

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

Příprava ostrůvkových organoidů z expandovaných buněk Langerhansových ostrůvků a amnionu

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

36

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾

Diabetes, Langerhansovy ostrůvky, transplantace

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

Cílem projektu je vývoj a ověření nové metody léčby diabetu, založené na použití ostrůvkových organoidů produkujících inzulin. Ostrůvkové organoidy budou vytvořeny z expandovaných ostrůvkových buněk amniotických epiteliálních buněk a endoteliálních buněk.

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)

Transplantace pankreatu, nebo izolovaných Langerhansových ostrůvků jsou v současné době jediné dostupné způsoby léčby diabetu 1. typu, umožňující obnovu endogenní produkce inzulinu. Hlavním úskalím transplantační léčby diabetu je omezený počet orgánových dárců a omezené množství izolovaných pankreatických ostrůvků. Vývoj nové metody pro přípravu tkáně produkující inzulin, která by byla k dispozici v dostatečné kvalitě a množství, by mohl výrazně zvýšit potenciál transplantační léčby diabetu. Hlavním cílem projektu je jednak výrazné zvýšení množství inzulin produkující ostrůvkové tkáně pomocí nové technologie založené na použití syntetických mRNA kódujících regulátory buněčného cyklu a zároveň její následné použití pro přípravu ostrůvkových organoidů produkujících inzulin. Ostrůvkové organoidy budou kromě expandovaných ostrůvkových buněk vytvořeny i z amniotických epiteliálních buněk, které poskytnou protizánětlivou a imunomodulační podporu a endoteliálních buněk, které přispějí k lepší vaskularizaci a imunitní ochraně transplantované tkáně. Vzhledem k vysoké míře incidence diabetu se jedná o výzkum, který by mohl výrazně rozšířit stávající způsoby léčby tohoto závažného onemocnění.

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

Před zahájením samotného pokusu, bude zvířatům ponechána doba minimálně 2-4 týdnů na adaptování k novým chovným podmínkám.

Dárci: Izolace Langerhansových ostrůvků se provádí v celkové anestézii (Dexdomitor 0,25 – 0,5 mg/kg a Narketan 50 mg/kg i.m.). Dárci už nenabudou vědomí.

Příjemci: Diabetes bude navozen intraperitoneálním podáním streptozotocinu (60 mg/kg u potkanů, 200 mg/kg u myší). Navození diabetu bude posouzeno podle hodnot glykemie, která bude měřena z kapky kapilární krve 3 dny po sobě.

Transplantace ostrůvkových organoidů s *ex vivo* expandovanými beta-buňkami bude provedena v celkové anestezii zajištěné Zoletilem a Rometarem (30 mg/kg a 20mg/kg) pro myši a inhalační anestézie pro Brown-Norway/Crl potkany (isofluranum 5% iniciace a 2,5% udržení + butorphanolum 1 mg/kg i.m.). Krátkým řezem v dolní části zad umožníme přístup k levé ledvině, kterou opatrně vytáhneme na vlhký sterilní tampon. Pod kapsulu ledviny bude zavedena kanyla, přes kterou budou aplikovány Langerhansovy ostrůvky resuspendované v minimálním množství fyziologického roztoku. Následně umístíme ledvinu do původní polohy. Rána bude zašita ve dvou vrstvách. Zvíře po zákroku označíme a uložíme na vyhřívanou podložku do probuzení. Bolest po zákroku bude tlumena podáním analgetik (meloxicamum). Po transplantaci bude zvířatům pravidelně monitorována glykemie z kapky krve z ocasní žíly (3x/týden) a 1 a 2 měsíce po transplantaci ostrůvkových organoidů bude u potkanů proveden Intravenózní glukózový toleranční test a u myší Intraperitoneální glukózový toleranční test.

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) a doba trvání těchto účinků					
Jediným nežádoucím účinkem plynoucím z navrhovaného projektu je vyvolaná hyperglykemie po navození diabetu, která může vést k přechodné ztrátě hmotnosti do doby transplantace a krátce po ní (2 týdny). Míra závažnosti plynoucí z přetrvávající hyperglykemie je vzhledem k poměrně krátké době pokusu nízká až střední.					
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
Myš laboratorní (Mus musculus)	60			60	
Potkan laboratorní (Rattus norvegicus)	300	240		60	
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena					
Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití					
Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu					
Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu					
Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - <i>uveďte</i>					
Všechna zvířata budou na konci pokusu usmrcena buď z důvodu izolace/získání Langerhansových ostrůvků nebo z důvodů analýzy transplantované inzulin produkující tkáně.					
Uplatňování 3R					
Nahrazení používání zvířat - <i>uveďte, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu</i>					
Navrhovatel prohlašuje, že projekt nelze nahradit alternativní technikou, protože neexistuje žádný <i>in vitro</i> model, který by uměl ověřit schopnost ostrůvkových organoidů vyléčit diabetes. Rovněž neexistuje stabilní buněčná linie, kterou by bylo možné využít jako zdroj pankreatických beta-buněk pro přípravu ostrůvkových organoidů.					
Omezení používání zvířat - <i>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).</i>					
V rámci studie bude využit minimální počet zvířat nutných pro vytvoření statisticky významného souboru. V seznamu ECVAM schválených alternativních metod neexistuje žádný alternativní model, který by mohl nahradit <i>in vivo</i> model léčby experimentálního diabetu.					
Šetrné zacházení se zvířaty - <i>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</i>					
Všechny operační výkony budou prováděny v celkové anestezii, pooperační péče bude prováděna v dostatečné analgezií. Zvířata budou mít volný přístup k potravě a tekutinám. Glykémie se bude měřit z minimálního množství kapky krve odebrané tenkou jehlou z ocasní žíly. V pokusu budou využity operační standardy shodné s humánní medicínou a manipulace se zvířaty bude prováděna v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, tak aby byla zajištěna maximální pohoda a dobrý zdravotní stav pokusných zvířat.					
Použité druhy zvířat - <i>vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií</i>					
Imunodeficitní myš kmene NOD-SCID IL2rg ^{-/-} (NSG) je ideálním modelem pro studium xenotransplantovaných buněk pocházejících od jiných živočišných druhů. NSG myši postrádají zralé T buňky, B buňky a NK buňky. Tím je zabráněno vzniku rejekce po transplantaci buněk jiného živočišného druhu. NSG myši jsou vhodné rovněž z hlediska snadného navození diabetu pomocí podání streptozotocinu. Rovněž jsou vhodné z hlediska potřebného množství inzulin produkujících buněk nutných pro transplantaci léčbu diabetu. V rámci pokusu budou použity samice NSG myši ve věku 1-2 měsíců při zahájení experimentu. Potkani kmene Wistar a Brown-Norway/Crl byli zvoleni jako vhodní dárce z důvodů možnosti získat dostatečné množství Langerhansových ostrůvků, které je potřebné pro přípravu ostrůvkových organoidů. V rámci pokusu budou použity samice potkanů kmene Brown-Norway/Crl a samci kmene Wistar ve věku 3-6 měsíců při zahájení experimentu.					

- 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