

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Protuupalni učinak botulinum toksina A – periferni ili središnji učinak?		
Trajanje projekta	01.01.2020-01.01.2023.		
Ključne riječi (najviše do 5)	botulinum toksin, bol, upala, koljeno, nosna šupljina, zubobolja, štakor		
	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika)		
	Temeljno istraživanje	da	ne
	Translacijska i primijenjena istraživanja	da	ne
	Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja	da	ne
	Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje	da	ne
	Očuvanje vrste	da	ne
	Visoko obrazovanje ili osposobljavanje	da	ne
	Forenzička ispitivanja	da	ne
	Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima		
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	U prijašnjim objavljenim pokusima na štakorima pokazali smo da bol uzrokovana različitim manipulacijama u području glave i vrata prati i upala moždanih ovojnica. U tim je modelima BT-A nakon lokalne primjene smanjio i bol i udaljenu neurogeni upalu moždanih ovojnica. U našim prijašnjim istraživanjima s karagenanom i kapsaicinom uzrokovane upale šape pokazali smo da u promatranom vremenu BT-A nije značajnije djelovao, što nam je sugeriralo da su utjecaj BT-A na upalu i bol dva različita fenomena, a sama istraživanja protuupalnog učinka nismo nastavili. U međuvremenu je kineska grupa autora (Yoo i sur. 2014) našla da CFA intraartikularno u koljeni zglobov izaziva intenzivan edem koji se može spriječiti s BT-A. Ako se ti rezultati povežu ona je jasno da bi BoNT-A mogao imati protuupalno djelovanje, međutim nije jasno u kojim oblicima upale, u kojem vremenskom razdoblju itd. Potencijalno klinički važan protuupalni učinak do sada nije do sada sistematski istraživani i to je cilj naših predloženih istraživanja. U daljnjim pokusima istražiti ćemo detaljnije mehanizam djelovanja BT-A na upalu. Specifični ciljevi ovog projekta su istražiti: 1. Učinak periferno i centralno primijenjenog BT-A u modelu upale koljenog zgloba uzrokovane CFA (Completer'eund'sAdjuvant) 2. Učinak periferno i intraganglijski primijenjenog BT-A u modelu upale zubnog mesa izazvane s CFA 3. Učinak perifernog i intraganglijski primijenjenog BT-A području u modelu rinosinusitisa izazvanog instiliranjem malih količina formalina u nosnu šupljinu.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Razumijevanje mjesta i mehanizma djelovanja botulinum toksina na upalu, što u konačnici može utjecati na širenje kliničkih indikacija BT-A.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Wistar štakori, mužjaci stari 8-16 tjedana; 100 štakora		
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinje, vjerojatna očekivanja razina težine postupaka i sudbina životinja?	Životinje u pokusu osjetit će nelagodu povećanu osjetljivosti uslijed stimulacije područja oko koljena s von Freyevim filamentima. Budući da pokusi ukupno traju do 9 dana, ne očekuje se narušavanje zdravstvenog stanja štakora. Svi bolni zahvati rimetiranje u periferna tkiva, gangliji, intraartikalni prostor i v. primjenom odvijaće se u općoj anesteziji. Pokus se klasificira kao umjeren. Pokus završava žrtvovanjem životinja radi uzimanja uzoraka za biokemijske i histološke analize. Životinje će se anestezirati i p. injekcijom ketamina-ksilazina 70 mg/kg + 7 mg/kg intraperitonealno nakon čega će biti podvrgnute transkardijalnoj perfuziji a samo s fiziološkom		

	otopinom (5 životinja po eksperimentalnoj grupi u pokusima 1-3), uzorci za mjerenje ekstravazacije) ili b) s fiziološkom otopinom i fiksativom (5 životinja po grupi u pokusima 1 i 2 (250 ml fiziološke otopine, nakon čega slijedi 250 mL fiksativa).
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Istraživanje nocepcije i analgezije nije moguće provesti <i>in vitro</i> jer su u ovakvom tipu istraživanja prijeko potrebna bihevioralna mjerenja. U ovom se pokusu koristi u literaturi dobro opisani model uzrokovanja upalne boli koljena u štakora koji omogućava praćenje povećane osjetljivosti na mehanički podražaj, kao i praćenje anatomskih, fizioloških i biokemijskih promjena na mjestu uzrokovanja boli, ali i na anatomski udaljenim mjestima, što se inače ne može pratiti kod ljudi ili na kulturama stanica. Također, ostali predloženi pokusi uključuju složena bihevioralna mjerenja, poput facijalne ekspresije i alodinije. Upravo iz tog razloga istraživanja na glodavcima predstavljaju trenutno najprihvatljivije rješenje.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	U pokusima koristimo minimalan broj životinja potreban za dobivanje pouzdanih rezultata i zadovoljavanje statističkih kriterija. Veličina uzorka i minimalan broj životinja po eksperimentalnoj grupi je unaprijed određeno na osnovu predviđanja veličine učinka (eng. effect size) prijašnjih naših pokusa (Filipović i sur, 2012) i prema <i>a priori</i> power analizi snage studije pomoću slobodno dostupnog statističkog software-a (G*power verzija 3.1. Sveučilište u Düsseldorf-u, Njemačka (Charan i Kantharia, 2013). Izračunati broj životinja po eksperimentalnoj grupi je 5 na osnovu procijenjene veličine učinka $f^2=0.4$, vjerojatnosti greške $\alpha = 0.05$, snage $(1-\beta) = 0.8$, statistički test: jednosmjerna analiza varijance (ANOVA), interakcije između i unutar eksperimentalnih grupa. Međutim, u pokusima 1 i 2 potrebna su tkiva od 5 životinja po grupi za svaki od dva tipa planiranih biokemijskih analiza (mjerenje ekstravazacije i imunohistokemija, gdje se načini pripreme uzoraka međusobno isključuju, odn. tkivo koje se priprema za mjerenja ekstravazacije se ne može koristiti za imunohistokemiju i obrnuto). Stoga smo broj životinja u tim pokusima povećali na 10 (to je minimalan broj životinja za kvalitativnu i kvantitativnu obradu rezultata biokemijskih i histoloških analiza).
3. Poboľšanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	Za sada ne postoje adekvatne alternativne metode za ispitivanje složenih mehanizama upalne boli i povezanosti lokalne upale s patološkim promjenama na udaljenim mjestima (strukturama središnjeg živčanog sustava). Životinjama u pokusu će se osigurati uvjeti mikrookoliša (dovoljno veliki kavez, čista stela) i makrookoliša (ciklus izmjene svjetla i tame 12/12 h, temperatura 23 °C, vlaga 50%) u skladu s relevantnim propisima i preporukama. Radi smanjenja stresa, životinje će se na svaki postupak i manipulaciju navikavati prije pokusa, a tijekom mjerenja će se izbjegavati čimbenici poput prejakog svjetla i buke koje u životinja mogu uzrokovati anksioznost i stres. Životinje će boraviti u kavezima u skupinama (3 štakora po kavezu), osim u razdoblju oporavka nakon miciranja u zglob koji uključuje duboku anesteziju, kada će životinje biti izolirane u posebnim kavezima do potpunog buđenja iz anestezije. Hrana i voda će im biti ponudene <i>ad libitum</i> osim u vrijeme testiranja osjetljivosti (do 60 minuta u danu).