

PRÍLOHA Č. 2: NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

podľa § 40 nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.

NÁZOV PROJEKTU:

**PRENATÁLNE PROGRAMOVANIE CHORÔB V DOSPELOSTI: MOŽNOSTI TERAPIE A PREVENČIE
NÁSLEDKOV NESKOREJ GESTAČNEJ HYPOXIE U POTOMSTVA POTKANOV**

KLÚČOVÉ SLOVÁ:

hypoxia, vývin, správanie, kardiovaskulárny systém, potomstvo

ÚČEL PROJEKTU PODĽA § 3 A JEHO ZDÔVODNENIE:

Hypoxia predstavuje závažnú hrozbu pre vyvíjajúci sa plod, ktorá sa často spája so situáciami, ako je napríklad intrauterinná rastová reštrikcia (IUGR), preeklampsia, fajčenie, vysoká nadmorská výška a obezita. Zostáva medzi najväčšími rizikovými faktormi pre novorodenca dokonca aj vo vyspelých krajinách. Vyvíjajúci sa plod môže byť vystavený zvýšenému riziku hypoxie počas prenatálneho obdobia, hlavne vo fáze morfolologickej diferenciacie mozgových a neuronálnych obvodov, ale aj počas pôrodu a prechodu na autonómne dýchanie. Pretože plod je prispôsobený prostrediu v maternici, ktoré má fyziologicky nízky obsah kyslíka, nereaguje na hypoxický inzult adekvátnou reakciou, ale presne opačným spôsobom. Finančná záťaž spojená s liečbou kardiovaskulárnych a neurovývinových ochorení je pre zdravotníctvo enormná, čo nás vedie k hľadaniu nových poznatkov o potenciálnych mechanizmoch vedúcich k prenatálnemu programovaniu zdravia, ale aj možným terapeutickým intervenciám. Príležitosti pre terapeutickú intervenciu siahajú od vnútromaternicového prostredia (teda od terapie matky) do postnatálneho života, s liečbou potomstva v ktoromkoľvek okamihu ich života. Možná intervencia v ranom štádiu života by tak mohla byť užitočná pri zmene trajektórie prenatálneho programovania zdravia. Využitie antioxidantov sú jedným z najdôležitejších terapeutických prístupov súčasnosti na zabezpečenie neuroprotektie pri mozgovej ischémii. Veľký počet dôkazov podporuje zásadnú úlohu mitochondriálneho oxidačného stresu pri ischemických poraneniach mozgu a aj napriek neuspokojivým výsledkom nešpecifických antioxidantov v klinických štúdiách existuje sľubná vyhládka v prospech priaznivých účinkov použitia MTA pri ischemických poraneniach mozgu. Štúdie so suplementáciou niektorých antioxidantov naznačujú, že ich použitie je v tehotenstve bezpečné, pričom môžu zabrániť malformáciám embryí vyvolaným oxidačným stresom.

PODROBNÝ POPIS CIEĽA PROJEKTU VRÁTANE OČAKÁVANÉHO VÝSLEDKU:

Použitím vhodného animálneho modelu budeme zisťovať skoré príčiny a mechanizmy, ktoré sa môžu stať podkladom pre zvýšenú citlivosť organizmu na vznik a rozvoj úzkosti, depresie a iných psychiatrických chorôb v dospelosti ako aj kardiovaskulárnych a metabolických zmien u potomstva. V predchádzajúcom projekte sme zistili, že vhodný model na štúdium prenatálneho programovania kardiovaskulárnych a neurobehaviorálnych porúch je úzke okno v neskorej fáze vývinu. Konkrétne u

potkana to je 20. gestačný deň. V tomto projekte sa získajú nové poznatky o mechanizmoch vzniku úzkosti a depresie na zavedenom animálnom modeli neskorej gestačnej hypoxie, ďalej sa získajú nové poznatky o mechanizmoch vzniku kardiovaskulárnych a metabolických porúch u dospelých zvierat a získajú sa taktiež informácie o možnom terapeutickom zásahu mitochondriálnymi antioxidantami.

Výsledky jednotlivých experimentálnych štúdií prispievajú k lepšiemu poznaniu príčin a mechanizmov, ktoré sú podkladom pre zvýšené riziko vzniku psychiatrických, kardiovaskulárnych a metabolických porúch v dospelosti a ich možnej skorej detekcie na základe hodnotenia molekulárno-biologických, biochemických a behaviorálnych ukazovateľov.

Metodické aspekty:

Ide o **základný biomedicínsky výskum** v zmysle **§ 4 bod b**, ktorý vykonávajú výhradne školení a skúsení pracovníci s dodržiavaním všetkých platných predpisov pre prácu s laboratórnymi zvieratami **v plnom znení § 5 a § 6 a všetkých ich bodov**.

POČTY SKUPÍN A ZVIERAT

Potkany kmeňa Wistar

60 ks samíc, vek 3-4 mes, hmotnosť 180-200 g

20 ks samcov, vek 3-4 mes, hmotnosť 200-220 g

Mláďatá **700** ks (pri predpoklade, že v pokuse sa pripári 50 samíc a priemerný počet môže dosahovať 14 mláďat na matku). Po odstavbe bude pokračovať v postupe 100 samcov a 100 samíc. Zvyšné mláďatá sa utratia cervikálnou dislokáciou.

