

4681/19-221

**Názov projektu:****Analýza expresie gangliozidov v mozgovom tkanive a plazme myšacieho modelu pre diabetes****Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** gangliozidy, diabetes mellitus, hmotnostná spektrometria**Účel projektu:** Základný výskum**Podrobný účel postupu:**

Diabetes 2. typu (D2T) patrí medzi ochorenia, u ktorých sa prevalencia zvyšuje úmerne s narastajúcim vekom pacientov. D2T, tzv. nezávislý na inzulíne (inzulín independentný), vzniká predovšetkým medzi vekovo staršími a je asociovaný so zvýšeným rizikom vzniku Ach. Diabetes možno charakterizovať ako komplexnú metabolickú poruchu spojenú s hyperglykémiou, retinopatiou, nefropatiou, neuropatiou a kardiovaskulárnymi ochoreniami. D2T je charakterizovaný inzulínovou rezistenciou, hyperinzulinémiou, a poruchou signálnej dráhy sprostredkovanej inzulínom. Vplyv diabetu na CNS, najmä v spojitosti s kognitívnou dysfunkciou, nebol zatiaľ dostatočne popísaný. Epidemiologické štúdie ukázali, že ku kognitívnemu poškodeniu u pacientov s D2T dochádza predovšetkým v dôsledku zlyhania využitia glukózy neurónmi a tým k zníženej produkcii energie. Medzi poruchy CNS súvisiace s D2T patria mozgové príhody, zmeny štruktúry, funkcie hematoencefalickej bariéry (HEB) a zmeny transportných funkcií mikrovaskulatury mozgu. Pre D2T sú charakteristické prítomnosť a navodenie inzulínovej rezistencie, indukcia neurozápalu a oxidačného stresu, porušenie signalizačného mechanizmu glykogén syntázy kinázy (GSK3 $\beta$ ), dysregulácia aktivity acetylcholinesterázy.

Lipidy zohrávajú v procese starnutia a neurodegenerácie dôležitú úlohu. Kvôli technologickej náročnosti lipidomickej analýzy bol ich výskum dlho zanedbávaný a úloha mnohých lipidov v organizme ostáva nejasná. Nové analytické prístupy v súčasnosti otvárajú možnosti objasnenia ich úlohy v patofyziológii ochorení a ich použitie v diagnostike a prevencii. V tomto projekte sústredíme svoju pozornosť na špecifickú triedu lipidov – gangliozidy. Lipidy boli dlhú dobu považované najmä za štrukturálne jednotky biologických membrán a molekuly, ktoré slúžia na uskladnenie energie. Dnes už je známe, že okrem týchto funkcií sú aj dôležitými signálnymi molekulami a priamo sa zúčastňujú na regulačných procesoch buniek. Vďaka pokrokom v analytických technológiách sa v súčasnosti lipidomika dostáva stále viac do popredia biomedicínskeho výskumu. Zpomedi všetkých orgánov ľudského tela je práve mozog najbohatší na rôzne triedy lipidov, hoci ich biologický význam je čiastočne objasnený. Preto skúmanie zmien produkcie lipidov v mozgu patrí dnes medzi aktuálne témy. V tomto projekte cielime našu pozornosť na špecifickú triedu lipidov – gangliozidy – a ich potenciálne využitie ako biomarkerov pre metabolické poruchy ako diabetes mellitus. Tieto kyslé glykosfingolipidy sa podieľajú na viacerých fyziologických funkciách ako rast, diferenciácia a vzájomné rozpoznávanie buniek.

Zvieratá v predkladanom projekte budú použité na lipidomickú analýzu expresie gangliozidov v mozgovom tkanive a plazme animálneho modelu pre diabetes. Zvieratá budú uvedené do hlbkej anestézie, perfundované pomocou fosfátového pufru s heparínom a humane usmrtené pomocou dekapitácie. Následne im bude odobraté mozgové tkanivo, pečeň a plazma. Tkanivá a plazma budú použité na kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu rôznych podtypov gangliozidov. Zmrazené mozgové tkanivo bude použité pre MALDI-imaging analýzu gangliozidov. Mozgové tkanivá budú zároveň zachované pre verifikačnú imunohistochemickú analýzu.

**Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse**

Cieľom projektu bude kvalitatívna a kvantitatívna analýza expresie gangliozidov ako nových biomarkerov pre metabolické ochorenia. Pre stanovenie produkcie lipidov použijeme moderné experimentálne metódy: kvapalinovú chromatografiu, imunohistochemickú analýzu a MALDI-imaging. Pre experimenty použijeme animálny model pre diabetes B6.Cg-Lep<sup>ob</sup>/J. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

**Druhy a počty použitých zvierat v pokuse:**

Celkovo bude použitých 20 myší (samcov vo veku 14-16 týždňov): 10 myší B6.Cg-Lep<sup>ob</sup>/J a 10 kontrolných zvierat.

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov.

**Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:**

Zvieratá budú uvedené do hlbkej anestézie a po transkardiálnej perfúzii im bude odobraté mozgové tkanivo, pečeň a plazma.

**Manipulácia so zvieratami:**

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Zaradenie podľa krutosti
<b>Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia anestetík</b>	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.	<b>slabá</b>
<b>Transkardiálna perfúzia</b>	Štandardná metóda. Zviera sa v celkovej anestézii transkardiálne perfunduje štandardným roztokom s následným odberom vzoriek	<b>stredná</b>
<b>Celkové hodnotenie krutosti štúdie</b>		<b>stredná</b>

**Zohľadnenie 3R**

**Zjemnenie:** Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné štandardné pracovné postupy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich ich fyziologickým a sociálnym potrebám. Starostlivosť o zvieratá zabezpečujú osoby, na ktoré si zvieratá zvykli. Vo zverinci je denne kontrolovaný a monitorovaný zdravotný stav a pohoda zvierat.

Zdravotný stav každého zvierat'a bude hodnotený pri každom pozorovaní na základe hlavných štyroch znakov: \*letargie (lethargy), hrbenia (hunching), naježenej srsti (piloerection), straty váhy >15 % očakávanej hmotnosti (weight loss). Hodnotenie jednotlivých znakov je uvedený v tabuľke human end point.

Pri prejavoch zmien zdravotného stavu veterinárny lekár upovedomí vedúceho experimentu o prípadnej potrebe vyradiť zviera z experimentu a pristúpiť k humánnemu usmrteniu zvierat'a.

**Redukcia:** V navrhovanom experimente budeme využívať zvieratá zakúpené Velaz, s. r. o. Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov.

**Nahradenie:** Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v ľudskom mozgu, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané zo živého mozgového tkaniva animálnych modelov za poznatky, ktoré pochádzajú z *in vitro* experimentov. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

#### **Zásada nahraditeľnosti zvierat**

Pre hľadanie alternatívnej metódy sme použili nasledovné registre medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód (ECVAM, NC3Rs, AltTox), kde sme nenašli žiadnu alternatívnu metódu, ktorú by sme mohli použiť vo svojom projekte, aby sme nemuseli vykonávať experimenty na zvieratách. Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

#### **Utrpenie versus prínos**

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu, všetky odbery tkanív sa uskutočnia v hlbokoj anestézii. Výsledky získané z plánovaného experimentu môžu významne napomôcť pochopeniu patologických procesov v CNS.

Začiatok pokusu je plánovaný na 17.2. 2020 a bude sa realizovať do 17.4. 2020.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

Projekt nevyžaduje spätné posúdenie (podľa Nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.).