

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 47/2018

Název projektu pokusů

Buněčná a genová terapie míšního poškození a ischemie mozku s využitím preklinického modelu miniaturního prasete. Terapie míšního poškození pomocí lokálního proplachu hypotermickým roztokem s růstovými faktory.

Doba trvání projektu pokusů 2018-2020, max. 33 měsíců

Klíčová slova - maximálně 5 miniprase, buněčná a genová terapie, poškození míchy a mozku, akutní terapie poškození míchy

Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka

☒	základní výzkum
☒	translační nebo aplikovaný výzkum
☒	vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
☐	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
☐	zachování druhů
☒	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
☐	trestní řízení a jiné soudní řízení

Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)

Cílem studie je studium ischemického (mechanického) poškození mozku a míchy u miniaturního prasete včetně následné buněčné (lidské nebo prasečí nervové prekursorů, indukované pluripotentní buňky atd.) a/nebo genové (lentivirové nebo adeno-asociované virové konstrukty) terapie.

Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů (jak by mohlo být dosaženo pokroku ve vašem vědním oboru nebo jaký přínos by z něj člověk či zvířata mohli mít)

Předpokládaným účelem a přínosem je získání nových poznatků v ischemickém a mechanickém poškození míchy či mozku v oblasti základního výzkumu a translačního nebo aplikovaného výzkumu s cílem zabránit a předejít následkům nebo léčit taková poškození u lidí. Experimenty budou také sloužit pro ověření bezpečnosti a terapeutické účinnosti buněčné a/nebo genové terapie na tomto velkém preklinickém modelu s následným použitím výsledků v klinických studiích.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Miniaturní prase bylo zvoleno jako modelový organismus z důvodů fyziologických parametrů podobných člověku. Podobná velikost míchy a mozku miniaturního prasete umožní kvantifikovat bezpečné množství buněk nebo počet a typ virových konstruktů (Lentivirových-LV, Adeno-asociovaných-AAV), které lze transplantovat do lidské míchy a mozku. Budou použiti jedinci obou pohlaví ve věku 2-24 měsíců, jednak intaktní zvířata nebo zvířata transgenní s lidským mutovaným huntingtinem jako modelem geneticky podmíněného onemocnění. Bude použito max .300 ks na celou dobu trvání projektu (3 let; 2018-2020). Experimenty budou prováděny ve skupinách 1-6ks. Uvedený počet je nezbytný pro možnou variabilní odpověď jedinců na traumatické nebo ischemické poškození a následnou terapii nebo transplantační zákrok.

Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?

Míra závažnosti experimentů je střední.

Následky ischemického a traumatického poškození míchy u miniaturního prasete jsou dostatečně prozkoumány a charakterizovány. Miniprasata s částečnou krční nebo úplnou hrudní a bederní míšní lézí bez problémů přijímají krmivo a přibírají na tělesné hmotnosti. Jsou držena na hluboké podestýlce a jsou každodenně rehabilitována pro zamezení proleženin. Zvířata bez větších problémů přežívají několik měsíců. Parciální ischemie mozku způsobí zvířatům jen krátkodobé (1-3 dny) trvající zhoršení klinického stavu spojeného s výskytem ataxie, zhoršení motorického skóre nebo ojedinělým výskytem epileptických záchvatů (1-3x denně). V předchozích experimentech jsme také optimalizovali dávkování imunosupresivních látek (takrolimus, mykofenolát mofetilt, dexametazon) miniaturním prasatům a tím v budoucích experimentech omezíme jejich nežádoucí vedlejší účinky (ztráta hmotnosti, nechutenství, poškození ledvin, srdce a jater) na minimum. Zvířata budou po navození míšního nebo ischemického poškození dostávat léky s protizánětlivým a analgetickým účinkem Vetalgín nebo Flunixin (i.m.). Při jakémkoliv zhoršení zdravotního stavu budou zvířatům sníženy dávky imunosuprese nebo zcela odpojena od imunosuprese. V nevyhnutných případech budou bezodkladně utracena celotělovou perfuzí ledovým PBS. Po ukončení experimentů budou zvířata

předávkována anestetikem a propláchnuta ledovým PBS pro odběr vzorků.
Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)
Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.
Pro zavedení buněčné a/nebo genové terapie do klinické praxe je nutné otestovat její bezpečnost a terapeutický účinek na velkém zvířecím modelu. Miniaturní prase je z etických a ekonomických důvodů nejvhodnější alternativou v porovnání s nehumánními primáty. Model poškození míchy na hlodavcích má své anatomické omezení (velikost míchy) a u hlodavců se také popisuje masivnější spontánní regenerace po arteficiální míšní lézi než u velkých zvířecích modelů a lidí (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029501). Neexistuje alternativní metoda bez použití zvířecích modelů pro testování buněčné a/nebo genové terapie, která by napodobila komplexnost nebo složitost zvířecího organismu.
Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.
V předchozích studiích jsme optimalizovali počty experimentálních zvířat v jednotlivých skupinách (1-6ks) a také počty a objemy injekcí a koncentrace buněk a virových konstruktů. Uvedený počet zvířat je tudíž nezbytný pro eliminaci možné variabilní odpovědi jedinců na traumatické nebo ischemické poškození a následnou terapii nebo transplantační zákrok.
Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlete volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů.
Vysvětlete obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.
Miniaturní prase je pro ověření bezpečnosti a léčebné účinnosti buněčné a/nebo genové terapie z etických a ekonomických důvodů nejvhodnější alternativou v porovnání s nehumánními primáty. Výsledky těchto experimentů budou sloužit pro udělení povolení pro klinické experimenty na lidech. Miniprasata s částečnou krční nebo úplnou hrudní a bederní míšní lézi jsou držena na hluboké podestýlce a jsou každodenně rehabilitována pro zamezení proleženin. Zvířata bez větších problémů přežívají několik měsíců. Parciální ischemie mozku způsobí zvířatům jen krátkodobé (1-3 dny) trvající zhoršení klinického stavu spojeného s výskytem ataxie, zhoršení motorického skóre nebo ojedinělým výskytem epileptických záchvatů (1-3x denně). Zvířata budou po navození míšního nebo ischemického poškození dostávat léky s protizánětlivým a analgetickým účinkem Vetalgín nebo Flunixin (i.m.). Při jakémkoliv zhoršení zdravotního stavu budou zvířatům sníženy dávky imunosupresiv nebo zcela odpojena od imunosupresiv. V nevyhnutných případech budou bezodkladně utracena.