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

Počas postupu sa bude so zvieratami zaobchádzať šetrne v súlade so zásadami 3R s minimálnou ujmou počas vystavenia aplikácie ERG alebo hypoxickej komôrke. Celkový zdravotný stav potkanov bude sledovaný podľa kritérií human end points, aby sa zabránilo bolesti a utrpeniu zvierat. Pri pobyte zvierat v hypoxickej komôrke, môžu zvieratá pociťovať mierny stres, ktorý ale nepresiahne strednú úroveň krutosti. V predchádzajúcich projektoch zvládali hypoxiu zvieratá bez väčších náznakov diskomfortu a zvieratá vykazovali prirodzené prvky správania takmer ihneď po hypoxii. Pri behaviorálnych testoch sa bude postupovať podľa zaužívaných protokolov. FST môže mať miernu újmu, nakoľko potkany nebudú mať možnosť uniknúť z valca napusteného vodou, avšak tento test bude jednorazový a budeme sa snažiť obnoviť komfort zvierat hneď po teste.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná

- Váženie zvierat, potkany dobre znášajú váženie – slabá krutosť
- Priparovanie – slabá krutosť
- Aplikácia ERG – zvieratám sa bude podávať perorálne na piškóte - slabá krutosť
- Vystavenie 12 h hypoxii na 20. D.G., potkany relatívne dobre znášajú pobyt v hypoxickej komôrke. Historicky sme nepozorovali navodenie stavu po hypoxii, ktoré by viedlo k trvalému poškodeniu alebo smrti zvierťa - stredná krutosť
- **prežívanie mláďat – slabá krutosť**

Behaviorálne testy:

- Sledovanie neuromotorického a reflexného vývinu potomstva – slabá krutosť
- Test motorickej aktivity a explorácie v otvorenom poli – slabá krutosť
- Vyvýšené bludisko v tvare plus – slabá krutosť
- Explorácia v tmavom/svetlom prostredí – slabá krutosť
- Učenie aktívnym vyhýbaním – stredná krutosť
- Rozpoznávanie nového objektu – slabá krutosť
- Porsoltov test núteného plávania – stredná krutosť
- Test preferencie sacharózy – slabá krutosť
- **Odobratie vody a stravy pred testom preferencie sacharózy – slabá krutosť**
- Bludisko v tvare Y – slabá krutosť
- Hodnotenie emocionálnej reaktivity za využitia RGS – slabá krutosť

Hodnotenia kardiovaskulárnych parametrov

- **Operačný zákrok zavádzania telemetrických snímačov – stredná krutosť**

SÚLAD S POŽIADAVKOU NAHRADENIA, OBMEDZENIA A ZJEMNENIA (3R)

Nahradenie (Replacement)

V súčasnej dobe neexistuje validovaná vedecky akceptovateľná alternatívna metóda na štúdium vplyvu gestačnej hypoxie na vývin potomstva, ktorá by nahradila klasický *in vivo* prístup na zvieratách. Počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako *in vitro* pokusy, keďže na bunkových kultúrach nie je možné relevantne posúdiť zložitý proces ovplyvnenia vývinu jedinca v jeho kritických fázach. Rovnako nie je možné zhodnotiť komplexné deje akými sú poruchy činnosti srdca, ciev a mozgu v dôsledku gestačnej hypoxie. Z tohto dôvodu nie je možné dosiahnuť výsledky bez použitia zvierat a testovania na celistvom organizme.

Obmedzenie (Reduction)

Na dosiahnutie cieľov projektu sa plánuje použiť najnižší možný počet zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie a zachovanie relevantnosti pokusu. Preto je potrebné v experimente použiť v jednotlivých

skupinách 10 ks zvierat. Počas plánovaného obdobia sa za 4 roky predpokladá použitie 60 samíc, 20 samcov, 700 mláďat (ak porodí 50 samíc a budú mať priemerne 14 mláďat) potkanov.

Zjemnenie (Refinement)

Starostlivosti o zvieratá ako i manipulácii s nimi sa bude venovať veľká pozornosť. Zvieratá budú ošetrované skúsenými pracovníkmi a budú pod neustálym dohľadom pracovníkov zodpovedných za projekt. Pri všetkých postupoch sa bude manipulovať so zvieratami ohľaduplne, pri behaviorálnych testoch sa budeme snažiť obnoviť komfort zvierat hneď ako bude možné. V prípade vodných testov (Porsoltov test) po ukončení testu budú zvieratá jemne osušené bavlnenou handrou a dané pod infračervenú lampu a nakoniec vložené do domovskej klietky. Diskomfort zvierat budeme znižovať tým, že ich rozdelíme do 2 testovacích skupín, tak aby sme znížili riziko nepohodlia pri opakovaných testovaniach. V prípade zhoršenia zdravotného stavu sa potkany v postupe humane usmrtia predčasne ak by vykazovali príznaky ochorenia uvedené v human endpoints, aby sa zabránilo ich utrpeniu a bolesti. Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prístupom potravy a pitnej vody, klietky budú obohatené o plastové tunely umožňujúce preliezanie a hru. Počas celého postupu sa so zvieratami manipuluje jemne, aby nepocítovali strach alebo bolesť. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu by sa potkanom podalo napr. registrované analgetikum Novasul (500mg/ml; max. 0,1 ml/ 450g potkan).

Nevyžaduje sa spätné posúdenie projektu.