

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Rola białka Arc, estrogenu, oraz cytoszkieletu aktynowego w regulacji plastyczności synaptycznej związanej z uzależnieniem od alkoholu

2. Czas trwania projektu: 5 lat

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) ARC, uzależnienie od alkoholu, estrogen, kofilina, plastyczność synaptyczna

4. 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.

Celem niniejszego projektu jest pogłębienie wiedzy na temat molekularnego podłoża plastyczności synaptycznej związanej z uzależnieniem od alkoholu. W szczególności skupimy się na roli białka Arc, hormonów płciowych oraz cytoszkieletu aktynowego w regulacji poszukiwania i picia alkoholu.

Korzyści: Poznanie molekularnego podłoża uzależnienia może pomóc w stworzeniu nowych strategii leczenia tej choroby oraz pogłębi naszą wiedzę na temat działania mózgu.

Nasze badania przeprowadzone zostaną na myszach. Myszom podawany będzie alkohol etylowy (4-12%, przy ciągłym i nieograniczonym dostępie do wody i pokarmu).

Szkody: U części zwierząt (ok. 20%) swobodny dostęp do alkoholu doprowadzi do zwyczajowego picia. Część samiec przejdzie zabieg ovariectomii. Zabieg ten przeżywa 95% zwierząt. Zabieg ten doprowadzi do obniżenia poziomu hormonów płciowych jaki zachodzi w czasie menopauzy.

Część zwierząt przejdzie zabieg stereotaktycznego podania do mózgu wirusów kodujących system CRISPR/Cas9_gRNA_Arc lub kofilinę (białko regulujące polimeryzację aktyny). Ekspresja wirusów spowoduje lokalne obniżenie ekspresji białka Arc, lub podwyższenie ekspresji białka kofilina, a także może doprowadzić do zaburzeń powstawania pamięci u myszy.

Należy podkreślić, że wszystkie operacje będą przeprowadzone przez osoby doświadczone w pracy ze zwierzętami, z dbałością o zminimalizowanie cierpienia zwierząt, z zachowaniem warunków sterylnych i zapewnieniem odpowiedniej anestezji, oraz z podaniem środków przeciwbólowych i przeciwzapalnych.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

- 288 myszy z linii Tg(Arc KR)

- 288 myszy z linii Arc KO.

- 1280 myszy C57BL/6J.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazie danych PUBMED. Wykorzystałam następujące słowa kluczowe:

ARC, uzależnienie od alkoholu, estrogen, cytoszkielet aktynowy;

- A. Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że białko Arc bierze udział w uczeniu się, plastyczności mózgu oraz w regulacji układu glutaminianergicznego poprzez kontrolę endocytozy receptorów AMPA. Ekspresja białka Arc jest regulowana zarówno przez substancje uzależniające, jak i kontekst kojarzony z podawaniem takich substancji. Również estrogen reguluje procesy molekularne związane z plastycznością mózgu (w tym funkcje receptorów AMPA), strukturę i funkcje komórek nerwowych jak i proces uczenia się. Ponadto nasze badania wskazują, że myszy Arc KO (z delecją genu *arc*) piją tyle samo alkoholu, co myszy typu dzikiego, ale są bardziej wytrwałe w poszukiwaniu alkoholu podczas odstawienia. Oraz poziom białka Arc zwiększa się w jądrze podstawno- boczny (BLA) i jądrze środkowym ciała migdałowatego (CeA), a także polu CA1 hipokampa, korze przedczołowej i jądrze

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

pótleżających prądkowia u myszy typu dzikiego w czasie odstawieniu po długotrwałym treningu picia alkoholu.

W celu lepszego zrozumienia molekularnego podłoża rozwoju alkoholizmu u ludzi przeprowadziliśmy także analizę baz danych zawierających informację na temat polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (Single Nucleotide Polymorphism – SNPs). Spośród zidentyfikowanych 472 SNP korelujących z uzależnieniem od alkoholu szczególnie ciekawe wydały nam się polimorfizmy w receptorze 1 estrogenu (Estrogen Receptor1 gene ESR1: rs6902771) i trzy w podjednostce $\alpha 2$ GABA (GABRA2: rs279836, rs279845, rs279871). Ich związek z aktywnością białka Arc potwierdziliśmy w hodowli komórkowej. Podanie agonisty receptorów dla estrogenu w pierwotnej hodowli neuronów hipokampalnych powoduje wzrost ekspresji białka Arc. Co ciekawe związek estrogenu z rozwojem uzależnienia od kokainy był wcześniej badanych, lecz w kontekście uzależnienia od alkoholu jest słabo poznany. W szczególności brak danych na temat roli estrogenów w regulacji plastyczności synaptycznej indukowanej przez alkohol.

