

NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Vliv terapeutické hypotermie na farmakokinetiku paracetamolu, bezpečnost a potenciální neuroprotektci v Rice-Vannucciho modelu hypoxicko-ischemického poškození mozku novorozenečích potkanů

Doba trvání projektu pokusů v měsících	36
Klíčová slova	hypoxicko-ischemická encefalopatie
terapeutická hypotermie	paracetamol
neuroprotektce	potkan

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Gastrointestinální systém včetně jater [PB5]

Translační a aplikovaný výzkum: Nervové a duševní poruchy u lidí [PT24]

0

0

Cíle projektu pokusů

Neonatální hypoxicko-ischemická encefalopatie (nHIE, poškození mozku novorozenců z nedostatku přísunu kyslíku a prokrvení dané snížením či zástavou cirkulace) představuje jednu z nejzávažnějších příčin úmrtnosti a nemocnosti novorozenců. Účinnost současné léčby nHIE je poměrně nízká. Rutinně používaná terapeutická hypotermie (TH, tj. snížení tělesné teploty na 33-34 ° C) je účinná pouze částečně. Pro zvýšení hypotermické ochrany nervové tkáně (neuroprotektce) jsou testovány léky jako erythropoetin, antikonvulziva, antioxidanty a inertní plyny. Na druhé straně může snížení tělesné teploty dítěte vést k významným změnám farmakokinetiky léků (dostupnosti a pohybu léčiv v organismu), včetně zvýšené distribuce léků rozpustných v tucích; snížení metabolismus v játrech; snížené vylučování ledvinami. Paracetamol, acetaminofen (APAP), je léčivo, které se u novorozenců používá především jako účinné a bezpečné analgetikum k potlačení bolesti; jeho účinnost je studována i u předčasně narozených dětí s otevřenou Botallovou dužejí. Účinek APAP však nebyl doposud studován za podmínek celotělové hypotermie aplikované u novorozenců s přerušovanou dodávkou kyslíku do organismu (asfyktických novorozenců). Doposud nejsou k dispozici žádné údaje o farmakokinetice, účinnosti a bezpečnosti APAP pro novorozence za těchto podmínek. Zde předkládaná studie byla proto navržena

Potenciální přínosy projektu pokusů

Výsledky studie získané na experimentálních zvířatech, resp. potkaních mláďatech ve věku 7 a 10 dní, mohou pomoci k lepšímu porozumění mechanismů neonatální hypoxicko-ischemické encefalopatie (poškození mozku novorozenců z nedostatku přísunu kyslíku a prokrvení) za současného uplatnění léčebného podchlazení a nově i podání paracetamolu, které by vedly k optimalizaci způsobů terapie novorozenců s přerušovanou dodávkou kyslíku do organismu, jenž jsou v klinické praxi omezené.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Potkaní mláďata PND 7 a PND 10 budou vystavena snížené teplotě prostředí (33,5 ± 0,3 ° C) nebo normotermii (36,5 ± 0,3 ° C) v komoře s řízenou teplotou po dobu nejméně 90 minut a maximálně po dobu 6 hodin. Potkaním mláďatům bude podán jednorázově fyziologický roztok nebo APAP intravenózně krční žílou nebo orálně žaludeční sondou (obě v bolusovém objemu 50-100 microL na 10 g tělesné hmotnosti) 1 hodinu po zahájení normotermie či hypotermie. Během tohoto experimentu budou zvířata krátce vyjmuta z příslušných teplotních komor pro monitorování tělesné teploty (každou hodinu) a pro aplikaci APAP a poté vrácena. Vhodná teplotní sonda bude vložena 5 mm do konečníku pro měření rektální teploty. Mláďata budou odebrána v časových bodech 20, 120, 180 a 300 minut po intravenózním nebo perorálním podání paracetamolu. Pro každý časový bod po podání APAP a každé teplotě budou 3 mláďata dekapitována v hluboké inhalační anestezii isofluranem (4% ve vzduchu) a budou terminálně odebrány vzorky krve, moči, jater a mozku. Jiná mláďata PND 7 (váží 13-18 g) budou anestetizována isofluranem a levá společná krční tepna bude podvázána chirurgickým hedvábím. Řez na krku bude sešit a mláďatům bude umožněno zotavit se z anestezie po dobu jedné hodiny v péči své vlastní matky. Následně budou mláďata vystavena hypoxii (vdechování 8% kyslíku, dosažené smícháním

