

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569	
Název projektu pokusů	
Možnosti kontroly zánětu pomocí stimulace nervus vagus u experimentálních modelů subarachnoidálního krvácení a sepse na laboratorním potkanovi	
Doba trvání projektu pokusů - v měsících	60 měsíců
Klíčová slova - <i>maximálně pět ¹⁾</i>	Subarachnoidální krvácení, sepse, zánět, stimulace nervus vagus
Účel projektu pokusů - zaškrtněte políčko; možno i více možností	
☐ základní výzkum	
☒ translační a aplikovaný výzkum	
☐	kontrola kvality (včetně zkoušení bezpečnosti a účinnosti šarže)
☐ legislativní účely	jiné zkoušení účinnosti a tolerance
☐ a běžná výroba	zkoušení toxicity a jiné zkoušky bezpečnosti včetně farmakologie
☐	běžná výroba
☐ ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat	
☐ zachování druhů	
☐ vyšší vzdělávání	
☐ odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí	
☐ trestní řízení a jiné soudní řízení	
☐ udržování populací ustálených geneticky upravených zvířat, která nebyla použita v jiných pokusech	
Cíle projektu pokusů - např. řešení některých vědeckých neznámých nebo vědeckých či klinických potřeb	
Zhodnocení použitelnosti různých cytokinů, zejména cytokinů z rodiny IL-6 jako markerů dynamiky zánětlivé odpovědi a dále zhodnocení možnosti použití stimulace nervus vagus k potlačení zánětu subarachnoidálního krvácení (subarachnoid hemorrhage – SAH), který v počátečním stádiu reprezentuje lokalizovaný zánět a sepse, která je generalizovaným zánětem. Vedlejším cílem je zjistit vliv stimulace na srdeční frekvenci (zjištění rozmezí bezpečných parametrů stimulace) za účelem předejití nežádoucím účinkům stimulace.	
Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů - jak by mohlo být dosaženo vědeckého pokroku nebo jaký přínos by z něj člověk, zvířata či životní prostředí mohli mít; v příslušných případech rozlišujte mezi krátkodobými (v době trvání projektu) a dlouhodobými přínosy (mohou se projevit až po skončení projektu)	
Vzájemné porovnání dynamiky zánětu a efekt stimulace u subarachnoidálního krvácení a sepse by mohlo přinést důležité informace o možnostech diagnostiky a léčby těžkých stavů.	
Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání	
Přímá stimulace nervus vagus – preparace bloudivého nervu v oblasti krku. Nepřímá stimulace – zavedení jehlových elektrod do oblasti zevního zvukovodu. EKG monitoring – zavedení končetinových jehlových elektrod. Perforační model subarachnoidálního krvácení - chirurgická preparace nervově cévního svazku na krku, endovaskulární perforace vnitřní karotické arterie v oblasti větvení na přední a střední mozkovou tepnu. Sepse – intravenózní nebo intraperitoneální aplikace lipopolysacharidu. Stimulace bude následovat bezprostředně (v případě hodnocení efektu stimulace na srdeční frekvenci), nebo 15 minut po navození patologie (subarachnoidální krvácení nebo sepse) a stimulovat se bude po dobu dvaceti minut. Terminální anestezie bude navozena 2 nebo 4 hodiny skončení stimulace.	
Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) a doba trvání těchto účinků	
Zvířata, u kterých bude provedeno hodnocení vlivu stimulace na srdeční frekvenci nenabudou vědomí neboť budou držena v celkové anestezii a na konci experimentu eutanazována. Zvířata s těžkým SAH po operaci vědomí nenabudou z důvodu závažnosti patologického stavu. Septická zvířata budou mít, po ukončení anestezie, tendenci k pomalému nabývání vědomí. Dá se předpokládat, že velká část zvířat v době před terminální anestezí vědomí nenabude. Zvířata s lehkým/středním SAH po operaci nabudou vědomí. Terminální anestezie bude navozena 2 nebo 4 hodiny po stimulaci.	
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu	
	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti

