

§ 40 NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

NÁZOV PROJEKTU

Neinvazívne markery funkcie obličiek

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. Pomerne vysoká interindividuálna a intraindividuálna variabilita vyššie uvedených markerov zatiaľ bráni širšiemu klinickému využitiu slín. Identifikácia možných zdrojov variability pomocou animálnych postupov môže pomôcť. 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. Okrem vyššie spomínaných kandidátnych markerov sú v súčasnosti predmetom vedeckého záujmu aj markery založené na rôznych formách nukleových kyselín, tzv. extracelulárne nukleové kyseliny (ecDNA, microRNA...), ktoré je možné detekovať v rôznych biologických tekutinách ako je plazma, moč, či slina. Zámerom projektu je zistenie akú úlohu pri poškodení obličiek má práve ecDNA, čo by mohlo pomôcť k objasneniu patomechanizmov pri obličkovom zlyhaní. Takisto si projekt kladie za cieľ overiť využitie ecDNA ako nového včasného markera poškodenia obličiek.

OČAKÁVANÝ PRÍNOS A UJMA

Zvieratá budú podstupovať úkony, ktoré spadajú do kategórie slabé až stredné. Niektoré zvieratá podstúpia operačný zákrok, čo najmä postoperačne môže predstavovať stres a viesť k bolesti. Celková mortalita chronického modelu je približne 20%, avšak polovica tejto úmrtnosti je perioperačná úmrtnosť pod vplyvom anestetík a analgetík, kedy zvieratá netrpia. Druhá polovica mortality nastáva po 12 mesiacoch, zvieratá sa ale nebudú dožívať, resp. experiment nebude trvať 12 mesiacov ale výrazne kratšie. Pri akútnom modeli najmä bilaterálnej nefrektómie je prežívanie zvierat približne 4-5 dní, projekt ale bude ukončený po

48h od indukcie akútneho zlyhania, t.j. v dostatočnom časovom predstihu pred možným závažným utrpením. Postupy patriace do kategórie slabé zahŕňajú najmä handling a bežnú manipuláciu so zvieratami ako i ich preznačovanie, čo určite môže vyvolať stres, ktorý sa ale vplyvom habituácie bude postupne znižovať. Zvieratá môžu pociťovať aj krátkodobý stres spôsobený relatívne stiesnenými priestorovými podmienkami po umiestnení do metabolickej klietky, ktorá slúži na odber moča. Existuje viacero zvieracích, ale aj klinických štúdií zaoberajúcich sa koncentraciou 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, ecDNA počas rozvoja obličkového zlyhania ako aj zistenie vzájomných vzťahov medzi plazmatickými a salivárnymi koncentraciami kreatinínu a urey, ecDNA. Tieto zistenia pomôžu odhaliť diagnostický potenciál sliny ako biologickej tekutiny na hodnotenie obličkových funkcií. Podobne, nie je doposiaľ známa rýchlosť vzostupu CNA po indukcii ochorenia, ani nie je dostupná žiadna štúdia, ktorá by analyzovala dynamiku CNA vo viacerých modeloch akútneho a chronického zlyhania obličiek. Je dynamika týchto kandidátnych biomarkerov rovnaká bez ohľadu na príčinu zlyhania obličiek? V ktorej diagnostickej tekutine najviac stúpajú tieto biomarkery, v ktorej stúpajú najskôr? Odpovede by malo priniesť riešenie tohto projektu. Vo všeobecnosti prínos projektu bude spadať pre ochorenia, ktoré sa dajú podľa MKCH zaradiť medzi N10 až N16, t.j. akútne a chronické tubulo-intersticiálne nefritídy ako i obličkové tubulo-intersticiálne ochorenia z rôznych príčin (metabolické, vaskulárne, autoimunitné).

DRUHY POUŽÍVANÝCH ZVIERAT A ICH PREDBEŽNÉ POČTY

Počet zvierat použitých v projekte bude 125 potkanov, dospelých samcov rodu Wistar, vo veku 10 týždňov.

ÚROVEŇ KRUTOSTI CELÉHO PROJEKTU

stredná krutosť

SÚLAD ZÁSAD 3R

Nahradenie

Pretože v plánovaných postupoch sa budú stanovovať plazmatické, salivárne a močové koncentrácie kreatinínu, urey a ecDNA ako aj sledovať ich dynamika, je nevyhnutné, aby sa postup vykonal „*in vivo*“ na celom zvierati. Využitie bunkových kultúr alebo počítačových simulácií nie je pri tomto type postupu vhodný ako alternatívny spôsob výskumného prístupu. Alternatívne sa dá samozrejme uvedené sledovať priamo u ľudí, avšak treba zdôrazniť, že u ľudí je veľká variabilita aj intraindividuálna aspoň niektorých sledovaných markerov a naším cieľom je nájsť aj zdroj tejto variability, čo momentálne pri práci s ľuďmi nie je možné. Takisto u ľudí nie je možné realizovať dynamické testovania, nakoľko nie je jasný jednotný protokol pre odber slín.

