

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

NÁZOV PROJEKTU

Dynamika salivárnych markerov obličkových funkcií na zvieracích modeloch akútneho a chronického zlyhania obličiek

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1669//18-221/1

Kľúčové slová: obličkové zlyhanie, slina, diagnostika

Účel projektu: základný výskum

CIEĽ PROJEKTU

Cieľom projektu bude stanovenie plazmatickej a salivárnej koncentrácie markerov obličkových funkcií kreatinínu a urey a sledovanie ich dynamiky pri modeloch **akútneho** (glycerolová nefropatia - GLY, bilaterálna nefrektómia - BNX, ischemicko-reperfúzne poškodenie - IRI) a **chronického zlyhania obličiek u potkanov** (5/6 nefrektómia – 5/6 Nx).

Stanovenie koncentrácií plazmatického kreatinínu a urey sú v súčasnosti najčastejšie používané markery na hodnotenie funkcie obličiek a diagnostiku ich poškodení. Ich plazmatická koncentrácia koreluje s funkciou obličiek. V posledných rokoch stúpol záujem o slinu ako biologickú tekutinu, ktorá by mohla slúžiť ako menej invazívna a ekonomickejšia náhrada odberu krvi. Zloženie slín je ovplyvnené mnohými faktormi ako sú potrava, činnosť žuvacích svalov, vek, orálne a extraorálne chorobné procesy a mnohé ďalšie. Pomerne vysoká interindividuálna a intraindividuálna variabilita zatiaľ bráni širšiemu klinickému využitiu slín za týmto účelom. Výskum na humánnej úrovni naráža na výrazné etické problémy. Identifikácia možných zdrojov variability pomocou animálnych postupov môže pomôcť. Dosiaľ neboli publikované štúdie, ktoré by stanovovali salivárny kreatinín a ureu a sledovali ich dynamiku v potkaních modeloch akútneho a chronického zlyhania obličiek. Pri **akútnych modeloch obličkového zlyhania** (acute kidney injury – AKI) budeme u kontrolných aj experimentálnych zvierat sledovať zmeny plazmatickej a salivárnej koncentrácie kreatinínu a urey v časových intervaloch 0, 3, 12, 24 a 48 hodín. Pri **chronickom modeli obličkového zlyhania** (chronic kidney disease – CKD) sa zmeny ich plazmatických a salivárnych koncentrácií budeme sledovať v časových intervaloch 0, 2, 4 a 6 mesiacov. Zámerom projektu je zistenie vzájomných korelácií medzi plazmatickými a salivárnymi koncentraciami čo by mohlo pomôcť k zisteniu relevantnosti použitia sliny ako diagnostickej tekutiny na monitorovanie funkcií obličiek.

PRÍNOS Z VYKONANÉHO PROJEKTU

Existuje viacero zvieracích, ale aj klinických štúdií zaoberajúcich sa koncentráciou markerov obličkových funkcií kreatinínom a ureou v plazme a v slinách. Doposiaľ však nebola publikovaná žiadna štúdia, ktorá by hodnotila koncentráciu týchto markerov a sledovala ich časovú dynamiku vo viacerých animálnych modeloch akútneho a chronického zlyhania obličiek. Originalita nášho projektu spočíva v tom, že zvieratám je chemicky (glycerol – GLY) alebo chirurgicky (ischemicko-reperfúzne poškodenie – IRI, bilaterálna nefrektómia – BNX, 5/6 nefrektómia – 5/6 Nx) indukované zlyhanie obličiek. Viaceré modely použijeme z dôvodu, aby sme čo najviac napodobňovali rôzne formy a príčiny zlyhania obličiek u ľudí. Zlyhanie obličiek má stále zvyšujúci sa výskyt, čo predstavuje závažný klinický problém. Prínosom projektu je zistenie dynamiky zmien salivárneho kreatinínu a urey počas rozvoja obličkového zlyhávania ako aj zistenie vzájomných vzťahov medzi plazmatickými a salivárnymi koncentraciami kreatinínu a urey. Tieto zistenia pomôžu odhaliť diagnostický potenciál sliny ako biologickej tekutiny na hodnotenie obličkových funkcií.

DRUHY POUŽÍVANÝCH ZVIERAT A ICH PREDBEŽNÉ POČTY

Potkany, dospelé samce rodu Wistar, celkový počet zvierat 90

ZOZNAM A FREKVENCIA APLIKOVANÝCH LÁTOK

Pri opakovaných odberoch sliny (AKI – **začiatok** postupu pred navodením akútneho poškodenia obličiek, po **3, 12, 24 a 48 hodinách** od akútneho poškodenia obličiek, CKD - **začiatok** postupu pred navodením chronického poškodenia obličiek, po **2, 4 a 6 mesiacoch** od chronického poškodenia obličiek) bude zvieratám podaná celková anestézia (intraperitoneálne, ketamín a xylazín, 100 mg/kg a 10 mg/kg, v pomere 3:1) a následne aplikovaný pilokarpín (1 mg/kg). Po počiatočnom odbere slín a krvi pred samotnou indukciou poškodenia obličiek, bude zvieratám navodené toto poškodenie buď **chirurgicky**, pričom budú udržiavané v celkovej anestézii (ketamín a xylazín, 100 mg/kg a 10 mg/kg, v pomere 3:1) alebo **chemicky, jednorazovou** aplikáciou glycerolu (intramuskulárne, riedený 1:1 s fyziologickým roztokom, 8 ml/kg).

