

§ 40 NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

NÁZOV PROJEKTU

Úloha pohlavných hormónov pri infekciách močových ciest

CIEĽ PROJEKTU

Cieľom projektu je identifikácia molekulárneho mechanizmu rôznych antimikrobiálnych efektov steroidov na uropatogénne baktérie, čo má význam nielen pre možné odhalenie príčin a potenciálnych terapeutických cieľov u pacientov s infekciami močových ciest, ale môže prispieť k nastaveniu rozdielnej liečby u žien a mužov. Náš projekt bude realizovaný výhradne na experimentálnych zvieratách, pretože ich použitie je v súčasnosti jedinou možnosťou ako adekvátne pozorovať a popísať dané mechanizmy. Budeme kombinovať jednotlivé faktory takým spôsobom, ako sa to deje priamo u pacientov, hoci to nesporne zvyšuje variabilitu a komplikuje interpretáciu. Zároveň však znižuje riziko klinicky irelevantných výstupov, ktoré nie sú reprodukovateľné kvôli mnohým špecifickým faktorom ako je napr. genetické pozadie zvierat.

OČAKÁVANÁ PRÍNOS A UJMA

Zvieratá budú podstupovať úkony, patriace do kategórie slabé až stredné. Jednoznačnou ujmom je podstúpenie operačného zákroku, a hormonálna manipulácia (podávanie testsoterónu, estradiolu, gonadektómie), čo môže pre zvieratá predstavovať stres a aj bolesť. V prípade týchto úkonov, ktoré by stres mohli zvýšiť budeme minimalizovať stres, utrpenie minimalizovať podávaním dostatočných dávok anestetík a analgetík. Predpokladáme perioperačnú úmrtnosť okolo 10% u skupiny, kde sa budú v mini-invazívnym prístupom podávať baktérie. Samostatným stresom i keď relatívne nízkym bude handlovanie zvierat, denná manipulácia s nimi ako i krátkodobý stres spôsobený relatívne stiesnenými priestorovými podmienkami po umiestnení do metabolickej kletky, ktorá slúži na odber moča. Handlovanie ale postupne bude viesť k habituácii a stres sa bude znižovať a zároveň následná manipulácia pri ostatných postupoch bude nižšia.

Význam tejto práce spočíva najmä v kontexte zvyšujúcej sa antibiotickej rezistencie uropatogénnych baktérií, kedy akákoľvek alternatívna alebo úplne nová liečba je viac ako vítaná. Tento projekt si kladie za úlohu zodpovedať otázku do akej miery ovplyvňujú pohlavné hormóny priebeh UTI na *in vivo* zvieracích modeloch, vzhľadom na to, že výsledky *in vitro*

experimentov využitie steroidov ako alternatívnu alebo aspoň doplnkovú liečbu UTI podporujú. Predpokladáme, že steroidné látky majú schopnosť aktivovať/deaktivovať vrodenuú imunitu, čím potenciálne môžu prienik baktérií do vyšších častí uropoetického aparátu (obličky) spomaliť až zastaviť. Prínos projektu bude spadať pre ochorenia, ktoré sa dajú podľa MKCH 10 zaradiť medzi N30.0 až N30.9, t. j. infekcie močových ciest.

POČET ZVIERAT

Počet zvierat v experimente bude 360ks, pričom samce 180ks a samice 180ks, kmeň myši (*mus musculus*) C3H. Vek zvierat bude 3 týždne (90ks samice a 90ks samce) a 14 týždňov (90ks samice a 90ks samce).

SÚLAD ZÁSAD 3R

NAHRADENIE

Z pohľadu náhrady animálneho modelu alternatívnymi metódami, sme v literatúre síce našli podobné projekty s *in vitro* realizáciou. Je nutné však zdôrazniť, že *in vivo* porovnania chýbajú. Inými slovami, vieme, že steroidné látky *in vitro* v rôznej miere stimulujú vrodenuú imunitu, avšak v kontexte komplexných systémov, tieto informácie chýbajú, preto je nutné a je ďalším logickým krokom, že z *in vitro* dokazovania sa presúvame do komplexného organizmu. V tomto experimente a štádiu výskumu nie je teda možné nahradiť tieto zvieratá tkanivovými kultúrami alebo počítačovými modeláciami, ani inými alternatívnymi metódami nakoľko ide o posúdenie komplexných zmien v organizme navyše s pozorovaním rozdielov v imunitnej odpovedi medzi samicami a samcami. Vo výskume v tomto štádiu potrebujeme poznať odpoveď organizmu ako celku, nie jednotlivých tkanív. Preto je nevyhnutné realizovať experiment na zvieratách. Z tohto dôvodu, alternatívne možnosti nie sú vhodné.