Druh zvířat ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhadovaný počet	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Potkan laboratorní (Rattus norvegicus)	500			500	
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena					
Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití					0
Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu					0
Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu					0
Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - <i>uveďte</i>					
Všechna zvířata budou na konci pokusu usmrcena z důvodu nutnosti odběru vzorků tkání pro další analýzy.					
Uplatňování 3R					
Nahrazení používání zvířat - <i>uveďte, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu</i>					
V databázi alternativních metod EURL ECVAM není uvedena validovaná metoda, která by nahradila navrhované pokusy na zvířatech. Naše experimenty jsou zaměřeny na studium buněčných a molekulárních změn, které lze modelovat pouze v podmínkách organismu <i>in vivo</i> .					
Omezení používání zvířat - <i>vysvětlete, jaký počet zvířat byl pro tento projekt stanoven. Popište kroky, které byly podniknuty ke snížení počtu používaných zvířat, a zásady použité k vytvoření studie; případně popište postupy, které budou používány po celou dobu trvání projektu za účelem minimalizace počtu používaných zvířat a které odpovídají vědeckým cílům (mezi tyto postupy mohou patřit např. pilotní studie, počítačové modelování, sdílení tkání a opakované použití).</i>					
V každé pokusné skupině bude použit pouze minimální nezbytný počet zvířat nutný ke správnému statistickému vyhodnocení. Pokus je plánován na dobu pěti let, od 06/2021 do 06/2026.. Operace budou probíhat po celou dobu pokusu, ročně se plánuje cca. 80 operací. Fáze pokusu: 2021 – skupiny sepse/SAH 2h + hodnocení efektu stimulace na srdeční frekvenci; 2022-2023 - skupiny sepse/SAH 2h + hodnocení efektu stimulace na srdeční frekvenci; 2024 – skupiny sepse/SAH 4h; 2025-2026 - skupiny sepse/SAH 4h. Laboratorní hodnocení získaných vzorků budou probíhat průběžně.					
Šetrné zacházení se zvířaty - <i>uveďte příklady konkrétních opatření (např. zvýšené pozorování, pooperační péče, tlumení bolesti, výcvik zvířat) přijatých v souvislosti s postupy k minimalizaci dopadů na dobré životní podmínky zvířat; popište mechanismy k přijímání vznikajících zmírňujících postupů v době trvání projektu</i>					
Před operací budou zvířata ustájena skupinově. Prostředí jejich ustájení je klidné a má stabilní podmínky (teplota, vlhkost vzduchu, osvětlení). Přístup k potravě a vodě budou mít zvířata po celou dobu pokusu ad libitum. Po transportu bude dodržena patřičná doba k adaptaci zvířat na nové prostředí. Při práci bude používáno klidné zacházení v tichém prostředí. Budou použity takové návyky uchopení rukou i pomůcky, které zvířeti minimalizují strach i bolest z probíhajícího pokusu. Při operačních výkonech bude zajištěna celková anestezie. Před započítím pokusu bude hloubka anestezie a necitlivost k bolestivým podnětům ověřena – pokus bude zahájen pouze v případě absence jakékoliv reakce. Po operaci budou zvířata sledována po dobu 2 nebo 4 hodin a následně utracena za účelem odběru vzorků. S výjimkou operací nebudou zvířata vystavována jiným algickým nebo stresujícím inzultům.					
Použité druhy zvířat - <i>vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií</i>					
Pro navrhovaný pokus byl zvolen potkan laboratorní kmene Sprague Dawley samčího pohlaví v hmotnostním rozmezí 250-320g, který je standardním organismem, na kterém se modeluje subarachnoidální krvácení.					

¹⁾ Včetně vědeckých pojmů, které se mohou skládat z více než pěti jednotlivých slov, a s výjimkou druhů zvířat a účelů uvedených jinde v dokumentu

²⁾ Druhy zvířat v souladu s kategoriemi statistického vykazování v příloze III prováděcího rozhodnutí Komise 2020/569 s doplňkovou možností „**nespecifikovaného savce**“ pro zachování anonymity ve výjimečných případech