

## REZUMATUL CU CARACTER NONTEHNIC AL PROIECTULUI

Titlul proiectului	Determinarea metaboliților vitaminei D în țesut cerebral și în lichid cefalo-rahidian la șobolani și relația dintre nivelul vitaminei D și funcțiile cognitive
Durata proiectului (în luni)	12 luni
Cuvinte-cheie (maximum 5) <sup>(1)</sup>	vitamina D3, funcție cognitivă, farmacocinetică, metaboliți
Scopul proiectului <sup>(2)</sup> (puteți alege mai multe răspunsuri)	- Cercetare de bază <sup>(3)</sup> - Cercetare translațională și aplicată <sup>(3)</sup>
Obiectivele și beneficiile preconizate ale proiectului	
Descrieți obiectivele proiectului (de exemplu, abordând anumite necunoscute științifice sau anumite necesități științifice sau clinice).	În ultimele două decenii au apărut multe date care confirmă acțiunea și rolul important al vitaminei D în sistemul nervos central (SNC) și în momentul de față este considerată un neurosteroid cu acțiuni multiple. Studiile clinice sugerează un rol important al vitaminei D în funcțiile cognitive, niveluri serice scăzute de 25-hidroxi-vitamina D corelând cu demența și cu tulburările de memorie la vârstnici, însă studiile experimentale nu au reușit să elucideze complet efectele vitaminei D în SNC. S-a demonstrat că atât 25-hidroxi vitamina D3 cât și 1,25-dihidroxi vitamina D3 (calcitriol) trec prin bariera hematoencefalică și receptorii vitaminei D sunt prezenți și la nivel neuronal. Apoi, s-a arătat că și garnitura enzimatică necesară pentru sinteza calcitriolului se găsește în țesutul neuronal. Acest lucru permite o funcționare independentă a sistemului ligand-receptor fără o corelație evidentă cu nivelul seric de 25-OH vitamina D, parametru folosit în prezent pentru evaluarea statusului vitaminei D în organismul uman. Așadar, este necesară o determinare mai specifică a nivelului de 25-OH vitamină D3, 1,25-OH vitamină D3 și/sau al metaboliților inactivi (de ex. 24,25-(OH)2 vitamina D3) în lichid cefalo-rahidian sau în țesut cerebral pentru a înțelege rolul acestora în funcțiile cognitive.
Care sunt potențialele beneficii care ar putea rezulta în urma acestui proiect? Explicați modul în care știința ar putea avansa, iar oamenii, animalele sau mediul pot beneficia, în ultimă instanță, de proiect. Acolo unde este cazul, diferențiați între beneficiile pe termen scurt (pe durata proiectului) și beneficiile pe termen lung (care se pot acumula după încheierea proiectului).	Obiectivele acestui proiect vizează determinarea concentrației de vitamină D3 și a metaboliților săi în lichid cefalorahidian și în țesut cerebral la șobolani și studierea corelației dintre nivelurile cerebrale și cele serice. Astfel, vom putea înțelege, dacă administrarea vitaminei D3 sub formă de supliment alimentar poate să crească nivelul formei active a vitaminei D3 în creier. În următoarea fază se dorește studierea efectului vitaminei D3 asupra funcțiilor cognitive la șobolani și corelarea efectului farmacodinamic cu concentrația vitaminei D în probe biologice (ser, lichid cefalorahidian, țesut cerebral). În această etapă se studiază dacă un nivel mai crescut de calcitriol poate îmbunătăți performanța șobolanilor în testele specifice de memorie. Rezultatele obținute în proiectul propus pot contribui la înțelegerea rolului pe care vitamina D3 îl are în procesul de învățare și memorie. În plus, rezultatele farmacocinetice vor permite evaluarea funcționării sistemului de semnalizare a vitaminei D din creier și dependența acestuia de nivelurile periferice de vitamină D și ai metaboliților săi.
