

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1.Tytuł projektu: Terapia genowa ataksji rdzeniowo-mózdkowych: przywracanie prawidłowego metabolizmu cholesterolu poprzez mózgową nadekspresję 24-hydroksylazy cholesterolowej (CYP46A1)

2.Czas trwania projektu 02.01.2019 - 31.11.2023

3.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3, poliQ, badania przedkliniczne

4.Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) **B. Badania translacyjne**, Zaburzenia układu nerwowego i zaburzenia psychiczne u człowieka.

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.

Upośledzony metabolizm cholesterolu w mózgu jest dobrze udokumentowany dla wielu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, Alzheimer, Huntingtona, Niemann-Pick (typ C), a także dla zaburzeń związanych z wiekiem. Cholesterol jest ważny dla funkcjonowania neuronów w procesach przekazywania sygnałów. Nadmiar cholesterolu jest szkodliwy, jednakże czasami mózg nie potrafi usunąć niepotrzebnego cholesterolu z tkanki. Tylko przekształcenie cholesterolu w jego formę uwodnioną (24-hydroksycholesterol) przez enzym CYP46A1 jest przemianą cholesterolu, która sprawia, że może on przeniknąć z tkanki nerwowej do krwiobiegu poprzez barierę krew-mózg. Nasze wstępne wyniki wskazują, że poziom enzymu CYP46A1, jak i uwodnionej wersji cholesterolu są obniżone w mózgu myszy, transgenicznego modelu, ataksji rdzeniowo-mózdkowej, a także u pacjentów z ww. ataksją. Celem projektu jest potwierdzenie wpływu złego metabolizmu cholesterolu w ataksjach rdzeniowo-mózdkowych oraz udowodnienie skuteczności terapii genowej polegającej na sztucznym zwiększeniu poziomu enzymu CYP46A1 w ataksjach rdzeniowo-mózdkowych. Po stronie naszego

zespołu leży wygenerowanie kolonii myszy mut/mut Ki91 i kolonii C57BL/6, a następnie przeprowadzenie iniekcji domózgowych środka, który obniży poziom enzymu CYP46A1 oraz pokaże czy może to być składnik procesu chorobowego w ataksjach poprzez ocenę po-iniekcyjnych zmian behawioralnych. Przewidziane w projekcie zabiegi operacyjne mogą spowodować ból charakterystyczny dla gojenia się przeciętej skóry głowy. Jednak duże doświadczenie eksperymentatorów, jak i przewidziane środki znieczulające pozwolą ograniczyć go do minimum. Mózg ze względu na brak receptorów bólowych nie jest źródłem bólu. Zachowanie sterylności w trakcie zabiegów jak i dalsza opieka pooperacyjna minimalizują ryzyko powikłań takich jak zakażenia. Zaplanowane analizy pozwolą ocenić zmiany poziomu enzymu CYP46A1 w mózgu i wpływ zmian tych poziomów na przenikanie cholesterolu przez barierę krew-mózg i wynikający z tego obraz chorobowy ataksji SCA3.

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu użyte zostaną 144 myszy domowe (*Mus musculus*) obu płci.

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

Celem planowanych badań jest uzyskanie przekonujących dowodów eksperymentalnych na zastosowanie obiecującej terapii genetycznej dla ataksji mózdkowo-rdzeniowych typu 3 i 7. Terapia ta miałaby bazować na enzymie przekształcającym cholesterol i ułatwiającym jego usuwanie z mózgu. Dobór mysich modeli, jaki i zastosowanego terapeutyku to wypadkowa poprzednich doświadczeń prowadzonych przez nasz zespół, jak i pozostałych członków konsorcjum.

**ZASTĄPIENIE:** Przed podjęciem decyzji o wykorzystaniu zwierząt w planowanych doświadczeniach, dokonano szczegółowego przeglądu dostępnej literatury naukowej w zakresie patogenezy ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 z użyciem modeli komórkowych i zwierzęcych. Wykorzystano do tego bazy danych jak: PUBMED, EBSCO oraz Web of Science. Przeanalizowano wszystkie możliwości wykorzystania organizmów o prostszej budowie jak *S. cerevisiae*, *C. elegans*, czy *D. melanogaster*, które mogłyby stanowić alternatywę dla ssaków. Wspomniane modele muszki owocowej, nicieni czy rybek z rodzaju *danio* są wprowadzane stosowane do modelowania chorób człowieka, jednak nie wykazują złożonych objawów chorobowych podobnych do objawów u ludzi, co stanowi znaczne ograniczenie w ocenie progresji choroby czy stosowanej strategii terapeutycznej. Dlatego też zastosowanie ich w prezentowanym projekcie badawczym nie zapewniłoby wiarygodnych i miarodajnych wyników, udzielających jasnej odpowiedzi na postawione pytania.

