

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Wpływ modulacji układu autonomicznego na percepcję sygnałów ultradźwiękowych u szczura

2. Czas trwania projektu 01.09.2019-01.09.2023

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) wokalizacje ultradźwiękowe, częstość skurczów serca, układ autonomiczny, opóźnione warunkowanie na bodźce ogólne

4. 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.

W stanach silnego pobudzenia emocjonalnego człowieka zazwyczaj nie tylko rośnie częstość skurczów serca, lecz także zmienia się jego mowa – mówimy głośniejsze i wyżej. Podobną silną korelację między wysokością wydawanych dźwięków a pracą serca zaobserwowano u zwierząt.

Szczury komunikują się głównie w ultradźwiękowym, ich wokalizacje (USV, *ultrasonic vocalizations*) występują w dwóch wysokościach: 22 kHz (w sytuacjach awersyjnych: strach, zapach drapieżnika) oraz 50 kHz (w sytuacjach apetytywnych: zabawa, zaloty). W doświadczeniu planujemy zbadać relację pomiędzy pracą serca szczura a wokalizacjami przez niego wydawanymi.

Celem naukowym projektu będzie opisanie zmian parametrów krążeniowych i zachowania szczurów wobec odtwarzanych USV przy różnych poziomach pobudzenia autonomicznego układu nerwowego. Zbadane zostaną m.in. częstość skurczów serca, ciśnienie krwi tętniczej, emitowane

przez zwierzęta USV i in. Wykorzystamy następujące układy doświadczalne: szczury doświadczające stresu, szczury z wrodzoną genetyczną nadpobudliwością układu nerwowego, farmakologiczną blokadę jednej z dwóch części ukł. autonomicznego (współczulną lub przywspółczulną).

Stres. Stan stresu u zwierząt zostanie wywołany przy pomocy warunkowania strachu na określony bodziec. Szczur po otrzymaniu sygnału świetlnego otrzyma krótkotrwały, niegroźny dla zdrowia impuls elektryczny w łapy. Przewidujemy trzy grupy doświadczalne, w których zwierzęta otrzymają odpowiednio jeden, sześć lub dziesięć impulsów.

Szczury SHR (*Spontaneously Hypersensitive Rats*). Nadaktywność tych szczurów jest najbardziej zbliżona do ludzkiego ADHD.

Blokada układu autonomicznego. Ta część układu nerwowego odpowiada za reakcje mimowolne, związane z emocjonalnością, m. in. częstość skurczów serca i charakterystykę sygnałów wokalizacyjnych.

Połączenie obserwacji parametrów krążeniowych z sytuacjami stresogennymi, a także z rejestracją USV spełniającymi funkcje społeczne ma znaczenie dla obszarów badań związanych z fizjologią słuchu, komunikacją, emocjami, motywacją, neurobiologią społeczną. Może też znaleźć zastosowanie w badaniu zwierzęcych modeli lęku, depresji i autyzmu.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Szczury Wistar – stado szczurów nieposiadające dodatkowych cech charakterystycznych, stosowane jako podstawowe w badaniach czynnościowych i behawioralnych. Liczba szczurów: 160.

Szczury SHR (spontanicznie nadciśnieniowe) – szczep szczurów powstały przez krzyżowanie wyłącznie osobników o podwyższonym ciśnieniu tętniczym. Uzyskano w ten sposób drogą naturalną zwierzęta będące modelem ludzkiego nadciśnienia i ADHD. Liczba szczurów: 160.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: __PUBMED; __ScienceDirect; __Web of Science (JCR);

Wykorzystałem słowa kluczowe: Wistar, SHR, USV, scopolamine, atenolol, HRV, delay fear conditioning, SNS blockade, PNS blockade, ANS blockade, polyvagal perspective, vagus

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że:

¹ Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

- W różnych schematach doświadczalnych warunkowania strachu wykorzystuje się różną liczbę bodźców elektrycznych – od jednego do dwunastu [3, 8-15]. Jak dotąd nie wypracowano konsensusu w kwestii optymalnego przebiegu warunkowania strachu, przypuszcza się jednak, że zarówno zbyt krótkie, jak i zbyt długie warunkowanie może nie być optymalne dla uzyskania właściwego efektu eksperymentalnego.
- Cechą charakterystyczną szczurów SHR jest przede wszystkim przyspieszony rozwój układu współczulnego [6], co przekłada się m. in. na wysokie wartości ciśnienia tętniczego krwi, czy deficyty uwagi, które mogą upośledzać warunkowanie strachu u tych zwierząt [16]. Prace dotyczące badania wokalizacji szczurów SHR niemalże nie istnieją. W pojedynczych wykazano, że samice SHR wokalizują w odpowiedzi na zapach ściółki z klatki samca [17]. Ponieważ jednak nadaktywność układu współczulnego u szczurów SHR zależna jest częściowo od chromosomu Y [18], emisje wokalizacji u samców mogą się wyraźnie różnić od wokalizacji samic. Odpowiedź na bodźce akustyczne szczurów SHR jest słabsza niż szczurów normotensyjnych [19]. Ponieważ u szczurów SHR obserwuje się zaburzenia w interakcjach społecznych, to również może przyczyniać się do odmiennej niż u szczurów Wistar reakcji na USV [20]. Szczury SHR charakteryzuje także anatomiczno-funkcjonalne upośledzenie nerwu krtaniowego wstecznego (odgałęzienia nerwu błędnego, kluczowego dla wokalizowania) o niesprecyzowanym pochodzeniu.
- Istnieje wiele prac, w których stosuje się farmakologiczną modulację układu współczulnego (atenolol), przywspółczulnego (atropina) lub obu (hexamethonium); prace te jednak opisują działanie układu nerwowego lub sercowo-naczyniowego, nie odnosząc się do zmian w poziomie wokalizacji zwierząt lub reakcji na wokalizację [7, 21].

A. Zgromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:

Poniższe obserwacje wynikają z przeprowadzenia doświadczeń według uchwał LKE:

- U szczurów Wistar istnieje wyraźna reakcja na USV prezentowane z głośnika. Na 50-kHz USV szczury odpowiadają wzrostem HR i własnymi wokalizacjami. Na 22-kHz USV odpowiadają spadkiem HR i znikomą liczbą własnych wokalizacji. Szczury przed ekspozycją na USV nie były poddawane działaniu żadnych czynników stresowych.
- Reakcja szczurów Wistar na sygnały wygenerowane komputerowo, a naśladujące naturalne USV, jest zbliżona do reakcji na USV naturalne; kierunek zmian jest ten sam (tj. wzrost HR i emisji USV w odpowiedzi na 50 kHz, spadek HR w odpowiedzi na 22 kHz), lecz są one zdecydowanie słabsze.
- U szczurów Wistar nie obserwuje się wyraźnych różnic w odpowiedzi na USV prezentowane z głośnika między szczurami chowanymi w parach a szczurami chowanymi pojedynczo (izolacja społeczna jako czynnik stresowy).
- U szczurów SHR reakcja na USV prezentowane z głośnika różni się od reakcji szczurów Wistar tylko w przypadku ekspozycji na 50-kHz USV: nie pojawiają się wyraźne zmiany w HR, a odpowiedź własnymi wokalizacjami jest słabsza niż u szczurów Wistar.
- Podczas warunkowania strachu szczury Wistar emitują 22-kHz USV już po pierwszym podaniu bodźca elektrycznego na łapy. Szczury SHR zaczynają emitować 22-kHz USV znacznie później, po 6-8 bodźcu lub nie emitują ich wcale. W dniu testu warunkowania szczury Wistar emitują 22-kHz USV, szczury SHR emitują krótkie USV o różnych częstotliwościach, lecz nie typowe 22-kHz USV.
- W dniu testu warunkowania (test na kontekst) szczury SHR charakteryzuje wyraźny wzrost HR; podobny kierunek zmian u szczurów Wistar jest jedynie zarysowaną tendencją. Szczury Wistar podczas testu na kontekst wokalizują intensywnie 22-kHz USV, szczury SHR niemalże nie wokalizują.

- Wymienione powyżej przykłady charakterystyki emisji USV przez szczury SHR są wyjątkowe, ponieważ nie istnieje w literaturze opis zachowań wokalizacyjnych tego szczepu szczurów.

B. Brak jest danych dotyczących: ogólnej charakterystyki emisji USV przez szczury SHR; zależności między warunkowaniem strachu u szczurów a ich percepcją sygnałów USV; związków HR z reakcją na USV; związków blokady układu współczulnego/przywspółczulnego na emisję/percepcję USV.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

A/ wskazanie różnic w poziomie warunkowania szczurów a ich reakcji na USV, co może stanowić ważne wzbogacenie niejednorodnej metodyki warunkowania strachu w literaturze.

B/ stworzenie charakterystyki emisji USV u szczurów SHR, powszechnie wykorzystywanych jako model ADHD i schizofrenii. Ponieważ w chorobach tych u ludzi pojawiają się deficyty społeczne, cenną informacją byłoby wzbogacenie modelu tych chorób o charakterystykę USV, będących wyrazem komunikacji międzyosobniczej.

C/ określenie stopnia zaangażowania układu współczulnego i przywspółczulnego w kształtowanie odpowiedzi na USV i emisję USV.

* * *

Zwierzęta hodowane będą w dwóch niezależnych pokojach hodowlanych: w jednym przebywać będą wyłącznie szczury niepoddane warunkowaniu, w drugim – poddane warunkowaniu. Uniemożliwi to potencjalny transfer strachu między zwierzętami przebywającymi w różnych klatkach.

Po przybyciu zwierząt do laboratorium przewidziany jest czas przyzwyczajania do nowych pomieszczeń i eksperymentatora. Później duży nacisk położony jest na przyzwyczajenie zwierząt do wszystkich osób uczestniczących w eksperymencie, co jest kluczowe w doświadczeniach behawioralnych.

Czynności chirurgiczne wykonywane są w narkozie i o ile to możliwe stosuje się w nich preparacja „na tępo”, tzn. tam, gdzie nie jest konieczne używanie nożyczek, tkanki rozdzielane są pęsetami zgodnie z przebiegiem włókien, a naczynia preparowane za pomocą pocierania wacikami. Zmniejsza to inwazyjność zabiegu chirurgicznego i ułatwia późniejsze gojenie. Zabiegom chirurgicznym oraz okresowi pozabiegowemu towarzyszą środki przeciwbólowe. Osoba odpowiedzialna za zabiegi chirurgiczne przeszła zagraniczne szkolenia poświęcone zarówno chirurgii gryzoni ogólnie, jak i wszczepiania nadajników telemetrycznych w szczególności. Posiada także kilkuletnią praktykę w wykonywaniu tego zabiegu.

Liczba zwierząt wykorzystanych w doświadczeniu zostanie ograniczona do minimum na podstawie zależności statystycznych przedstawionych w punkcie 5, dzięki którym oszacowano najmniejszą liczebność grupy, dającą wiarygodną analizę statystyczną po zakończeniu doświadczenia.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

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

☒ NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.