PREDPOKLADANÝ NEPRIAZNIVÝ VPLYV/UJMA NA POUŽITÉ ZVIERATÁ V RÁMCI VYKONÁVANÉHO PROJEKTU

Počas chirurgických zákrokov budú zvieratá udržiavané v celkovej anestézii. Po zákroku môžu pociťovať krátkodobú strednú bolesť, ktorá bude tíšena podávaním analgetík. Na všetky experimentálne úkony si budú zvieratá zvykať postupne pomocou handlingu. Na

zmiernenie utrpenia zvierat bude zvieratám dávané zvýšené množstvo podstielky, materiál na stavbu hniezd či predmety stimulujúce hru. Opakované odbery krvi z chvosta môžu byť spojené s krátkodobou strednou bolesťou a stresom v dôsledku krátkodobej imobilizácie (1 minúta). Počas opakovaných odberov sliny budú zvieratá udržiavané v krátkodobej celkovej anestézii. Projekt nepredpokladá nepriaznivý vplyv týchto postupov na zvieratá. Navyše, u kontrolných skupín nedôjde k ujme na zdravotnom stave v dôsledku vzniku a rozvoja choroby. Zdravotný stav zvierat s indukovaným zlyhaním obličiek sa bude zhoršovať, čo bude súvisieť s progresiou choroby. Zvieratá s náhlym zhoršením zdravotného stavu t.j s prítomnosťou 5 prejavov zhoršeného zdravotného stavu súčasne, budú eutanazované, aby sme zabránili utrpeniu. Zhoršenie zdravotného stavu zvierat sa prejaví malátnosťou, spavosťou, privreté oči, stratou hmotnosti > 20%, neschopnosťou prijímať potravu a vodu, stratou elasticity kože, naježením srsti atď. Zodpovednosť za sledovanie zdravotného stavu bude mať ošetrovateľ a osoby zodpovedné za realizáciu projektu.

ÚROVEŇ KRUTOSTI CELÉHO PROJEKTU

stredná krutosť

PREDPOKLADANÁ MORTALITA ZVIERAT

V tomto type projektu sa predpokladá celková mortalita maximálne 20% pričom pri náhlom zhoršení zdravotného stavu budú zvieratá humánne usmrtené. Z tohto dôvodu je plánovaný vyšší počet zvierat v experimentálnych skupinách.

HUMAN ENDPOINT

Human endpoint nastane, v prípade súčasnej prítomnosti viac ako 5 prejavov zhoršeného zdravotného stavu t.j. malátnosti, dehydratácie, stratou elasticity kože, naježením srsti, zmenšením orbitálnych oblúkov, neschopnosťou natiahnuť sa za vodou a potravou a stratou hmotnosti o 20%. Zvieratá, ktoré dosiahnu hodnotiace skóre 5, budú pod dohľadom veterinárneho lekára humánne usmrtené exsanguináciou po podaní celkovej anestézie a postup bude ukončený.

Tabuľka 1: Hodnotiace skóre zdravotného stavu zvierat

Bodové skóre	Charakter zdravotného stavu	Opatrenie
0	Fyziologický zdravotný stav	
1	Dobry zdravotný stav	
2	Mierne zhoršený zdravotný stav	zváženie doplnkovej zdravotnej starostlivosti, častejšia kontrola zvierat

3	Zhoršený zdravotný stav	prítomnosť 3 prejavov zhoršeného zdravotného stavu, častejšia kontrola zvierat'a, podávanie analgetík, zvýšenie tepla
4	Zlý zdravotný stav	prítomnosť 4 prejavov zhoršeného zdravotného stavu, konzultácie s veterinárom
5	Nepriaznivý zdravotný stav	prítomnosť 5 a viac prejavov zhoršeného zdravotného stavu (human endpoint), vyradenie zvierat'a z postupu

Sledované parametre v hodnotiacom procese:

Celkový vzhľad zvierat'a:

- telesný stav (strata/nárast hmotnosti)
- stav srsti a kože (opuchy, kožné lézie, strata elasticity kože, naježená srst')
- prítomnosť výtoku (oči, uši, urogenitálny trakt)
- vzhľad oči (privreté, zatvorené)
- držanie tela a pohyb (ohnutý chrbát, nakláňanie, krívanie)

Telesné funkcie zvierat'a:

- príjem potravy a vody
- respirácia (hyperventilácia, ťažké dýchanie)
- telesná teplota (zvýšená/znížená)
- koncentrácia kreatinínu a urey
- defekácia a urinácia (oligouria, anúria, polyúria)

Sociálne interakcie:

- hypo/hyper reaktivita, anxiózne správanie, abnormálna chôdza a pohyby, letargia

Iné:

- nafúknuté brucho, tras

SÚLAD ZÁSAD 3R

Pri práci so zvieratami budú dodržané všetky predpísané predpisy pre chov a zaobchádzanie s laboratórnymi zvieratami podľa zásad 3 R.

