

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569	
Název projektu pokusů	
Zavedení metody analýzy mikrodialyzátů přístrojem QTRAP 6500 v kombinaci s mikroprůtokovou kapalinovou chromatografií.	
Doba trvání projektu pokusů - v měsících	Doba trvání projektu je od schválení projektu pokusů do 31. 12. 2023
Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾	Mikrodialýza, návykové látky, neurotransmitery, farmakokinetika
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
☐	a běžná výroba
☐	jiné zkoušení účinnosti a tolerance
☐	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	
Cílem projektu je zavést a optimalizovat mikrodializační analýzu přístrojem QTRAP 6500 mikroLC-MS/MS na našem pracovišti. Zavedená metodika bude využívána v dalších experimentech hodnotící vliv návykových látek na organismus a jejich farmakokinetiku.	
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)	
Zavedením metodiky se eliminuje se riziko znehodnocení vzorků kvůli transportu (stabilizační činidlo, zamražení apod.) Zavedení analýzy séra pro farmakokinetické měření by znamenalo výraznou redukci počtu zvířat pro stanovení křivky koncentrace měřené látky v čase.	
Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání	
<u>Mikrodialýza CNS</u> Zvířata určená na mikrodializační experimenty budou před vlastním sběrem mikrodialyzátu naoperována v celkové anestezii (inhalační či injekční). K navození inhalační anestezie použijeme 5,0% isofluran ve směsi vzduchu a kyslíku. Po navození v průběhu pokusu bude anestezie udržována < 2,0% isofluranu. Pro injekční anestezii bude použit ketamin/xylazin (50 mg/kg i. p.). Během operace bude do cílové struktury nucleus accumbens (NAcc) / medial prefrontal cortex (mPFC) / Dorsal raphe nucleus (DRN) zavedena vodící kanyla. Po 7 denní rekonvalescenci bude zvířatům vodící kanylou zavedena CNS proba. <u>Mikrodialýza vena jugularis</u> Každému jedinci bude v celkové anestezii v aseptickém prostředí, sterilními nástroji a s použitím lokální desinfekce (Betadine) zaveden venou jugularis permanentní katetrem s perferní probou do srdce. Katetr bude vyveden podkožím a fixován mezi lopatkami zvířete. Katetr bude proplachován denně fyziologickým roztokem s heparinem (Heparin Leciva inj. sol. 1x10 ml/ 50 IU; 5 IU), preventivně podle potřeby na základě zjištěného zdravotního stavu podávána antibiotika (cefalosporin 0,05 mg/kg s.c.) a analgetikum – s.c. meloxicam 1mg/kg/s.c. (Metacam 1,5 mg/ml). Látky budou aplikovány subkutánně injekčně.	

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) a doba trvání těchto účinků					
Střední závažnost: Všechny testy mohou zvířeti způsobit krátkodobý stres. Zvířata budou usmrcena dekapitací nebo předávkováním isofluranovou anestézií a poté deponována v kafilerním boxu.					
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)	250			250	
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 - <i>uved'te</i>					
Uplatňování 3R					
Nahrazení používání zvířat - <i>uved'te, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu</i>					
V těchto pokusech není možné zvířata (v tomto případě potkany) nahradit (např. alternativa buněčných kultur nemůže být v tomto případě použita).					
Omezení používání zvířat - <i>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).</i>					
K dosažení statisticky relevantních výsledků je naplánován nejmenší nutný počet zvířat.					
Šetrné zacházení se zvířaty - <i>uved'te 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</i>					
Se zvířaty bude zacházeno s citlivým přístupem a v maximální míře bude minimalizováno vystavení stresovým situacím, především díky průběžnému handlingu. Průběh experimentů i euthanasie budou ke zvířatům v rámci možností co nejvíce šetrné.					
Použité druhy zvířat - <i>vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií</i>					
Experimenty budou provedeny na potkaních samcích kmene Wistar, o váze 200 – 350 g. Celkem bude použito maximálně 250 jedinců. Stáří a druh zvířat byl zvolen s ohledem na povahu prováděného pokusu.					

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