

**Názov projektu:**

Úloha svetelnej kontaminácie, ako možného endokrinného disruptora, v procese prenatálneho programovania postnatálnych behaviorálnych stratégií - štúdium mechanizmov súvisiacich s poruchami autistického spektra

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:**

3906/19-221/3

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):**

tlmené svetlo v noci, prenatálne programovanie, neurobehaviorálna charakteristika potomstva, autizmus, potkan laboratórny

**Účel projektu:**

Základný výskum

**a) informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, o počte a typoch zvierat, ktoré sa použijú**

Cieľ (Ciele) projektu:

- štúdium pôsobenia svetla nízkej intenzity počas noci, ako negatívneho environmentálneho faktora, na proces prenatálneho programovania správania po narodení, predovšetkým s ohľadom na vzrastajúci výskyt afektívnych porúch správania a neurovývinových ochorení vrátane spektra autistických porúch (F84, MKCH 10).

Prínos z vykonaného projektu (napr. aký je prínos pre vedu, ľudstvo, zvieratá):

Pôsobenie umelého osvetlenia počas noci v interiéroch, ale aj exteriéroch, je jedným z environmentálnych faktorov, ktoré sa dostávajú v poslednom čase do povedomia odbornej, ale aj laickej verejnosti. Umelé osvetlenie pôsobí v čase, keď sú zvieratá aj ľudia programovaní na tmu, narúša biologické rytmy až na molekulárnej úrovni. Tieto zmeny môžu mať za následok zmeny v syntéze hormónov, ktoré sa zas priamo alebo nepriamo podieľajú na regulácii vývinu mozgu jedinca počas gravidity, čím ovplyvňujú („programujú“) jeho individuálne správanie v čase od narodenia až do neskorej dospelosti.

Svetelná kontaminácia životného priestoru človeka aj živočíchov neustále rastie. Zatiaľ chýbajú podrobnejšie experimentálne štúdie, ktoré by definovali príčinné súvislosti medzi svetelnou kontamináciou prostredia počas gravidity matky, narušením jej biologických rytmov a následnými zmenami správania jej potomkov.

V našom experimente sa sústreďujeme na štúdium dôsledkov nočného pôsobenia svetla nízkej intenzity počas gravidity na potomstvo takto ovplyvnených matiek. Očakávame, že vystavenie takémuto pôsobeniu svetla bude mať za následok zmeny vo vývine potomkov a že tieto zmeny budú na viacerých úrovniach podobné tým, ktoré možno pozorovať u autistických detí. Zároveň predpokladáme, že nami nadobudnuté výsledky na animálnom modeli sa budú dať do značnej miery aplikovať na človeka s možnými odporúčaniami pre minimalizovanie negatívnych následkov pôsobenia svetla počas noci.

### **Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

V rámci výskumu budeme pracovať s potkanmi laboratórnymi (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar. V etape 1 plánujeme použiť 22 samíc a 8 samcov rodičovskej generácie a ich potomstvo (po optimalizácii 176 zvierat), spolu 206 zvierat. V druhej etape plánujeme využiť 28 samíc a 8 samcov rodičovskej generácie a ich potomstvo (odhadom 336 zvierat), spolu 372. V tretej etape plánujeme využiť 72 dospelých samcov.

Spolu v celom projekte plánujeme použiť 650 zvierat.

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

Pri pozorovaní zvierat v domácom prostredí a pri testovaní ich správania budú použité štandardizované postupy, ktoré patria medzi neinvazívne/ nenásilné a preto nepredpokladáme (ani na základe našich predchádzajúcich skúseností) že spôsobia zvieratám závažnejšiu ujmu. Vážnejšiu ujmu nepredpokladáme, keďže zvieratá budú handlované, ani pri robení vaginálnych výterov (určovaní cyklu samíc) a ani pri meraní vybraných morfológických parametrov (anogenitálnej vzdialenosti).

Určité nepriaznivé vplyvy strednej intenzity môžeme očakávať pri sociálnej izolácii zvierat počas pozorovania zmien v mimike (tzv. RGS skóre) a pri aplikácii olíg, kedy budú zvieratá krátkodobo umiestnené v imobilizačnej komôrke a tiež pri teste núteného plávania. Vo všetkých vyššie spomínaných prípadoch však bude vystavenie stresu len krátkodobé (max. 10 min). Určitú ujmu tiež môže spôsobovať samotná injekčná aplikácia miRNA olíg do chvostovej vény. Na zmiernenie stresu a prípadnej bolesti však použijeme znecitlivenie v mieste vpichu ponorením chvosta na 60s do roztoku s lokálnou anestéziou – mezokaínom.

Odber biologických vzoriek (krvi a jednotlivých orgánov) bude realizovaný až po humánnom usmrtení zvierat dekapitáciou v celkovej anestézii navodenej inhaláciou izofluránu.

Za ujmu tiež môžeme považovať skutočnosť, že matky budú počas gravidity dlhodobejšie vystavené osvetleniu (aj keď nízkej intenzity, ktorému sú bežne vystavení aj ľudia), čo môže do určitej miery zhoršovať nielen ich zdravotný stav, ale ovplyvňovať aj vývin ich potomstva (štúdium dôsledkov pôsobenia svetla nízkej intenzity počas noci na proces prenatalného programovania je však samotným cieľom nami predkladaného projektu).

### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

Nami plánované pozorovania, behaviorálne testy a merania vybraných morfometrických parametrov spadajú z hľadiska krutosti do kategórie „slabé“, stanovenie zmien v emocionalite na základe mimických výrazových prostriedkov (tzv. RGS skóre), test núteného plávania ako aj aplikácia miRNA olíg do chvosta spadajú z hľadiska definície krutosti do kategórie „stredné“.

### **b) preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia**

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat (Replacement; Zdôvodnenie použitia zvierat v projekte, zdôvodnenie prečo sa nemôže použiť alternatívna metóda bez použitia zvierat)

Pokus je zameraný predovšetkým na zisťovanie zmien správania (charakteristických pre autizmus), ktoré nastanú u potomkov matiek ovplyvnených svetlom nízkej intenzity počas gravidity, ako aj na zisťovanie fyziologických zmien s tým súvisiacich. Je robený s perspektívou uplatnenia jeho výstupov aj na človeka. Náhrada modelového organizmu potkana laboratórneho nie je možná, nakoľko pokus nie je možné robiť na bunkových kultúrach, ani na nižších organizmoch, ktoré nemajú vyvinuté také komplexné správanie ako cicavce. Z dôvodu nedostatočného množstva štúdií nie je v tomto prípade možné použiť ani počítačovú simuláciu. Keďže robenie pokusu v nami naplánovanom rozsahu na gravidných ženách a ich deťoch by bolo neetické, uvedený model potkana laboratórneho (vzhľadom na fyziologické parametre) je najlepšou alternatívou náhrady humánneho modelu.

V odborných publikáciách venujúcej sa podobnej problematike je potkan laboratórny bežne používaný ako modelový druh pre tento typ biomedicínskeho výskumu.

2. Redukcia počtu zvierat (Reduction; Zdôvodnenie použitia určeného počtu zvierat, akým spôsobom sa použije redukcia, objasnenie toho, že sa použil minimálny možný počet zvierat)

Projekt sme plánovali tak, aby sme nahradili a obmedzili počty zvierat použitých v plánovaných experimentoch, aby sme zároveň boli schopní získať údaje a výstupy, ktoré môžu byť štatisticky spracované a aby takto získané výsledky boli z vedeckého hľadiska akceptovateľné. Počty zvierat boli zároveň navrhnuté tak, aby pri testoch zameraných na výskum správania zohľadňovali požiadavku minimalizácie zaťaženia pripadajúceho na jedno zviera (aby každý jedinec prešiel len limitovaným počtom testov).

3. Zjemnenie (Refinement; Vysvetliť výber použitých druhov zvierat, zdôvodnenie použitia zvieratá, objasnenie spôsobu ako sa minimalizuje stres, utrpenie a bolesť zvierat v priebehu vykonávania postupu tak, aby sa dosiahli vedecké ciele projektu)

Potkan laboratórny je druh bežne používaný na vedecké výskumy a pre nami realizovaný projekt je vzhľadom na jeho charakter ideálnym modelovým organizmom. Zvieratá v našom experimente budú chované v štandardných podmienkach (požadovaná teplota aj vlhkosť) certifikovaného chovného zariadenia, pričom budú mať k dispozícii vodu aj potravu bez obmedzenia. Využívané metodické postupy testov, v ktorých bude pozorované správanie sú neinvazívne a nebudú zvieratám spôsobovať bolesť ani utrpenie. Ak plánované postupy budú spôsobovať zvieratám určité strádanie (ako v prípade RGS testu, testu núteného plávania), bude len krátkodobé (v trvaní pár minút).

Všetky nami použité zvieratá budú handlované (budú denne prichádzať do kontaktu s človekom), čo prispeje k minimalizácii prípadného stresu pri meraní vybraných morfológických parametrov, určovaní cyklu a tiež pri injekčnej aplikácii olíg/ miRNA oligoprób. Tieto postupy budú zároveň realizované odborníkmi s bohatými skúsenosťami. Pred samotnou aplikáciou olíg do chvostovej vény bude miesto vpichu znecitlivené ponorením do roztoku s lokálnou anestéziou.

V etape 2 bude odber mláďat od matiek v čase do odstavu (na 21. deň po narodení) robený postupne, tak aby samica vždy mala pri sebe určitý počet mláďat, čím sa bude redukovať jej stres a bude môcť v období laktácie realizovať svoje materské správanie.

Po aplikácii olíg (v 3. etape), ale aj v prípade ďalších metodických postupov spadajúcich pod strednú mieru krutosti, budú zvieratá po podstúpení takéhoto zákroku monitorované na

základe kritérií humane endpoint a zvieratám bude po jednotlivých testoch poskytnutý čas na dostatočnú regeneráciu.

Čo sa týka usmrcovania zvierat, zrealizuje sa so zreteľom na minimalizáciu bolesti, utrpenia, úzkosti a strachu dekapitáciou vykonanou skúseným odborníkom po predchádzajúcom uvedení do stavu hlbokého bezvedomia.

Počas všetkých etáp riešenia projektu bude dodržiavaných všetkých päť slobôd uvádzaných pri definícii zásad welfare zvierat.

**Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:**    áno    nie