REPLACEMENT

Pretože v plánovaných postupoch sa budú stanovovať plazmatické a salivárne koncentrácie kreatinínu a urey ako aj sledovať ich dynamika, je nevyhnutné, aby sa postup vykonal „*in vivo*“ na celom zvierati. Využitie bunkových kultúr alebo počítačových simulácií neprichádza pri tomto type postupu do úvahy ako alternatívny spôsob výskumného prístupu.

REDUCTION

Plánovaný postup je zostavený tak, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov použitých čo najmenej zvierat a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého použitého experimentálneho zvierat'a. Postupy budú vykonávať iba dostatočne vyškolené a zacvičené osoby, čím sa výrazne zníži možná chybovosť výsledkov a nutnosť opakovania postupu. Počet použitých zvierat bol stanovený tak, aby bola zachovaná reprodukovateľnosť a validita postupov. Jedná sa o počet jedincov, ktorý je akceptovateľný

pre publikovanie výsledkov za predpokladu ideálneho odberu a analýz (ANOVA, a Študentovho t-test) zameraných na sledovanie rozdielov plazmatických a salivárnych koncentrácií kreatinínu a urey medzi kontrolnými zvieratami a zvieratami s indukovaným zlyhaním obličiek. Zvieratá budú objednávané v jednotnom časovom intervale, aby sa predišlo sezónnym zmenám a potrebe postup opakovať. V postupe sa použijú geneticky homogénne rovnaké skupiny zvierat.

REFINEMENT

Spôsob manipulácie so zvieratami a starostlivosť o zvieratá počas postupu bude v súlade s požiadavkami uvedenými v Nariadení vlády SR č. 377/2012 Z.z. a Vyhláske Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR č. 436/2012 Z.z.. Zvieratá budú počas postupu kontinuálne sledované a výsledky priebežne vyhodnocované. V prípade prítomnosti 3-4 prejavov zhoršeného zdravotného stavu budú zvieratám podávané analgetiká. V prípade súčasnej prítomnosti 5 a viac prejavov zhoršeného zdravotného stavu t.j. strata hmotnosti > 20%, neschopnosť prijímať potravu a vodu, dehydratácia, strata elasticity kože, naježenie srsti, orbitálne zúženie očí, zhrbený postoj, dôjde k humánnemu usmrteniu zvierat exsanguináciou po navodení celkovej anestézie podaním ketamínu a xylazínu (100 mg/kg a 10 mg/kg, v pomere 3:1). a postup bude ukončený. Denným sledovaním zdravotného stavu dochádza k jemnej manipulácii so zvieratami a kontaktu s tými istými školenými osobami, čím sa maximálne eliminuje stres zvierat. Počas chirurgických zákrokov budú zvieratá udržiavané v celkovej anestézií. Po zákroku bude krátkodobá stredná bolesť tliesená podávaním lokálnych analgetík (napr. mezokaín). Pri opakovaných odberoch sliny budú zvieratá v celkovej anestézií (intraperitoneálne, ketamín a xylazín, 100 mg/kg a 10 mg/kg, v pomere 3:1). Pri opakovaných odberoch krvi z chvosta bude použitá mierna sedácia zvierat na zmiernenie stresu (izoflurán). Krv bude odobratá použitím tenkých jednorazových ihli (30G) čím sa zmierni stres a bolesť zvierat. Na zabránenie tepelných strát bude zvieratám poskytnutá výhrevná podložka. Životné prostredie zvierat bude obohatené materiálom na stavbu hniezd, predmetmi podnecujúcimi hru, potrava nasiaknutá vodou umiestnená na podlahe pre ľahšiu konzumáciu.

SÚHRN JEDNOTLIVÝCH ÚKONOV NA ZVIERATÁCH:

Po dovezení zvierat (dospelé samce potkanov kmeňa Wistar vo veku 8 týždňov) do pokusného zariadenia budú zvieratá neodkladne a bez zbytočného meškania šetrne umiestnené do čistých klietok na to určených v **karanténnej miestnosti** na tento účel

vyhradenej. Bezodkladne im bude podaná strava a dostatok tekutín obvyklým spôsobom. Zvieratá ostanú v **karanténnej miestnosti 14 dní**, čo je optimálna doba na prejav chorôb a vylúčenie väčšiny chorôb prichádzajúcich do úvahy. Po uplynutí karanténnej doby zvieratá vo vyhovujúcom stave budú zaradené do postupu. Zvieratá sa z karanténnej miestnosti šetrne a bez zbytočných stresov premiestnia do **chovnej miestnosti**. Táto miestnosť je riadne označená na aký účel slúži a zabezpečená pred vstupom cudzích osôb.

Modely akútneho zlyhania obličiek budú rozdelené do dvoch skupín – **chirurgicky** (BNX a IRI) a **chemicky** (glycerolová nefropatia) **indukované modely** (tab. 2).

