

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

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. II

Doba trvání projektu pokusů v měsících

33

Klíčová slova

buněčná a genová terapie

poškození míchy a mozku

akutní terapie poškození míchy

miniprase

0

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Nervová soustava [PB3]

0

Translační a aplikovaný výzkum: Nervové a duševní poruchy u lidí [PT24]

0

Cíle projektu pokusů

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

Potenciální přínosy projektu pokusů

Předpokládaným 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.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

1. Implantace elektrod a snímačů telemetrického zařízení (EEG, ECG, EMG, aktivita, teplota atd.) - 7 až 14 dní před 2A. bodem
2. A. Provedení mechanického nebo ischemického poškození mozku/míchy
B. Terapie míšního poškození pomocí lokálního proplachu hypotermickým roztokem s růstovými faktory (do několika hodin po poškození bod 2A.)
3. A. Buněčná a/nebo genová terapie poškození mozku/míchy v akutní (<24h po bodu 2A) nebo chronické (>24h po bodu 2A) fázi - individuální podle klinického stavu zvířat
B. Značení descendentních drah u poškození míchy pomocí AAV konstruktů v akutní (<24h po bodu 2A) nebo chronické (>24h po bodu 2A) fázi - individuální podle klinického stavu zvířat
4. Imunosuprese zvířat v případě buněčné terapie (1-24 měsíců po bodu 3A a 3B.)
5. Utracení zvířat celotělovou perfuzí ledovým PBS

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata, a doba trvání těchto účinků

Nejsou očekávány závažné nežádoucí účinky u zvířat. Klasifikace závažnosti je střední z důvodu provádění chirurgického zákroku v celkové anestezii. 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) trvajících zhoršení klinického stavu spojeného s výskytem ataxie, zhoršení motorického skóre nebo ojedinělým výskytem epileptických záchvatů (1-3x denně). Z předchozích experimentů je také známo optimalizované dávkování imunosupresivních látek (takrolimus, mykofenolát mofetil, methylprednisolon) miniaturním prasatům a tím budou v navrhovaných experimentech omezeny 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 Fentanyl, Tramal, Vetalgín nebo Flunixin (i.m.). Při jakémkoliv zhoršení zdravotního stavu budou zvířatům sníženy dávky imunosuprese nebo zcela odpojena od imunosuprese. V

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

Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
prasata (<i>Sus scrofa domesticus</i>) [A14]	0	0	300	0

0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0

Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi

Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat		
	Opětovné použití	Navrácení do chovu, do přírodního stanoviště	Do zájmového chovu
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty

Po ukončení experimentů budou zvířata předávkována anestetikem a propláchnuta ledovým PBS a odebrány vzorky pro biochemické a histologické analýzy.

Uplatňování 3R
Nahrazení používání 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

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

Miniprasata s částečnou krční nebo úplnou hrudní a bederní míšní lézí 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 dni) 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 Fentanyl, Tramal, 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.

Použité druhy zvířat - vysvětlení

Miniaturní prase je charakterem tkání a anatomií blízké podmínkám humánní medicíny. Současně 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. Podobná velikost míchy a mozku miniaturního prasete umožní kvantifikovat bezpečné množství buněk nebo počet a typ virových konstruktů (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.