

## НЕТЕХНИЧЕСКО ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОЕКТ ЗА РАБОТА С ОПИТНИ ЖИВОТНИ

**ТЕМА: РОЛЯ И РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА МАТРИКСНИ МЕТАЛПРОТЕИНАЗИ- 2 И -9 В ЕПИЛИГАМЕНТА  
НА КОЛАТЕРАЛНИТЕ ВРЪЗКИ НА КОЛЯННАТА СТАВА ПРИ ПЛЪХ В НОРМА И ЕКСПЕРИМЕНТ**

Финансиран от МУ- София, Съвет по Медицински Наука, Грант 2016 г

Авторски колектив: Ръководител: Доц. д-р Лина Георгиева Малинова, дм  
Членове на изследователския екип: д-р Георги Петров Георгиев, дм; проф. д-р Бойчо Василев Ланджов, дм;  
д-р Ива Николаева Димитрова, д-р Александър Асенов Илиев, дм.

<b>НАИМЕНОВАНИЕ НА ПРОЕКТА</b>	РОЛЯ И РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА МАТРИКСНИ МЕТАЛПРОТЕИНАЗИ- 2 И -9 В ЕПИЛИГАМЕНТА НА КОЛАТЕРАЛНИТЕ ВРЪЗКИ НА КОЛЯННАТА СТАВА ПРИ ПЛЪХ В НОРМА И ЕКСПЕРИМЕНТ		
<b>Продължителност на проекта</b>	1 година - от 27.05.2016 г.		
<b>Ключови думи</b>	Матриксни металопротеинази -2 и -9, епилигамент, колатерални коленни връзки		
<b>Цел на проекта</b> (в съответствие с чл. 4 на Наредба 20 от 1 ноември 2012г. за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им)	Фундаментални научни изследвания	Да	
	Транслационни или приложни изследвания		Не
	Разработване, производство или изпитване на качеството, ефективността и безопасността на лекарства, храни и фуражи и други вещества или продукти		Не
	Защита на природната среда с оглед опазване здравето на хората и животните и тяхното благосъстояние		Не
	Изследвания, насочени към опазване на биологичните видове животни		Не
	За обучение с цел придобиване, поддържане или подобряване на професионалните умения в средните специални училища, колежите или висшите учебни заведения		Не
	Съдебномедицински изследвания		Не
	Поддържане на колонии от генетично изменени животни, които няма да бъдат използвани в други опити		Не