Pri **chirurgických modeloch** akútneho zlyhania obličiek (**BNX, n=15; IRI, n=15**) použijeme spoločnú kontrolnú skupinu, ktorá podstúpi sham operáciu (**CTRL, n=10**). Všetky zvieratá budú uspané intraperitoneálnou aplikáciou ketamínu a xylazínu (100 mg/kg a 10 mg/kg, v pomere 3:1). Všetky chirurgické zákroky budú vykonávané školenými a skúsenými osobami

[1–3]. Operácie budú prebiehať na vyhrevnej podložke. Pri **BNX**, obličkové pedikly budú podviazané stehom a pomocou rezu vykonaného distálne od stehov budú obličky odstránené [4]. Pri **IRI**, ischémia obličiek bude indukovaná pomocou klipov (30 min) s následnou reperfúziou (48h) [3]. Pri sham operácii budú obličky len dekapsulované.

Pri **chemicky indukovanom** akútnom zlyhaní obličiek, bude na indukciu (**GLY, n=10**) použitá intramuskulárna aplikácia glycerolu (riedený 1:1 s fyziologickým roztokom, 8 ml/kg) [5]. Kontrolnej skupine bude intramuskulárne podaný fyziologický roztok (**CTRL, n=5**).

Pri odberoch krvi bude použitá čiastočná sedácia zvierat pomocou izofluránu. Odbery krvi na začiatku a po 3, 12 a 24 hodinách budú uskutočnené z chvostovej žily do mikrovetiek (Microvette CB 300 K3 EDTA, SARSTEDT, Bratislava, Slovenská republika; maximálny objem krvi pri každom odbere bude 0,25 ml na 100 g zvierat'a). Terminálne odbery krvi z aorty (po 48 hodinách) budú uskutočnené pomocou kanyly (20G, Safety IV Catheter with Injection port, Hessen, Germany) do mikrovetiek (Microvette 300 Lithium-heparín, microvette 500 EDTA; SARSTEDT, Bratislava, Slovenská republika) po predchádzajúcej celkovej anestéze. Salivácia na začiatku a počas postupu bude indukovaná pomocou pilokarpínu (Unimed Pharma, Bratislava, Slovensko, 1 mg/kg) [6].

Pri **chronickom modeli obličkového zlyhania**, budú zvieratá rozdelené do dvoch skupín **kontrolná** skupina (**CTRL, n=15**) a skupina, ktorej bude indukované chronické

zlyhanie obličiek (5/6 Nx, n=20; tab 2.). Zvieratá budú uspané intraperitoneálnou aplikáciou ketamínu a xylazínu (100 mg/kg a 10 mg/kg, v pomere 3:1). V prvom kroku, pedikla pravej obličky bude podviazaná stehom. Pomocou rezu distálne od stehu bude oblička odstránená. Po 2 týždňovej rekonvalescencii budú odstránené 2/3 ľavej obličky [7]. Krvácanie bude zastavené pomocou vstrebatelného gelpónu (Gelita Medical GmbH, Eberbach, Nemecko). Odber krvi na začiatku postupu a po 2 a 4 mesiacoch budú tiež uskutočnené z chvostovej žily (maximálny objem krvi pri každom odbere bude 0,6 ml na 100 g zvierat'a). Terminálny odber krvi po 6 mesiacoch bude uskutočnený pomocou kanyly (20G, Safety IV Catheter with Injection port, Hessen, Germany) po predchádzajúcej celkovej anestéze. Salivácia bude indukovaná pilokarpínom [6].

Zvieratá budú mať počas celého postupu *ad libitum* prístup k vode a k štandardnej potrave. Na prevenciu vyschnutia očí bude zvieratám aplikovaný do oka Vidisic očný gél (Dr. Gerhard Mann, chem.-pharm. Fabrik GmbH, Berlín, Nemecko).

Tabuľka 2: Počet zvierat: celkovo 90 zvierat

Druh/plemeno/línia	Model	Pohlavie	Počet (za celé obdobie)	Počet na skupinu
Potkan Wistar	Bilaterálna nefrektómia (BNX)	Samce	25	10sham/15BNX
Potkan Wistar	Ischemicko reperfúzne poškodenie (IRI)	Samce	15 Spoločná sham skupina s BNX	15 IRI
Potkan Wistar	Glycerolová nefropatia (GLY)	Samce	15	5kontrol/10 glycerolových
Potkan Wistar	5/6 nefrektómia (5/6 Nx)	Samce	35	15sham/20 nefrektómia

