

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu: **Znaczenie interakcji pomiędzy receptorami AMPA i NMDA a białkami rusztowania komórkowego w synapsie pobudzającej w rozwoju i terapii depresji**

1.Czas trwania projektu: od 02. 2017 do 01.2020 r. (3 lata, OPUS\_11)

2.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów); depresja, synapsa pobudzająca, NMDA, AMPA, białka gęstości synaptycznej

3.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.

Depresja jest schorzeniem psychicznym o słabo poznanej i bardzo zróżnicowanej etiologii. Co gorsza, zachorowalność na nią stale wzrasta, podobnie jak i liczba będących jej następstwem, zgonów. Badania ostatnich lat wskazują na duże znaczenie zaburzonej (hiperaktywność) transmisji glutaminianergicznej w przebiegu depresji, a w szczególności na znaczne zaangażowanie receptorów NMDA i AMPA. W proces kontroli liczebności receptorów glutaminianergicznych (oraz samego składu podjednostkowego) zaangażowane są liczne białka gęstości synaptycznej oddziałujące z receptorami poprzez domeny PZD, inne białka rusztowania komórkowego oraz same receptory zawierające liczne miejsca ulegające (nie tylko) fosforylacji. Jak dotąd znaczenie poszczególnych białek w kontroli liczebności i funkcji receptorów NMDA i AMPA jest raczej słabo poznane, zwłaszcza w kontekście zaburzeń depresyjnych. Stąd celem niniejszego projektu jest wyznaczenie punktów krytycznych, których dysregulacja może prowadzić do niepożądanych (niekontrolowanych) zmian w funkcjonowaniu synapsy pobudzającej. W związku z tym w projekcie planujemy określić dynamikę zmian zachodzących w synapsach pobudzających w przebiegu depresji.

W pierwszej części projektu zbadamy jak zmienia się lokalizacja i skład podjednostkowy receptorów NMDA i AMPA oraz ich interakcje z poszczególnymi białkami rusztowania komórkowego. Analizy zostaną przeprowadzone w 2 strukturach mózgowych (kora czołowa i hipokamp - dobrze udokumentowana rola w depresji; bogate w unerwienie glutaminianergiczne) pobranych od zwierząt (szczurów) z zaindukowaną depresją (zwierzęce modele depresji). Badania będą wykonywane z zastosowaniem skrupulatnie dobranych metod biochemicznych (m.in. ELISA, ko-immunoprecypitacja, Western Blot, BN-PAGE czy test ligacji zbliżeniowej) w różnych frakcjach komórkowych.

W drugiej części projektu planuje się podanie zwierzętom specyficznych odwracalnych inhibitorów GluN2A i GluN2B lub PSD-95 i CaMKII. Korzystając z testów do oceny aktywności przeciwdepresyjnej związków u zwierząt (myszy) będziemy mogli sprawdzić, czy zahamowanie funkcji powyższych białek będzie skutkowało poważnymi zmianami w zachowaniu zwierząt. Jednoczesne zastosowanie inhibitorów z lekiem przeciwdepresyjnym (LPD) wskaże, czy dane białka pełnią istotne funkcje w mechanizmie działania badanego LPD. Celem potwierdzenia (lub zaprzeczenia), czy zakłócenie interakcji pomiędzy białkami gęstości synaptycznej ma istotny wpływ na procesy ekscytotoksyczne w komórce (których konsekwencją może być nasilenie procesów wolnorodnikowych w komórce) planuje się oznaczenie podstawowych markerów stresu oksydacyjnego (produkty peroksydacji białek i lipidów, aktywność syntazy tlenu azotu) w pobranych od zwierząt tkankach.

Realizacja projektu pozwoli po raz pierwszy opisać w sposób kompleksowy zmiany zachodzące w synapsach pobudzających oraz pomoże wskazać punkty krytyczne dla rozwoju zachowań depresyjnych. Tym samym badania te mogą wyznaczyć nowe obszary poszukiwania skutecznych terapii przeciwdepresyjnych i być wstępem do badań o charakterze aplikacyjnym.

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

108 szczurów Sprague-Dawley, samce, wiek 4 tygodnie

84 szczury Wistar, samce, wiek 4 tygodnie

600 myszy C57BL/6J, samce, wiek 4 tygodnie

600 myszy CD-1, samce, wiek 4 tygodnie

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

Podczas przygotowania projektu badawczego sprawdzono dotychczasową wiedzę w zakresie objętym niniejszym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED oraz Scopus oraz Google Scholar wykorzystując słowa kluczowe: *depression, animal model of depression, antidepressants, NMDA-, AMPA-, scaffolding proteins- interaction, TAT inhibitors*. Na podstawie przeglądu literaturowego można stwierdzić, że do chwili obecnej nie prowadzono kompleksowych badań dotyczących wyjaśnienia znaczenia zmian zachodzących w synapsach pobudzających (interakcji

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

między poszczególnymi białkami) w rozwoju zachowań depresyjnych. Podobnie nie wykorzystywano selektywnych i odwracalnych inhibitorów TAT w badaniach nad depresją. Wykorzystanie zwierząt w projekcie jest konieczne, ponieważ nie możliwe jest badanie tego typu mechanizmów z wykorzystaniem modeli *in vitro*.

W trakcie realizacji badań osoby wykonujące będą dokładnie obserwowały zachowania zwierząt w celu wyłapania objawów dystresu i wyciągnięcia wniosków, które będą pomocne w planowaniu przyszłych eksperymentów. Zaplanowanie tych samych procedur (1-3) w powtórzeniach (w zależności od zapotrzebowania na tkankę) pozwoli na maksymalne ograniczenie liczby użytych w projekcie zwierząt. W procedurze 4, eksperymenty (1-10) zostały zaplanowane w ten sposób, aby uniknąć zbędnych powtórzeń grup kontrolnych (Kontrola, TAT-AA, czy związek przeciwdepresyjny), przy równoczesnym założeniu, że w ciągu jednego dnia istnieje możliwość przeprowadzenia testów behawioralnych na max. 60 zwierzętach. Podobnie, celem ograniczenia całkowitej liczby zwierząt w procedurze 4 planuje się przeprowadzenie testu wymuszonego pływania i pomiaru aktywności lokomotorycznej na tej samej grupie zwierząt. W eksperymentach planuje się jedynie wykorzystanie związków dobrze penetrujących przez barierę krew mózg, co pozwala uniknąć wykonywania operacji w celu podań domózgowych

Przeprowadzone badania mogą wyznaczyć nowe obszary poszukiwania skutecznych terapii przeciwdepresyjnych.