<p><b>Описание на целта на проекта:</b> (нови научни постижения, медицински изследвания и др.)</p>	<p>Ставните връзки подобно на останалите структури на опорно-двигателния апарат, като кости, хрущяли, мускули и сухожилия, притежават повърхностен съединително-тъканен слой, наречен епилигамент (ЕЛ), който представлява много добре кръвоснабдена и инервирана съединително-тъканна обвивка, разграничима от самия лигамент и преминаваща в периоста около прикрепването на лигамента. ЕЛ продължава в дълбочина на ставната връзка, като съединително-тъканна структура нар. ендолигамент, която обвива отделните снопчета. Предполага се, че връзката на ЕЛ – ендолигамент обособява ставната връзка, като единна структурна и функционална единица, която има важно значение за функцията на ставата. ЕЛ в сравнение с лигамента се характеризира с хиперцелуларитет. Морфологията на клетките в ЕЛ също е различна от тази на клетките изграждащи лигамента. В тази структура има повече типове клетки: фибробласти, адипоцити и мастоцити. Доказано е, че фибробластите по външната повърхност ЕЛ на lig. collaterale mediale на колянната става не са статични клетки, а участват активно в синтеза на колаген тип I, III и V. Вторият тип клетки, адипоцитите се предполага, че участват в метаболизма и натрупването на липиди и служат като пакиращ материал. Матриксните металопроотеинази (ММП) са голяма група цинк-съдържащи протеолитични ензими, които в норма регулират състава на екстрацелуларния матрикс. Активността им се контролира от различни ендогенни инхибитори в отговор на редица стимули. Понастоящем са известни около 28 различни вида ММП, класифицирани в групи според вида на протеолитичния субстрат, който те разграждат. ММП -2 и -9 са желатинази. ММП притежават свойствата да се прикрепват към компоненти на екстрацелуларния матрикс и в частност към колагена и еластина. Всички ММП са синтезирани в латентна форма (зимоген), но могат да се активират от редица цитокини и растежни фактори. Активността им е ниска в здрави тъкани. Увеличението на техните серумни нива е показател за повишено разграждане на екстрацелуларните матриксни протеини. Повишена експресия на MMP-2 и -9 се наблюдава при различни патологични процеси, като възстановяването след травматична лигаментарна увреда.</p>
<p><b>Потенциални ползи от осъществяването на проекта:</b> (ползи за здравето на човека и животните, научни постижения и др.)</p>	<p>Целта на проекта е изследване на матриксните металопроотеинази (ММП) -2 и -9, чиято повишена експресия се наблюдава при възстановяването след травматична лигаментарна увреда на медиалната колатерална колянна връзка. Поради този факт, считаме, че изследването им именно в ЕЛ, които е основният източник на клетки по време на оздравителния процес, би било от изключителна важност.</p>
<p><b>Вид и брой на опитните животни, които се очаква да бъдат използвани в проекта</b></p>	<p>15 бр. плъхове от порода Wistar за период от 1 година, разпределени в 5 групи по 3 животни в група.</p>
<p><b>Очаквани неблагоприятни ефекти, вероятното ниво на тежест на опитите и увреждане на животните, както и съдбата на животните след приключване то на опитите</b></p>	<p>Чрез интраперитонеална апликация на комбинация от Ketamine 45mg/kg и Nylazine (5mg/kg) плъховете се въвеждат в анестезия. Левият долен крайник на животното се обръсва и обработен с Braunol. С помощта на скалпел се прави малък разрез на кожата в областта над медиалната колатерална връзка на колянната става. След това се екартира подлежащата съединителна тъкан над връзката и със скалпел се прерязва срединната и част, като двата прерязани края на връзката се маркират с конец 9/0 Етхилон (Ethicon). Животните претърпели оперативна интервенция се оставят на свободен режим на движение. Очакваното ниво на тежест на опита е средно. В края на експериментите плъховете ще бъдат евтаназирани чрез дълбока наркоза с Ketamine (45mg/kg) и Nylazine (5mg/kg) интраперитонеално след което ще се извърши транскардиална перфузия с параформалдехид. След приключване на опитите биологичните отпадъци се изгарят в инсертатор.</p>
<p><b>Въвеждане на принципите на заместване, намаляване и облекчаване</b></p>	
<p><b>1.Заместване:</b> Обяснете защо е необходимо използването на опитни животни и защо не могат да бъдат приложени алтернативни методи</p>	<p>Ролята и разпределението на матриксни металопроотеинази -2 (ММП-2) и -9 (ММП-9) в епилигамента при увреждане на колатералните връзки на колянната става у плъх се прави с цел използването на експериментални модели на животни за изследване на промените, настъпващи в епилигамента по време на ранния оздравителен процес на ставната връзка. Опитите са необходими поради факта, че възстановяването протича по-добре при спонтанно наговарване на крайника. Необходимостта от използването на опитни животни е породено от факта, че ще се използват експериментални животински модели на често срещани травми на ставите при хора, които не могат да бъдат заместени с алтернативни експерименти in vitro и друг тип моделиране.</p>

<p><b>2. Намаляване:</b> Обяснете как е осигурено използването на минимален брой животни</p>	<p>Броят на животните n=15, разделени в 5 групи по 3 животни в експериментална група, е изчислен на базата на нашия и чуждия опит при разработването на подобни проучвания за получаване на статистически достоверни данни.</p>
<p><b>3. Облекчаване:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Обяснете избора на животните и защо избраният модел на опитната постановка е най-облекчен;</li> <li>➤ Обяснете основните мерки, които са предприети за намаляване на страданието на животните</li> </ul>	<p>Плъховете от породата Wistar се използват в голям брой експериментални постановки за проследяване на различни патологични промени. За намаляване риска от инфектиране на раната, плъховете ще се третират допълнително с Braunol и локална антибиотична терапия. Ще бъдат групирани по подходящ начин и ще им бъдат осигурени всички необходими средства за нормален начин на живот. Травматичното увреждане със скалпел при открита рана, би могло да доведе до инфектиране, въпреки взетите мерки. При евентуално настъпване на неблагоприятно развитие и влошаване на състоянието на животните, те ще бъдат хуманно умишлени.</p> <p>Преди началото на експерименталните процедури, животните се хабитуират към експериментатора посредством ежедневно хендлиране. Хирургични манипулации ще бъдат извършвани под обща анестезия, приложена интраперитонеално от Ketamine (Calypsol, RG, Hungary), (45mg/kg) и Nylazine (Bioveta, Czech Republic) (5mg/kg). Експериментите ще бъдат проведени в климатизирано помещение, при постоянна стайна температура. Евентуална постоперативна болка се третира локално с 5% лидокаин.</p>