

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu **Wpływ zmian struktury chromatyny na ekspresję genu receptora glukokortykoidów w strukturach mózgu myszy związanych z powstawaniem zaburzeń lękowych i depresji.**

Czas trwania projektu **3 lata**

Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **receptor glukokortykoidów, struktury mózgu związane z depresją, stres, deksametazon, zmiany struktury chromatyny**

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.

Odpowiedź na stres jest jedną z ważniejszych odpowiedzi fizjologicznych organizmu. Ma charakter pozytywny, gdyż pozwala zminimalizować niekorzystne skutki urazów, bądź ekstremalnych sytuacji. Wydzielane wówczas przez korę nadnerczy hormony steroidowe (kortykosteroidy) wnikają z krwi do komórek ciała, gdzie po związaniu ze swoim receptorem (GR, receptor glukokortykoidów) przemieszczają się do jądra komórkowego. Tam regulują ekspresję wielu genów, w tym także ekspresję genu *GR*, co prowadzi do autoregulacji działania kortykosteroidów na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego.

W sytuacji patologicznej, np. w wyniku traumatycznego zdarzenia dochodzi do wydzielania dużej ilości kortykosteroidów, a ich wysoki poziom we krwi utrzymuje się przez dłuższy czas (tzw. stres chroniczny).

Zachodzące w skutek tego zmiany w poziomie ekspresji genów stanowią główną przyczynę powstawania zaburzeń lękowych oraz depresji.

Do tej pory poznano zmiany w poziomie ekspresji genu *GR*, odzwierciedlające stopień autoregulacji, a tym samym odpowiedzi na stres w komórkach nieneuronalnych. Badania te prowadzone były jedynie przy użyciu metod biochemicznych w homogenatach tkanek. Wiadomo także, iż za regulację ekspresji genów w dużym stopniu odpowiedzialne są zmiany strukturalne chromatyny, dlatego też, aby poznać w pełni mechanizm regulacji ekspresji genów, konieczne jest zbadanie zmian epigenetycznych przy użyciu metod morfologicznych.

**Celem naukowym projektu jest zbadanie stopnia autoregulacji genu *GR* w strukturach mózgu związanych z powstawaniem zaburzeń lękowych oraz depresji (hipokamp, kora przedczołowa, brzuszna część prążkowia) poprzez zbadanie zmian w poziomie ekspresji genu oraz zmian jego wewnątrzjądrowej lokalizacji w modelu stresu ostrego i chronicznego.**

Do przeprowadzenia doświadczenia posłużymy się powszechnie stosowanym modelem stresu, polegającym na jednorazowym lub wielokrotnym dootrzewnowym podaniu deksametazonu. Jest to syntetyczny odpowiednik kortykosteroidów, działający specyficznie względem *GR*, o 25 do 80-krotnie silniejszym działaniu. Analizę prowadzić będziemy w warunkach indukowanego stresu: i) ostrego, ii) chronicznego:

i) Analiza poziomu ekspresji genu *GR* w trzech strukturach mózgu u zwierząt po jednorazowym podaniu deksametazonu lub soli fizjologicznej (procedura 1, czynność 1), poddanych eutanazji (procedura 1, czynność 2) w jednym z czterech punktów czasowych (30min, 4h, 8h i 48h). Wybór punktów czasowych podyktowany jest odwracalnymi zmianami poziomu ekspresji genu *GR* w innych niż mózg narządach ciała (gwałtowny spadek poziomu mRNA, a następnie powrót do wartości wyjściowych). Następnie w punktach czasowych o najwyższym i najniższym poziomie ekspresji genu *GR* przeprowadzona zostanie analiza morfologiczna zmian wewnątrzjądrowej lokalizacji alleli genu *GR*.

Analiza poziomu ekspresji genu *GR* w trzech strukturach mózgu u zwierząt, którym podawano deksametazon lub sól fizjologiczną przez 21 kolejnych dni (procedura 2, czynność 1), poddanych eutanazji (procedura 2, czynność 2) w jednym z dwóch punktów czasowych (najniższy poziom ekspresji genu *GR* oraz moment, kiedy poziom ekspresji wraca do wartości wyjściowej, obserwowane w przypadku stresu ostrego). Następnie, podobnie jak opisano w punkcie 1, przeprowadzona zostanie analiza morfologiczna zmian wewnątrzjądrowej lokalizacji alleli genu *GR* w obu punktach czasowych. 21-dniowe podawanie deksametazonu powoduje pojawienie się u myszy objawów typowych dla depresji.

