od matki (procedura nr 1 - umiarkowana). W ciągu dwóch pierwszych tygodni życia, krytycznych dla dojrzewania mózgu oraz BBB u gryzoni, oseski szczurów będą oddzielane od matek. Kompleksowe badania, zawarte w tym projekcie, będą prowadzone na trzech różnych etapach życia szczura: u młodych gryzoni kiedy BBB jest niedojrzała; w okresie przedadolescencyjnym, po uszczelnieniu BBB oraz u osobnika dorosłego (procedura nr 1-3). Mając na uwadze różnice płciowe, w naszym projekcie uwzględniliśmy zarówno samce, jak i samice. Zaplanowane procedury

zakładają zbadanie przepuszczalności BBB oraz ciągłość i dystrybucję tworzących ją białek złącz ścisłych oraz aktywację śródbłonna BBB. Wprowadzenie terminalnej procedury nr 2 pozwoli nam sprawdzić integralność i funkcjonowanie BBB, planujemy zbadać jej ilościową oraz jakościową przepuszczalność przy użyciu odpowiednich barwników. Terminalna procedura nr 3, jest niezbędna do przeprowadzenia eksperymentów z wykorzystaniem metod immunohistochemicznych oraz immunofluorescencyjnych, które pozwolą zbadać m.in., rozmieszczenie i ciągłości połączeń ścisłych BBB oraz pomiaru markerów aktywacji śródbłonna BBB. Dodatkowo, dekapitacja przewidziana w procedurze nr 1 dostarczy tkanek potrzebnych do analizy biochemicznej ekspresji genów i białek komponentów złącz ścisłych BBB oraz markerów aktywowanego śródbłonna BBB. Realizacja projektu zawartego we wniosku pozwoli na zdobycie kluczowych informacji dotyczących pierwotnych mechanizmów ELS, które wniosą cenny wkład w obecny stan wiedzy o stosowanym przez nas modelu.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Planuje się wykorzystanie 798 szczurów Wistar.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Niestety, niemożliwe jest zastosowanie metody badawczej zapewniającej osiągnięcie celów tego projektu bez wykorzystania zwierząt. W celu modelowania etiologii oraz dynamiki rozwoju chorób psychicznych i neurodegeneracyjnych nie jest możliwe zastąpienie zwierząt kręgowych innymi zwierzętami, a przedstawiony w niniejszym wniosku model jest opracowany właśnie z wykorzystaniem gryzoni, szczurów. Co więcej, badany przez nas model w znacznym stopniu oparty jest na interakcji matka-potomstwo. Ze względu na fakt ograniczonego rozwoju więzi matki z potomstwem u gatunków niższych, zmuszeni jesteśmy pracować na gryzoniach. Z wykorzystaniem obecnie dostępnych metod *in vitro*, czy też *in silico* wciąż trudno jest badać tak skomplikowane układy, jakim jest badany przez nas model.

Liczba zwierząt wykorzystanych w planowanym doświadczeniu została ograniczona do liczby pozwalającej na osiągnięcie określonych celów badawczych i bazującej na doświadczeniach własnych i dostępnej literaturze z zakresu wykorzystania zwierzęcych modeli badawczych do badań nad stresem w kontekście neurorozwoju i etiologii chorób psychicznych i neurodegeneracyjnych. Liczba zwierząt zaproponowana w doświadczeniu uwzględnia zarówno specyfikę rozrodu szczurów, jak również ich odpowiedź na działanie czynników środowiskowych i pozwala na osiągnięcie wyników istotnych statystycznie w przedstawionych eksperymentach. Również w celu ograniczenia liczby zwierząt, planowane jest dłuższe utrzymanie samców rozplodowych, w celu ich wielokrotnego wykorzystania do kojarzenia w celach rozrodczych. Co więcej, planowany projekt zakłada badanie różnic międzypłciowych, co powoduje, że na biochemiczną analizę poświęcane są całe mioty. Obecnie, większość prowadzonych badań z różnych przyczyn obejmuje eksperymenty z udziałem jednej płci, gdzie poświęcane są zwykle samce.

Proponowany przez nas model wczesnego stresu postnatalnego, jest oparty o stosunkowo umiarkowaną procedurę w porównaniu do bardziej dotkliwych modeli dostępnych w literaturze które między innymi zakładają: znacznie dłuższy czas izolacji (12-godzin) w bardziej dotkliwych warunkach tj. temperatura pokojowa, czy brak ściółki).

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

Zwierzęta są stresowane, w stopniu, który pozwala na wywołanie odpowiednich deficytów, jednak należy podkreślić, że: izolowane są całe mioty, a nie pojedynczo osobniki; separacja jest stosunkowo krótka (3 godziny) i odbywa się w warunkach zbliżonych do naturalnego gniazda.

W trakcie przygotowywań projektu badawczego, sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym typu PubMed oraz Google Scholar. Wykorzystano następujące słowa kluczowe: early life stress, maternal separation, blood brain barrier permeability, neurodevelopment, stress, tight junctions, mental disorders, neurodegeneration disease .

Na podstawie przeglądu literatury, stwierdzono, że:

1. Doświadczenie stresu we wczesnym okresie życia (z ang. *early-life stress*, ELS), może zwiększać ryzyko zapadalności na przewlekłe choroby w życiu dorosłym. Wśród nich wyszczególniono choroby układu sercowo-naczyniowego, a także choroby neurodegeneracyjne oraz psychiczne. Schorzenia te często ujawniają się w późniejszym okresie życia, pomimo iż wiele z nich ma swoje początki w trakcie rozwoju mózgu. Badania dowodzą, że dysfunkcje bariery krew-mózg (z ang. *blood brain barrier*, BBB) są ściśle zaangażowane w etiologię, rozwój oraz progresję wspomnianych chorób. Co więcej, dane statystyczne sugerują również, że zapadalność na choroby neurodegeneracyjne jest powiązana z płcią.
2. Wciąż niewiele wiadomo na temat wpływu ELS, na zmiany w procesach dojrzewania oraz funkcjonowania BBB.

Podjęte przez nas badania, i uzyskane wyniki umożliwią sprawdzenie, czy ELS wywołuje dysfunkcje BBB, będącą elementem patomechanizmów wymienionych schorzeń. Tym samym, zdobędziemy kluczowe informacje, które pozwolą nam dogłębniej zrozumieć patomechanizmy leżące u podstaw ELS, a także poszerzenie obecnego stanu wiedzy dotyczącej stosowanego przez nas modelu ELS. Przypuszczamy również, iż podjęte przez nas badania mogłyby pośrednio przyczynić się do wcześniejszej diagnostyki chorób psychicznych czy predyspozycji do chorób neurodegeneracyjnych, a także wdrażania badań profilaktycznych u dzieci i młodzieży dotkniętych ELS.