

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu ***Rola hiperhomocysteinemii w chorobie Alzheimer'a***

2. Czas trwania projektu 1.05.2019 -30.04.2024

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): AD, hiperhomocysteinemia, modele zwierzęce, neurodegeneracja, funkcje poznawcze

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) **B. Badania translacyjne lub stosowane**

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.

Homocysteina (Hcy) jest aminokwasem niebiałkowym, który powstaje jako jeden z przejściowych produktów metabolizmu metioniny, dostarczanej w diecie. Jej nadmierne stężenie we krwi (hiperhomocysteinemia, HHcy) jest stwierdzonym czynnikiem ryzyka chorób układu naczyniowo-sercowego oraz chorób neurodegeneracyjnych tj. choroba Alzheimer'a (AD). Jeden z metabolitów Hcy, Hcy-tiolakton (HTL) modyfikuje białka w procesie *N*-homocysteinylacji. *N*-Hcy-białka tracą swoje funkcje i nabywają tendencji do agregacji. Główna hipoteza, którą pragniemy zweryfikować zakłada, że HHcy promuje chroniczny stan zapalny w mózgu oraz obniża autofagię, proces, w którym usuwane są zniszczone bądź нефunkcyjne białka lub zbędne elementy komórki.

Korzystając z modeli myszy, w których deaktywowane są enzymy detoksykujące szkodliwy HTL oraz z modeli AD, będziemy badać mechanizmy toksyczności homocysteiny i jej metabolitów, głównie ich

udział w patologii układu nerwowego.

Badania zmian proteomu mózgu myszy, jak również analiza poszczególnych procesów takich jak indukcja stanu zapalnego, odpowiedź immunologiczna oraz autofagia w HHcy i AD przeprowadzone zostaną na tkankach mózgu *post mortum*. W testach behawioralnych, których dotkliwość jest łagodna (labirynt Y, rozpoznawanie nowego obiektu) do umiarkowanej (labirynt Morrisa), zbadamy wpływ HHcy na uczenie się i zapamiętywanie. Dzięki takiemu podejściu połączymy konkretne zmiany zaobserwowane na poziomie białek w mózgu spowodowane HHcy z obserwowanymi odchyleniami funkcji poznawczych analizowanych myszy.

Myszy odczuwać będą umiarkowany dystres w trakcie prowadzenia procedur, natomiast wyniki uzyskane dzięki zastosowaniu ww modeli w proponowanych badaniach, poza wyjaśnieniem podstawowych aspektów wpływu Hcy na zmiany w proteomie mózgu oraz zmiany funkcji poznawczych, **pozwolą na określenie szlaków i mechanizmów leżących u podstaw związku HHcy z chorobą Alzheimer’a i innymi chorobami neurodegeneracyjnymi.** Znalezienie i potwierdzenie mechanizmów rozwoju AD jest podstawą do opracowywania diagnostyki i terapii.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W analizach wykorzystanych będzie **480 myszy** (240 samców i 240 samic), po 10 osobników z każdej płci z 12 genotypów w 2 grupach testowych

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

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

ZASADA ZASTĄPIENIA:

Przygotowując projekt badawczy, sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych PubMed, Ebsco, Web of Science (JCR), Google Scholar, Science Direct, Wiley, stosując słowa kluczowe: mouse/hyperhomocysteinemia/high Met diet/AD models/tiolactonase/ mTOR//inflammation/autophagy/ cognitive function. Zaplanowanego badania nie można przeprowadzić w warunkach hodowli komórkowych lub tkankowych *in vitro* ani za pomocą symulacji komputerowych *in silico*, ponieważ żaden z tych modeli nie jest w stanie odtworzyć modelu fizjologicznego. Dodatkowo, z uwagi na niepokrywające się spektrum charakterystyki planowanych modeli zwierzęcych tylko łączne ich wykorzystanie w tych badaniach pozwoli na całościową analizę zmian wywołanych HHcy, prawidłową ich analizę i w połączeniu z badaniami molekularnymi na określenie mechanizmów toksyczności HTL w AD. Nie ma danych w literaturze świadczących, że przeprowadzono badania dotyczące wpływu hiperhomocysteinemii indukowanej zarówno genetycznie jak i dietetycznie w modelach AD na funkcje poznawcze, tworzenie pamięci i uczenie się. Zaplanowane badania według naszej najlepszej wiedzy są prowadzone pierwszy raz na świecie.

ZASADA OGRANICZENIA

W doświadczeniu zostaną wykorzystane wyłącznie zwierzęta hodowlane. Liczebność grup została sumiennie przeliczona przy pomocy metody kalkulacji zasobu wg Charan and Kantharia, której wynikiem jest najniższa z możliwych liczba zwierząt w doświadczeniu, dla których wyniki przeprowadzonych badań będą statystycznie istotne.

Powtórne przeprowadzenie testu w labiryncie Y i testu Morrisa dla każdej z myszy zredukowało o połowę liczbę potrzebnych w naszych badaniach myszy, przy takim podejściu na jednym osobniku sprawdzimy zmiany funkcji poznawczych w rozwoju AD i przy wpływie HHcy w młodym wieku (6 miesięcy) i starszym wieku (12 miesięcy). Dodatkowo, prowadzone w trakcie trwania eksperymentu pomiary z krwi obwodowej i moczu pozwalają wyznaczyć trend zmian co znowu pozwoliło zmniejszyć całkowitą liczbę zwierząt w eksperymencie.

Również, aby wyeliminować konieczność ponownego prowadzenia podobnej hodowli lub skutecznie ograniczyć liczbę zwierząt potrzebnych do przyszłych badań prócz mózgu pobrane zostaną również wszystkie pozostałe organy (wątroba, serce, nerki, płuco, śledziona, oczy, kości, skóra) co zapewni możliwość prowadzenia badań w innych aspektach/projektach.

ZASADA UDOSKONALENIA:

W celu zapewnienia optymalnego dobrostanu, myszy będą utrzymywane w grupach po 5 osobników tej samej płci w klatkach zawierających wzbogacenia (klocki drewniane, rurki). Wszystkie procedury na myszach będą wykonywane przez wąską grupę wysoko wykwalifikowanych pracowników, co ograniczy stres zwierząt związany m.in. z nowymi osobami. Każdy z eksperymentatorów będzie uczestniczył w aklimatyzacji zwierząt. Osoby planujące i wykonujące procedury na zwierzętach posiadają wieloletnie doświadczenie w prowadzeniu badań behawioralnych. Myszy przed każdym z eksperymentów będą osztywiane ze sprzętem co ograniczy ich stres. Sprzęt używany w badaniach behawioralnych jest specjalnie wykonany do pracy z myszami (mniejsze wymiary) i bezpieczny dla zwierząt (materiały z atestem do użytku w przemyśle spożywczym).

Dodatkowo, w celu zmniejszenia niedogodności spowodowanej długotrwałym testowaniem zachowań zastąpiliśmy 12-dniowy test w 8- ramiennych labiryncie promienistym na jednodniowe badanie w labiryncie Y (8 minut).

Czułe metody biochemiczne zaplanowane w doświadczeniu i komercyjnie dostępne zestawy dedykowane dla myszy, pozwalają na minimalizację objętości krwi potrzebną do pobrania każdorazowo od zwierzęcia.

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.