

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

Reakce jaterní tkáně na transplantaci Langerhansových ostrůvků

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

25

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾

Langerhansovy ostrůvky, játra, cholangiogenní cysty, imunosupresiva

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

Transplantace Langerhansových ostrůvků (LO), je v současné době klinicky využívanou metodou léčby diabetes mellitus 1. typu. Izolované LO se při transplantaci infundují do kmene portální žíly jater. Přilehlé jaterní buňky jsou pak trvale vystaveny účinku inzulinu v suprafyziologické koncentraci. Na potkaních modelech byly popsány neoplastické změny přilehlých hepatocytů a cholangiocytů po transplantaci LO. Cíl předkládaného projektu:

Posouzení protektivního efektu vybraných léčiv (mTOR inhibitorů, kalcineurinových inhibitorů a metforminu) u inzulin senzitivní potkanů BN na vývoj neoplastických změn v játrech po transplantaci LO.

1. monitorování dynamiky akumulace lipidů sonograficky/magnetickou rezonancí při terapii vybranými léky a následné morfologické vyšetření (14 dní, 1 měsíc a 3 měsíce po transplantaci LO)
2. monitorování dynamiky rozvoje cyst sonograficky/magnetickou rezonancí při terapii vybranými léky (3, 6, 8, 10 měsíců po transplantaci LO)
3. posouzení významu inzulinové rezistence na vznik a progresi morfologických změn v játrech příjemců. (Pomocí imunohistochemie detekujeme změny u jednotlivých členů inzulinové kaskády v játrech)

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)

Objasnění protektivního efektu vybraných imunosupresiv odpoví na otázku, jestli je vysazení mTOR inhibitorů po transplantaci LO bezpečné a jaká imunosupresiva s antiproliferativním účinkem by byla nejvhodnější pro užití v klinické praxi.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání

- Aplikace léčiv rozpuštěných ve vodě (Glukophage 1000) – pitný režim.
- Aplikace léčiv sondou do žaludku v maximálním objemu 1 ml každý všední den (Sandimmun neoral sirup, Rapamune).
- Odběr maximálně 1 ml krve z ocasní žíly (po týdnu a 14 dnech od první aplikace léčiv).
- Izolace pankreatických ostrůvků se provádí v celkové anestézii intramuskulární. Střední laparotomií je otevřena břišní dutina, usmrcení zvířete vykrvením a další zpracování pankreatu in vitro.
- Transplantace ostrůvků do jater se provádí v celkové anestézii (isofluran – 5% indukce, 2% vedení inh. + butorphanol 1mg/kg i.m.). Po otevření břišní dutiny je do ileocékální žíly infundován roztok s izolovanými ostrůvky. Po 30–60 vteřinách se vyjímá jehla, krvácení se zastavuje hemostatickou pěnou. Bolest po operaci je tlumena podkožní injekcí analgetik (meloxicam – 1 mg/kg s.c.).

- Vyšetření magnetickou rezonancí nebo sonografické vyšetření se provádí v celkové ventilační anestezii isofluranem (úvodní koncentrace ve vzduchu 5%, následuje udržovací fáze s 1.5% koncentrací), specifická kontrastní látka se podává intravenózně nekovovým katetrem zavedeným do periferní žíly. Vyšetření bude prováděno po 14 dnech, 1, 3, 6, 8 a 10 měsících od transplantace LO.
- Diabetes se navozuje intraperitoneální injekcí streptozotocinu (50 mg/kg u potkana).
- Glykemie se měří 1x týdně glukometrem z kapky venózní krve získané punkcí postranní ocasní.

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) **a doba trvání těchto účinků**

Neočekáváme nežádoucí účinky. Zvířata použitá jako dárci pro izolaci Langerhansových ostrůvků nenabudou vědomí. Zvířata, kterým budou transplantovány ostrůvky, podstoupí pokusy střední závažnosti. Nežádoucím účinkem plynoucím z navrhovaného projektu je vyvolaná hyperglykemie po navození diabetu. Míra závažnosti plynoucí z přetrvávající hyperglykemie je vzhledem k rychle navazující transplantaci a terapii diabetu nízká.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

Druh zvířat ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhadovaný počet	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
		Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Potkan laboratorní (Rattus norvegicus)	109	70		39	
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					

Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena

Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití	---
Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu	---
Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu	---

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - *uveďte*

Všechna laboratorní zvířata v tomto projektu budou na konci projektu usmrcena.

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat - *uveďte, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu*

Studium vlivu transplantovaných Langerhansových ostrůvků na játra se neobejdou bez použití laboratorních zvířat. Prohlašuji, že tento pokus je nezbytné provést s využitím laboratorních zvířat.

Omezení používání zvířat - *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).*

Celkové počty experimentální zvířat byly zvoleny na nejnižších počtech umožňujících statistické porovnání skupin. Langerhansovy ostrůvky není možné získat jiným způsobem než izolací z pankreatů čerstvě usmrcených dárců - v našem případě potkanů Brown Norway.

Šetrné zacházení se zvířaty - *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*

Se zvířaty bude zacházet pouze vyškolený personál. Veškeré chirurgické zákroky budou prováděny v celkové anestezii. Předpokládaná bolest po zákroku bude mírněna podáním analgetik.

Použité druhy zvířat - *vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií*

Pro předkládaný projekt plánujeme použít potkany kmene Brown Norway, samce ve věku 10 – 12 týdnů (220 - 250 g na začátku pokusu), protože je známa jejich vysoká citlivost k inzulínu a tedy poměrně nízká náročnost na množství transplantované inzulín produkující tkáně. Druhým důvodem pro volbu tohoto kmene je velká zkušenost pracovníků laboratoře právě s tímto kmenem laboratorního potkana.

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.