Uzyskane wyniki pozwolą na poznanie mechanizmu odpowiedzialnego za regulację ekspresji genu *GR*, a tym samym odpowiedzi komórek neuronalnych, w obrębie struktur związanych z powstawaniem zaburzeń lękowych i depresji na ostry i chroniczny stres.

Projekt zalicza się do badań podstawowych (klasyfikacja A, układ nerwowy).

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

8 - 10 tygodniowe (młode dorosłe) samce myszy C57BL/6J w liczbie 312 osobników.

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

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

Wykorzystałem słowa kluczowe: dexamethasone/ glucocorticoid receptor gene / brain structures connected with depression / stress / chromatin remodeling / Mus Musculus

**Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że:**

**A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:**

Deksametazon - syntetyczny odpowiednik kortykosteroidów, charakteryzuje się wyższą specyficznością (wiąże się jedynie do GR, a nie jak w przypadku kortykosteroidów także do receptora mineralokortykoidów) oraz wykazuje ponad 25-krotnie silniejsze działanie. Stanowi powszechnie stosowany lek o działaniu przeciwzapalnym, przeciwalergicznym i immunosupresyjnym. Po jednorazowym podaniu wywołuje odwracalne zmiany w poziomie mRNA oraz białka receptora GR. Wielokrotne podanie indukuje powstawanie nieodwracalnych zmian prowadzących do powstawania zaburzeń lękowych.

Związek ten jest powszechnie stosowany w badaniach, do indukcji ostrego (acute stress) oraz długotrwałego stresu (chronic stress).

Zagadnienie roli zmian organizacji chromatyny oraz jej wpływu na regulację poziomu ekspresji genu *GR* jest całkowicie niezbadane. Wywołanie ostrego stresu za pomocą deksametazonu jest odpowiednim modelem do zbadania interesujących mnie zagadnień. Wykazano, iż podanie deksametazonu indukuje zmiany w poziomie ekspresji genu *GR* w wielu narządach ciała. Ponadto nasze badania wykazały, iż deksametazon powoduje przemieszczanie się alleli interesującego nas genu wewnątrz jądra komórkowego.

**B. Brak jest danych dotyczących:...**

możliwości wykorzystania innego (niż myszy lub szczurzy) modelu do przeprowadzenia proponowanych przez mnie badań, który odzwierciedlałby zmiany poziomu ekspresji oraz związane z tym zmiany struktury chromatyny zachodzące w wybranych strukturach mózgu w warunkach ostrego lub chronicznego stresu.

Ponadto badania możemy przeprowadzić tylko na zwierzętach, ponieważ żaden z dostępnych obecnie modeli komórkowych nie odtwarza złożoności połączeń nerwowych w mózgu, w tym roli poszczególnych struktur.

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

**A. Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku**

zbadania zmian ekspresji genu *GR* w obrębie struktur mózgu związanych z występowaniem zaburzeń lękowych i depresji, a także poznania mechanizmów epigenetycznych, w szczególności wpływ wielkoskalowych zmian struktury chromatyny na regulację ekspresji tegoż genu.

**B. Zastosowanie uzyskanej wiedzy,**

Poznanie zmian na poziomie molekularnym powstałych na skutek ostrego i chronicznego stresu stojących u podstaw zaburzeń lękowych i depresji w przyszłości może pomóc w formułowaniu nowych kierunków terapeutycznych wymienionych zaburzeń.

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 połączeń nerwowych w mózgu, w tym roli poszczególnych struktur 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, które pozwoli na wiarygodną analizę statystyczną i weryfikację postawionego problemu badawczego.

**UDOSKONALENIE**

Nadrzędnym celem jest ograniczenie cierpienia i stresu zwierząt, związanego z przeprowadzanymi procedurami. Dlatego też zwierzęta na pięć dni przed rozpoczęciem eksperymentu podlegać będą procesowi habituacji: będą pojedynczo wyjmowane z klatek przez eksperymentatora, tak, aby mogły się do niego przyzwyczaić. Ponadto przez cały czas trwania eksperymentów zwierzęta będą przebywać w klatkach o wzbogaconym środowisku, umożliwiającym budowanie gniazda (chusteczki, skompresowane bawełniane płatki/wałeczki) i zabawę (drewniane kołeczki). Kolejnym działaniem zmniejszającym stres zwierząt będzie przestrzeganie ograniczonej, do eksperymentatora i opiekuna, liczby osób pracujących z badanymi zwierzętami.