POOPERAČNÁ STAROSTLIVOSŤ

Zvieratá budú počas chirurgického zákroku a zobudzania sa udržiavané na výhrevnej podložke, aby sa zabránilo stratám tepla. Stratené tekutiny budú u zvierat v celkovej anestézii doplnené intraperitoneálnou aplikáciou fyziologického roztoku. Po zákroku bude krátkodobá bolesť tlmená aplikáciou lokálnych analgetík (napr. mezokaín). Zvieratám bude v klietkach poskytnuté väčšie množstvo podstielky na zlepšenie pohody, ich potrava bude nasiaknutá vodou a následne umiestnená na podlahe klietky pre ľahšiu konzumáciu. U kontrolných zvierat nedôjde k ujme na zdravotnom stave v dôsledku vzniku a progresie choroby. U zvierat s akútnym poškodením obličiek sa dá po 72 hodinách očakávať zhoršenie zdravotného stavu v dôsledku progresie choroby. Z tohto dôvodu zvieratá humane usmrtíme už po 48 hodinách, aby sa zvieratá nedostali do krutého štádia. U zvierat s chronickým poškodením obličiek

sa iniciálnom štádiu prejavujú kompenzačné mechanizmy čo spôsobí, že sa renálne parametre nemenia a zvierá nepociťuje utrpenie. K zhoršeniu zdravotného stavu s prejavmi výrazného poškodenia obličiek dochádza až po 12 mesiacoch. Zvieratá humane usmrtíme už po 6 mesiacoch, aby sa nedostali do krutého štádia. K hlavným príznakom, ktoré sa môžu u zvierat s poškodením obličiek prejavíť patrí porucha močenia (oligoúria až anúria), zmena sfarbenia stolice, strata hmotnosti, malátnosť, zježená srst'. Zvieratá budú počas postupu kontinuálne sledované a výsledky priebežne vyhodnocované. V prípade prítomnosti 3-4 prejavov zhoršeného zdravotného stavu budú zvieratám podávané analgetiká. V prípade súčasnej prítomnosti 5 a viac nasledujúcich prejavov zhoršeného zdravotného stavu t.j. strata hmotnosti > 20%, neschopnosť prijímať potravu a vodu, dehydrácia, strata elasticity kože, naježenie srsti, orbitálne zúženie očí, zhrbený postoj, dôjde k humane usmrteniu zvierat exsanguináciou po navodení celkovej anestézie podaním ketamínu a xylazínu (100 mg/kg a 10 mg/kg, v pomere 3:1). a postup bude ukončený.

Rozhodli sme sa, že experimentálne zvieratá budeme značiť na chvoste prostredníctvom permanentnej fixky, lebo to považujeme za menej stresujúci spôsob označovania. **Odber moču** budeme realizovať prostredníctvom metabolických kliebok s rozlohou 200 cm² (Tecniplast, Buguggiate, Italy), kam individuálne vložíme zvieratá maximálne na 3 hodiny.

Hoci nezabezpečíme sterilné prostredie, individuálne ventilované kliebky zamedzia skríženej kontaminácii jednotlivých skupín potkanov, čo postačuje pre experimentálne ciele a je určite lepším modelom pacientov ako postupy na úplne sterilných zvieratách.

Tabuľka 3: Predpokladaná úroveň krutosti počas postupov:

Druh/plemeno/línia	Skupina	Pohlavie	Úkon	Počet zvierat	Krutosť
Potkany Wistar	BNX/sham	Samce	<ol style="list-style-type: none"> 1.Handling 2.Váženie 3.Opakovaný odber moču (met. kliecky) 4.Opakovaný odber krvi 5.Anestéza (i.p.) 6.Opakovaný odber slín 7.BNX resp. sham operácia 8.Pooperačný stav 9.Podávanie analgetík (lokálne) 10.Exsanguinácia 	15+10 kontrol spoločných pre BNX a IRI	<ol style="list-style-type: none"> 1.Slabá 2.Slabá 3.Stredná 4.Stredná 5.Slabá 6. Stredná 7. Stredná 8.Stredná 9. Slabá 10. Slabá
Potkany Wistar	GLY/kontrola	Samce	<ol style="list-style-type: none"> 1.Handling 2.Váženie 3.Opakovaný odber moču (met. kliecky) 4.Opakovaný odber krvi 5.Anestéza (i.p.) 6.Opakovaný odber slín 7.Intramuskulárne podanie glycerolu resp. fyziologického roztoku 8.Podávanie analgetík (lokálne) 9.Exsanguinácia 	10+5 kontrol	<ol style="list-style-type: none"> 1.Slabá 2.Slabá 3.Stredná 4.Stredná 5.Slabá 6. Stredná 7. Slabá 8. Slabá 9. Slabá
Potkany Wistar	IRI/sham	Samce	<ol style="list-style-type: none"> 1.Handling 2.Váženie 3.Opakovaný odber moču (met. kliecky) 4.Opakovaný odber krvi 5.Anestéza (i.p.) 6.Opakovaný odber slín 7.IRI resp. sham operácia 8.Pooperačný stav 9.Podávanie analgetík (lokálne) 10.Exsanguinácia 	15+10 kontrol spoločných pre BNX a IRI	<ol style="list-style-type: none"> 1.Slabá 2.Slabá 3.Stredná 4.Stredná 5.Slabá 6. Stredná 7. Stredná 8.Stredná 9. Slabá 10. Slabá
Potkany Wistar	5/6 Nx/sham	Samce	<ol style="list-style-type: none"> 1.Handling 2.Váženie 3.Opakovaný odber moču (met. kliecky) 4.Opakovaný odber krvi 5.Anestéza (i.p.) 6.Opakovaný odber slín 7. 5/6 nefrektómia 	20+15 kontrol	<ol style="list-style-type: none"> 1.Slabá 2.Slabá 3.Stredná 4.Stredná 5.Slabá 6. Stredná 7. Stredná 8. Stredná 9. Slabá 10.Slabá

			resp. sham operácia 8. Pooperačný stav 9. Podávanie analgetík (lokálne) 10. Prežívanie po 2-4 mesiacoch 11. Exsanguinácia		11. Slabá
--	--	--	---	--	------------------

