

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 25/2019

Název projektu pokusů

Modelování perineurálních sítí a gliové jizvy v léčbě míšního poranění
GAČR 19-10365S

Doba trvání projektu pokusů 3 roky od 1.1.2019

Klíčová slova - *maximálně 5* model míšního poranění, perineurální síť, remodelace, gliová jizva

Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka

x	základní výzkum
x	translační nebo aplikovaný výzkum
	vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
	zachování druhů
	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
	trestní řízení a jiné soudní řízení

Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)

Cílem studie je vyhodnotit vliv orální aplikace inhibitoru syntézy kyseliny hyaluronové, 4-methylumbelliferonu (4-MU), v léčbě chronického míšního poranění, a to konkrétně vliv na redukci vzniku gliové jizvy a na remodelaci perineuronálních sítí.

Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů (jak by mohlo být dosaženo pokroku ve vašem vědním oboru nebo jaký přínos by z něj člověk či zvířata mohli mít)

- Po perorální aplikaci 4-MU dojde u zvířat po chronickém míšním poranění ke zlepšení regenerace, zejména z hlediska motorických funkcí. Kombinace podávání 4-MU s rehabilitací bude tento efekt potencovat.
- Modelace perineurálních sítí pomocí 4-MU povede k zesílení plasticity, zvýší se formování nových synapsí, a sníží se vazba efektorů perineurálních sítí na neurony.
- Výsledky umožní vyhodnotit účinnost perorálního podávání 4-MU léčbě chronického míšního poranění.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

350 samců laboratorního potkana kmene Wistar 300-350g

Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?

U modelu míšního poranění pomocí balónkové léze se mohou projevit komplikace související s modelovanou nemocí (sekundární infekce, atrofie svalů etc.).

Navrhovaná míra závažnosti: závažná, jedná se o zásah, kdy v důsledku míšního poranění dochází k omezené hybnosti a citlivosti zadních končetin.

Zvířata budou po ukončení pokusu usmrcena s cílem získat míšní tkáň pro následnou analýzu. V hluboké anestézii chloralhydrátem (100mg/kg) bude provedena transkardiální perfúze paraformaldehydem s následným vyjmutím tkáně. Opětovné použití zvířat nebude prováděno. Usmrcená zvířata budou umístěna ve sběrných nádobách pro kadavery v kafilerním boxu budovy ZS FgÚ. Likvidace zvířat bude provedena asanační službou.

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

Nahrazení používání zvířat: Uved'te, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.

Alternativní metody nepostihují složitost zkoumané problematiky, a proto nemohou nahradit navrhované pokusy. In vitro modelování míšního poranění nezahrnuje celou škálu procesů, které se rozvinou po poškození nervového systému u živého organismu a trvají řádově několik měsíců. Při plánování pokusů byly zvažovány dva typy in vitro modelů – kultura astrocytů a neuronů a in vitro model transektce. Oba modely se používají k navrhování neuroprotektivních strategií po neurotraumatu, pro naše použití jsou však nevhodné. Po míšním poranění je jedním z hlavních sledovaných parametrů zánět, který in vitro modely nepostihují. Zánětlivý proces je velmi komplexní kaskáda dějů, které na sebe složitě navazují, a není možné jeho sledování in vitro v celém jeho rozsahu.

Existence alternativních metod byla ověřena v následujících literárních zdrojích:

<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/animalwelfare.htm>

<http://www.edqm.eu/en/Alternatives-to-animal-testing-1483.html>

Ve všech našich pokusech je navrhovaný minimální počet pokusných zvířat k dosažení sledovaných cílů. Výsledky pokusů budou průběžně vyhodnocovány a v případě získání dostatečného množství dat budou pokusy na zvířatech zastaveny.

Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.

Počty zvířat v jednotlivých skupinách jsou navržena dle Multicenter animal spinal cord injury study, která zhodnotila výsledky několika nejvýznamnějších amerických institucí a navrhla minimální požadavky pro experimentální míšní poranění. -Zvířata z behaviorálních pokusů budou pak perfundována za účelem histologického zpracování a molekulárně-

biologické analýzy.

Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlete volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů.

Vysvětlete obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.

Utrpení zvířat bude zmírněno jednak co nejšetrnějším zacházením, mírněním bolesti a každodenním sledováním jejich životních projevů s cílem odhalení jednotlivých komplikací neurologického poškození. U míšního poranění budeme sledovat každý den močové funkce (manuální vyprázdnění močového měchýře při retenci). V případě hematurie bude zahájena léčba antibiotiky. V celé době trvání pokusů bude zdravotní stav zvířat konzultován s veterinárním lékařem, který navrhne nejvhodnější postupy péče o zvířata s neurologickým poškozením.

Zvířata mohou trpět bolestí, která bude mírněna analgetickou medikací. Všem zvířatům bude bolest tišena carprofenem (Rimadyl a. u. v.) v dávce 5mg/kg sedm dní po operačním zákroku. Poté budou bolest tišící preparáty podány v případě, když budou u zvířat rozpoznány projevy bolesti, jako je vokalizace, piloerekce, změna postoje, čištění, zúžení zornic, změna v obličejí, změny u vousků, změny v pozici uší. U zvířat bude pravidelně sledována jejich hmotnost a její enormní úbytek, nebo naopak nabírání na váze bude dále diagnostikováno s cílem odhalení komplikací neurologického onemocnění a případné medikace. Úzkost a snížení aktivity chování a sociální interakce nebo zvýšená agresivita bude rovněž považováno za znaky komplikace neurologického onemocnění. Zvířata, která budou behaviorálně testována, budou z důvodu minimalizace stresu před zahájením pokusů adaptována na testování. Usmrcení zvířat bude provedeno v hluboké anestézii chloralhydrátem (100mg/kg) provedením transkardiální perfúze paraformaldehydem s následným vyjmutím tkáně.