

# **Нетехническо обобщение на проект за работа с опитни животни**

**Проект: №421 Договор: №12**

**„Взаимодействие между серотонинергичната и ГАВА-ергичната невротрансмитерни системи в ретината на нисши гръбначни“**

## **ВОДЕЩ ИЗСЛЕДОВАТЕЛ:**

**Проф. Лилия Александрова Витанова, дм, дмн**

## **УЧАСТНИЦИ В ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИЯ ЕКИП:**

- 1. Доц. Петя Николова Купенова-Шербанова, дм**
- 2. Доц. Елка Бориславова Йорданова-Попова, дм**
- 3. Д-р Десислава Иванова Жекова**

<b>Наименование на проекта</b>	Взаимодействие между серотонинергичната (5-HT) и GABA-ергичната невротрансмитерни системи в ретината на лисици (тръбачни)		
<b>Продължителност на проекта</b>	1 година		
<b>Ключови думи</b>	ретина, електроретинограма, имунофлуоресценция, серотонин - невротрансмисия и невромодуляция, GABA <sub>ρ</sub> (ρ) рецептори, жаба, костенурка		
<b>Цел на проекта</b>	Фундаментални научни изследвания	ДА	
	Транслационни или приложни изследвания		НЕ
	Разработване, производство или изпитване на качеството, ефективността и безопасността на лекарства, храни и фуражи и други вещества или продукти		НЕ
	Защита на природната среда с оглед опазване здравето на хората и животните и тяхното благосъстояние		НЕ
	Изследвания, насочени към опазване на биологичните видове животни		НЕ
	За обучение с цел придобиване, поддържане или подобряване на професионалните умения в средните специални училища, колежите или висшите учебни заведения		НЕ

	Поддържане на колонии от генетично изменени животни, които няма да бъдат използвани в други опити		НЕ
	Съдебномедицински изследвания		НЕ
<p><b>Описание на целта на проекта</b></p>	<p>Серотонинът и GABA са основни невротрансмитери в централната нервна система (ЦНС). Като такива те са ангажирани в патогенезата на множество социално значими заболявания като голям депресивен епизод, шизофрения, епилепсия и др. Много лекарствени групи повлияват серотонинергичната и GABA-ергичната невротрансмисия.</p> <p>Тези основни за ЦНС невротрансмитерни системи са широко представени и в ретината. Тя - от своя страна, като един естествен биологичен модел на мозъка, е особено подходяща за изучаване на нервните мрежи, в които са включени серотонинът и GABA, тъй като няколко вида ретинални неврони отделят тези медиатори.</p> <p>Изследването на ретините на нисши гръбначни има и едно по-фундаментално значение – поради развиващата се във филогенезата енцефализация на функциите, те в известен смисъл представляват своеобразни модели на нервни мрежи, които при бозайници се локализируют в ЦНС. Освен това, електроретинограмата (ЕРГ) е един достъпен клиничен метод за изследване на биоелектричната активност на ретината, а има данни за отклонения в ЕРГ при пациенти с психиатрични заболявания (Lavoie et al., 2014).</p> <p>В наши предишни изследвания ние показахме, че серотонинът в ретината на</p>		

жабата *Rana ridibunda* и костенурката *Trahemys scripta elegans* изпълнява ролята на невротрансмитер, невромодулятор и глиотрансмитер (Vitanova & Zhekova, 2015). За модулиращите ефекти на серотонина съдехме по предизвиканото от антителата, насочени срещу серотониновите рецептори, интензивно имуноцитохимично багрене на голям брой клетъчни тела, без това да беше придружено от съответстващо по обем и интензивност багрене в синаптичните слоеве на ретината. Това ние интерпретирахме като екстрасинаптично багрене. Широкото екстрасинаптично представителство на серотониновите рецептори може да медира и ефекта на извънретиалния серотонин (отделян от ретиалните израстъци на нерони, чиито тела са разположени извън ретината). Съществуват данни, че в ретината навлизат израстъците на т.н. ретинопетални неврони, които притежават серотонинергична характеристика (Gastinger et al, 2005).

