

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „**BADANIE PODATNOŚCI NA EPILEPTOGENEZĘ U MYSZY Z NADPRODUKCJĄ LUB WYCISZENIEM BIAŁKA CD44**”

2. Czas trwania projektu: 5 lat

3. Słowa kluczowe: CD44, astrocyty, epilepsja, epileptogeneza 4. Cel projektu (art. 3 ustawy): 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 naukowym doświadczenia jest sprawdzenie podatności zwierząt transgenicznych, wykazujących i) nadprodukcję lub ii) wyciszenie genu *CD44* w astrocytach, na czynniki wywołujące drgawki oraz do rozwinięcia w ich efekcie epilepsji (badania podstawowe, układ nerwowy). Błonowe białko CD44 jest receptorem dla głównego składnika macierzy zewnątrzkomórkowej w mózgu – hialuronianu, regulującym procesy plastyczności strukturalnej i funkcjonalnej. Ulega ono ekspresji w neuronach i gleju, a jego poziom znacząco wzrasta w „reaktywnych” astrocytach w procesach patologicznych zachodzących w mózgu, m.in. w epilepsji. Jednakże, pomimo wysokiego poziomu ekspresji *CD44* w „reaktywnych” astrocytach, rola jaką odgrywa w tych komórkach w epileptogenezie jest praktycznie nieznana.

Punktem wyjścia w projekcie jest model myszy wykorzystujący system Cre/lox, w którym rekombinaza Cre, dostarczana endo- lub egzogennie, rozpoznaje sekwencje loxP (otaczające docelowy fragment genomu) i wycina znajdujący się między nimi gen/fragment genu DNA. Tak powstaje regulowany w czasie i przestrzeni knockout danego genu lub jego nadekspresja (w przypadku aktywacji przez Cre rekombinazę wprowadzonych dodatkowych kopii genu).

Na pierwszym etapie u myszy transgenicznych indukowana będzie nadprodukcja (CD44-OE) lub wyciszenie (CD44-KO) białka CD44. Następnie, po okresie rekonwalescencji, porównana zostanie aktywność mózgów myszy kontrolnych oraz myszy z modyfikacją w genie *CD44*, CD44-OE oraz CD44-KO, po podaniu związku wywołującego drgawki – kwasu kainowego. Dodatkowo, mózgi myszy uśmierconych po zakończeniu monitorowania aktywności epileptycznej zostaną poddane analizie morfologicznej w celu dokonania korelacji między zmianami elektrofizjologicznymi i strukturalnymi (na poziomie komórkowym i subkomórkowym) w mózgach badanych osobników. Uzyskane wyniki mogą wnieść znaczący wkład w poszerzenie wiedzy na temat komórkowych i molekularnych podstaw epileptogenezy.

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

Liczba zwierząt: 90 osobników na linię (2 linie) – w sumie 180

Gatunek: mysz, tło genetyczne C57BL/6J

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

Przygotowując projekt badawczy sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED; Google Scholar; Web of Science (JCR).

Wykorzystałam słowa kluczowe: CD44/astrocyty/epilepsja/epileptogeneza **Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:**

- A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, iż ze względu na widoczną immunoreaktywność CD44 w hipokampie po indukcji status epilepticus (SE), białko to jest ściśle zaangażowane w proces epileptogenezy. W badaniach z zastosowaniem pilokarpiny (substancji podobnej w działaniu do kwasu kainowego) białko CD44 wykazywało wysoką nadprodukcję w zakręcie zębatym hipokampa w trakcie SE (Borges et al. 2004). Dodatkowo, badania nad urazowym uszkodzeniem mózgu, będącym często bezpośrednią przyczyną epileptogenezy, pokazały, iż *CD44* jest: i) jednym z genów wykazujących wysoce podwyższoną ekspresję w patologicznych stanach pourazowych oraz ii) jednym z potencjalnych celów terapii po urazach mózgu (Lipponen et al. 2016).
- B. Brak jest danych dotyczących wykorzystania transgenicznego modelu mysiego z modyfikacjami w obrębie genu *CD44* do badania zmian zachodzących w hipokampie w trakcie SE. Brak jest również badań, które pokazywałyby w jaki sposób białko CD44 wpływa na podatność na epileptogenezę.

**Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:**

- A. Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku scharakteryzowania roli białka CD44 w procesie epileptogenezy.
- B. Zastosowanie uzyskanej wiedzy, która w przyszłości może pomóc w formułowaniu nowych kierunków terapeutycznych odnoszących się do epilepsji oraz jednostek jej towarzyszących.

Zachowując wprowadzoną w 1959r. przez W. Russela i R. Burcha zasadę 3R uzasadniam podjęte we wniosku wybory dotyczące tematyki, modelu i procedur:

### **ZASTĄPIENIE**

Ze względu na złożoność procesu epileptogenezy, jako zaburzenia funkcji działania całego mózgu, nie jest możliwe zastąpienie proponowanego modelu mysiego zwierzętami o niższym stopniu rozwoju ewolucyjnego, ani też modelami in vitro (hodowle tkankowe/komórkowe).

### **OGRANICZENIE**

W celu spełnienia „zasady ograniczenia”, liczba zwierząt planowanych do wykorzystania w eksperymencie została zredukowana do koniecznego minimum. Na grupę eksperymentalną przewidziano 15 zwierząt. Jest to liczba określona przez statystyczne minimum (10) powiększona o dodatkowe zwierzęta (5) po uwzględnieniu zwiększonej śmiertelności związanej z zabiegami operacyjnymi, podaniem kwasu kainowego (40-50%) oraz implantacji elektrod (10%) w głębokiej narkozie. Wybrana wielkość grupy pozwoli na wiarygodną analizę statystyczną i weryfikację postawionego problemu badawczego. W przypadku uzyskania niższej śmiertelności w

---

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

grupie określonej przez minimum statystyczne, dodatkowe zwierzęta nie będą wykorzystane w procedurach. Dodatkowo, w celu uzyskania jak największej liczby informacji przy użyciu tej samej liczby zwierząt, po zakończeniu wszystkich procedur tkanka zwierząt będzie pobrana do analizy immunohistochemicznej. **UDOSKONALENIE**

Nadrzędnym celem jest ograniczenie cierpienia i stresu zwierząt, związanego z przeprowadzanymi procedurami. Czynniki, które mogą być dla zwierząt, możliwym do zredukowania, źródłem dyskomfortu, to zabieg operacyjny oraz odseparowanie od stada. Udoskonaleniem w tej materii będzie podawanie, zgodnych z powszechnie przyjętymi normami weterynaryjnymi, środków usypiających (Ketamina/Medetomidyna), przeciwzapalnych i uśmierzających ból śród- i pooperacyjny (Butomidol, Tolfine). Ponadto, zwierzęta farmakologicznie wyprowadzane z narkozy (Revertor) przetrzymywane będą do czasu całkowitego wybudzenia na płytce grzejnej. Następnie, na czas rekonwalescencji, odkładane będą do klatek o wzbogaconym środowisku, umożliwiającym budowanie gniazda (chusteczki, skompresowane bawełniane płatki/wałeczki) i zabawę (drewniane kołeczki). Dodatkowo klatki, w których zwierzęta będą przetrzymywane mają transparentne ścianki, co umożliwi kontakt wzrokowy z innymi osobnikami. Kolejnym działaniem zmniejszającym stres zwierząt będzie przestrzeganie ograniczonej, do eksperymentatora i opiekuna, liczby osób pracującej z badanymi zwierzętami.

Przy wyborze modelu sposobu podawania kwasu kainowego zdecydowano się na bezpośrednie dohipokampalne iniekcje stereotaktyczne w pełnej narkozie, co ogranicza działanie konwulsantu do docelowej struktury i jest związane ze zmniejszeniem cierpienia, efektów ubocznych oraz znacznie ogranicza śmiertelność zwierząt.

#### 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.