Tabuľka 4: Predpokladaná úroveň krutosti jednotlivých skupín zvierat:

Skupina	Krutosť	Počet na skupinu
Bilaterálna nefrektómia (BNX)	stredná	15 BNX
Ischemicko reperfúzne poškodenie (IRI)	stredná	15 IRI
Spoločná sham skupina pre IRI a BNX	slabá	10 sham
Glycerolová nefropatia (GLY)	stredná	10 GLY
Kontrolná skupina pre GLY	slabá	5 CTRL
5/6 nefrektómia (5/6 Nx)	stredná	20 5/6 Nx
Sham skupina pre 5/6 Nx	slabá	15 sham

SPÄTNÉ POSÚDENIE

Vzhľadom na to, že ide o projekt so slabou až strednou krutosťou, nebude podliehať spätnému posúdeniu.

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

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Blokáda účinkov aldosterónu v liečbe správania podobného depresii

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2291/18-221/3

Kľúčové slová v projekte:

aldosterón, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza typu 2, Glycyrrhiza glabra, stres, depresia

Účel projektu:

základný biomedicínsky výskum

Cieľ projektu:

Napriek výraznému pokroku vo vývoji relatívne efektívnych antidepresív, je potrebné hľadať nové, účinnejšie liečivá, ktoré budú dosahovať v liečbe depresie lepšie výsledky. Nová stratégia vývoja liečiv s antidepresívnym pôsobením by mohla smerovať k modulácii účinkov hormónu aldosterónu a jeho receptorov. Účinok aldosterónu je sprostredkovaný vďaka kľúčovému enzýmu 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy typu 2 (11 β -HSD2), ktorý inaktivuje glukokortikoidy na neaktívne metabolity, vďaka čomu sa aldosterón môže naviazať na mineralokortikoidné receptory a mediovať svoje účinky. Ukazuje sa, že aldosterón má anxiogénne a depresogénne účinky a mohol byť zodpovedný za vyvolanie depresívneho správania u potkanov. Predpokladáme, že blokáda jeho účinkov by mohla zabrániť prejavom depresívneho správania v animálnom modeli depresie. V predkladanom projekte budeme u potkanov simulovať navodenie správania podobného depresii, prostredníctvom modelu chronického mierneho stresu. Hlavným cieľom projektu je potvrdiť hypotézu, blokáda účinkov aldosterónu prostredníctvom inhibície enzýmu 11 β -HSD2, navodenej podávaním extraktu z *Glycyrrhiza glabra* zvráti príznaky depresívneho správania, teda vyvolá antidepresívne účinky. Nosnými postupmi v predkladanom projekte budú nasledovné metódy: (1) chronický mierny stres ako animálny model depresie, (2) chronická blokáda účinkov aldosterónu, (3) chronické podávanie antidepresíva fluoxetínu a (4) behaviorálne testy na hodnotenie depresívneho správania a kognitívneho výkonu.

Prínos z vykonaného projektu:

Jedná sa o základný výskum, ktorý môže byť následne využitý v klinickej praxi. Predchádzajúce štúdie preukázali depresogénne a anxiogénne účinky hormónu aldosterónu. Očakávame odhalenie antidepresívneho pôsobenia blokády aldosterónu, prostredníctvom inhibície enzýmu 11 β -HSD2. Farmakologické ovplyvnenie enzýmu 11 β -HSD2 by mohlo predstavovať nový terč vývoja liečiv s antidepresívnym účinkom. Rozšírenie poznatkov o efektoch modulátorov účinku aldosterónu prispeje k novým možnostiam farmakoterapie depresívnej poruchy.

Počet a druh použitých zvierat:

V projekte bude použitých 72 samcov potkanov kmeňa Sprague-Dawley (Velaz, Praha, Česká republika) vo veku 9 týždňov na začiatku experimentálnych postupov. Zvieratá budú rozdelené do šiestich skupín po 12 jedincov v závislosti od podávanej látky (placebo, extrakt z *G.glabra* a fluoxetín) a vystavenia stresovým podnetom (chronický mierny stres, kontrola).