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

Všechny operační zákroky, vyšetření mozku pomocí zobrazovacích metod (MRI/MRS) a terminální odběry budou prováděny v celkové inhalační anestezii isofluranem (4% pro indukci event. u terminálního podání, 2% pro udržování v průběhu operačního zákroku a MRI/MS). V místě sutury kožního řezu bude mláďatům aplikováno lokální anestetikum ve spreji (lidokain 10% kožní sprej). Opakované oddělování mláďat od kojící matky může působit stres jak matce, tak mláďatům. Proto nebudou nikdy oddělována všechna mláďata od 1 samice. Změny okolní teploty mohou také způsobovat opakovaný stres, na druhou stranu hypotermie u takto starých mláďat vyvolává snížení všech metabolických procesů (včetně mozku), určité anestetické účinky a zmírnění bolestivých vjemů (snížené vnímání). Hypoxicko-ischemický inzult u mláďat vyvolá očekávaný rozvoj neonatální hypoxicko-ischemické encefalopatie s možným zvýšením morbidity a mortality. Studovaná látka bude aplikována perorálně nebo intravenózně pouze jednorázově. Tato aplikace může vyvolat krátkodobý stres spojený s manipulací a bolestivostí danou vpichem jehly. Pro perorální aplikaci budou používány jednorázové umělohmotné sondy vhodné pro daný věk.

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	466	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 provedení postupu budou mláďata usmrcena dekapitací v hluboké terminální inhalační anestézii z důvodů odběrů vzorků krve, mozku, jater, a event. i moče a ledvin. Samice budou po odstavení všech (posledních) mláďat ihned humánně utraceny předávkováním inhalačním anestetikem a zajišťovacím zlomením vazů z důvodu neúměrného stresu způsobeného odejmutím všech mláďat při stávající laktaci.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Vzhledem k charakteru pokusů, tj. sledování změn farmakokinetiky a možného neuroprotektivního vlivu paracetamolu (APAP) na vývoj mozku u mláďat vystavených terapeutické hypotermii (HT) a difúznímu hypoxicko-ischemickému (HI) poškození mozku, nelze pokusy na pokusném zvířeti nahradit alternativními metodami.				
Omezení používání zvířat				
Bude použit minimální počet březích potkaních samic a jejich mláďat zajišťující statistickou významnost pokusu, a to na základě řady literárních údajů a námi vypracovaného statistického plánu. S ohledem na vysokou interindividuální variabilitu u konvenčních zvířat byl minimální počet mláďat ve skupině pro testování farmakokinetiky paracetamolu stanoven na 3 ks pro každý časový interval u mláďat starých 7 a 10 dnů pro každé pohlaví vystavené normální teplotě nebo hypotermii a 6 ks přeživších mláďat pro každou skupinu ve studii průkazu potenciace neuroprotektivního působení terapeutické hypotermie paracetamolem.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Experimenty budou prováděny v akreditovaných zvířetnicích v souladu se zákonem a s ohledem na maximální welfare zvířat. Se zvířaty bude zacházeno co nejšetrněji dle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání a s ohledem na jejich fyziologické potřeby. O pokusná zvířata budou pečovat osoby odborně způsobilé k této práci. Potkaní samice budou chovány ve standardních konvenčních podmínkách v odpovídajících klecích (voda a potrava ad libitum, pravidelná výměna podestýlky, atd.) a budou denně kontrolovány. Samice budou před porodem samostatně v kleci, bude umožněn spontánní vaginální porod. Každá samice bude po porodu s 10 mláďaty, která budou plně kojena a postupně oddělována od 7. resp. 10 postnatálního dne od kojící samice na maximálně 6 hodin. Mláďatům bude jednorázově aplikován paracetamol nebo fyziologický roztok standardním šetrným způsobem (perorální gaváž/intravenózní injekcí) dostatečně zaškolenou osobou. Mláďatům bude rektálně každou hodinu měřena tělesná teplota, aby nedošlo k přehřátí nebo přílišné hypotermii, navíc budou denně váženy a sledován neurobehaviální vývoj. Po každém zákroku budou neutracená mláďata vrácena vždy ke své matce ke zmírnění stresu, a aby mohla být nakojena. V případě pozorování závažných negativních změn u laboratorního zvířete bude pokus ukončen a zvíře utraceno předávkováním anestetikem.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Na celou studii je plánováno použít maximálně 50 březích samic kmene Wistar k získání minimálně 416 mláďat (maximální počet narozených mláďat nelze dopředu přesně určit).

K experimentům budou použita potkaní mláďata obou pohlaví ve věku 7 nebo 10 dnů. V postnatálním věku 10 dnů (PND 10) jsou vývoj a dospívání mozku potkana histologicky podobné vývoji

a dozrávání donošených kojenců (37–41 týdnů těhotenství). Nezralá potkaní mláďata ve věku 7 dnů (PND 7) obou pohlaví budou použita jako reprezentanti mírně předčasně / blízko termínu narozených (32–36 týdnů těhotenství) kojenců. Na tomto druhu zvířat byl zaveden Rice-Vannucci model hypoxicko-ischemického poškození mozku novorozenech potkanů, který bude použit i v této studii.