Aby w pełni scharakteryzować zmiany poziomu enzymu CYP46A1 w ataksji rdzeniowo-mózdkowej, konieczne jest użycie kręgowców o złożonym układzie nerwowym, dla których dostępne są wyspecjalizowane testy behawioralne. Dotychczas nie zostały opracowane modele zwierzęce dla SCA3, dlatego też w tym przypadku wykorzystanie myszy, jako modelu jest uzasadnione. Przemawia za tym poziom rozwoju centralnego układu nerwowego u myszy, który pozwala na obserwacje patologii wywołanych chorobą neurodegeneracyjną i porównanie ich do tych obserwowanych u człowieka (Morton i Howland, 2013). W odniesieniu do obecnego stanu wiedzy i hipotezy przedstawionego projektu stwierdzamy, iż nie jest możliwe zastąpienie modelu gryzoni innym. Dane literaturowe wskazują, że

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

myszy laboratoryjne są najczęściej wykorzystywanym obiektem do testowania założeń zarówno odnośnie patogenezы jak i testowania strategii terapeutycznych w chorobie Huntingtona oraz ataksji rdzeniowo-mózdkowej. Wydają się one być również wystarczające, a zarazem niezbędne w prezentowanym projekcie.

**OGRANICZENIE:** Wykorzystanie modelu Ki91 w projekcie jest podyktowane jednostką chorobową, która te modele dotyka. Bogate doświadczenie eksperymentatorów w pracy z tymi zwierzętami zostało wykorzystane do zminimalizowania grup osobników.

Planując eksperyment dążono do zmniejszenia do niezbędnego minimum liczby zwierząt użytych w projekcie. Proponowane grupy badane reprezentujące oba mysie modele oraz dobrze przemyślane grupy kontrolne zostały zaplanowane tak, by jak najbardziej ograniczyć dodatkowe użycie zwierząt typu WT stanowiących często stosowane grupy kontrolne. Liczba zwierząt na grupę została określona na podstawie dostępnego piśmiennictwa oraz bazując na doświadczeniu zdobytym podczas charakterystyki modelu Ki91 tak, by można było przeprowadzić racjonalne analizy statystyczne.

W dbałości o zminimalizowanie stresu i bólu ponoszonego przez zwierzęta podczas zabiegów operacyjnych, wiążącego się z powstaniem rany w centralnej części głowy czy iniekcji domózgowych, myszy zostaną znieczulone za pomocą mieszanki powietrza i izofluranu w komorze. Po uprzednim sprawdzeniu głębokiej anestezji zwierząt testem refleksu łapki, zwierzę zostanie przeniesione do aparatu stereotaktycznego, gdzie dalej będzie pod znieczuleniem ogólnym w zmniejszonej dawce izofluranu podanej przez stożek nosowy. Mysz przebywać będzie na ciepłej podkładce zabezpieczającej ją przed hipotermią. Powierzchnia około-zabiegowa zostanie przykryta folią, w celu zmniejszenia ryzyka zakażenia. Głowa myszy zostanie pozbawiona sierści za pomocą kremu do depilacji. Po przemyciu wodnym roztworem jodyny, zostanie wykonane nacięcie skóry. W trakcie wszystkich wymienionych powyżej zabiegów i procedur, zwierzęta będą przebywać w anestezji, co ograniczy do minimum możliwość odczuwania przez nie bólu lub stresu. Ponadto, w celu ograniczenia niepożądanych skutków planowanych zabiegów, oczy zwierząt zostaną zabezpieczone przed wysychaniem za pomocą soli fizjologicznej bądź lubrykantu. Pomimo zastosowania środków mających na celu ograniczenie niepożądanych skutków planowanych zabiegów, nie jest wykluczone ich wystąpienie. Szkody, do których może dojść: ogólne osłabienie, apatie, reakcje uczuleniową na zastosowane leki, zaczerwienienie skóry głowy w okolicy rany, miejscowe zakażenie eliminowane przez maść antybiotyczną, czy krwawienie rany. Opieka pooperacyjna od momentu operacji, aż do planowanego uśmiercenia pozwoli eksperymentatorom na zaobserwowania potencjalnych szkód i ewentualne podjęcie decyzji o przedwczesnym uśmierceniu myszy.

