

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

Bioartificiální kardiovaskulární záplaty a cévní náhrady na bázi porcinního kolagenu zesílené nano/mikrovlákný remodelované pomocí kmenových buněk v bioreaktorech. (NV19-02-00068)

Doba trvání projektu pokusů - v měsících 2/2021 – 12/2022

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾ Autologní implantabilní štěp; alogenní implantabilní štěp; xenograft; cévní záplata; cévní náhrada

Účel projektu pokusů - zaškrtněte políčko; možno i více možností

- ☐ základní výzkum
- ☒ translační a aplikovaný výzkum
- ☐ kontrola kvality (včetně zkoušení bezpečnosti a účinnosti šarže)
- ☐ legislativní účely jiné zkoušení účinnosti a tolerance
- ☐ a běžná výroba zkoušení toxicity a jiné zkoušky bezpečnosti včetně farmakologie
- ☐ běžná výroba
- ☐ ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
- ☐ zachování druhů
- ☐ vyšší vzdělávání
- ☐ odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí
- ☐ trestní řízení a jiné soudní řízení
- ☐ udržování populací ustálených geneticky upravených zvířat, která nebyla použita v jiných pokusech

Cíle projektu pokusů - např. řešení některých vědeckých neznámých nebo vědeckých či klinických potřeb

Vývoj autologního, alogenního implantabilního štěpu (kardiovaskulární záplata a cévní náhrada), jež vychází z potřeb vývoje biokompatibilního materiálu – tělem příjemce plně akceptovaného, zajišťující tolik potřebnou durabilitu a eliminaci nežádoucích účinků. Základním stavebním prvkem nových implantátů je využití degradabilních kolagenních gelů vyztužených nano/mikro vlákný, které budou odlity do potřebného tvaru spolu s kmenovými buňkami (alogenní nebo autologní prasečí nebo xenogenní lidské). Tyto konstrukty budou remodelovány v bioreaktoru za vzniku nové tkáně. Poté bude tento laboratorně připravený konstrukt decelularizován pro eliminaci imunitní odpovědi avšak se zachováním nosné struktury. Ke konstrukci je možno využít i cílenou impregnaci komerčně dostupných cévních protéz. Konstrukty je možno implantovat i nedecelularizované s živými buňkami za sledování imunitní odpovědi.

V rámci laboratorního in vivo ověření plánujeme 4 skupiny laboratorních zvířat:

- 1) Alogenní cévní záplata
- 2) Alogenní cévní náhrada
- 3) Buňkami osídlená cévní záplata
- 4) Buňkami osídlená cévní náhrada

Výsledkem je tedy vývoj dostupného, biokompatibilního štěpu připraveného metodami tkáňového inženýrství pro použití na poli cévní chirurgie a kardiochirurgie a dále potvrzení/vyvrácení hypotézy nutnosti osídlení takového štěpu buňkami a jejich přínosu pro rychlejší remodelaci v těle.

Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů - jak by mohlo být dosaženo vědeckého pokroku nebo jaký přínos by z něj člověk, zvířata či životní prostředí mohli mít; v příslušných případech rozlišujte mezi krátkodobými (v době trvání projektu) a dlouhodobými přínosy (mohou se projevit až po skončení projektu)

Výše uváděný biokompatibilní materiál by mohl být v klinické praxi použit jako nová cévní náhrada, cévní záplata, příp. i záplata k augmentacím/plastikám srdečních oddílů, chlopní

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání

Celková anestézie (CA): zahrnuje premedikaci i.m. injekcí, úvod do anestézie a vedení anestézie aplikací i.v. injekcí a infúzí (např. anestetika, analgetika, antibiotika, antitrombotika, krystaloidní roztoky), intubaci pro inhalační anestézii. Pooperační analgésie transdermálně náplastí. Zvířata v rámci implantace štěpu osídleného autologními buňkami podstoupí CA celkem 3x (1. odběr tuku - 2. implantace - 3. explantace), ostatní 2x (1. implantace - 2. explantace).

Perorální léčiva: např. antitrombotika (aspirin)

Odběry krve k vyšetření, cca 1x týdně.

Chirurgický zákrok: Odběr krční tukové tkáně pro izolaci autologních buněk v CA, cca 15 min, následně příprava štěpu v laboratoři (cca 3 týdny).

Chirurgický zákrok: Implantace záplaty nebo náhrady karotické tepny v CA, cca 2 h.

Chirurgický zákrok: Explantace karotidy (po 1-6 měsících), provedení angiografie kontrastní látkou z třísla pod rentgenem v CA, cca 3h, následně usmrcení zvířete v CA.

