

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Popálení u myši (Scalded mice model)

Doba trvání projektu pokusů v měsících	60
Klíčová slova	model popálení
myši	opioidní receptory
chemokiny	cytokiny

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Nervová soustava [PB3]

0

Základní výzkum: Multisystémové [PB11]

0

Cíle projektu pokusů

Cílem projektu bude sledování vybraných prozánětlivých chemokinů (CCL2, CCL21, CXCL12, and a CXCR4), prozánětlivých cytokinů (s IL-1b, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-12p70, IL-17, GM-CSF, KC, MIP-1a, RANTES, a TNF), protizánětlivých cytokinů (IL-10, G-CSF, and IFN-c) a opioidních receptorů (MOR, KOR a DOR) imunohistochemickými metodami a metodami molekulární biologie (Western blot, PCR). Dále bude elektrofyziologickými metodami prokazována přítomnost funkčních opioidních receptorů (MOR, DOR a KOR) v kůži experimentálních zvířat. □

Potenciální přínosy projektu pokusů

Model popálení se používá ke studiu popáleninových infekcí a jejich léčbě. Popálení indukuje relativně jedinečný komplex změn, který významně mění funkční stav imunitního systému. Současná léčba popálenin se soustřeďuje na léčbu komplikací, jako je infekce, bolest a poruchy hojení.

Opioidy jsou stále lékem první volby při zvládnutí bolesti u popálenin. Různé opioidy se však liší ve své schopnosti potlačit rozvoj bolesti nejen pro jejich vazbu na různé opioidní receptory, ale také protože aktivují různé intracelulární signální cesty i po navázání na stejný receptor. Použití opioidů jako analgetik také může vést k negativním efektům, které komplikují léčbu, včetně rizika rozvoje tolerance a indukce hyperalgie. Navíc popálení způsobuje takové molekulární změny, které mohou vést k redukcii antinociceptivního potenciálu opioidů. To může být způsobeno snížením exprese opioidních receptorů. Proto budeme sledovat všechny tři základní opioidní receptory (MOR, KOR, DOR). Cílem současných studií je však také identifikace nových neopioidních přístupů k léčbě bolesti založených na změnách molekulárních mechanismů, ke kterým u popálenin dochází. Je prokázáno, že v závislosti na závažnosti tepelného poškození dochází ke změnám jak vrozené, tak získané imunitní odpovědi, které mění

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

K experimentům budou myši rozděleny do skupin podle rozsahu % tělesného povrchu při popálení (TBSA). K výpočtu celkového tělesného rozsahu se používá tzv. Meeh's formula $A = KW^{\frac{2}{3}}$, kde A je celkový rozsah v našem případě počítaný v cm², K je specifická konstanta pro jednotlivá zvířata. Pro myši je 10. Z výpočtu vyplývá, že při hmotnosti jedince 30 g je celkový tělesný rozsah 90 cm². Obecně však platí pravidlo, že popálením nesmí být překročen rozsah 35 % tělesného povrchu (TBSA).

Jako model jsme zvolili model opaření myši (scalded mice model). V modelu se použije 50 ml plastová zkumavka na centrifugu s držadlem, ve které je vytvořeno okénko příslušných rozměrů (viz.níže), a dále vodní lázeň, do které bude zkumavka s experimentálním zvířetem ponořena.

Po uvedení zvířat do celkové anestézie (směsí ketaminu a xylazinu i.p.) jim bude odstraněna srst z dorzální a ventrální části těla. Dále budou zvířata rozdělena do čtyř skupin: naivní, 10 % TBSA, 25 % TBSA a sham operování. K páteři jim bude subkutánně aplikován fyziologický roztok (1 ml) jako prevence poškození míchy. Zvířata budou umístěna do velké plastové laboratorní zkumavky na centrifugu s okénkem vystavující pouze předem stanovenou plochu povrchu kůže, jak bylo vypočítáno Meehovou

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

Během experimentu očekáváme, že zvířata budou pociťovat různou míru bolesti, v závislosti na rozsahu poškození. Dále se u nich může objevit stres, snížená chuť k jídlu a snížená aktivita. Negativní projevy chování a zdravotního stavu se budou v průběhu pokusu vracet k normálnímu stavu.

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	0	500

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

Eutanázie bude realizována formou předávkování anestetika nebo oxidem uhličitým. Likvidace mrtvých zvířat je organizována LF MU. Mrtvá zvířata jsou ukládána předepsaným způsobem do mrazicího boxu pro kadavery označeného VŽP a následně odvážena.

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat

Žádnou z alternativních metod (např. buněčnou linii) není možno v našem případě uplatnit jako adekvátní náhradu pokusů. Naše experimenty jsou zaměřeny na studium buněčných a molekulárních změn, které lze modelovat pouze v podmínkách organismu in vivo. Po prostudování informací „European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing“ (<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>) jsme zjistili, že zde není uvedena validovaná metoda, která by nahradila navrhované pokusy na zvířatech.

Omezení používání zvířat

V každé pokusné skupině bude použit pouze nezbytný počet zvířat nutných ke správnému statistickému vyhodnocení. Navrhované schéma pokusu minimalizuje počty experimentálních zvířat, která budou použita pro experimenty in vivo. Vzorky pro imunohistochemickou detekci se odebírají z nafixovaného zvířete (za pomoci Zamboniho fixačního roztoku), vzorky pro Western Blot se odebírají z fresh materiálu (tzn. bez fixace) a vzorky pro elektrofyziologické vyšetření se odebírají ve speciální elektrofyziologické laboratoři. Z toho vyplývá, že vyžadují jiný způsob usmrcení zvířete a postup přípravy, tudíž nemohou být odebrány ze stejné pokusné skupiny zvířat. Z důvodu statistické validity výsledků experimentů není možné dále snížit počty zvířat, což potvrzuje i dostupná vědecká literatura včetně publikovaných protokolů (ověřeno v databázích Medline PubMed a Web of Science, březen 2021)..

Šetrné zacházení se zvířaty

Pokusné zvíře bude po přinesení do laboratoře ponecháno před zahájením pokusu v klidu minimálně 30 min. Anestezie bude provedena injekčně a zvíře pak bude ponecháno v klidu až do plného nástupu účinku anestetik. Před započatím pokusu bude hloubka anestezie a necitlivost k bolestivým podnětům ověřena– pokus bude zahájen pouze v případě absence jakékoliv reakce.

Použité druhy zvířat - vysvětlení

U studií popálenin jsou in vitro modely omezené ve schopnosti zachytit všechny aspekty patofyziologie popálenin. Popáleniny vyvolávají strukturální a funkční změny v řadě orgánových systémů. Vzhledem ke komplexnosti a vlivu na více orgánů jsou zásadní in vivo experimentální zvířecí modely. I přes některé zásadní rozdíly je stále nejpoužívanější myší model. Největší výhodou je nízká morbidita díky kratší době hojení a dobré imunitě. Žádnou z alternativních metod (např. buněčnou linii) není možno v našem případě uplatnit jako adekvátní náhradu pokusů. Naše experimenty jsou zaměřeny na studium buněčných a molekulárních změn, které lze modelovat pouze v podmínkách organismu in vivo. Po prostudování informací „European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing“ (<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>) jsme zjistili, že zde není uvedena validovaná metoda, která by nahradila navrhované pokusy na zvířatech.