

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu

Określenie wpływu pasz wysokotłuszczowych o różnym składzie na funkcje motoryczne, zachowanie oraz uczenie proceduralne u wybranych szczepów myszy i szczurów

2. Czas trwania projektu 3 lata

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): dieta ketogenna, behavior

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.

Wszystkie planowane procedury będą wykonywane w celu prowadzenia badań podstawowych, o których mowa w art. 3 pkt 1 lit. a ustawy (odnośnik 9 pkt 1 lit. a). Rodzaj badań: układ nerwowy (odnośnik 9 pkt.2 lit. c). Klasyfikacja procedur nr 1-4 planowanych w ramach doświadczenia: dotkliwość procedury: łagodna (odnośnik 12 pkt. 3).

Celem planowanych badań jest stworzenie kompleksowej charakterystyki behawioralnej zwierząt laboratoryjnych karmionych wybranymi rodzajami pasz wysokotłuszczowych. Ponadto projekt

zakłada próbę poszukiwania mechanizmów, które mogą być odpowiedzialne za potencjalne zmiany zachowania indukowane stosowaniem diety ketogennej. Badania zostaną przeprowadzone na dwóch gatunkach zwierząt laboratoryjnych najczęściej wykorzystywanych w badaniach neurobiologicznych – na szczurach i myszach. Dorosłe samce szczura lub myszy rozpoczynając od 9 tygodnia życia przez 125 dni karmione będą:

- paszą standardową – grupy kontrolne
- A paszą imitującą klasyczną dietę ketogenną skomponowaną głównie z tłuszczu nasyconych
- B paszą imitującą zmodyfikowaną dietę ketogenną o dużej zawartości tłuszczów nienasyconych
- C paszą imitującą dietę ketogenną, zawierającą przewagę tłuszczów pochodzenia zwierzęcego gdzie stosunek tłuszczów do węglowodanów i białek to 6:1

Rozpoczynając od 112 dnia eksperymentu przez kolejne 13 dni zwierzęta podlegać będą testom behawioralnym. W 125 dniu eksperymentu przeprowadzona zostanie eutanazja zwierząt w celu pobrania materiału do dalszych badań.

Zestaw testów obejmować będzie:

- test otwartego pola – do oceny aktywności lokomotorycznej
- test uniesiony labirynt krzyżowy – do oceny poziomu lęku
- test na podniesionej bieżni – do oceny koordynacji zwierzęcia oraz zdolności do uczenia motorycznego zwierzęcia,
- test na urządzeniu ROTAROD - do oceny koordynacji zwierzęcia oraz zdolności do uczenia motorycznego zwierzęcia,
- griptest - do pomiaru siły uchwytu małych zwierząt laboratoryjnych

Materiał pobrany od zwierząt podlegających testom posłuży do oznaczeń poziomu ekspresji genów (na poziomie białka i transkryptu), które mogą być związane z obserwowanymi zmianami zachowania. Oznaczenia wykonywane będą metodą QRT-PCR oraz Western blot wybranych strukturach mózgu – korze czołowej i hipokampie. Badane czynniki będą wybierane na podstawie zmian zaobserwowanych w testach behawioralnych (np. neurotrofiny, receptory dla neuroprzekaźników, markery stanu zapalnego).

Materiał posłuży również do oznaczeń poziomu neurogenezy w zakręcie zębatym hipokampa (obszar mózgu w którym neurogeneza zachodzi u dorosłych zwierząt).

Ideą doświadczenia jest również porównanie przydatności wybranych gatunków myszy i szczurów oraz ich szczepów do badań nad wykorzystaniem pasz wysokotłuszczowych, co w przyszłości pozwoli na lepszy dobór gatunków i szczepów do tego rodzaju eksperymentów a tym samym ograniczenie liczby zwierząt wykorzystywanych do doświadczeń.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu wykorzystane zostaną:

- 9 tygodniowe samce szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*) szczep Long-Evans – 80sztuk
- 9 tygodniowe samce szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*) szczep Wistar – 80sztuk
- 9 tygodniowe samce myszy domowej (*Mus musculus*) szczep 129/SV – 80sztuk
- 9 tygodniowe samce myszy domowej (*Mus musculus*) szczep C57/BL/6 – 80sztuk

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym sprawdzono w bazach danych:

PUBMED; ScienceDirect; Web of Science (JCR)

Wykorzystałam słowa kluczowe:

- Ketogenic diet+animal behavior
- Ketogenic diet+memory
- Ketogenic diet+ locomotor activity
- Ketogenic diet+anxiety
- Ketogenic diet+sociability
- Ketogenic diet+social behavior

Dieta ketogenna o bardzo niskiej zawartości węglowodanów, wysokiej zawartości tłuszczu i odpowiedniej podaży białka stanowi podejście żywieniowe, stosowane od wielu lat w terapii padaczki lekoopornej (Barañano i Hartman, 2008). W ostatnich latach zaobserwowano, że dieta ketogenna wykazuje wiele innych korzystnych efektów zdrowotnych, w tym działanie neuroprotektoryjne. Dlatego duże nadzieje wiąże się z możliwościami jej zastosowania w leczeniu m.in. chorób neurodegeneracyjnych oraz zaburzeń neurorozwojowych (Paoli et al., 2013). Zainteresowanie dietą ketogenną wzrasta nie tylko w środowisku medycznym i naukowym ale również w społeczeństwie. Wielokrotnie udowodniono jej skuteczność w leczeniu otyłości. Uważa się, że dieta ketogenna może przyczyniać się do poprawy wyników sportowych, przez co staje się ona popularna wśród sportowców (Paoli et al., 2015). Dieta ketogenna wpływa na funkcjonowanie mózgu w wielu aspektach : moduluje ekspresję genów (Cheng et al., 2003; Noh et al., 2004; Stafford et al., 2010), neurotransmisję (Verpeut et