OBMEDZENIE

Dizajn pokusov, ako aj počet jedincov v skupinách bude vychádzať zo súčasných poznatkov vedy tak, aby bola zabezpečená validita a najmä prípadná reprodukovateľnosť našich experimentov. Toto je dôležité pre porovnateľnosť výsledkov s inými našimi dátami, ale aj dátami z iných pracovísk. Analýza predbežných dát - z kultivácií baktérií poukazuje na to, že veľkosť skupiny by pri sile testu 80% a sledovanej variabilite, resp. rozdieloch mala

dosahovať až $n=15-16$ pri hladine významnosti $p<0,05$. Týmto prístupom by problém falošnej negativity, prípadne positivity výsledkov mal byť minimalizovaný. I keď sa môže zdať počet zvierat na skupinu vysoký, vychádzame najmä z predpokladanej štatistickej sily, ktorá musí byť podľa súčasných vedeckých poznatkov na úrovni 80%.

ZJEMNENIE

Spôsob manipulácie so zvieratami a starostlivosť o zvieratá počas postupu bude v súlade s požiadavkami uvedenými v Nariadení vlády SR č. 377/2012 Z.z. a Vyhláske Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR č. 436/2012 Z.z.

Z pohľadu zjemnenia budeme pri všetkých postupoch minimalizovať utrpenie, bolesť a strach ohľaduplným prístupom k zvieratám, jemnou manipuláciou ako i denným handlingom, aby si na postupy a najmä prítomnosť experimentátora zvieratá zvykli. V prípade invazívnejších výkonov ako gonadektómia alebo mini-invazívne chirurgické podanie baktérií, budeme zvieratá operovať v celkovej anestézii, analgetiká dostanú všetky zvieratá podstupujúce operačný zákrok bez rozdielu a v prípade výskytu známk bolesti postoperačne (využijeme pozorovanie tváre) podáme analgetiká tiež. Zvieratá budú počas experimentu sledované a výsledky priebežne vyhodnocované. Po chirurgickom zákroku dostanú všetky zvieratá analgetiká (buprenorfín 0,1mg/kg subkutánne). Podobne, v prípade prítomnosti 2 prejavov zhoršeného zdravotného stavu budú zvieratám podávané analgetiká (buprenorfín v dávke 0,1mg/kg subkutánne). V prípade súčasnej prítomnosti 5 a viac ľahkých prejavov zhoršeného zdravotného stavu, alebo prítomnosti 2 príznakov viac ako 48h napriek intervencii, alebo pri prítomnosti 2 a viac závažných príznakov ako strata hmotnosti $> 20\%$, neschopnosť prijímať potravu a vodu, dehydratácia, strata elasticity kože, naježenie srsti, zhrbený postoj, strnulosť, kontinuálny výtok z očí dôjde k humánnemu usmrteniu zvierat po navodení celkovej anestézie podaním Isofluranu 5% a následne cervikálnou dislokáciou a postup bude ukončený. Podobne, pri odbere krvi z retroorbitálneho plexu bude použitá procedurálna analgosedácia zvierat na zmiernenie stresu (izoflurán, bez buprenorfínu). Krv bude odobratá použitím tenkých jednorazových kapilár (30G) čím sa zmierni stres a bolesť zvierat. Na zabránenie tepelných strát bude zvieratám poskytnutá výhrevná podložka, najmä po operačnom zákroku. V neposlednom rade, životné prostredie zvierat bude obohatené materiálom na stavbu hniezd, predmetmi podnecujúcimi hru, potravu nasiaknutá vodou umiestnená na podlahe pre ľahšiu konzumáciu tiež postoperačne 24hodín.

SPÄTNÉ POSÚDENIE

Zvieratá sa nebudú opätovne využívať, a s ohľadom na to, že ide o projekt, ktorý má predpokladanú krutosť strednú, **projekt nebude podliehať spätnému posúdeniu.**

KLÚČOVÉ SLOVÁ

infekcie močových ciest, testosterón, pohlavné rozdiely