

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Duodenální slizniční resurfacing jako faktor glukózové homeostázy

Doba trvání projektu pokusů v měsících	44
Klíčová slova	ZDF- potkan
diabetes mellitus 2. typu	slizniční resurfacing
radiofrekvenční ablace	0

Účely projektu pokusů

Translační a aplikovaný výzkum: Endokrinní/metabolické poruchy u lidí [PT31]

0

0

0

Cíle projektu pokusů

Diabetes mellitus 2. typu je onemocněním zatížené vysokou morbiditou i předčasnou mortalitou, které epidemicky postihuje rozvinuté i rozvojové země.

Cílem projektu je ověřit, zdali modifikace duodenální sliznice endoskopickou technikou slizničního resurfacingu (radiofrekvenční ablace a následná reepitelizace sliznice) vede k ovlivnění glukózového metabolismu v potkaním modelu. Na základě literatury a znalosti fyziologie očekáváme, že po tomto mini-invazivním výkonu dojde ke zlepšení metabolismu sacharidů a zabránění rozvoji cukrovky u potkanů, čímž se otevrou dveře k aplikaci identické metody v humánních experimentech a následnému ověření účinnosti tohoto postupu v léčbě diabetes mellitus 2. typu. Uvedený experiment bude probíhat v přímé návaznosti na projekt „Duodenální slizniční resurfacing jako faktor modulační glukózové homeostázy, projekt GAUK č.1042317“ již řádně schválen MZ ČR pod pořadovým číslem 85/2018.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Výsledky této práce přinesou základní poznatky o vzniku diabetes mellitus 2. typu a zejména o podílu duodenální sliznice na regulaci hodnot plazmatické glykémie. Zároveň výsledky studie poskytnou pilotní data pro využitelnost duodenálního resurfacingu (radiofrekvenční ablace) v terapii cukrovky 2. typu u lidských subjektů. Cílem projektu je ověřit, zdali modifikace duodenální sliznice endoskopickou technikou slizničního resurfacingu (radiofrekvenční destrukce a následná reepitelizace sliznice) vede k ovlivnění glukózového metabolismu v potkaním modelu cukrovky. Naše hypotéza zní, že destrukce duodenální sliznice a její obnovení pozmění endokrinní odpověď této části tenkého střeva (zejména sekreci GLP-1 a GIP) na stimulaci a následně sekreci inzulinu v pankreatu. Předchozí studie na zvířecích modelech i na lidských dobrovolnících prokázaly, že vyloučení kontaktu tráveniny se sliznicí duodena např. pomocí zavedeného plastového rukávu vede ke zlepšené kompenzaci cukrovky. Nicméně tato metoda má řadu komplikací a nevýhod, musí být pravidelně obnovována a zatěžuje pacienta opakovanými endoskopickými výkony. Proto jsou hledány cesty, jak ovlivnit strukturu duodenální sliznice trvale, například pomocí radiofrekvenční ablace sliznice, jak bude provedeno v navrhovaném projektu.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

V celkové anestezii isofluranem bude provedeno odstranění srsti (depilační krém) a jodová desinfekce a následně provedena za kautele aseptické střední laparotomie umožňující optickou kontrolu pro adekvátní zavedení radiofrekvenčního balónkového katetru do duodena a kontrolu rozsahu ablace. Po každém výkonu bude opticky zkontrolován rozsah ablace zejména s cílem okamžitě odhalit případné známky poškození kontinuity tenkého střeva (perforace). Kontrolní operace („shamoperation“) bude provedena identicky, se zavedením radiofrekvenčního katetru, ovšem nebude aplikována radiofrekvenční energie. V případě příznivého nálezu bude provedena sutura laparotomie po vrstvách vstřebatelným materiálem a atraumatickou jehlou. Na konci výkonu, před ukončením celkové anestezie, bude aplikováno analgetikum (buprenorfin dávka: 0.01 - 0.05 mg/kg, s.c.), které bude v případě potřeby podáváno i v pooperačním období po 12 hodinách. Vzhledem k výkonu v dutině břišní ke snížení rizika rozvoje peritoneální infekce bude po výkonu aplikováno antibiotikum (enrofloxacin 5-15mg/kg s.c.), které bude následně podáno ještě v dávkách po 12 hodinách na 3 dny po výkonu. S odstupem 1 měsíce od výkonu budou provedeny metabolické testy (oGTT, IPT - podrobně popsáno v PP). Následně bude proveden odběr vzorků (sval, tuk, jaterní tkáň, duodenum, pankreas) a izolace primárních

