

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Prenatální faktory ovlivňující rozvoj plicní hypertenze v dospělosti - studie na potkanech

Doba trvání projektu pokusů v měsících	26
Klíčová slova	plícní cirkulace
plícní hypertenze	hyperglykémie
perinatální období	streptozotocin

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Kardiiovaskulární krevní a lymfatický systém [PB2]

Základní výzkum: Dýchací soustava [PB4]

0

0

Cíle projektu pokusů

Patogenní vlivy působící na jedince v perinatálním stadiu mohou zanechávat trvalé následky až do dospělosti. Diabetes mellitus (cukrovka, hyperglykémie) matky zvyšuje riziko rozvoje diabetu u jejích potomků. Data z našich předchozích pokusů navíc naznačují, že diabetes matky také negativně ovlivňuje plícní cirkulaci u dospělých potomků a že tyto vlivy jsou pohlavně specifické. Rozsah a mechanismy vlivu cukrovky matky (a potažmo také hyperglykémie matky během laktace) na různé orgány potomků však nejsou známy. V našem projektu proto chceme sledovat dlouhodobé hemodynamické a metabolické důsledky intrauterinního působení experimentálního diabetu matky na její potomky (plícní hypertenze, ovlivnění slinivky, kosterní svaloviny, tukové tkáně a makrofágů, zánětlivé reakce, oxidační stres). Získaná data budou vyhodnocována z pohledu fyziologie, proteomiky a histologie.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Diabetes mellitus (cukrovka) v těhotenství je častou a významnou komplikací jak pro matku, tak pro plod a posléze novorozence. V poslední době se ukazuje, že i po zvládnutí případných novorozeneckých problémů si děti diabetických matek mohou odnášet do dospělého života zvýšené riziko různých chorob, počínaje cukrovkou samotnou. Tato studie se zaměřuje na mateřský diabetes jako možný rizikový faktor jiné vážné choroby, plícní hypertenze, a to včetně pohlavních rozdílů. Porozumění tomuto riziku a jeho mechanismům je předpokladem budoucích intervencí, jak preventivních, tak terapeutických.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

U 1. generace potkanů (pokusná a kontrolní skupina samic) bude ve věku 5 dní provedena jednorázová injekční (subkutánní) aplikace buď streptozotocinu (pokusná skupina), či citrátového pufru (kontrolní skupina). Ve věku 11 týdnů bude samicím z obou skupin stanovena glykémie za použití orálního glukózového tolerančního testu (OGTT): samice budou ponechány 6 hodin na lačno, poté jim bude gaváž do jícnu aplikován roztok glukózy. Pro stanovení hladiny glukózy pak bude každé samici odebrána 4x kapka krve ze špičky ocasu.

Všem jedincům 2. generace bude dva dny před konečným měřením rovněž proveden OGTT (aplikace roztoku glukózy gaváží na lačno, odebrání 4 kapek krve ze špičky ocasu). Vlastní invazivní fyziologické měření a odběr orgánů pro další zpracování probíhá po uvedení do celkové anestezie, ze které se jedinec již neprobere. K samotnému usmrcení zvířete dochází předávkováním anestetikem (thiopental intraperitoneálně) a odebráním vnitřních orgánů (zejména srdce a plíce). Pooperační péče zde nebude třeba.

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata, a doba trvání těchto účinků

U samic s indukovaným diabetem lze očekávat snížení tělesné hmotnosti, zvýšenou spotřebu vody (větší žíznivost v souvislosti s hyperglykemií), v době gravidity též vyšší riziko potratu či mrtvě narozených mláďat.

U potomků hyperglykemických matek předpokládáme zvýšené riziko rozvoje plícní hypertenze (zvýšeného krevního tlaku v malém plícním oběhu). Zdravotní stav a chování všech zvířat budou pravidelně monitorovány kvalifikovanými osobami (veterinář, ošetřující personál).

