

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Studium modulátorů klíčových signálních molekul jako potenciálních léčiv na modelu experimentální nealkoholové tukové jaterní choroby a nealkoholové steatohepatitidy (NAFLD/NASH) u laboratorních potkanů a myši

Doba trvání projektu pokusů v měsících

36

Klíčová slova

nealkoholová tuková jaterní choroba (NAFLD)

nealkoholová steatohepatitida (NASH)

zánět

mTORC1 inhibitory

experimentální model

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Gastrointestinální systém včetně jater [PB5]

Translační a aplikovaný výzkum: Gastrointestinální poruchy včetně jater u lidí [PT26]

0

0

Cíle projektu pokusů

Nealkoholová tuková jaterní choroba (jaterní steatóza, NAFLD) označuje široké spektrum onemocnění jater, které je často spojováno s obezitou, cukrovkou 2. typu, a metabolickým syndromem a jeho prevalence je odhadována na přibližně 25-30% evropské populace. Patogeneze NAFLD je komplikovaná a zahrnuje oxidativní stres, lipotoxicitu, poškození mitochondrií, inzulinovou rezistenci a zánět, které pokud zůstávají neléčeny, mohou v přibližně 30% progredovat až do rozvoje nealkoholové steatohepatitidy (NASH), fibrózy, cirhózy, a v konečném důsledku k selhání jater nebo hepatocelulárnímu karcinomu, které přispívají ke zvýšené morbiditě a mortalitě pacientů s metabolickým syndromem. Jelikož jsou aktuální možnosti farmakotapie NAFLD/NASH značně omezené, je velká pozornost věnována identifikaci terapeutických cílů, které poskytují nové strategie pro léčbu NAFLD/NASH. Hlavním cílem projektu pokusů tedy bude vyhodnotit potenciální profylaktický a terapeutický účinek modulátorů signálních molekul (např. Nrf2, mTOR, SIRT1, SREBP) klíčových pro rozvoj chronického zánětlivého onemocnění jater na experimentálním modelu NAFLD/NASH indukované vysokotukovou dietou napodobující stravu „západní“ populace.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Krátkodobé přínosy: optimalizace preklinického modelu NAFLD a především NASH nejvíce napodobující vývoj onemocnění u lidí. Dlouhodobé přínosy: Výsledky projektu by mohly přispět k lepšímu porozumění patogenese NAFLD/NASH a k nalezení nových farmakoterapeutických přístupů v léčbě tohoto jaterního onemocnění u lidí.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Pro navození NAFLD/NASH bude laboratorním zvířatům od začátku experimentu podávána ad libitum komerční standardizovaná vysokotuková aterogenní dieta („Western type diet with 1.25% cholesterol“, 4 575 kcal/kg) spolu s fruktózou a sacharózou (42 g/l) v pitné vodě po dobu 10-24 týdnů.

Studované látky budou aplikovány:

- jednorázově perorální gaváží nebo intraperitoneálně ke stanovení optimální dávky a způsobu podání v pilotní studii.
- perorální gaváží denně nebo obden pod dobu 2-4 týdnů nebo intraperitoneální injekcí denně po dobu 2 týdnů v experimentální studii pro stanovení profylaktického a terapeutického účinku u NAFLD/NASH.

Odběry krve budou prováděny:

- buď jednorázově intravenózně, nebo z retrobulbárního plexu v krátkodobé inhalační anestézii zajištěné podáním lokálních anestetik do spojivkového vaku (objem odebrané krve nepřesáhne 1% celkové hmotnosti zvířete)
- nebo terminálně v hluboké inhalační anestézii.

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

Při indukci NAFLD/NASH budou zvířata 1 týdně vážena, což může být spojeno s mírným stresem. Indukce NAFLD/NASH vysokotukovou dietou vede k nárůstu tělesné hmotnosti (obezitě), ale není spojována se stresem, bolestí a strádáním zvířete. Aplikace látek perorální gaváží nebo intraperitoneální injekcí nepřesahující 1 minutu je spojena s mírným stresem a diskomfortem. Předpokládá se krátkodobá bolest korespondující s vpichem jehly skrze kůži u intraperitoneální aplikace látek. Jednorázový odběr krve bude vždy prováděn v celkové anestézii. Před odběry krve bude zvířatům na maximálně 12 hodin odebrána potrava, pití bude dostupné bez omezení.