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

Zvieratá až do začatia experimentálneho postupu nebudú vystavené žiadnym nepriaznivým vplyvom. V projekte budeme simulovať navodenie depresívneho správania, prostredníctvom vystavenia potkanov chronickému mierneho stresu v dĺžke trvania 5 týždňov. Model chronického mierneho stresu predstavuje súbor nepredvídateľných podnetov mierneho charakteru, ktoré možno označiť ako stredne kruté, nakoľko môžu vyvolať príznaky depresívneho správania. V experimente budeme sledovať vplyv extraktu z koreňa rastliny *Glycyrrhiza glabra* a antidepresíva fluoxetínu, podávaných neinvazívne v peletovanej strave vyrobenej na zákazku po dobu 2 týždňov. Na základe predchádzajúcich experimentov neočakávame v súvislosti s podávaným typom liečiv v potrave žiadny nepriaznivý vplyv/ujmu na zvieratách. Predpokladáme, že u zvierat vystavených stresu a liečených extraktom *G.Glabra* a fluoxetínom bude kumulatívny dopad chronického mierneho stresu menší a liečivá zabránia príznakom depresívneho správania. Kontrolné zvieratá budú v priebehu experimentu vystavené len váženiu a behaviorálnemu testovaniu. Test otvoreného poľa, test vyvýšeného plusového bludiska a test rozpoznávania nového objektu môže u zvierat vyvolať krátkodobú úzkosť a stres. V prípade testu sacharózovej preferencie, ktorá obnáša depriváciu vody očakávame vyvolanie nepriaznivého stavu v podobe smädu, ktorého navodenie je však nevyhnutné pre následný test preferencie sacharózy. V prípade testu preferencie soli neočakávame žiadnu ujmu. Test núteného plávania predstavuje pre potkany intenzívny stresový podnet, ktorý možno označiť ako krutý.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Podľa prílohy č.4 k nariadeniu vlády Slovenskej republiky č.377/2012 Z.z. klasifikujeme krutosť nasledovne:

Postup	Krutosť v jednotlivých skupinách zvierat			
	Kontrola-placebo	Stres-placebo	Kontrola-G.glabra/fluoxetín	Kontrola-G.glabra/fluoxetín
Vázenie	slabá	slabá	slabá	slabá
Deprivácia vody v trvaní 8 h	-	stredná	-	stredná
Naklonenie klietky	-	slabá	-	slabá
Bez podstielky	-	slabá	-	slabá
Osvetlenie počas tmavej fázy dňa	-	stredná	-	stredná
Prerušované osvetlenie	-	slabá	-	slabá

Vlhká klietka	-	slabá	-	slabá
Sociálna izolácia v trvaní 8 alebo 16 h	-	stredná	-	stredná
Výmena partnera	-	stredná	-	stredná
Biely šum	-	slabá	-	slabá
Podávanie liečiv v potrave	-	-	slabá	slabá
Test preferencie soli	slabá	slabá	slabá	slabá
Test sacharózovej preferencie	stredná	stredná	stredná	stredná
Deprivácia vody v trvaní 20 h	stredná	stredná	stredná	stredná
Test rozpoznávania nového objektu	slabá	slabá	slabá	slabá
Test otvoreného poľa	slabá	slabá	slabá	slabá
Test vyvýšeného plusového bludiska	slabá	slabá	slabá	slabá
Test núteného plávania	stredná	stredná	stredná	stredná
celková klasifikácia	stredná	stredná	stredná	stredná

Vzhľadom na povahu vyššie uvedených plánovaných postupov navrhujeme spätné posúdenie projektu.

Uplatňovanie zásad “3R”:

Nahradenie zvierat:

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov. V biomedicínskom výskume, rovnako teda aj výskume depresívnej poruchy, je zatiaľ použitie laboratórneho potkana nevyhnutné a nenahradiiteľné. V projekte bude simulované navodenie depresívneho správania a jeho zvrátenie pomocou farmakologického ovplyvnenia. V tomto kontexte budú sledované komplexné behaviorálne zmeny, preto je nevyhnutné pracovať s potkanom laboratórnym.

Redukcia počtu zvierat:

V postupoch je zabezpečený optimálny počet experimentálnych zvierat na základe analýzy štatistickej sily. Maximálna využiteľnosť a vyťaženosť bude zabezpečená tým, že optimalizujeme počet meraní a maximalizujeme počet odobraných vzoriek na sledovanie behaviorálnych, fyziologických, a biochemických parametrov. Znižovanie počtov by ovplyvnilo validitu dosiahnutých výsledkov.

Zjemnenie:

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody (s výnimkou obdobia vykonávania postupov modelu chronického mierneho stresu a testu sacharózovej preferencie). Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. U zvierat vykazujúcich akékoľvek zhoršenie stavu v dôsledku stresu pristúpime k humánnemu ukončeniu postupu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie do 3 mesiacov od ukončenia projektu (do 10. júna 2019)

Netechnické zhrnutie projektu 2246/18-221/3

Názov projektu: **Vplyv elektromagnetickej radiácie počas prenatálneho vývoja potkanov na niektoré tkanivá a orgány z morfológického aspektu**

Kľúčové slová v projekte: elektromagnetická radiácia, štruktúra a ultraštruktúra, mozog, semenníky, obličky, pečeň

Účel projektu*: Základný výskum

Ciele projektu:

Vedecké ciele projektu sú zamerané na sledovanie možného negatívneho vplyvu elektromagnetickej radiácie (EMR) s frekvenciou 2,45 GHz na prenatálny vývin potkanov. Na úrovni svetelnej a transmisnej elektrónovej mikroskopie, ako aj histochemických a imunohistochemických metód preštudujeme morfológický obraz niektorých vybraných tkanív a orgánov. Je známe, že mobilné telefóny spolu s anténami svojich základných staníc a bezdrôtových pripojení k internetu produkujú EMR a majú významné miesto v sociálnom živote. Ich účinku sú neustále vystavené aj gravidné ženy a malé deti a preto je dôležité zistiť možné škodlivé účinky EMR u týchto rizikových skupín, najmä po dlhodobej expozícii žiareniu. Mnohé zmeny, ktoré vznikajú vplyvom tohto neionizujúceho žiarenia na biologické systémy predstavujú možnosť vážneho zdravotného rizika a možno ich pozorovať najmä na subcelulárnej úrovni.

Prínos z vykonaného projektu

Vplyv EMR na tkanivá a orgány v období prenatálneho – intrauterinného vývoja zatiaľ neboli dostatočne preštudované. Naše štúdie budú zamerané na sledovanie vplyvu EMR na úrovni morfológických zmien vo vybraných tkanivách a orgánoch, najmä v mozgu, semenníkoch, teda v orgánoch v ktorých prebiehajú početné mitózy aj po narodení. Hlavným prínosom bude zistenie, či prenatálne pôsobenie EMR môže negatívne ovplyvniť vývoj sledovaných orgánov.

Tým, že niektoré zvieratá necháme prežívať až do obdobia ich pohlavnej dospelosti, zistíme aký bude vplyv elektromagnetickej radiácie na reprodukčný systém a fertilitu. Sledovanie procesov neurogenézy v mozgu dospelých zvierat nám poskytne informácie o možnom dlhodobom negatívnom vplyve EMR na neurogenézu.

Očakávame, že naše výsledky o vzniknutých možných morfológických zmenách u potkanov, ktorých matky boli dlhodobo vystavené účinkom EMR o frekvencii, ktorú využívajú operátori mobilných sietí, by mohli pomôcť pri riešení základnej otázky ohľadne možného rizika používania mobilných telefónov, Wi-Fi, ako aj s rozširovaním už aj tak hustej siete transmisných staníc všetkých štyroch mobilných operátorov na Slovensku. Súčasné poznatky a naše budúce experimenty môžu pomôcť všeobecnej publicite a uvedomiť si škodlivosť neprimeraného používania mobilných telefónov a bezdrôtových pripojení k internetu najmä v období gravidity.

V predchádzajúcom projekte sme sledovali vplyv EMR na juvenilné potkany. Vplyv EMR na tkanivá a orgány v období prenatalného intrauterinného vývinu (čo je predmetom predloženého projektu) zatiaľ neboli dostatočne preštudované. Hlavným prínosom projektu bude zistenie, či prenátálne pôsobenie EMR môže ovplyvniť vývoj sledovaných orgánov. Oproti predchádzajúcemu projektu tu budeme zisťovať, či u zvierat ktoré budú prežívať do obdobia pohlavnej dospelosti EMR ovplyvní ich reprodukčný systém a fertilitu.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimente bude použitých 12 gravidných samičiek potkana kmeňa Wistar albino. Predbežný celkový počet potkanov oboch pohlaví (priemerný počet v hniezde 6-8 potkanov) vrátane ožarovaných matiek je 102 96 ks.

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

V projekte nebudeme vykonávať žiadne operačné zákroky ani iné manipulácie, ktoré by mohli spôsobiť zvieratám akúkoľvek bolesť. Váženie, ožarovanie, ako aj prežívanie mláďat predstavuje slabý stupeň krutosti.

V súhrnom článku, ktorá poskytuje najnovšiu databázu o biologickom efekte neionizujúceho žiarenia (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29874195>) sa nenachádza informácia, že by žiarenie spôsobilo zvieratám bolesť.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Postupy, ktoré budeme na zvieratách vykonávať budú ~~bez možnosti zotavenia~~ „slabé“ podľa Klasifikácie krutosti postupov - prílohy č. 4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z. z.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Po zadaní klíčových slov tohto projektu nebola v databáze European Centre for Validation of Alternative Methods (<http://altweb.jhsph.edu/news/current/ecvamdb-alm.html>) nájdená žiadna alternatívna metóda.

Na _____ je akreditovaný zverinec iba na potkany, okrem toho všetky naše predchádzajúce pozorovania boli vykonané na tomto zvieracom modeli. Morfológické pozorovania na úrovni svetelnej, elektrónovej mikroskopie a použitých histochemických a imunohistochemických metódik sa nedajú počítačovo simulovať.

2. Redukcia počtu zvierat:

V experimentálnych skupinách použijeme minimálny počet zvierat (6-8). Tento počet je nevyhnutný, aby bolo možné štatisticky vyhodnotiť výsledky.

3. Zjemnenie:

So zvieratami budú ohľaduplne manipulovať skúsení vedeckí pracovníci a doktorandi (veterinárni lekári). Zvieratá počas ožarovania sa budú nachádzať vo vlastných chovných kliebkach. Nie je potrebné uľahčovanie ich používania pri postupe počas ožarovania. V kliebkach sa len prenesú do vedľajšej miestnosti a po ukončení ožarovania späť do zverinca.

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