Ponadto, w procesie przygotowywania wniosku o finansowanie projektu powołany został ekspert do wyliczeń statystycznych (analiza G-power) w konsorcjum międzynarodowym. Co więcej, w projekcie wszystkie eksperymenty na mysich modelach zostały zaprojektowane zgodnie z wytycznymi ARRIVE, by ulepszać dobrostan zwierząt. Wszystkie aspekty są zgodne z regulacjami Komisji Unii Europejskiej i ocenione pozytywnie przez międzynarodowy panel ekspertów.

**UDOSKONALENIE:** Spełniając zasadę udoskonalenia, nasze doświadczenia zostały zaplanowane tak, by maksymalnie ograniczyć dyskomfort zwierząt. Podczas realizacji zaplanowanych procedur myszy będą utrzymywane w warunkach laboratoryjnych odpowiednich dla tego gatunku. W klatkach zastosowane zostaną elementy wzbogacające środowisko bytowania jak: papierowe tulejki, materiał do gniazdowania i zgryzania. Zastosowanie tego typu urozmaiceń środowiska i poszerzenia zakresu czynności, jakie mogą wykonywać zwierzęta pozwoli na redukcję stresu. Posiadamy już doświadczenie oraz zaawansowany warsztat badawczy, który został opracowany podczas charakterystyki mysiego modelu SCA3, wygenerowanego w naszym Zakładzie (Switonski et al., 2015). Czynności w procedurach zostały zaplanowane tak, aby zmniejszały do minimum lub eliminowały ból, cierpienie oraz dystres. Tego

typu procedury były także z powodzeniem stosowane u myszy laboratoryjnych wykorzystywanych w podobnych analizach przez inne zespoły badawcze (Molero et al., 2016, Menalled et al., 2012). Planowane w projekcie testy behawioralno-motoryczne, zabiegi oraz ogólne obserwacje zwierząt wyszczególnione w czynnościach od 1 do 4, procedury pierwszej, stanowią dobrze scharakteryzowane, jak również łatwo wykonywalne czynności w pracy ze zwierzętami. Posiadane doświadczenie członków zespołu badawczego, umożliwi przeprowadzenie wymienionych czynności sprawnie i szybko, przez co zwierzęta objęte procedurami nie będą narażone na stres czy ból.

Dodatkowo, wykorzystanie modelu Ki91 wprowadza kolejny element udoskonalenia, czyli redukcję wykorzystywania zwierząt ze dotkliwym fenotypem, takich jak: R6/2 oraz N171-82Q.

Podczas aplikacji wlewu dokomorowego mysz zostanie pozbawiona sierści za pomocą kremu depilującego lub golarki, a nie ostrza skalpela czy brzytwy. Rana zostanie zaszyta nićmi rozpuszczalnymi. Na ranę zostanie nałożony antybiotyk, by nie wdało się żadne zakażenie. Mysz będzie przebywać na macie grzewczej, by zapobiec hipotermii i będzie kontrolowana temperatura za pomocą rektalnego termometru. W trakcie operacji na oczy zostanie nałożony lubrykant oraz podana zostanie analgezia (w postaci podskórnej iniekcji niesterydowego leku przeciwzapalnego Meloxicam), by czas pooperacyjny był bezbolesny. Po wybudzeniu mysz będzie miała dostęp do jedzenia i picia na płytce na położonej na ściółce, by nie musiała wstawać oraz klatka umieszczona będzie na regale grzewczym.

Do testu rotarod myszy będą uprzednio przyzwyczajane i trenowane, aczkolwiek w formie udoskonalenia protokół zostanie skrócony do trzech podejść po 3-6 minut. Do testu prętów statycznych, na bazie dotychczasowego doświadczenia, stworzona zostanie konstrukcja własna, najbardziej optymalna do tego typu testu. Projekt zawiera test IntelliCage, który będzie próbą wprowadzenia nowego testu dla myszy, który potencjalnie może okazać się mniej stresujący dla myszy, gdyż jest to system typu „Home cage”. Nie mamy na razie wiedzy na temat tego czy test będzie przydatny dla modeli chorób poliglutaminowych, ale podejmujemy wysiłki w celu wszelkiej redukcji stresu u zwierząt w przyszłych projektach. Umożliwi to odkrycie innych statystycznie różnych parametrów behawioralnych, które później można będzie używać, jako biomarkera w ocenie efektywności terapii bądź jakiegokolwiek ingerencji w te modele. Wszystkie testy behawioralne poprzedzone zostaną jednodniowym treningiem, którego rezultaty w będą brane pod uwagę w dalszych analizach.

#### 8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

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

☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

☒ NIE

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.