

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

GA UK 309621 - Možnosti regulace autoimunitního nitroočního zánětu na myším modelu prostřednictvím buněčné terapie

Doba trvání projektu pokusů v měsících

36

Klíčová slova

mesenchymální kmenové buňky

experimentální autoimunitní uveitida

exosom

kondicionované médium

experimentální myší model

Účely projektu pokusů

Translační a aplikovaný výzkum: Poruchy smyslových orgánů (kůže, očí a uší) u lidí [PT30]

0

0

0

Cíle projektu pokusů

Cílem řešení projektu je studium možnosti léčby zánětlivého poškození sítnice a cévnatky na myším modelu experimentální autoimunitní uveitidy (EAU) pomocí mesenchymálních kmenových buněk (MSC) a jejich produktů. Na modelu EAU, který je na našem pracovišti již roky využíván, bude sledován zejména imunomodulační potenciál MSC, dále schopnost jejich migrace do místa poškození sítnice a doba jejich přežívání. Bude měřena exprese a produkce prozánětlivých a protizánětlivých faktorů v poškozené sítnici, cévnatce a sklivci a jejich změna po aplikaci MSC. Zároveň bude testován efekt lokální aplikace kondicionovaného média získaného kultivací MSC a také samotných exosomů vylučovaných z MSC.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Výsledky přispějí k objasnění terapeutického přínosu MSC pro léčbu závažných zrak ohrožujících onemocnění sítnice a cévnatky, které jsou provázeny zánětem. Získané poznatky mohou být prospěšné pro případnou klinickou studii tohoto typu léčby u nitroočních zánětů.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Myší modely budou využity při studiu terapeutických vlastností MSC a jejich sekrečních produktů v experimentálně navozeném patologickém prostředí a pro testování účinnosti a bezpečnosti vybraných léčebných postupů. Dospělé laboratorní myši (6-10 týdnů) kmene C57BL/6J budou umístěny do chovných nádob a adaptovány na nové prostředí minimálně týden před zahájením vlastního experimentu. Kultivované MSC či jejich produkty budou injekčně v objemu 1 či 2 ul fyziologického roztoku či bezsérového média pomocí mikrostříkačky a 33G jehly vpraveny intravitálně do oka pokusného zvířete, v prvních pokusech do zdravého oka (ověření bezpečnosti pokusu) a následně do oka s patologickými změnami. Využívat budeme myší model EAU - indukce pomocí kompletního Freundova adjuvans a pertusového toxinu, zavedený model používaný v našich předchozích projektech. Zvířatům budou aplikována standardním šetným způsobem anestetika a jiné látky nutné pro navození nitroočního onemocnění a pro jeho ovlivnění. Rozsah očního poškození bude hodnocen v celkové anestezii za použití otoskopu napojeného na fotoaparát. Po navození mydriázy lokální oční aplikací 1 kapky 1% roztoku tropicamidu (Unitropic 1% oph. gtt., Unimed Pharma, Slovakia) a 1 kapky 10% roztoku fenylefrinu (Neosynephrin-POS 10% oph. gtt., Ursapharm, Czech Republic). Na oční povrch bude aplikován

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

Zvířata podstoupí nejméně dvakrát během pokusu celkovou anestezii, při rozvoji zánětu v třetím a čtvrtém týdnu budou mít zhoršené vidění.

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
myš laboratorní (Mus musculus) [A1]	0	0	450	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				
Experimentální zvířata nebudou ponechána naživu. Po usmrcení cervikální dislokací bude provedena enukleace. Tkáně budou následně zpracovány pomocí histologických a molekulárně genetických metod.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
In vitro pokusy jsou zavedeny a dlouhodobě užívány na spolupracujícím pracovišti Oddělení nanotoxikologie a molekulární epidemiologie, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i. Ty experimenty, které nebude možné ověřit in vitro metodikou, budou provedeny na experimentálním modelu. Cílem pokusů na zvířatech je zkoumat chování a funkčnost in vitro kultivovaných a do oka aplikovaných kmenových buněk a jejich produktů. Proběhlo ověření v databázi validovaných alternativních metod schválených a přijatých Evropskou společností pro alternativní metody (European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)). Studii nelze modelovat alternativními metodami bez použití živých zvířat či lidských dobrovolníků.				
Omezení používání zvířat				
Bude použit minimální počet myší zajišťující statistickou významnost pokusu, a to na základě našich předchozích zkušeností (Heissigerova et al., JIR 2016:5065703).				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Myši jsou chovány ve standardních podmínkách v individuálně ventilovaných klecích v počtu max. 4 zvířata na klec (voda a potrava ad libitum, pravidelná výměna podestýlky, atd.). Před zahájením pokusu proběhne adaptace na nové prostředí po dobu minimálně 1 týdne. Během indukce uveitidy a při následných kontrolách očního nálezu jsou myši udržovány v celkové anestezii inhalací směsi isofluranu a vzduchu. Při nitroočních aplikacích jsou myši uvedeny do celkové anestezie intraperitoneální aplikací směsi ketaminu a xylazinu v dávkování dle jejich hmotnosti. Během anestezie jsou myši umístěny na vyhřívané podložce a sledovány do kompletního zotavení. Během vyšetřování jsou myším do očí aplikována lokální anestetika k minimalizaci bolesti a oční gel jako prevence oschnutí očního povrchu. Pokusná zvířata budou pravidelně 1x denně kontrolována zvětšovací loupou, v případě známek strádání zvířete bude pokus ukončen eutanázií zvířete.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Použití budou samci a samice kmene C57BL/6J stáří 6-10 týdnů, konvenčního chovu. Uvedený kmen myší je dostatečně citlivý k vyvolání autoimunitní uveitidy. Předpokládaný maximální počet je 150 myší/rok, s ohledem na statistickou průkaznost výsledků je tento počet nutný. Pokusy na zvířatech budou představovat důležité rozšíření in vitro experimentů prováděných v tkáňových kulturách, které neumožňují přesnou simulaci komplexních imunitních a regeneračních mechanismů samostatného organismu. Cílem pokusů na zvířatech je nutnost ověřit chování a funkčnost in vitro kultivovaných a do oka aplikovaných kmenových buněk a jejich produktů.