

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

Podpora transplantace pankreatických ostrůvků epigenetickou intervencí

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

9

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾

Transplantace, pankreatické ostrůvky, tkáňový faktor, siRNA

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

Transplantace (Tx) Langerhansových ostrůvků je v praxi limitovaná mimo jiné vysokým procentem buněk ztracených během 2 dnů po Tx díky nespecifickému zánětu spouštěnému tkáňovým faktorem. Předpokládáme, že krátkodobým snížením exprese genu pro tkáňový faktor pomocí RNA interference můžeme omezit intenzitu zánětu a zlepšit tak přijetí ostrůvků po transplantaci do portální žíly. Navazujeme na dříve řešený projekt, kdy pro transfekci siRNA do buněk ostrůvků byla použita technika mikroporace (elektroporace), která sice zajistila efektivní průnik siRNA do buněk ostrůvků, ale snižovala i jejich viabilitu. Nově lokalizovaná metoda transfekce RNA do buněk pomocí lipofekčního činidla RNAiMAX významně méně snižuje viabilitu buněk ostrůvků, a proto by měla zlepšit přežívání štetu oproti transfekci mikroporací.

Krátkodobá inhibice produkce tkáňového faktoru je výhodná, neboť akutně snižuje intenzitu zánětu a lokální hyperkoagulace a v pozdějším období nebrání stimulaci neoangiogeneze tkáňovým faktorem.

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)

Technika je slibná pro allogenní Tx LO diabetikům 1. typu s poruchou rozpoznávání hypoglykemie. Vyšší podíl přijetých ostrůvků by mohl umožnit normalizaci glykemie ostrůvky z jednoho dárcovského pankreatu – dnes je třeba 2-3 kadaverosních pankreatů. Tím by se transplantační léčba mohla dostat vyššímu počtu potřebných pacientů.

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

Dárci: Izolace pankreatických 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 (50 mg/kg). Navození diabetu bude posouzeno podle hodnot glykemie, která bude měřena z kapky kapilární krve 3 dny po sobě. Transplantace ostrůvků se provádí v celkové anestézii (isofluranum 5%/2,5% inh + butorphanolum 1 mg/kg i.m.). Bolest po zákroku bude tlumena podáním analgetik (meloxicamum 1 mg/kg s.c.). Výsledky transplantace budou posuzovány podle hodnot glykemie transplantovaných zvířat (1. týden po Tx měřeno každý den, poté 2x týdně) a intravenózním glukózovým tolerančním testem (IVGTT - aplikace glukózy se provádí v inhalační anestezii). V případě selhání štetu budou příjemci usmrceni.

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

Zvířata použitá jako dárce pro izolaci Langerhansových ostrůvků nenabudou vědomí. Zvířata, kterým budou transplantovány ostrůvky, podstoupí pokusy střední závažnosti. Nežádoucím účinkem plynoucím z navrhovaného projektu je možnost vyvolání hyperglykemie po navození diabetu a následná přechodná ztráta

hmotnosti. Míra závažnosti plynoucí z přetrvávající hyperglykemie je vzhledem k poměrně krátké době (1 týden) nízká.					
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
Potkan laboratorní (Rattus norvegicus)	32	22		10	
Zvolte položku.					
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 Langerhansových ostrůvků nebo z důvodů analýzy pankreatu.					
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>					
Izolace Langerhansových ostrůvků i ostatních typů buněk je možné provádět pouze na tkáni odebrané z čerstvě usmrcených zvířat. Transplantační experimenty sledující funkci transplantovaných ostrůvků je možné provádět pouze na živých zvířatech. V seznamu ECVAM schválených alternativních metod neexistuje žádný alternativní model, který by mohl nahradit <i>in vivo</i> model léčby experimentálního diabetu. Navrhované experimenty prokazatelně nelze nahradit metodami <i>in vitro</i> .					
Omezení používání zvířat - <i>vysvětlíte, 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>					
Celkové počty experimentálních zvířat byly zvoleny na nejnižších počtech umožňujících statistické porovnání skupin.					
Setrné 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>					
V pokusech budou využity operační standardy dle akreditace pracoviště 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. Všechny operační výkony budou prováděny v celkové anestezii, pooperačně bude podávána analgezie. Zvířata budou mít volný přístup k potravě a vodě. Glykémie se bude měřit z minimálního množství kapky krve odebrané tenkou jehlou z ocasní žíly.					
Použité druhy zvířat - <i>vysvětlíte výběr druhů a souvisejících životních stadií</i>					
Dospělí potkani kmene Brown Norway jsou v naší laboratoři tradičně zavedeným modelem a velká část dosavadních experimentů probíhala právě s využitím těchto zvířat. Plánujeme použít 32 samců kmene Brown Norway jako dárců i příjemců Langerhansových ostrůvků o hmotnosti 200-300 g.					

- 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