

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu: WPLYW POLA ELEKTROMAGNETYCZNEGO O NISKIEJ CZĘSTOTLIWOŚCI (50 HZ) NA REAKCJE STRESOWE I PLASTYCZNOŚĆ MÓZGOWĄ U SZCZURÓW - EFEKT HORMEZY

1. Czas trwania projektu: 3 lata
2. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): pole elektromagnetyczne, hormeza, układ współczulno-nadnerczowy, stres, szczur
3. 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.

Zagadnienie wpływu promieniowania elektromagnetycznego (PEM) na organizm człowieka ze względu na powszechność jego występowania w środowisku, budzi od dawna zainteresowanie społeczeństwa. PEM o częstotliwości około 50Hz oprócz potencjalnie negatywnych oddziaływań na organizmy żywe wykazują także działanie pozytywne, które znajduje coraz częściej zastosowanie w leczeniu różnych zespołów chorobowych. Powszechnie uważa się, że małe dawki powodują proporcjonalnie mniejsze zagrożenia dla zdrowia niż dawki duże, badania naukowe pokazują, że siły obronne organizmu działają w taki sposób, który pozwala na wystąpienie korzystnych dla organizmu

skutków małych dawek. W ostatnich latach ukazało się wiele prac omawiających efekty działania PEM na organizmy żywe. Jednak uzyskiwane wyniki badań często nie korespondują ze sobą lub wręcz są przeciwstawne.

Dlatego postanowiliśmy przeprowadzić badania, które mają na celu wyjaśnienie przyczyn/mechanizmów niejednoznacznego oddziaływania pola elektromagnetycznego niskiej częstotliwości na organizmy. Stawiamy hipotezę, że PEM wykazuje hormezę, tzn. dwukierunkowe działanie (pozytywne – niwelujące wpływ innych czynników stresowych na organizm bądź negatywne - zwiększające wrażliwość na kolejne uszkodzenia) uzależnione od wielkości indukcji magnetycznej.

Badania planujemy przeprowadzić na szczurze, który jest najbardziej odpowiednim gatunkiem do badań układu nerwowego i wyniki uzyskane z takich badań pozwalają nam wnioskować na temat zmian w obrębie układu nerwowego u ludzi.

Poznanie mechanizmu działania PEM może mieć olbrzymie znaczenie dla ustalenia optymalnych standardów ochrony ludności przed szkodliwymi dawkami PEM. Ponadto wykazanie, że pierwsze szkodliwe efekty jego działania pojawiają się dopiero po przekroczeniu pewnej „dawki” tego pola, natomiast poniżej tej wielkości może ono mieć nawet dobroczynny wpływ na organizm otwiera nowe perspektywy wykorzystania pola elektromagnetycznego w opracowywaniu nowych strategii profilaktycznych czy leczniczych.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniach planowane jest wykorzystanie 250 szczurów stada Wistar-Crl:WI(Han), samców w wieku 3-5 miesięcy.

Zwierzęta będą pochodziły z hodowli własnej (numer w rejestrze hodowców 023) z albinotycznego stada nie krewniaczego.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Zgodnie z ustawą z 21 stycznia 2005 roku „O doświadczeniach na zwierzętach”, mając na uwadze dobro zwierząt doświadczenia zaplanowano w taki sposób, aby nie narażać zwierząt na zbędny strach, ból, cierpienie lub trwałe uszkodzenia ich organizmów oraz aby maksymalnie wykorzystać zebrany

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

materiał do celów naukowych, przestrzegając reguł zasady 3R

Przygotowując projekt badawczy, zweryfikowano istniejącą wiedzę w zakresie oddziaływania pola elektromagnetycznego na organizm żywe w bazach danych: PUBMED; Google Scholar; ScienceDirect.

Wykorzystałam słowa kluczowe: electromagnetic field, 50 Hz, stress, sympathoadrenal system, monoamine, noradrenaline, adrenaline, HPA axis, CRH, ACTH, corticosterone, α 1-AR, β 2-AR, HSP70, BDNF, TrkB, open field test, behaviour, hormesis.