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) **a doba trvání těchto účinků**

Nepříznivé účinky na zvířata nejsou očekávány. Navrhovaná míra závažnosti je "střední". Nepředpokládá se, že by implantace mohla způsobovat výraznou bolest, strach nebo utrpení zvířete. Plánované chirurgické výkony budou prováděny v celkové anestezii, s pooperační analgézií, certifikovanou osobou a nezhorsí celkový zdravotní stav nebo dobré životní podmínky pokusných zvířat. Během celého experimentu budou zvířata pravidelně kontrolována. Na konci experimentu budou zvířata utracena předávkováním anestetik v CA po provedené explantaci zkoumaných tkání. Po usmrcení budou odebrány tkáně pro další výzkum.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

Druh zvířat ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhadovaný počet	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
		Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Prase domácí (Sus scrofa domesticus)	32	0		32	
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					

Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena

Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití 0

Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu 0

Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu 0

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - uveďte

Při ukončení pokusu bude implantovaný konstrukt v celkové anestézii chirurgicky explantován pro makroskopické a mikroskopické vyšetření a tato explantace vyžaduje usmrcení zvířete v anestézii.

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat - uveďte, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu

In vivo model, tj. použití prasat pro tento pokus, je zcela nezbytné. Modelování v in-vitro podmínkách je sice možné, nicméně limitní. Arteficiální reaktor, jenž byl vyvinut a je používán, není s to obsáhnout veškeré skutečnosti/jevy, k nimž v živém organismu dochází. Proto biologický model představuje optimální řešení.

Omezení používání zvířat - vysvětlete, jaký počet zvířat byl pro tento projekt stanoven. Popište kroky, které byly podniknuty ke snížení počtu používaných zvířat, a zásady použité k vytvoření studie; případně popište postupy, které budou používány po celou dobu trvání projektu za účelem minimalizace počtu používaných zvířat a které odpovídají vědeckým cílům (mezi tyto postupy mohou patřit např. pilotní studie, počítačové modelování, sdílení tkání a opakované použití).

V rámci pokusů proběhlých v předcházejících projektech (realizované stejným týmem) bylo dosaženo potřebné praktické dovednosti stran práce s laboratorními prasaty, optimálního zvládnutí chirurgické techniky implantace decelularizovaných cévních záplat a cévních náhrad. Již tento fakt přispívá k redukci nechtěného nadužívání pokusných zvířat. Celkový počet zvířat byl zvolen jako minimální možný pro statistické vyhodnocení pokusu. Pakliže se v iniciálních fázích pokusu objeví zásadní problém na jakékoli úrovni, bude od dalších pokusů upuštěno s cílem maximální možné redukce užitým zvířat. Strategie k omezení počtu zvířat: oboustranná implantace, využití dárce allograftu k jiné implantaci, využití resekované karotidy ke kontrole barvení, odběr tkání zvířete pro jiné experimenty po ukončení pokusu.

Šetrné zacházení se zvířaty - uveďte příklady konkrétních opatření (např. zvýšené pozorování, pooperační péče, tlumení bolesti, výcvik zvířat) přijatých v souvislosti s postupy k minimalizaci dopadů na dobré životní podmínky zvířat; popište mechanismy k přijímání vznikajících zmírňujících postupů v době trvání projektu

K laboratorním zvířatům bude přistupováno s veškerým respektem a ohledy. Zvířata budou kromě úkonů nezbytných k pokusu ponechána v klidu, bude o ně pečováno dle platných zoohygienických předpisů a jejich biologických potřeb, včetně navykací periody. Během vystavení zákrokům budou zvířata uvedena do celkové anestezie, přičemž po dobu anestezie bude zajištěn jejich tepelný komfort a vlhčení očí. Zvířata nebudou použita pro pokus při známkách snížené zdravotní kondice. Bude prováděna pravidelná pooperační

kontrola a podávána pooperační analgésie. Se zvířaty budou manipulovat pouze certifikované osoby a usmrcení zvířat bude provedeno maximálně šetrně, a to v celkové anestezii předávkováním anestetik. Opatření, jež budou provázet celý projekt, vychází jednak z platných, zákonem stanovených předpisů pro práci s laboratorními zvířaty i ze zkušenosti týmu ošetřovatelů/ošetřovatelek a laborantů/laborantek.

Použité druhy zvířat - vysvětlíte výběr druhů a souvisejících životních stadií

Laboratorní prase je humánnímu organismu velice blízké, a to jak funkčně, tak strukturálně – proto se jeví jako optimální model. Druh zvířete (prase přeštické, samice, 30 – 50 kg) je tedy vybrán s ohledem na anatomickou, funkční a chirurgickou podobnost člověku. Životní stadium je vybráno s ohledem na dobu trvání pokusu, růst zvířete a opakování celkové anestézie 2 až 3krát.

- ¹⁾ Včetně vědeckých pojmů, které se mohou skládat z více než pěti jednotlivých slov, a s výjimkou druhů zvířat a účelů uvedených jinde v dokumentu
- ²⁾ Druhy zvířat v souladu s kategoriemi statistického vykazování v příloze III prováděcího rozhodnutí Komise 2020/569 s doplňkovou možností „**nespecifikovaného savce**“ pro zachování anonymity ve výjimečných případech