

## Netechnické zhrnutie projektu

**Názov projektu:** Identifikácia a charakterizácia proteínov, signálnych dráh a biochemických markerov aktivovaných v procese navodenia ischemickej tolerancie

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 826-1/2020-220

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** ischémia, neuroprotekcia, kondicioning, proteomika

**Účel projektu\*:**

Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

Regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z.z.)

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

**Ciele projektu:**

Cieľom výskumu v projekte je detailné štúdium proteínového profilu vybraných mozgových štruktúr u potkana laboratorneho po navodení celkovej ischémie a na druhej strane po indukcii ischemickej tolerancie v rovnakých regiónoch mozgu. Identifikované látky proteínového charakteru po ich zatriedení do príslušných metabolických bunkových dráh a procesov budú hodnotené z hľadiska ich účasti v neuroprotekcii. Plánujeme identifikovať jednotlivé komponenty indukcie ochrany neurónov pred bunkovou smrťou, ktoré sa podieľajú na úspešnom prežívaní buniek po ischemickom poškodení. Porovnanie rozdielov v expresii proteínov (ischemické vs. tolerantné tkanivo) nám umožní detekciu neuroprotektívnych látok, zúčastňujúcich sa aktivácie ischemickej tolerancie. Predpokladáme, že táto stratégia nám umožní vyprofilovať látky, ktoré sú pravdepodobne zodpovedné, alebo sa vo vzájomnej súčinnosti podieľajú na získaní ischemickej tolerancie a takto prispieť k získaniu podrobnejších poznatkov o mechanizmoch účinku kondicionovania.

**Prínos z vykonaného projektu:**

Ischémia mozgu spolu s poruchami jeho krvného zásobovania sú na tretej pozícii v príčinách smrti alebo trvalej indispozície a výskum v oblasti mechanizmov neuroprotekcie rieši spoločensky aktuálnu problematiku z medicínskeho aj socio-ekonomického hľadiska. Z tohto dôvodu je urgentná potreba nájsť nový potenciálny cieľ pre inovatívnu terapeutickú stratégiu schopnú ochrániť ischemicky poškodený mozog. Ochrana najcitlivejších buniek mozgu voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu prostredníctvom získania ischemickej tolerancie

predstavuje v súčasnosti najsilnejšiu známu procedúru pre prevenciu alebo reverzibilizáciu neurodegenerácie. Mozgové bunky disponujú prirodzenou schopnosťou tolerovať poškodenie spôsobené ischemickou epizódou a naštartovanie tohto procesu pomocou kondicionovania, či už vzdialeného alebo aplikáciou druhého stresu počas ischemie alebo v reperfúznom intervale do dvoch dní po ukončení ischemie sa ukazuje sľubným postupom, ktorý je do značnej miery schopný zabrániť výskytu oneskorenej smrti neurónov. Takto splnenie vytýčených cieľov projektu môže významným spôsobom prispieť k rozvoju poznatkov o mechanizme neuroprotektie a o ochrannom ovplyvnení ischemickej príhody.

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

V experimentoch je plánované použiť dospelé potkany laboratórne (*Rattus norvegicus*), Wistar, samce v počte 312 jedincov na celú dobu riešenia.

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

Navodenie ischemického poškodenia mozgu podľa štandardného modelu 4-cievneho podväzu sa uskutočňuje chirurgickým zákrokom v celkovej anestézii v prvej fáze na dorzálnej strane prvého krčného stavca, kde sa cez foramina alares kauterizujú obidve vertebrálne artérie, čo však nespôsobí úplné zastavenie prívodu krvi do mozgu a zvieratá spravidla bez problémov prežívajú. V druhej fáze navodenia ischemie sa v celkovej inhalačnej anestézii pripravia na atraumatickú oklúziu obidve krčnice a následne sa uzavrujú na prechodný čas, zviera upadne do ischemickej kómy. Po uvoľnení sa obe krčnice opäť spriechodnia a zviera sa po čase zotaví bez vonkajších viditeľných známkov poškodenia. Model spôsobí neurodegeneratívne zmeny v najcitlivejších bunkových populáciách v neokortexe, striate a hipokampe, ktoré sa navonok odrazia v správaní zvierat a prejavujú sa ako znížená schopnosť učenia sa ako aj zhoršenie priestorovej pamäti. Injekčná aplikácia tzv. postkondicionérov, čo sú vlastne biologicky aktívne látky prirodzene sa vyskytujúce v organizme avšak v nižších koncentráciách, spôsobí krátkodobý stres počas podávania a počas prvých hodín po podaní môžu zvieratá prejavovať apatiu resp. zvýšenú citlivosť. Turniketový model postkondicionovania je neinvazívny, zvieratám nespôsobuje bolesť ani poranenie a na zamedzenie stresu sa vykonáva v celkovej inhalačnej anestézii.

### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

Na základe posudzovaných faktorov navrhujeme klasifikáciu krutosti postupu označiť ako „strednú“.

### **Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia - uplatňovanie zásad 3R**

#### **1. Nahradenie zvierat:**

Ischemické poškodenie mozgu s následnou reperfúziou a fenomén ischemickej tolerancie sú procesy dynamické, ťažko predvídateľné a závisiace na mnohých faktoroch. Z týchto dôvodov nie je možné uskutočniť dané experimenty alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat. Okrem toho, experiment nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov.