Cytoszkielek aktynowy reguluje strukturę i funkcję komórek nerwowych, w tym aktywność głównych receptorów dla glutaminianu, AMPA. Nasze wcześniejsze badania pokazały, że nadekspresja kofiliny (białko regulujące polimeryzację aktyny) w hipokampie myszy obniża konsumpcję alkoholu. Funkcja kofiliny w innych strukturach mózgu w regulacji zachowań związanych z uzależnieniem od alkoholu oraz plastyczności synaptycznej indukowanej przez alkohol jest nieznaną.

Planowane badania poszerzą wiedzę na temat molekularnego i komórkowego podłoża uzależnienia od alkoholu, a w szczególności roli białka Arc, estrogenów i cytoszkieletu aktynowego w tworzeniu cichych synaps (bez funkcjonalnych receptorów AMPA), które wg. naszych badań mogą być podłożem procesu uzależnienia. B.

C. W przeszukanym materiale nie znalazłam informacji dotyczących funkcji białka Arc oraz estrogenu w regulacji rozwoju uzależnienia od alkoholu. Literatura na temat wpływu estrogenu na ekspresję białka Arc w mózgu także nie istnieje.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

- A. Rozwinięcie istniejącej wiedzy na temat molekularnego podłoża uzależnienia od alkoholu.
- B. Rozwinięcie istniejącej wiedzy na temat wpływu estrogenu na zachowania związane z uzależnieniem, oraz na procesy molekularne w komórkach mózgu.

ZASADA ZASTĄPIENIA: W celu zbadania komórkowych mechanizmów odpowiadających za tak złożone procesy jak uzależnienie od alkoholu niezbędne jest użycie zwierząt, która mają złożony układ nerwowy. W celu zastąpienia zwierząt naczelnych, wykorzystane zostaną myszy, jako małe kręgowce charakteryzujące się złożonym układem nerwowym. Ze względu na doświadczenie w pracy z myszami osób zaangażowanych w ten projekt będzie możliwe ograniczenie dystresu zwierząt do niezbędnego minimum.

OGRANICZENIE: Liczba zwierząt na grupę została obliczona w oparciu o wcześniejsze doświadczenia, za pomocą kalkulatora internetowego (<http://www.biomath.info/power/prt.htm>) dla testu t, na podstawie wytycznych statystycznych oraz porównana do liczebności grup podanych w literaturze. Biorąc pod uwagę otrzymane do tej pory wyniki behawioralne, różnice w średnich między grupami i odchylenia standardowe, a także umieralność zwierząt w wyniku operacji planujemy wykonać eksperymenty na jak najmniejszej liczbie zwierząt, ale wystarczającą, by móc wyciągnąć jednoznaczne wnioski z prowadzonych badań.

UDOSKONALENIE: Wszystkie doświadczenia będą wykonywane i/lub nadzorowane przez doświadczonych badaczy, którzy będą regularnie kontrolować dobrostan zwierząt, tak by ograniczyć ich cierpienie na wszystkich etapach. Do klatek domowych zwierząt dodawane będą przedmioty wzbogacające środowisko, umożliwiające budowę gniazda i zabawę (tunele z celulozy, klocki z drewna do ścierania zębów, bawełniane ręczniki czy bawełniane kokony). Zwierzęta poddane procedurom chirurgicznym otrzymają stosowne znieczulenie, środki przeciwbólowe i środki zapobiegające zakażeniu. Wszystkie inwazyjne interwencje operacyjne zostaną przeprowadzone z możliwie największym ograniczeniem dystresu, dyskomfortu i bólu jakie odczuwać może badane zwierzę. Podczas operacji uwzględnione zostaną także takie czynniki, jak m.in. warunki cieplne optymalne dla danego gatunku, czy zapewnienie myszom spokojnego otoczenia do rekonwalescencji.

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.