al., 2016), poziom czynników neurotroficznych (Vizuete et al., 2013) poziom fosforylacji białek (Ziegler et al., 2002) oraz metabolizm aminokwasów (Yudkoff et al., 2005). Wiele z tych czynników może przyczyniać się do zmian zachowania. Dotychczas zgromadzone wyniki badań w zakresie wpływu diety ketogennej na różne aspekty zachowania zwierząt przyniosły sprzeczne wyniki. Przykładowo część badań pokazuje, że dieta ketogenna powoduje wzrost aktywności lokomotorycznej szczurów podczas gdy inni autorzy obserwowali jej spadek (Murphy and Burnham 2006; Ziegler et al., 2005). Podobne sprzeczności dotyczą wyników badań nad wpływem diety ketogennej na pamięć zwierząt (Van der Auwera et al., 2005; Xu et al., 2010). Jedną z przyczyn takiej niespójności wyników jest prawdopodobnie fakt, że w badaniach stosuje się diety o zróżnicowanym składzie. Jest to uzasadnione, ponieważ istnieje kilka wariantów diety ketogennej stosowanych aktualnie w praktyce klinicznej, z których najważniejszymi są: klasyczna dieta ketogenna, wariant z trójglicerydami średniołańcuchowymi (MCT, medium-chain triglyceride), zmodyfikowana dieta Atkinsa i dieta o niskim indeksie glikemicznym. Wydaje się, że nie sama proporcja makroskładników, ale rodzaj tłuszczów ma kluczowe znaczenie dla wpływu diety ketogennej na funkcjonowanie mózgu. Z danych epidemiologicznych wynika, że diety bogate w długołańcuchowe nasycone kwasy tłuszczowe zwiększają ryzyko neurodegeneracji i zaburzeń funkcji poznawczych, podczas gdy diety bogate w długołańcuchowe nienasycone kwasy omega-3 wiąże się z działaniem neuroprotektynym (McCarty et al., 2015). Dlatego w badaniach planujemy zastosować trzy diety ketogenne: dietę ketogenną A – o składzie odwzorowującym klasyczną dietę ketogenną stosowaną u człowieka, zawierającą przewagę tłuszczów pochodzenia zwierzęcego, dietę ketogenną B – zawierającą przewagę tłuszczów pochodzenia roślinnego oraz dietę ketogenną C - zawierającą przewagę tłuszczów pochodzenia zwierzęcego, ale gdzie stosunek ilości tłuszczów względem węglowodanów i białek wynosi 6:1

Badanie wpływu diet które indukują złożone zmiany metaboliczne w całym organizmie, na mózg i zachowanie możliwe jest jedynie w modelu *in vivo*, z wykorzystaniem wybranego gatunku kręgowców. Tylko taki model uwzględnia cały złożony mechanizm wzajemnych oddziaływań tkanek i narządów obwodowych oraz mózgu i umożliwia ocenę zmian zachowania zwierząt poddanych działaniu diety ketogennej. Osiągnięcie celu w proponowanym projekcie badawczym nie jest możliwe przez zastąpienie modelu *in vivo* innymi narzędziami badawczymi.

Liczba wykorzystywanych zwierząt w planowanych badaniach została ograniczona do minimum pozwalającego na zrealizowane zamierzonych celów. W badaniach wykorzystamy łącznie 320 osobników. Na taką wielkość próby składa liczba osobników niezbędna do przeprowadzenia testów statystycznych w każdej z grup eksperymentalnych i w grupie kontrolnej (n=20 w każdej grupie).

Eksperyment obejmować będzie docelowo 8 grup: po 20 zwierząt dla każdego gatunku. Każda grupa liczyć będzie po 20 osobników, które podlegać będą testom behawioralnym. Realizacja założeń proponowanego projektu wymaga zastosowania dużej liczby zwierząt. Zastosowanie grup liczących po 20 osobników pozwoli na uniknięcie problemu związanego ze zmiennością osobniczą zwierząt. Chronologiczna organizacja testów behawioralnych w taki sposób aby nie interferowały wzajemnie ze sobą pozwoli na nie tworzenie osobnych grup do poszczególnych testów, a tym samym na redukcję liczby wykorzystanych zwierząt.

Należy podkreślić, że proponowane przez nas procedury charakteryzują się łagodnym stopniem dotkliwości. Najsilniejszy dystres jakiego doświadczą zwierzęta w całym przebiegu eksperymentu to pobieranie krwi z końcówki ogona w celu pomiaru poziomu i ciał ketonowych (pomiar ciał ketonowych) będzie wiązało się z wystąpieniem krótkotrwałego łagodnego bólu. Pozostałe czynności będą przebiegać bez istotnego niekorzystnego oddziaływania na dobrostan lub ogólny stan zwierząt. Uczestniczenie w testach behawioralnych może wiązać się z wzrostem poziomu stresu, ale związanego przede wszystkim z znalezieniem się w nowym otoczeniu, ponieważ testy zostały dobrane tak aby nie były stresujące dla zwierząt (nie stosujemy np. uczenia awersyjnego czy metod związanych z umieszczaniem zwierząt w wodzie). Taki dobór testów ma dwie istotne zalety: jest korzystny dla samopoczucia i dobrostanu zwierząt, ponieważ nie wywołuje silnego stresu, przez co uzyskane wyniki cechują się większą wiarygodnością.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy

TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

NIE

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

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

