

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu **Wpływ dobrowolnej aktywności fizycznej oraz wybranych mimetyków aktywności na ekspresję inflamasomu NLRP3 u myszy poddanych owariektomii**

Czas trwania projektu 33 miesiące

Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) neuroinflamacja, inflamasom, owariektomia, aktywność, mimetyki

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.

Okres postmenopauzy u kobiet charakteryzuje się znaczącym spadkiem poziomu krążącego estrogenu, a ponadto wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Chorobom OUN towarzyszy przewlekły, niekontrolowany stan zapalny w obrębie mózgu - neuroinflamacja. Estrogen wykazuje działanie neuroprotekcyjne m.in. poprzez hamowanie procesu neuroinflamacji. Regularna aktywność fizyczna ma korzystny wpływ na funkcjonowanie całego organizmu. Ponadto coraz częściej zwraca się uwagę na znaczenie regularnej aktywności fizycznej w prewencji jak i terapii chorób OUN. Jednak, wprowadzenie aktywności fizycznej nie zawsze jest możliwe. Z tego względu proponuje się wykorzystanie mimetyków aktywności fizycznej, których działanie na organizm ma wywoływać korzystne efekty podobne do tych, obserwowanych w wyniku regularnej aktywności fizycznej. **Celem projektu jest uzyskanie odpowiedzi czy i jak aktywność fizyczna lub podawanie mimetyków aktywności fizycznej może modulować zmiany, w ekspresji białek**

**zaangażowanych w szlaki sygnałowe związane z procesem neuroinflamacji, wywołane niedoborem estrogenów.**

Eksperyment będzie prowadzony w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Przeprowadzenie badań *in vitro* pozwoli na przebadanie pięciu mimetyków aktywności fizycznej pod kątem właściwości przeciwzapalnych z jednoczesnym zminimalizowaniem ilości wykorzystanych zwierząt. Jednak, badanie wpływu deficytu estrogenów, aktywności fizycznej oraz działania przeciwzapalnego mimetyków aktywności na proces neuroinflamacji jest możliwe jedynie w modelu *in vivo*, z wykorzystaniem wybranego gatunku kręgowców.

Celem wyjaśnienia tych mechanizmów, po zakończeniu eksperymentu od zwierząt zostanie pobrany mózg oraz surowica krwi. Wszystkie procedury, jakim zostaną poddane myszy zaliczają się do łagodnej lub umiarkowanej kategorii dotkliwości. Badania te mogą przyczynić się do rozwoju form terapii opartych na naturalnych mechanizmach ochronnych organizmu wśród kobiet w okresie postmenopauzy.

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

W badaniach planujemy wykorzystać 80 mysich noworodków oraz 104 10-miesięcznych samiec myszy domowej (*Mus musculus*) szczepu C57BL/6. Na taką wielkość próby składa liczba osobników niezbędna do przeprowadzenia testów statystycznych w każdej z grup eksperymentalnych i w grupach kontrolnych. Do eksperymentu planujemy wprowadzić dwie grupy z wykorzystaniem 80 noworodków myszy łącznie do założenia pierwotnych hodowli komórek glejowych. Taka liczba zwierząt jest potrzebna do przeprowadzenia badań *in vitro* w trzech powtórzeniach biologicznych oraz uzyskania materiału do przeprowadzenia testów statystycznych w każdej z grup. Ponadto, eksperyment obejmować będzie docelowo 8 grup z wykorzystaniem osobników dorosłych. Każda grupa liczyć będzie po 13 osobników. Taka liczebność grup stanowi rozsądny kompromis pomiędzy liczbą zwierząt wykorzystanych w doświadczeniu, a ryzykiem tego, że zbyt mała wielkość próby uniemożliwi przeprowadzenie analizy statystycznej i uzyskanie wiarygodnych wyników.

**Łączna liczba myszy w całym doświadczeniu: 184**

1. grupa mysich noworodków wykorzystana do izolacji astrocytów (**n=40**);
2. grupa mysich noworodków wykorzystana do izolacji mikrogleju (**n=40**);
3. grupa 10-miesięcznych myszy poddanych obustronnej owariektomii i utrzymywanych w hodowli przez 2 tygodnie (**n=13**);
4. grupa 10-miesięcznych myszy poddanych operacji placebo i utrzymywanych w hodowli przez 2 tygodnie (**n=13**);
5. grupa 10-miesięcznych myszy poddanych obustronnej owariektomii i utrzymywanych w hodowli przez 7 tygodni (**n=13**);
6. grupa 10-miesięcznych myszy poddana owariektomii i poddanych dobrowolnej aktywności fizycznej przez 6 tygodni (**n=13**);
7. grupa 10-miesięcznych myszy poddana owariektomii, którym będą podawane mimetyki aktywności fizycznej przez 6 tygodni (**n=13**);

8. grupa 10-miesięcznych myszy poddanych operacji placebo i utrzymywanych w hodowli przez 7 tygodni (**n=13**);
9. grupa 10-miesięcznych myszy poddana operacji placebo poddanych dobrowolnej aktywności fizycznej przez 6 tygodni (**n=13**);
10. grupa 10-miesięcznych myszy poddana operacji placebo, którym będą podawane mimetyki aktywności fizycznej przez 6 tygodni (**n=13**).

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

Przygotowując projekt badawczy, Wnioskodawca sprawdził aktualny stan wiedzy w zakresie, który obejmuje cel naukowy badania w bazach danych naukowych PUBMED oraz Google Scholar.

Wykorzystano następujące słowa kluczowe: ovariectomy, menopause, model of menopause, neuroinflammation, NLRP3 inflammasome, physical activity, exercise mimetics.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzono, że:

Owariektomia wywołuje zmiany w procesie neuroinflamacji u gryzoni, jednak nie wiadomo, czy i jak aktywność fizyczna lub stosowanie jej mimetyków może modulować te zmiany. Brak jest danych na temat oceny zmian w ekspresji białek zaangażowanych w szlaki sygnałowe inflammasomu NLRP3 i aktywację szlaku NF- $\kappa$ B w korze czołowej samic myszy poddanych owariektomii. Ponadto, nie wiadomo jak aktywność fizyczna i jej mimetyki wpływają na ekspresję białek zaangażowanych we wspomniane wyżej szlaki sygnałowe w warunkach deficytu estrogenów.

Autorzy proponowanego doświadczenia planują wykorzystać pierwotne hodowle komórek glejowych stymulowane lipopolisacharydem (LPS). Stymulacja komórek glejowych LPS jest uznaną metodą uzyskania modelu neuroinflamacji *in vitro*. Model ten pozwoli na ocenę pod kątem przeciwzapalnym pięciu substancji uznawanych w literaturze za mimetyki aktywności fizycznej z wykorzystaniem jak najmniejszej ilości zwierząt. Jest to etap eliminacji, w którym wybrana substancja, o najkorzystniejszym działaniu przeciwzapalnym w komórkach glejowych stymulowanych LPS, będzie podawana zwierzętom poddanym owariektomii.

Jednak, uzyskanie odpowiedzi na główną hipotezę badawczą jest możliwe tylko przy wykorzystaniu zwierząt laboratoryjnych. Nie ma bowiem możliwości odwzorowania skomplikowanego procesu neuroinflamacji zachodzącego w warunkach deficytu estrogenów czy pod wpływem stosowania aktywności fizycznej na hodowlach komórkowych, izolowanych modelach perfundowanych organów lub z wykorzystaniem symulacji komputerowej.

### OGRANICZENIE

Liczba wykorzystywanych zwierząt w planowanych badaniach została ograniczona do minimum pozwalającego na zrealizowanie zamierzonych celów. W badaniach wykorzystamy łącznie 80 noworodków oraz 104 osobników dorosłych. Zostanie wykorzystanych 80 osobników nowonarodzonych do założenia pierwotnych hodowli mikrogleju i astrocytów. Taka liczba zwierząt powinna wystarczyć do przeprowadzenia badań *in vitro* w trzech powtórzeniach biologicznych oraz uzyskania materiału do przeprowadzenia testów statystycznych w każdej z

grup (procedura 1, 2). Na taką wielkość próby składa się liczba osobników niezbędna do przeprowadzenia testów statystycznych w każdej z grup eksperymentalnych i w grupach kontrolnych. Eksperyment obejmować będzie docelowo 8 grup eksperymentalnych (4 grupy zwierząt poddanych owariektomii i 4 grupy zwierząt poddanych operacji placebo), każda grupa liczyć będzie po 13 osobników. Celem naszych badań będzie określenie wpływu wysiłku fizycznego lub podawania mimetyków aktywności fizycznej na indukowane owariektomią zmiany w ekspresji białek zaangażowanych w szlaki sygnałowe inflamasyonu NLRP3 i aktywację szlaku NF-kB oraz ocena markerów prozapalnych (badania homogenatów struktur mózgu).

#### UDOSKONALENIE

Doświadczenia zaplanowano z zastosowaniem metod, które pozwalają na uzyskanie wysokiej jakości wyników przy jednoczesnym ograniczeniu dystresu zwierząt. Zwierzęta wykorzystywane w doświadczeniach będą dobrane stosownie do zaplanowanych eksperymentów oraz będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku zgodnie z przyjętymi zasadami obowiązującej dyrektywy 2010/63/EU. Do planowanych doświadczeń wybrano mysz, które wykazują naturalną, dobrze udokumentowaną, skłonność do podejmowania dobrowolnej aktywności fizycznej. Zwierzęta będą biegały w kołach obrotowych, które pozwalają na kontrolę aktywności fizycznej zwierząt. Zaletą tej procedury jest fakt, iż nie będzie wiązała się ze stresem charakterystycznym dla popularnie stosowanej metody treningu zwierząt doświadczalnych z użyciem bodźca elektrycznego. Ponadto, planowany sposób podawania zwierzętom mimetyków aktywności fizycznej, wraz z wodą pitną, eliminuje pojawienie się bólu, cierpienia oraz dystresu związanego z podaniem substancji dootrzewnowo lub dożołądkowo.

Jedną z planowanych interwencji jest przeprowadzenie owariektomii lub operacji placebo, która będzie wykonywana w znieczuleniu ogólnym. Po operacji zwierzęta będą otrzymywać środki przeciwbólowe i będą obserwowane pod kątem wystąpienia objawów niepożądanych. Jeśli jednak w trakcie trwania badań u zwierząt zostaną zaobserwowane objawy cierpienia i przedłużonego dystresu (np. zwierzęta nie będą jadły i piły) lub jakiegokolwiek niepożądane zmiany fizyczne (np. zachowania sugerujące odczuwanie bólu, stan zapalny), to wykonywane czynności zostaną przerwane, a procedury humanitarnie zakończone. Wszelkie czynności związane z humanitarnym uśmierceniem będą wykonywane zgodnie z przyjętymi zasadami obowiązującej dyrektywy 2010/63/EU.

W przypadku pojawienia się alternatywnych modeli (zadowalających pod względem naukowym), zastąpią one modele zaplanowane w badaniu, z zastrzeżeniem, że nie będzie to miało wpływu na wiarygodność uzyskanych dotychczas wyników.

#### 8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną

- TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy



NIE