Prejudiciile preconizate	Procedurile aplicate în proiectul prezent vor provoca durere și suferință minimă datorită măsurilor de ameliorare care vor fi implementate. Totuși, un nivel redus de discomfort/stres va fi resimțit de către animale, însă beneficiile proiectului justifică acest prejudiciu asumat.
În ce proceduri vor fi utilizate animalele în mod obișnuit (de exemplu, injecții, intervenții chirurgicale) ? Indicați numărul și durata acestor proceduri.	Experimentul este compus din două etape: în etapa 1 se realizează un experiment farmacocinetic, în etapa 2 un experiment de tip intervențional pentru studierea efectelor produse de vitamina D. În etapa 1 șase animalele vor fi supuse următoarelor proceduri: intervenție chirurgicală de implantare a unor catetere și canule intrajugulare respectiv intracerebroventriculare. Postoperator animalele vor fi rehidratate/reechilibrate hidroelectrolitic. După recuperare postoperatorie animalelor li se administrează precursori de vitamina D3 și se prelevează probe de sânge și de lichid cefalorahidian pentru stabilirea corelațiilor dintre acțiunea tisulară și nivelul seric. Animalele vor fi supuse acestei proceduri de trei ori pentru fiecare substanță studiată (vitamina D3, 25-OH-vit D3, 1,25-OH2-vit D3) ținând o perioadă de washout de 7 zile între testări. În faza a doua, 36 de animale vor fi folosite pentru studierea funcțiilor cognitive și a memoriei după inducerea hipovitaminozei D urmată de administrare cronică, timp de 4 săptămâni, de vitamină D în două doze diferite: 1000 respectiv 10000 UI/kg în hrană. La sfârșitul experimentului animalele vor fi supuse unor teste comportamentale de memorie – testul labirintului cu brațe radiale și testul de recunoaștere a obiectului nou.
Care sunt impacturile/efectele adverse preconizate asupra animalelor, cum ar fi durerea, pierderea în greutate, inactivitatea/mobilitatea redusă, stresul, comportamentul anormal și durata acestor efecte?	La începutul experimentului șobolanilor li se va implanta o canulă de microdializă în ventricolul lateral pentru prelevare de lichid cefalorahidian și un cateter intrajugular pentru prelevare de sânge. Intervenția chirurgicală va fi efectuată sub anestezie generală cu ketamină și xilazină și va fi urmată de 5-7 zile de recuperare, în această perioadă animalele fiind monitorizate permanent de către un medic veterinar pentru a furniza tratament antibiotic și/sau analgezic în cazul unor complicații. Se va monitoriza creșterea în greutate pentru evaluarea recuperării. Administrarea substanțelor de interes se va realiza sub anestezie generală. Probe de sânge (câte 200 μl) vor fi prelevate la 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360 și 480 minute. Volumul total prelevat (2,2 ml) în 24 de ore este mai mic decât 10% din volumul sanguin. Prelevarea lichidului cefalorahidian se va realiza folosind

