

NETECHNICKÉ SHRNUTÍ PROJEKTU POKUSŮ	
Název projektu pokusů	
Polymerní mikročástice chelatuující železo.	
Doba trvání projektu pokusů	Prosinec 2021
Klíčová slova - maximálně 5	Hemochromatóza, polymerní mikročástice, železo.
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)	
Hemochromatóza je dědičné onemocnění charakterizované patologickým hromaděním železa v parenchymálních orgánech. Může být způsobena mutací libovolného genu řídícího vstup železa do krevního oběhu. Omezení příjmu železa by bylo neoptimálnějším způsobem léčby hemochromatózy. Mechanismus příjmu železa je však komplexní díky přítomnosti tří různých forem železa v potravě (dvojmocné, trojmocné, hemově vázané) lišících se mechanismem příjmu. Současná léčba je především invazivní (flebotomie) a nese s sebou řadu nežádoucích účinků. Cílem předkládaného projektu je vývoj nových polymerních terapeutik pro léčbu patologické akumulace železa v organismu jako je dědičná hemochromatóza. Novým přístupem projektu je inhibice příjmu železa perorálně podávanými polymery s několika různými vzájemně synergickými mechanismy účinku jako princip terapie hemochromatózy. Na laboratorních zvířatech budou testovány tři polymerní látky (tanin-proteinové komplexy, makroporézní polymerní částice s isonitrilovými skupinami a hyperbranched polymery s isothiuroniovými skupinami) jako potenciální léčiva.	
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)	
Jelikož je základem současné terapie hemochromatózy invazivní flebotomie, navrhované polymerní látky by měly především umožnit šetrnější a přístupnější léčbu hemochromatózy. Polymerní systémy by se podávaly perorálně a neměly by být vstřebatelné ze zažívacího traktu, ale plně vyloučeny stolicí po komplexaci železa. Tím se lze vyhnout případným nežádoucím systémovým účinkům, které představují zásadní problém mnoha současných léčiv. Navíc by komplexace železa měla být zaměřena na více jeho forem, které se nacházejí v potravě.	
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá	
Na experimenty budou použity myši kmene ICR (32 ks, samice, věk cca 8 týdnů), potkany kmene Wistar (66 ks, samice, věk cca 8 týdnů), 18 ks HFE-knockout myši (model HFE2 ^{tm1Nca} , samice, cca 8 týdnů staré). Celkově bude použito maximálně 116 ks zvířat.	
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?	
Jelikož by polymerní systémy měly být po perorální aplikaci nevstřebatelné a vyloučitelné stolicí, nejsou očekávané systémové nežádoucí účinky. Polymerní látky by měly fungovat pouze lokálně na sliznici tenkého střeva a jejich chování v místě působení by nemělo ovlivňovat správnou funkci trávicího procesu. Navíc je jeden polymerní systém založen na taninové kyselině, což je přirozeně se vyskytující biopolymer (např. v kávě či čaji). Kromě i.v. aplikací, aplikací gastrickou sondou a odběrů krve z retroorbitálního plexu, nejsou plánovány žádné další zákroky. Jedná se o postupy, u kterých se nevyžaduje znecitlivění či použití analgetik. Co se týče další manipulace se zvířaty, bude se jednat především o pravidelné vážení jejich hmotnosti a sledování celkového zdravotního stavu. Proto se závažnost pokusů hodnotí jako mírná. Po ukončení pokusu budou všechna zvířata usmrcena předávkováním ketamin-xylozinového anestetika. V případě jakékoliv nečekané změny a/nebo zhoršení stavu zvířete bude pokus předčasně ukončen.	
Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)	
Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.	
Biodistribuci, nevstřebatelnost a terapeutický účinek polymerních systémů je nutné otestovat přímo na živém biologickém modelu za in vivo podmínek, jelikož je potřebné zohlednit veškeré biologické faktory. Tento typ studie není možné realizovat jinak, než s použitím laboratorních zvířat a v současné době neexistuje žádný alternativní systém či model, kterým by bylo možné laboratorní zvířata nahradit. Tato skutečnost byla také ověřena v databázi validovaných alternativních metod schválených a přijatých Evropskou společností pro alternativní metody (European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)).	
Omezení používání zvířat: Vysvětlíte, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.	
Počet zvířat na skupinu byl zvolen jako minimální pro dosažení statisticky signifikantních výsledků. K statistickému vyhodnocení výsledků bude použita zejména analýza rozptylu ANOVA, která umožňuje porovnávání více než dvou vzorků. Obvykle se u biologických testování používá počet testovaných vzorků $n = 6$, což je počet nutný k dosažení relevantní statistické významnosti výsledků. Proto je u všech pokusech stanoven právě tento počet laboratorních zvířat jako minimální. Co se týče sdílení zvířat s jiným pracovištěm, tento postup v navrhovaném projektu není možný, jelikož	

se jedná o nově testované látky, u kterých není zatím známý žádný účinek na organizmus, resp. na jeho orgány. Mohlo by tak dojít k vzájemnému ovlivnění výsledků.

Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlíte volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů.

Vysvětlíte obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.

Během celého trvání pokusů bude se zvířaty manipulováno tak, aby se co nejvíc minimalizovala případná bolest a strach a pokus bude veden osobou kvalifikovanou v práci s pokusnými zvířaty. Zároveň se neplánuje žádný zákrok, který by si vyžadoval použití přípravků na znecitlivění či analgetik. Během pokusů budou zvířata denně sledována a v případě jakékoliv nečekané změny a/nebo zhoršení stavu zvířete bude pokus předčasně ukončen. Pro pokusy byly zvoleny myši kmene ICR a potkany kmene Wistar. Jedná se o cenově dostupné kmeny běžně používané v biodistribučních, toxikologických či terapeutických studiích nových testovaných přípravků. Pro nejslibnější polymerní systém bude jeho terapeutický účinek ověřen na knock-outových myších HFE2^{tm1Nca}, které jsou modelem lidské hemochromatózy. Účinek navrhovaného léku se tak otestuje i přímo na dané nemoci.