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
myš laboratorní (Mus musculus) [A1]	0	0	540	0

potkan laboratorní (Rattus norvegicus) [A2]	40	80	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				
Všechna zvířata budou na konci experimentu usmrcena, protože budou odebrány terminálně v hluboké inhalační anestézii velké objemy krve a orgány (játra) – zvíře již nenabude vědomí.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Vzhledem k charakteru pokusů, tj. navození NAFLD/NASH s aplikací vybraných modulátorů klíčových signálních molekul coby nových potenciálních léčiv, nelze pokusy na pokusném zvířeti nahradit alternativními metodami. V současné době navíc neexistuje jiný preklinický způsob ověření in vivo aktivity zánětu a tvorby vazivové tkáně v játrech postižených NAFLD/NASH. Tuto skutečnost jsme ověřili také v databázi validovaných alternativních metod schválených a přijatých Evropskou společností pro alternativní metody (ECVAM). V in vivo studiích budou navíc testovány pouze ty látky, které se na základě in vitro testů budou jevit jako perspektivní, tzn., že budou působit protektivně na rozvoj lipotoxicity v primárních jaterních buňkách.				
Omezení používání zvířat				
Bude použit minimální počet myší a potkanů zajišťující statistickou významnost pokusu, a to na základě řady literárních údajů. In vivo studii budou navíc předcházet in vitro experimenty na primárních hepatocytech získaných izolací z potkanů na standardní nebo vysokotukové dietě s NAFLD/NASH (max. 30 ks/rok) a bude provedena pilotní studie na malém vzorku laboratorních zvířat k optimalizaci indukce NAFLD/NASH (max. 60 zvířat pro celou studii: provedena jak na potkanech (max. 30 ks) tak na myších (max. 30 ks)), časového schématu odběrů, způsobu podání a dávkování (max. 18 myší na 1 molekulu), aby experimenty nemusely být vzhledem k uvedeným proměnným zbytečně opakovány. Minimální počet myší pro testování účinnosti jedné látky byl stanoven na 50 ks. V hlavních experimentech v každé skupině (celkem 5 skupin) bude počet zvířat minimální (a 10 ks) k dosažení statisticky významných výsledků. Uvedený počet ve skupině zahrnuje i zvířata, která budou použita k ověření rozvoje NAFLD a NASH před podáním léčiva v daném časovém úseku (1-2 ks na skupinu). S ohledem na vysokou interindividuální variabilitu u konvenčních zvířat a statistickou průkaznost výsledků je tento počet minimální. Potkani a myši budou průběžně nakupováni v co nejnižším počtu pouze pro účely daného pokusu, proto výše uvedený roční počet zvířat je maximální a lze předpokládat menší množství použitých zvířat.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Experimenty budou prováděny v akreditovaném zvířetníku v souladu se zákonem a s ohledem na maximální welfare zvířat. Potkani a myši budou chováni ve standardních konvenčních podmínkách v odpovídajících klecích v počtu 2-4 zvířata na klec (voda s nebo bez přidaných sacharidů, potrava ad libitum, pravidelná výměna podestýlky, atd.) a budou pravidelně kontrolovány a váženy. Zvířata budou postupně habituována na úchop pro budoucí aplikaci látek. Studované látky budou aplikovány standardním šetrným způsobem (perorální gaváží nebo intraperitoneální injekcí) dostatečně zaškolenou osobou. Jednorázový odběr krve před zahájením experimentů, se zajišťovacím podáním lokálních anestetik, a terminální odběry krve a jater budou vždy prováděny v celkové inhalační anestézii. V případě neuspokojivého zdravotního stavu zvířete bude pokus ukončen a zvíře usmrceno v hluboké terminální inhalační anestézii. Se zvířaty bude zacházeno co nejšetrněji dle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. O pokusná zvířata bude pečovat osoba způsobilá k této práci.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

K experimentům budou použiti samci kmene Wistar s tělesnou hmotností nejméně 180 g (stáří minimálně 8 týdnů) na počátku studie nebo myši samci inbredních kmenů C57BL/6J, BALB/c (ve věku minimálně 7 týdnů), kteří jsou dle literárních údajů nejčastěji používáni pro indukci jaterní steatózy navozené dietou a současně vhodní pro farmakologické a toxikologické studie. Navíc dospělí samci jsou náchylnější k časnějšímu rozvoji NAFLD/NASH.