	<p>tehnica de microdializă, astfel lichidul prelevat fiind înlocuit, deci nu există restricție în ceea ce privește prelevarea.</p> <p>În faza a doua, animalele vor fi adăpostite în cuști din policarbonat și vor fi hrănite cu hrană specială corespunzătoare pentru scopul urmărit, cu conținut verificat de vitamină D și vor primi apă ad libitum. Nu se preconizează producerea de efecte adverse cum ar fi durerea, pierderea în greutate, inactivitatea/mobilitatea redusă în această fază. Singurul factor de stres este reprezentat de testarea capacității cognitive și a memoriei la sfârșitul experimentului, care presupune amplasarea animalelor în mediu nou. Animalele vor fi manipulate de personal calificat.</p>					
Care sunt speciile și numărul de animale care urmează să fie utilizate? Care sunt nivelurile de severitate preconizate și numărul de animale din fiecare categorie de severitate (per specie) ?	Specia <sup>(4)</sup>	Numărul total estimat	Numărul estimat în funcție de severitate			
			Fără recuperare	Superficială	Moderată	Severă
	Șobolan	42		36	6	
Ce se va întâmpla cu animalele aflate în viață la finalul procedurii? <sup>(5) (6)</sup>	Numărul estimat care urmează a fi reutilizat	0	Numărul estimat care urmează a fi returnat într-un habitat/sistem de creștere	0	Numărul estimat care urmează a fi relocalat	0
Vă rugăm să furnizați motive pentru situația planificată a animalelor după procedură.	Din cauza intervențiilor specifice de implantare a unor canule respectiv prelevarea de țesut neuronal este imposibilă reutilizarea, returnarea sau relocalarea animalelor.					
Punerea în aplicare a principiului înlocuirii, reducerii și îmbunătățirii						
1. Înlocuirea Indicații alternative disponibile în acest domeniu care nu folosesc animale și motivul pentru care acestea nu pot fi utilizate în scopul proiectului.	Prezentul proiect și-a propus studierea farmacocineticii și efectului vitaminei D pe animale de experiență utilizând teste etofarmacologice, deoarece modelele experimentale in vitro (culturi celulare) sau in silico (modele matematice) nu sunt capabile să ofere informații referitoare la distribuția și transformarea (activarea și inactivarea) vitaminei D la nivelul diferitelor țesuturi, precum nici funcțiile cognitive și memoria nu pot fi studiate decât pe modele experimentale pe animale. Modelul și testele alese sunt larg-utilizate, recunoscute și validate științific, fiind utilizate frecvent și pentru testarea acțiunii medicamentelor.					
2. Reducerea Explicați modul în care a fost stabilit numărul de animale pentru acest proiect. Descrieți măsurile luate pentru a reduce numărul de animale care urmează să fie utilizate și principiile folosite pentru elaborarea de studii. După caz, descrieți practicile care vor fi folosite în cadrul proiectului de reducere la minimum a numărului de animale utilizate în conformitate cu obiectivele științifice. Aceste practici pot include, de exemplu, studii-pilot, modelare pe calculator, utilizare în comun de țesuturi și reutilizare.	În etapa 1, studiul farmacocinetic se realizează pe un număr minim de 6 animale, care din punct de vedere statistic este necesar pentru calcularea variației interindividuale. Tehnica de prelevare folosită permite mai multe testări cu diferite substanțe studiate, așadar numărul de animale utilizate poate fi redus la minimum. În faza a doua, numărul animalelor într-un lot este redus la minimum necesar (n=12) pentru a obține rezultate interpretabile din punct de vedere statistic, menționând că în studiile etofarmacologice, de regulă, se observă o variabilitate interindividuală mare ceea ce impune utilizarea mai multor animale decât în alte tipuri de experimente. Pentru o utilizare cât mai eficientă a probelor biologice obținute din acest studiu, fiecare lot va fi împărțit în două și probele de țesut neuronal vor fi studiate atât din punct de vedere histologic (reorganizarea unor rețele neuronale) cât și farmacologic (modificarea expresiei genice și proteice a receptorilor vitaminei D).					
3. Îmbunătățirea Dați exemple de măsuri specifice (de exemplu, monitorizare sporită, asistență postoperatorie, gestionarea durerii, dresarea animalelor) care urmează să fie luate, în legătură cu procedurile, pentru a reduce la minimum costurile bunăstării (prejudiciile aduse) animalelor. Descrieți mecanismele de preluare a noilor tehnici de îmbunătățire pe durata de viață a proiectului.	Procedurile implicate în proiect provoacă durere minimă, intervențiile chirurgicale se fac sub anestezie profundă cu ketamină (100 mg/kg) -xilazină (10 mg/kg). Postoperator animalele vor fi rehidratate/reechilibrate hidroelectrolitic. Există un risc de mortalitate de sub 10% . Se respectă normele de anti- și asepsie pentru evitarea infecțiilor. În faza postoperatorie (5-7 zile de recuperare) animalele vor fi monitorizate permanent de către un medic veterinar pentru a furniza tratament antibiotic și/sau analgezic în cazul unor complicații.					
Explicați alegerea speciilor și stadiile de dezvoltare aferente.	Pentru atingerea obiectivelor urmărite în prezentul proiect este necesară o intervenție chirurgicală de mare precizie. Sistemul nervos central al șobolanilor este foarte bine cunoscut din punct de vedere anatomic și histologic, ceea ce permite efectuarea operațiilor de implantare de canule cu precizii mari, folosind atlasul de stereotaxie special dezvoltat pentru șobolani, astfel reducând riscul de eșec și mortalitate legată de intervenție chirurgicală.					
Proiectele selectate pentru evaluarea retroactivă <sup>(7)</sup>	Termen-limită	Conține proceduri severe	Utilizează primate nonumane	Alt motiv NU ESTE CAZUL		
<sup>(1)</sup> Inclusiv condițiile științifice care pot conține mai mult de 5 cuvinte, cu excepția speciilor și a scopurilor înscrise în altă parte în document.						

(2) De furnizat printr-un meniu derulant.

(3) Lista scopurilor în conformitate cu categoriile și subcategoriile de raportare statistică anuală.

(4) Specii în funcție de categoriile de raportare statistică anuală, cu o opțiune suplimentară de «mamifer nespecificat» pentru a păstra anonimatul în cazuri excepționale.

(5) Speciile care urmează să fie preluate din răspunsul la întrebarea anterioară, corespunzătoare categoriei relevante (proporții).

(6) Sunt posibile mai multe opțiuni pentru fiecare specie în parte.

(7) Puteți alege mai multe răspunsuri.

---