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

Trvalé nežádoucí účinky výkonu radiofrekvenční ablace (RFA) nepředpokládáme, jedná se o výkon prováděný v různých indikacích v humánní medicíně. Nelze zcela vyloučit vzácné akutní komplikace v průběhu RFA, zejména pak perforaci stěny trávicí trubice. Investigátoři v průběhu i po dokončení RFA cíleně zhodnotí stav a integritu trávicí trubice a v případě známek perforace budou zvířata utracena předávkováním anestetika. Jelikož bude v průběhu zákroku provedeno otevření dutiny břišní, teoreticky lze zvažovat i obecné chirurgické komplikace (infekce, krvácení, poruchy hojení). Těmto se však lze obvykle vyvarovat dodržováním zásad aseptické a antiseptické a správnou operační technikou. Projekt tak spadá do kategorie střední závažnosti s odpovídající úrovní prevence a léčby bolesti a pooperačního sledování. Po ukončení pokusu budou zvířata uvedena do celkové inhalační anestezie, provedeny odběry krve, tkání a tenkého střeva k mikroskopickému zhodnocení a následně utracena předávkováním anestetika.

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]	40	0	40	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				
Po ukončení pokusu budou zvířata uvedena do celkové inhalační anestezie, provedeny odběry krve, tkání a tenkého střeva k mikroskopickému zhodnocení a následně utracena předávkováním anestetika.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Pro uvedený typ pokusu neexistuje alternativní metoda vzhledem k endokrinním mechanismům způsobujícím diabetický fenotyp a k sekreci klíčových endokrinních substancí duodenální sliznicí invivo. Rovněž intervenci na duodenu v podobě radiofrekvenční ablace nelze modelovat jinými přístupy a z podstaty experimentu musí být provedena na živém organismu. Laboratorní potkan, zejména kmen ZDF, je nejvhodnějším druhem pro tuto studii, jelikož se u něj spontánně rozvíjí diabetes mellitus 2. typu, včetně inzulinové rezistence a poruch sekrece inzulinu v pankreatických beta buňkách.				
Omezení používání zvířat				
Počet zvířat užitých v každé skupině byl stanoven na základě literárních údajů jako minimální počet nutný k detekci cca 25% rozdílů mezi skupinami. K redukci počtu zvířat dále dochází vysokou technickou zdatností investigátorů a stanovením maximálního počtu proměnných s využitím jednoho zvířete, včetně využití histologických a molekulárních metodik.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Invazivní procedury jsou vykonávány v celkové anestezii s následnou pooperační analgezií. V rámci experimentu nebudou omezeny sociální interakce ani kvalita života pokusných zvířat. Se zvířaty budou manipulovat výhradně osoby s platným osvědčením v rámci zákona na ochranu pokusných zvířat.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

S ohledem na možné selhání intervence, či pooperační komplikace, bude celkový počet zvířat použitých v rámci této studie odhadován na n= 40 potkanů kmene ZDF v následující struktuře:

- 10 heterozygotních potkanů kmene ZDF – k optimalizaci experimentálních procedur.
- 15 homozygotních potkanů kmene ZDF – bude provedena ablace duodenální sliznice.
- 15 homozygotních potkanů kmene ZDF – bude provedena kontrolní operace(„shamoperation“)

S ohledem na možné selhání intervence, či pooperační komplikace, bude celkový počet zvířat použitých v rámci této studie odhadován na n= 40 potkanů kmene ZDF v následující struktuře:

- 10 heterozygotních potkanů kmene ZDF – k optimalizaci experimentálních procedur.
- 15 homozygotních potkanů kmene ZDF – bude provedena ablace duodenální sliznice.
- 15 homozygotních potkanů kmene ZDF – bude provedena kontrolní operace(„shamoperation“)