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
potkan laboratorní (Rattus norvegicus) [A2]	0	200	20	0

0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi				
Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat			
	Opětovné použití	Navrácení do chovu, do přírodního stanoviště	Do zájmového chovu	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty				
Dospělí jedinci 0. a 1. generace slouží pro získání vlastních pokusných jedinců 2. generace (potomků hyperglykemických a kontrolních zdravých matek). Jedinci 0. a 1. generace nebudou opětovně použiti k žádnému jinému pokusu. Po odchování jejich potomků budou tito jedinci usmrceni předávkováním anestetikem (thiopental intraperitoneálně v dávce vyšší než 50 mg na 1 kg hmotnosti zvířete). Pokusní jedinci 2. generace jsou před konečným odběrem tkání usmrceni, jejich opakované použití není možné.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Pokusy sledující vliv diabetu matky na její potomky nelze provést na alternativním modelu (př. tkáňové kultuře). V organismu dochází k mnoha provázaným dějům, jejichž celkové působení ovlivňuje námi sledované fyziologické, histologické či biochemické parametry. V databázi ECVAM (září 2021) není validovaná metoda, jež by mohla plánovaný pokus zcela nahradit či redukovat.				
Omezení používání zvířat				
Studie počítá s použitím maximálně 220 potkanů. Z toho v 0. a 1. generaci (prarodiče a rodiče jedinců 2. generace) je pro každou skupinu počítáno maximálně 10 jedinců (celkem max. 40 jedinců). V 2. generaci potkanů (potomci diabetických a kontrolních zdravých matek) bude použito max. 180 jedinců, tj. 12 pokusných skupin po max. 15 jedincích. Ve skupinách diabetických potomků bude ovšem konečný počet pravděpodobně nižší, protože hyperglykemické potkaní matky trpí vyšší pravděpodobností potratů či narození mrtvých mláďat, jejich živě narozená mláďata pak s vyšší pravděpodobností hynou krátce po narození. Na základě znalostí z odborné literatury a předchozích výsledků pokusů provedených na našem pracovišti je počet jedinců ve skupinách nastaven jako minimální počet, při kterém je validita výsledků ještě dostatečná, aby bylo možno dosáhnout statistické signifikance u výsledných dat. Power analýza byla provedena s využitím http://www.quantitativeskills.com/sisa/calculations/powhlp.htm pro velikost efektu 20% a SD vycházející z naší dosavadní zkušenosti s plicní hemodynamikou u laboratorních potkanů.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
S potkany budou pracovat osoby s osvědčením podle § 15d,e a 16a zákona č. 246/1992 Sb na ochranu zvířat proti týrání a s dostatečnými předchozími zkušenostmi s péčí o laboratorní hlodavce. Zdravotní stav a welfare zvířat bude pravidelně monitorován kvalifikovaným personálem. Během pokusu zvířata nebudou vystavována stresujícím či bolestivým podnětům s výjimkou jednorázové subkutánní injekce podané matkám, jícnové gaváže prováděné zkušeným experimentátorem pro podání glukózy při glukózovém tolerančním testu a výše popsaného odběru 4 kapek krve z ocasu pro stanovení glykémie. Pro potřeby pokusu je nezbytné v maximální možné míře zabránit stresování zvířat, neboť stres mimo jiné negativně ovlivňuje naměřené fyziologické hodnoty. Veškerá invazivní fyziologická měření a odběry vzorků budou probíhat v celkové anestezii, po které již zvíře nenabude vědomí.				
Použití druhů zvířat - vysvětlení				

Laboratorní potkan kmene Wistar je obecně vhodným zavedeným modelem, navíc na našem pracovišti dlouhodobě používaným. Výzkumy na něm jsou dobře reprodukovatelné a srovnatelné s výsledky jiných studií. Cílem pokusu je sledování vlivu diabetu matky na organismus potomka - na změny fyziologických parametrů, biochemické či histologické změny na orgánech ap. Studii není možné provést na lidském materiálu vzhledem k praktické nedostupnosti většiny tkání (s výjimkou krve, která ovšem není předmětem této studie) z lidí, jejichž matka trpěla diabetem. Izolované lidské buňky navíc neumožňují vyhodnocení funkce celých orgánů. Při použití laboratorních zvířat je třeba diabetes vyvolat experimentálně. Vzhledem k tomu, že předmětem zájmu je druhá generace, musí být diabetes vyvolán u intaktních matek (aby následně mohly zabřeznout a porodit).