Obmedzenie

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 zvieratá. 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, salivárnych a močových koncentrácií kreatinínu, urey a ecDNA medzi kontrolnými zvieratami a zvieratami s indukovaným zlyhaním obličiek. Zvieratá pre akútne model budú objednávané v jednotnom časovom intervale a pre chronický model budú objednávané tiež naraz, aby sa predišlo sezónnym zmenám a potrebe postup opakovať. V postupe sa použijú geneticky homogénne rovnaké skupiny zvierat. Sham skupinu pre akútne modely využijeme rovnakú pre model bilaterálnej nefrektómie ako i pre ischemicko-reperfúzne poškodenie, čo znamená „úsporu“ minimálne 10 zvierat. Veľkosť skupiny pri sile testu 80% a sledovanej variabilite, resp. rozdieloch mala dosahovať n=10 pre kontrolnú skupinu, n=20 pre akútne modely, n=19 pre glycerolový model, n=15 pre SHAM skupinu 5/6 nefrektómie a n=28 pre 5/6 nefrektómiu, a to všetko pri hladine významnosti $p < 0,05$. Väčšie počty reálne plánovaných zvierat oproti vypočítaným rátajú aj s cca. 10% perioperačnou mortalitou. Týmto prístupom by problém falošnej negativity, prípadne positivity výsledkov mal byť minimalizovaný.

Zjemnenie

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 Vyhláške Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR č. 436/2012 Z.z..

Zvieratá budú počas postupov kontinuálne sledované a na prípadné známky utrpenia sa bude okamžite reagovať. Ohľaduplný prístup, jemná manipulácia sú samozrejmosťou a denný handling ráta s tým, aby si zvieratá formou habituácie zvykli na manipuláciu. Po chirurgických zákrokoch, budú tieto realizované v anestézii a všetky zvieratá vrátane ham operovaných zvierat dostanú analgetiká (buprenorfín 0,1mg/kg subkutánne). Podobne, v prípade prítomnosti 3 prejavov zhoršeného zdravotného stavu budú zvieratám podávané analgetiká (buprenorfín v dávke 0,1mg/kg subkutánne). Podobne, v prípade prítomnosti 2 prejavov zhoršeného zdravotného stavu budú zvieratám podávané analgetiká (buprenorfín v dávke 0,1mg/kg subkutánne). V prípade súčasnej prítomnosti 5 a viac ľahkých prejavov zhoršeného zdravotného stavu, alebo prítomnosti 2 príznakov viac ako 48h napriek intervencii, alebo pri prítomnosti 2 a viac závažných príznakov ako strata hmotnosti > 20%, neschopnosť prijímať potravu a vodu, dehydratácia, strata elasticity kože, naježenie srsti, zhrbený postoj, strnulosť, kontinuálny výtok z očí dôjde k humánnemu usmrteniu zvierat po navodení celkovej anestézie podaním Isofluranu 5% a následne cervikálnou dislokáciou a postup bude ukončený. Podobne, pri odbere krvi z chvosta bude zviera sedované, pričom táto sedácia bude využitá aj počas odberu slín. Odber krvi z chvosta bude zjemnený aj namočením chvosta do lokálneho anestetika – mezokaínového roztoku. Krv bude odobratá použitím tenkých jednorazových kapilár (30G) čím sa zmierni stres a bolesť zvierat. Na zabránenie tepelných strát bude zvieratám poskytnutá výhrevná podložka, najmä po operačnom zákroku. V neposlednom rade, životné prostredie zvierat bude obohatené materiálom na stavbu hniezd, predmetmi podnecujúcimi hru, potrava bude umiestnená na podlahe pre ľahšiu konzumáciu tiež postoperačne 24hodín. Pri opakovaných odberoch sliny budú zvieratá sedované (intraperitoneálne, ketamín a xylazín, 20 mg/kg a 5 mg/kg, v pomere 3:1). Zvieratá budú aj v metabolických klietkach za účelom odberu moča, čo môže predstavovať krátkodobý stres. Na druhej strane, pobyt v tejto klietke bude minimalizovaný na cca. 3 hodiny.

SPÄTNÉ POSÚDENIE

Zvieratá sa nebudú opätovne využívať a s ohľadom na to, že ide o projekt, ktorý má predpokladanú krutosť strednú **nemá** ambíciu **podliehať spätnému posúdeniu**.

Kľúčové slová: akútne a chronické renálne zlyhávanie, sliny, biomarkery, animálne modely