

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Mapowanie negatywnych wspomnień w mózgu**

Czas trwania projektu: **01.03.2017 – 31.01.2021**

2. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): **mózg, zaburzenia lękowe, fobie, obrazowanie**

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

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 projektu jest stworzenie mapy obwodów neuronalnych zaangażowanych w powstawanie negatywnych wspomnień i wygaszanie tych wspomnień w mózgu. Wykorzystamy do tego nową metodę obrazowania całego oczyszczonego mózgu przy pomocy mikroskopu opartego na arkuszu światła.

Jednym z największych wyzwań współczesnej neurobiologii jest zrozumienie podstawowych procesów zachodzących w mózgu, takich jak uczenie się i powstawanie wspomnień. Do tego konieczne jest opisanie struktury mózgu poprzez stworzenie mapy połączeń pomiędzy komórkami nerwowymi. Do niedawna obrazowanie całego mózgu z dużą rozdzielczością było możliwe tylko przez pokrojenie go na wiele cienkich skrawków i komputerową rekonstrukcję obrazu. To podejście jest bardzo pracochłonne i wymagające, dlatego większość prac koncentruje się na konkretnych obszarach mózgu lub pojedynczych projekcjach. To nie wystarcza do pełnego zrozumienia działania mózgu, ponieważ poszczególne obszary są ze sobą połączone i cały czas na siebie oddziałują, dlatego do badania aktywności mózgu konieczne jest stworzenie kompleksowej mapy obejmującej różne obszary mózgu jednocześnie tak, aby uwzględnić korelacje między nimi. Ostatnie kilka lat zaowocowało rozwojem technik obrazowania niedestruktywnego opartych na połączeniu oczyszczania mózgu tak, aby stał się przezroczysty dla światła, i obrazowania za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego opartego na arkuszu światła.

Wynikiem opisanych badań będzie trójwymiarowa, obejmująca cały mózg mapa obwodów neuronalnych zaangażowanych w powstawanie śladów pamięci awersyjnej i wygaszanie tej pamięci. Dodatkowo oszacujemy skalę aktywacji neuronalnej w poszczególnych obszarach na podstawie analizy liczebności komórek aktywowanych w poszczególnych treningach. Spodziewamy się, że obrazowanie całego, oczyszczonego mózgu może pozwolić na odkrycie obszarów, których dotychczasowa rola w uczeniu awersyjnym nie była znana, a także wyjaśnić, jak poszczególne obszary współdziałają ze

sobą.

Otrzymane wyniki pozwolą na głębsze zrozumienie procesów uczenia się i powstawania wspomnień oraz posłużą jako punkt wyjścia do dalszych badań na poziomie pojedynczych komórek i synaps. Uzyskane mapy będą mogły stanowić źródło referencyjne do dalszych badań nad uczeniem i pamięcią. Ponadto, ostatnie lata pokazują, że zrozumienie mechanizmów powstawania śladów pamięci awersyjnej i jej wygaszania jest niezwykle istotne, ponieważ stanowi klucz do zrozumienia zaburzeń lękowych u ludzi takich jak fobie, czy stres pourazowy. Zrozumienie mechanizmów wygaszania strachu otwiera zatem nowe możliwości terapii.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu zostanie wykorzystanych 30 myszy i 80 szczurów

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

W ramach planowania projektu badawczego sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazie danych PubMed. Wykorzystano słowa kluczowe: whole-brain mapping, whole-brain mapping AND fear, brain atlas AND fear.

Na podstawie przeszukanej literatury badawczej stwierdzono, że mimo dostępności nowych zaawansowanych technik badawczych nie istnieją atlasy pokazujące komórki aktywowane po uczeniu zdarzeń awersyjnych i wygaszaniu pamięci tych zdarzeń. Ostatnie lata pokazują, że zrozumienie mechanizmów powstawania śladów pamięci awersyjnej i jej wygaszania jest niezwykle istotne. Pozwoli to lepiej zrozumieć zaburzenia lękowe u ludzi takie jak fobie, czy stres pourazowy.

Do badania mózgu potrzebna jest metoda obrazowania umożliwiająca zbieranie dużej ilości wysokorozdzielczych danych z całej objętości preparatu. Powinna ona umożliwiać nie tylko badanie struktury, ale również funkcjonowania mózgu. Jednak w klasycznej mikroskopii optycznej maksymalna głębokość obrazowania ograniczona jest przez rozpraszanie światła w tkance do kilkuset mikrometrów lub około milimetra w przypadku mikroskopii wielofotonowej. Dlatego dotychczasowe próby rejestracji sieci połączeń w całym mózgu myszy wykorzystują technikę obrazowania kolejnych skrawków i komputerowej rekonstrukcji. Takie podejście jest czasochłonne, skomplikowane i generuje dużo artefaktów tworząc w ten sposób wyniki fałszywie pozytywne.

Planowany projekt ma na celu przezwycięzenie tych ograniczeń i zobrazowanie w całym nienaruszonym mózgu obszarów aktywowanych uczeniem awersyjnym, a także połączeń, które tworzą neurony aktywowane takim uczeniem. Pozwoli to na stworzenie bazy do trójwymiarowych atlasów referencyjnych, które będą w przyszłości mogły posłużyć kolejnym badaczom. Projekt zakłada przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach o rozwiniętym układzie nerwowym, a więc myszach i szczurach. Badanym narządem będzie mózg. Nie jest możliwe zastąpienie narządu, którego funkcjonowanie nie jest do końca poznane. Naszym nadrzędnym celem będzie stworzenie atlasu całego mózgu z zachowanymi połączeniami i strukturą trójwymiarową. Nie jest możliwe zatem i zastąpienie gryzoni. Myszy i szczury są często stosowanym i dobrze zwalidowanym pod względem behawioralnym modelem w neurobiologii. Pozwala to na odniesienie wyników bieżących badań od istniejącej już literatury i dzięki temu wzbogacenie naszej wiedzy.

W przypadku uzyskiwania preparatów tradycyjnymi metodami często zdarza się, że ulegają one zniszczeniu w trakcie przygotowania, zwiększa to liczbę zwierząt wykorzystywanych w doświadczeniach. W proponowanym przez nas projekcie, liczba zwierząt może być ograniczona, nie ma bowiem preparatyki, która niszczy mózg. Mózg jest obrazowany w całości.

Zwierzęta laboratoryjne w hodowli są przyzwyczajane do kontaktu z człowiekiem i późniejszy kontakt z eksperymentatorem nie powoduje u nich dużego dystresu. Zastosujemy też dobrze opracowane i opisane metody. Pozwoli to uniknąć przeprowadzania doświadczeń pilotażowych. Wprowadzenie habituacji pozwoli przyzwyczaić się zwierzętom do eksperymentatora, który będzie wykonywał kolejne czynności. Przeprowadzanie doświadczeń oraz uśmiercanie zwierząt będzie przeprowadzane przez pracowników z wieloletnim stażem i doświadczeniem w pracy ze zwierzętami oraz posiadających odpowiednie przeszkolenie i kwalifikacje.

Dane uzyskane z proponowanego projektu pozwolą na rozwinięcie teoretyczne i poznawcze istniejącej wiedzy w zakresie modeli doświadczalnych, a także wykorzystanie uzyskanej wiedzy w badaniach aplikacyjnych.

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