## 2. Redukcia počtu zvierat:

Počet 312 ks zvierat bol stanovený vzhľadom k tomu, že predpokladáme veľkú individuálnu variabilitu výsledkov, z tohto dôvodu plánovaný počet 8 kusov zvierat v experimentálnych skupinách je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný počet pre získanie štatisticky významných výsledkov s prihliadnutím na úspešnosť modelu, ktorú jeho autori odhadujú ako 50-75%-nú. Úhyn zvierat na úrovni 25-50% je spôsobený samotnou subletálnou ischémiou, tzn. model globálnej a fokálnej ischémie má reálny predpoklad na dosiahnutie maximálnej úspešnosti prežitia u 75% zvierat pri ideálnych podmienkach. V snahe o dosiahnutie čo najnižšej miery úmrtnosti počas experimentu, resp. prežívania jedincov sa na pracovisku kladie dôraz na vysokú úroveň zručnosti pri vykonávaní experimentálnych I+R metód s následnou maximalizáciou mierou poskytnutia pooperačnej starostlivosti a zjemňovania. Skupiny zvierat v postupoch, uvedených v prílohe č. 1 sú nevyhnutné na získanie relevantných výsledkov ako stavu poškodenia, tak aj neuroprotektívnych účinkov podávania postkondicioningu a vývoja ischemickej tolerancie v komplexnom pohľade na mechanizmus účinku. Ischemicky poškodený mozog nemôže byť použitý na biochemicko-proteomické analýzy a zároveň aj na histologické a imunohistochemické analýzy.

## 3. Zjemnenie:

Všetky invazívne zákroky na zvieratách (model celkovej ischémie mozgu, indukcia vzdialeného kondicionovania oklúziou turniketom alebo parenterálne) budú vykonávané v celkovej anestézii, t. j. nebudú pre zvieratá bolestivé, s ohľadom na patologické prejavy krátkodobého prežívania po ischémii. Prežívanie v tejto fáze reperfúzie uľahčuje umiestnenie zvierat'a na vyhrievanú podložku, ako aj podanie fyziologického roztoku subkutánne. V každom prípade sú ihneď po ukončení ischémie podávané analgetiká (Novasul) na zmiernenie bolesti, na zabránenie nežiaducich patologických prejavov a na celkové zjemnenie postupu. V pooperačnom období budú jedince denne sledované a analgetikum (Novasul) im bude podané opätovne pri akejkoľvek ďalšej nezvyklej manifestácii patologických pooperačných prejavov, ako je napr. bolestivosť prejavujúca sa stabilnou polohou zvierat'a so zježenou srst'ou, vydávanie neprirodzených zvukov a pod. Pri dosiahnutí bodového skóre 3 v ktoromkoľvek zo sledovaných parametrov hlavných kritérií (viď Tabuľka 3), bude zviera humane usmrtené letálnou dávkou chloralhydrátu i.p., pri skóre nad 1 až 2 podanie analgetika prípadne roztoku glukózy.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Tabuľka 3: Hlavné kritéria pre humane ukončenie postupu

HLAVNÉ KRITÉRIA PRE HUMÁNNE UKONČENIE POSTUPU				
Fyziologický stav	váha			Záznam
	normálna	úbytok pod 20%	úbytok nad 20%	

	0	1 až 2	3
		fyz.+glu p.o., i.p.	ukončenie postupu
	<b>trasenie</b>		
	<i>nemá</i>	<i>slabé s občasnými záškľbmi</i>	<i>silné trasenie s početnými záškľbmi</i>
	0	2	3
		analgetikum	ukončenie postupu
	<b>sekréty</b>		
	<i>nemá</i>	<i>prítomný mierny priehľadný</i>	<i>prítomný silný priehľadný alebo krvavý</i>
	0	1 až 2	3
			ukončenie postupu
	<b>svalový tonus</b>		
	<i>normálny</i>	<i>znížený</i>	<i>slabý</i>
	0	1 až 2	3
		analgetikum	ukončenie postupu
	<b>POMOCNÉ KRITÉRIÁ PRE HUMÁNNE UKONČENIE POSTUPU</b>		
<b>Celkový vzhľad jedinaca a prostredia</b>	<b>postoj</b>		
	<i>normálny</i>	<i>schúlený</i>	<i>abnormálne prejavy</i>
	0	2	3
		analgetikum	analgetikum+ kontrola hlavných kritérií
	<b>stav srsti</b>		
	<i>normálny</i>	<i>neučesaná</i>	<i>špinavá/sekréty</i>
	0	1 až 2	3
			kontrola hlavných kritérií
	<b>vzhľad očí</b>		
	<i>normálny</i>	<i>polozatvorené</i>	<i>Zatvorené</i>
	0	1 až 2	3
		analgetikum	analgetikum+ kontrola hlavných kritérií
	<b>pohybová aktivita</b>		
	<i>normálna</i>	<i>znížená</i>	<i>žiadna</i>
	0	1 až 2	03-Jan

		analgetikum	analgetikum+ kontrola hlavných kritérií	
	<b>zvukové prejavy</b>			
	<i>nemá</i>	<i>chrapot</i>	<i>pískanie</i>	
	0	1	3	
		analgetikum	analgetikum+ kontrola hlavných kritérií	
	<b>čistota prodstielky</b>			
	<i>normálna</i>	<i>mierne znečistená</i>	<i>výkaly a sekréty</i>	
	0	1	2 až 3	
			kontrola hlavných kritérií	