В края на 20 век бяха описани нов тип йонотропни, хомомерни GABA рецептори, изградени само от  $\rho$  ( $\rho$ ) субединици (първоначално наречени GABA(C), а понастоящем известни като GABA(A)  $\rho$  рецептори. Хлорният ток, протичащ през тях е с различна характеристика от тока, протичащ през "класическите" GABA(A) рецептори. Различават се и залавните места, разположени екстрацелуларно по протежението на белтъчната молекула на двата типа рецептори. Нашите изследвания върху функционалната значимост на GABA(A)  $\rho$  рецепторите и тяхното имунохистохимично доказване в ретината, бидейки едни от първите в тази област, са цитирани многократно в

	<p>научната литература (Vitanova et al., 2001; Kurenova et al., 2008, 2010). Съществува хипотеза, че между двете невротрансмитерни системи съществуват взаимодействия. Понастоящем идеята ни е да установим дали GABA(A)<math>\rho</math> рецепторите в ретините на нисши гръбначни търпят въздействия от серотонинергична система.</p>
<p><b>Потенциалните ползи от осъществяването на проекта</b></p>	<p>Получените резултати биха изяснили функционалната значимост на серотонина в ретината, за което данните са твърде оскъдни. Установяването на модулиращи влияния на серотонина върху медираните от GABA(A)<math>\rho</math> рецептори отговори би имало както фундаментално, така и клинично значение при изясняване механизма на редица невропсихиатрични заболявания. Установяването на потенциален стимулиращ ефект на серотонина върху биоелектричната активност на ретината би било в съзвучие с някои най-нови изследвания, съгласно които серотонинът, негови аналози и някои серотонинови рецептори действат като невропротектори. Всичко това придава на нашите изследвания, освен теоретичен, и клинично-приложен характер.</p>
<p><b>Вид и брой на опитните животни, които се очаква да бъдат използвани в проекта</b></p>	<p>29 жаби от вида <i>Rana ridibunda</i> 1 костенурка от вида <i>Trachemys scripta elegans</i></p>
<p><b>Очаквани неблагоприятни ефекти, вероятното ниво на тежест на опитите и увреждане на животните, както и съдбата на животните след приключване на опитите</b></p>	<p>Опитите ще се провеждат в условията на остър експеримент след евтаназия на животните. Ще се вземат мерки за минимизиране на болката и страданието на животните, като се спазват препоръките и процедурите на AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. В нашия случай това ще става посредством тристъпална процедура: 1) Анестезия с Tricaine methanesulfonate, приложен в концентрация 500mg/L в условия на водна баня (в съд с подходяща големина). Този начин на обезболяване е общоприет в</p>

	<p>Европейския съюз при работа с водни животни.</p> <p>2) Бърза декапитация</p> <p>3) Разрушаване на гръбначния мозък</p> <p>За дълбочината на анестезията ще се съди по изчезването на рефлекс на обръщане и рефлекс на отдръпване – при жаба, и изчезване на рефлекс на отдръпване при костенурка.</p> <p>Едва след третата стъпка се пристъпва към въздействия върху ретината на окото. От изброените по-горе процедурни стъпки става ясно, че всяко животно се подлага на остър опит, т.е. използва се еднократно и не подлежи на по-нататъшно наблюдение и следене. При имуноцитохимичните изследвания получените от едно животно стотици ретинални срезове може да се използват месеци при съхранение при - 20<sup>0</sup>С.</p>
<p><b>Въвеждане на принципите на заместване, намаляване и облекчаване</b></p>	
<p><b>1. Заместване</b></p>	<p>Посоченото изследване не може да се замести със симулация, тъй като нервните мрежи в ретината не са достатъчно изучени и не могат а бъдат ефективно моделирани.</p> <p>Експериментите с животни с фармакологични въздействия не могат да бъдат заменени с модели. Имуноцитохимичните изследвания също не подлежат на моделиране, тъй като всяко едно изследване е уникално.</p>
<p><b>2. Намаляване</b></p>	<p>Посоченият брой животни е минимален за получаване на статистически значими резултати.</p>
<p><b>3. Облекчаване</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Нито един от тези видове (жаба – <i>Rana ridibunda</i>; костенурка - <i>Trachemys scripta elegans</i>) не е застрашен, а дори видът <i>Trachemys scripta elegans</i>, който не е типичен представител на нашата фауна, а е внесен отвън, представлява заплаха за оцеляването на характерните за нашата фауна водни костенурки <i>Emys orbicularis</i>, които са изчезващ вид.</li> <li>•След получаване на животните от регистриран в Българската агенция по безопасност на храните (БАБХ) животновъден обект, те ще бъдат отглеждани</li> </ul>

при стандартизирани условия, подходящи за изследвания вид в лицензия вивариум на МУ-София. Във Вивариума са осигурени нормални условия – подходящи басейни, контролирана температура и осветление и т.н.

- Опитите ще се провеждат в условия на остър експеримент след евтаназия на животните. Ще се взимат всички мерки за минимизиране на болката и страданието на животните, като се спазват препоръките и процедурите на AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition.