

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Wpływ kofeiny na procesy pamięci u myszy poddanych intoksykacji metalami ciężkimi (kadm, ołów)**

2. Czas trwania projektu **5 lat**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **kofeina, kadm, ołów, pamięć, myszy**

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

Metale ciężkie, takie jak kadm i ołów, są powszechnie uznawanymi toksynami środowiskowymi i zawodowymi. Ekspozycja na metale ciężkie może prowadzić do wystąpienia zaburzeń pamięci. Badania doświadczalne pokazują, że możliwymi mechanizmami odpowiedzialnymi za zaburzenia kognitywne wywołane metalami ciężkimi, może być zahamowanie aktywności układu cholinergicznego czy stres oksydacyjny.

Kofeina jest najczęściej spożywaną na świecie substancją psychopobudzającą. Działanie kofeiny a zwłaszcza poprawa koncentracji i pamięci powodują, że zużycie kofeiny rośnie na całym świecie. Kofeina podobnie jak metale ciężkie wpływa na układ cholinergiczny (jest inhibitorem acetylocholinoesterazy) oraz stres oksydacyjny w tkance mózgowej.

Powszechne spożycie kofeiny wiąże się z możliwością wystąpienia interakcji farmakologicznych z przyjmowanymi lekami ale także z innymi substancjami chemicznymi.

Nie wiadomo jest, czy kofeina która jest substancją silnie oddziaływującą na ośrodkowy układ nerwowy,

wpływa na efekty neurotoksyczne metali ciężkich takich jak kadm czy ołów. Przy czym możliwy jest tu wpływ zarówno ochronny kofeiny jak i nasilający objawy neurologiczne. Celem niniejszej pracy jest ocena łącznego działania kofeiny oraz intoksykacji kadmem lub ołowiem, na funkcję tkanki mózgowej ze szczególnym uwzględnieniem procesów pamięci.

Badania zostaną przeprowadzone na dorosłych samcach myszy szczepu Swiss. Kofeina i związki metali (octan ołowiu, chlorek kadmu) będą podawane zwierzętom dootrzewnowo (i.p.) jednorazowo w dawkach stanowiących max. 15% wartości LD50 (podawanie ostre) oraz podprzewlekle (przez 10 dni) w dawkach niższych nie wywołujących objawów po podaniu ostrym. Do oceny wpływu intoksykacji ostrej metalami w połączeniu z kofeiną na pamięć, zostanie użyty test biernego unikania oraz labirynt Y. Uzupełnieniem badań nad pamięcią, będzie ocena koordynacji ruchowej zwierząt na urządzeniu typu rota-rod. Wpływ podprzewlekłego podania związków metali w połączeniu z kofeiną zostanie zbadany w testach pamięci: teście biernego unikania oraz labiryncie Y. Dodatkowo zostaną wykonane badania biochemiczne (aktywność acetylocholinoesterazy i enzymów antyoksydacyjnych) i histologiczne mózgów myszy zarówno po podaniu ostrym jak i podprzewlekłym. Uzyskane wyniki będą pomocne do określenia wpływu przyjmowania kofeiny na własności toksyczne kadmu i ołowiu u ludzi narażonych na te metale.

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

480 dorosłych samców myszy Swiss Albino

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

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w elektronicznych bazach danych: EBSCO, PubMed, Google Scholar, Web of Science, ScienceDirect. Wykorzystano następujące słowa kluczowe: caffeine, cadmium (lub cadmium exposure, cadmium toxicity, cadmium intoxication, Cd), lead (lub lead exposure, lead toxicity, lead intoxication, Pb), memory, learning, motor coordination.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że nie badano wpływu kofeiny na zaburzenia pamięci wywołane podaniem związków metali ciężkich (kadm, ołów) w doświadczalnych modelach pamięci. Przygotowany został projekt, którego celem jest ocena łącznego działania kofeiny oraz intoksykacji kadmem lub

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

ołowiem, na funkcję tkanki mózgowej ze szczególnym uwzględnieniem procesów pamięci badanych u myszy. Przyjęliśmy hipotezę, że kofeina jako substancja silnie oddziałującą na ośrodkowy układ nerwowy, w tym na układ cholinergiczny jak i zjawisko stresu oksydacyjnego (oba wpływają na układy pamięci), może wpływać na efekty neurotoksyczne metali ciężkich takich jak kadm czy ołów, których mechanizmy toksycznego działania obejmują stres oksydacyjny i układ cholinergiczny w tkance mózgowej. Przy czym możliwy jest tu wpływ zarówno ochronny kofeiny jak i nasilający objawy neurologiczne metali ciężkich. Uzyskane wyniki z projektu będą pomocne do określenia wpływu przyjmowania kofeiny na własności toksyczne kadmu i ołowiu u ludzi narażonych na te metale.

1. R-OGRA NICZENIE. W celu ograniczenia liczby zwierząt, podjęto następujące działania:

A. W projekcie zostaną użyte dawki ostre związków metali pochodzące z wcześniejszych badań własnych. Nie będą więc wyznaczane nowe wartości np. 10% LD<sub>50</sub> dla podawania ostrego związków metali, co wpłynęło na ograniczenie liczby zwierząt w doświadczeniu. Dawki związków metali dla podawania podprzewlekłego (przez 10 dni) będą wyznaczone na podstawie uzyskanych wyników z podawania ostrego. Będą to dawki subtoksyczne, niewywołujące objawów ostrych. W ten sposób zaplanowane wyznaczenie dawki podprzewlekłej związków metali wpływa na ograniczenie liczby zwierząt. Wyklucza bowiem w przyszłości konieczność powtórzenia doświadczenia z powodu błędnego na wstępie oszacowania zbyt niskiej dawki związków metali do podawania podprzewlekłego.

B. Liczba grup zostanie zredukowana tzn. grupy kontrolne (myszy którym podano tylko 0.9% NaCl) oraz grupy którym podano tylko kofeinę (40 mg/kg) będą takie same dla porównania z grupami którym podano kadm lub ołów. Nie wpłynie to na poprawność analizy naukowej uzyskanych wyników. Natomiast grupy kontrolne w układzie ostrym i podprzewlekłym doświadczenia muszą być różne, ponieważ w przeciwieństwie do ostrego, w schemacie podprzewlekłym zwierzęta otrzymują wielokrotne iniekcje 0.9% NaCl.

C. Badania biochemiczne i histologiczne tkanki mózgowej będą wykonywane na myszach wcześniej badanych w testach behawioralnych co znacząco ograniczy liczbę zwierząt użytych w projekcie.

2. R-UDOSKONALENIE. Wpływ na udoskonalenie doświadczeń będzie miało:

A. Przed rozpoczęciem doświadczeń myszy będą przyzwyczajane do bodźców dotykowych i zapachowych człowieka podczas 7-dniowego okresu adaptacji do warunków laboratoryjnych. W trakcie tej czynności zwierzęta będą wyjmowane z klatek i głaskane przez kilka minut, co pozwoli na znaczne zminimalizowanie stresu u badanych zwierząt podczas samych doświadczeń, a tym samym umożliwi otrzymanie wiarygodniejszych wyników badań.

B. Chlorek kadmu i octan ołowiu będą podawane w maksymalnej ostrej dawce nie przekraczającej 15% ich wartości LD<sub>50</sub>. Zaplanowane dawki związków metali w doświadczeniu są wystarczające (opierając się na wcześniejszych własnych pracach) aby wywołać efekty biologiczne u myszy pod postacią zaburzeń pamięci czy aktywności ruchowej, nie są jednak na tyle toksyczne aby istniała potrzeba wcześniejszego humanitarnego

zakończenia procedury (doświadczenia własne z dawkami octanu ołowiu i chlorku kadmu u myszy).

C. Kofeina (caffeine-sodium benzoate), chlorek kadmu, octan ołowiu opierając się na ich właściwościach fizykochemicznych (np. rozpuszczalności w wodzie) będą podawane w objętości 5 ml/kg m.c. a nie często stosowanej 10 ml/kg m.c.

D. Środowisko bytowe zwierząt będzie urozmaicone poprzez tunele (kolorowe tuby wykonane z poliwęglanu wysokiej jakości), bawełniane podkładki oraz drewniane klocki do ścierania zębów.

3. R-ZASTĄPIENIE. Badania in vitro stosowane w przypadku substancji o potencjalnym działaniu prokognitywnym bądź amnestycznym dostarczają jedynie informacji na temat mechanizmów ich działania w odniesieniu do receptorów, enzymów lub kanałów jonowych. Nie ma możliwości określenia czy dana substancja zaburza pamięć albo czy ją poprawia bez sprawdzenia tego w badaniach in vivo. W projekcie oprócz badań behawioralnych zaplanowano również badania biochemiczne i histologiczne mózgów myszy, celem wyjaśnienia postawionej hipotezy badawczej. Przeprowadzenie badań behawioralnych z następczymi badaniami biochemicznymi czy histologicznymi tkanki mózgowej, możliwe jest tylko na modelach zwierzęcych.

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.