Uwzględnienie zasady zastąpienia:

Użycie zwierząt bezkręgowych jest niemożliwe ze względu na fakt ich małego podobieństwa anatomicznego i fizjologicznego z człowiekiem. Badania pilotażowe, które prowadziliśmy na karaczanach amerykańskich sugerują, że PEM wywołuje reakcje stresową. Niestety mechanizm reakcji stresowej u tych zwierząt nie jest porównywalny do zmian zachodzących u zwierząt kręgowych. Proponowane badania biomedyczne dotyczące reakcji stresowych muszą być przeprowadzone na zwierzętach możliwie blisko spokrewnionych z człowiekiem, czyli na ssakach. Stąd do badań wybrano najbardziej adekwatne zwierzę modelowe czyli szczura. Ponadto postawione hipotezy wymagają weryfikacji badaniami prowadzonymi na żywym zwierzęciu (ekspozycja na pole elektromagnetyczne), a następnie zbadania zależności pomiędzy neurohormonami i hormonami zaangażowanymi w reakcję stresową i plastycznością mózgową. Proces reakcji stresowej przebiegający w żywym organizmie jest złożonym mechanizmem wymagającym współdziałania układu nerwowego i endokrynnego, których budowa i funkcja są zbliżone w organizmie szczura i człowieka. Tym samym, badanie mechanizmów regulujących reakcje stresowe organizmu wymaga podejścia integracyjnego, zakładającego oznaczenie wielu różnych parametrów biologicznych. Z tego też względu doświadczenia *in vitro* skupiające się na molekularnym podłożu reakcji stresowej mogą stanowić jedynie uzupełnienie badań *in vivo* i nie mogą całkowicie zastąpić badań z wykorzystaniem modeli zwierzęcych.

Uwzględnienie zasady ograniczenia:

We wniosku zaplanowaliśmy wykorzystanie 250 zwierząt, po 6 w grupach eksponowanych na PEM i po 10 zwierząt w grupach poddanych testowi otwartego pola. W przypadku grup poddanych testowi behawioralnemu zwiększono liczbę zwierząt do 10 uwzględniając dużą zmienność odpowiedzi

behawioralnych pomiędzy osobnikami.

Planowana we wniosku liczba zwierząt stanowi minimalną ilość podyktowaną względami statystycznymi, na podstawie której można weryfikować hipotezy doświadczalne. W doświadczeniach ujęto grupy kontrolne wyłącznie takie, jakie są konieczne do interpretacji otrzymanych wyników. W celu ograniczenia liczby zwierząt zastosowany zostanie układ doświadczalny ograniczający zmienność warunków. Użyte zostaną zwierzęta pochodzące z tej samej hodowli, w tym samym wieku, płci i o zbliżonej masie ciała.

Doświadczenia zaprojektowano w ten sposób, by uzyskać możliwie największą ilość wyników.

Struktury mózgowe, krew oraz nadnercza zostaną wykorzystane do maksymalnie największej liczby oznaczeń z zastosowaniem technik biologii molekularnej. Do oznaczenia monoamin i neurohormonów wykorzystamy metodę chromatograficzną. Przy użyciu HPLC 1100 Agilent w każdej z prób oznaczmy 9 amin biogennych: NA – noradrenalinę, A – adrenalinę, NT – normetanefrynę, MHPG – metoksyhydroksyfenyloglikol, DOPAC – kwas dihydroksyfenyloacetylowy 5HIAA – kwas 5-hydroksyindolooctowy HVA – kwas homowanilinowy, DA – dopaminę, 5HT – serotoninę, DOPA – 3,4-dihydroksy-L-fenyloalaninę. Do oznaczenia hormonów osi HPA (CRH, ACTH i kortykosteronu) wykorzystamy test immunoenzymatyczny ELISA, receptory adrenergiczne (α 1-AR, β 2-AR), mRNA CRH, ACTH, MR i GR oraz markery plastyczności mózgowej (HSP70, BDNF, TrkB) oznaczmy za pomocą RT-qPCR.

Ponadto zaproponowany test behawioralny (test otwartego pola) da nam szybką odpowiedź na pytanie, jaka jest reakcja stresowa u szczurów po ekspozycji na pole elektromagnetyczne o niskiej częstotliwości 50 Hz przez 1h/dziennie (1mT i 7 mT) lub 8h/dziennie (7mT) przez 7 dni.

Uwzględnienie zasady udoskonalenia:

Wszystkim zwierzętom zostaną zapewnione stałe warunki bytowania. Zwierzęta umieszczone zostaną w zbiorczych klatkach. Do klatek włożone zostaną rolki po papierze toaletowym uprzednio wysterylizowane parą wodną pod ciśnieniem w autoklawie. Podczas poszczególnych etapów planowanych doświadczeń wykwalifikowani eksperymetatorzy, będą dbali o dobrostan zwierząt. Osoby wskazane we wniosku jako przeprowadzające doświadczenia posiadają wieloletni staż pracy ze zwierzętami, doskonale znają techniczne aspekty planowanych procedur i czynności doświadczalnych. Zwierzęta będą znajdowały się pod opieką lekarza weterynarii.

Zaproponowane procedury, ekspozycja na PEM oraz test behawioralny, będą przeprowadzane ze szczególną dbałością o stan zwierząt tak aby do minimum ograniczyć dyskomfort.