

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Studium orofaciální neuropatické bolesti na modelu ligatury nervus infraorbitalis u potkana

Doba trvání projektu pokusů v měsících

60

Klíčová slova

orofaciální hyperalgezie

neuropatická bolest

chemokiny

ligatura nervus infraorbitalis

0

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Nervová soustava [PB3]

0

0

0

Cíle projektu pokusů

Cílem projektu je studium buněčných změn a změn v detekci a expresi vybraných chemokinů (CX3CL10, CXCR3, CX3CL13, CXCR5, CXCL12, CXCR4, CXCL1, CXCR2) a TLR7, TLR8 na úrovni prvních tří neuronů trigeminální dráhy po unilaterální IONL. Vybrané chemokinové systémy hrají roli v senzitivaci neuronů trigeminální dráhy, čímž se mohou stát terapeutickým cílem v léčbě trigeminální hyperalgezie. Základní výzkum přináší nové poznatky o regulaci zánětlivých mediátorů a jejich možném ovlivnění v neuronech, což je nezbytné v rozvoji nových klinických přístupů, vedoucích ke snížení rizika vzniku trigeminální neuropatické bolesti.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Trigeminální neuropatická bolest způsobená poškozením nervus trigeminus je v porovnání s ostatními typy neuropatické bolesti velmi intenzivní a extrémně zatěžující. Většina dosud publikovaných experimentálních výsledků, popisujících buněčné a molekulární změny, vedoucí k rozvoji neuropatické bolesti, je založena na modelu poranění míšních nervů. Dosavadní experimentální studie zabývající se mechanismy vzniku trigeminální neuropatické bolesti jsou velmi omezené. Projekt může pomoci s využitím vybraných chemokinových systémů k potlačení rozvoje trigeminální hyperalgezie a léčbě orofaciální neuropatické bolesti.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Jako model orofaciální neuropatické bolesti (TNP) bude zvolena ligatura nervus infraorbitalis (IONL).

Po uvedení zvířat do celkové anestézie (směs ketaminu - Narkamon 100 mg/ml (0,4 ml) a xylazinu – Rometar 20 mg/ml (0,2 ml), i.p.) jim bude provedena operace modifikovaným postupem dle Vos et al. (1994). Bude jim odstraněna srst z levé strany tváře, v oblasti mezi mediálním očním koutkem a nosní dírkou. Za použití operačního mikroskopu Zeiss bude proveden horizontální řez ve středu této spojnice. Po rozvláknění svalů se v hloubce objeví nervus infraorbitalis (ION) vystupující z fissura infraorbitalis, který se zde následně podváže dvěma ligaturami (6-0 Ethicon) za aseptických podmínek. Rána bude poté zašita a ošetřena Betadinou. Během první fáze experimentu budou na zvířatech prováděny behaviorální testy. Prahová hodnota mechanické hyperalgezie bude měřena v oblasti hmatových vousů modifikovanou metodou dle Vos (1994). Potkani budou aklimatizováni 2 hodiny před měřením v čirých plastových boxech kvůli adaptaci na nové prostředí. K měření bude použita vzestupná řada Von Freyových monofilament (Semmes-Weinstein Monofilaments, North Coast Medical, Inc., USA). Na oblast hmatových vousů, inervovanou ION, bude manuálně aplikováno každé vlákno třikrát na dvou různých místech (interval asi 1 s), s intervalem 5 minut mezi jednotlivými

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
potkan laboratorní (Rattus norvegicus) [A2]	0	0	530	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

Eutanázie bude realizována oxidem uhličitým. Likvidace mrtvých zvířat je organizována LF MU. Mrtvá zvířata jsou ukládána předepsaným způsobem do mrazicího boxu pro kadavery označeného VŽP.

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 (červen 2021).

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. 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, červen 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

Zvířecí modely jsou zásadní pro pochopení mechanismu neuropatické bolesti a pro vývoj účinné terapie. Při vzniku neuropatické bolesti dochází k rozvoji řady buněčných a molekulárních změn, které nejsou zachytitelné in vitro modely. Vzhledem ke komplexnosti jsou zásadní in vivo experimentální zvířecí modely. Nejpoužívanějšími zvířaty u studií trigeminální neuropatické bolesti jsou potkan a myš. Vzhledem k předchozím zkušenostem jsme zvolili model na potkanech, který máme prostudovaný. V průběhu všech pokusů během pětiletého časového období plánujeme využít 530 ks potkaních samců kmene Wistar hmotnosti 250 - 270 g, na kterých bude proveden model orofaciální neuropatické bolesti. Pro experimenty bude použito 106 zvířat ročně, což je minimální počet pro statistické vyhodnocení experimentu. Navrhovaný model je standardně používán renomovanými světovými pracovišti. 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.