Vyplňujte jen bílé kolonky!

Formulář vyplňujte na počítači; kolonky se zvětší automaticky podle množství textu.

NETECHNICKÉ SHRNUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 54/2015

Název projektu pokusů

Buněčná a genová terapie traumatického poškození mozku s využitím preklinického modelu miniaturního prasete.

Doba trvání projektu pokusů	56 měsíců
Klíčová slova - *maximálně 5*	miniprase, traumatické poškození mozku, buněčná a genová terapie

Účel projektu pokusů - *označte jej křížkem (x) do prázdného políčka*

x	základní výzkum
x	translační nebo aplikovaný výzkum
x	vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
	zachování druhů
x	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
	trestní řízení a jiné soudní řízení

Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)

Charakteristika cílů:

1. Preklinické experimenty jsou navrženy tak, aby bylo detailně studováno traumatické poškození mozku u miniaturního prasete (pomoci klinického vyšetření, magnetickou rezonancí, měřením evokovaných elektrických potenciálů nervové tkáně, implantovanou telemetrií (EEG, ECG, EMG, aktivita, teplota atd.) atd.
2. Takto vytvořený a charakterizovaný model bude následně sloužit pro ověření bezpečnosti a terapeutické účinnosti buněčné (transplantace lidských a prasečích míšních nervových prekurzorů) a/nebo genové (injekce LV nebo AAV konstruktů) terapie.

Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů (jak by mohlo být dosaženo pokroku ve vašem vědním oboru nebo jaký přínos by z něj člověk či zvířata mohli mít)

Traumatické poranění mozku (TBI) postihuje 1,4 milionu Američanů ročně; 175000 v Kalifornii. Projektilem-indukovaná mozková zranění jsou běžná mezi vojenským personálem ve válečných zónách, mezi civilisty u nehod se střelními zbraněmi nebo v souvislosti se zločiny se střelnými zbraněmi. Když dojde k poranění mozku, nervové buňky poblíž místa poškození umírají v důsledku počátečního traumatu a přerušení průtoku krve. Sekundární poškození nastane, když sousední tkáň je poškozena zánětlivou reakcí po počátečním poranění, což vede k většímu poškození. Toto poškození nastává u dvou typů buněk CNS: neuronů, elektricky aktivních buněk, a oligodendrocytů, buněk, které vytvářejí myelinovou izolaci. V důsledku TBI pacient typicky ztrácí kognitivní funkce v jedné nebo více doménách spojených s poškozením (např. deficitem pozornosti po poškození čelního laloku, nebo deficitem učení a paměti spojených s poškozením spánkového laloku nebo hippokampu); post-traumatické záchvaty jsou také časté. V současné době neexistuje žádné ošetření, které by bylo prospěšné při zmírňování kognitivních problémů spojených dokonce jenom s mírným TBI. Prasata nebo miniprasata mohou být využita pro simulaci TBI, a tím i pro testování účinnosti různých terapeutických přístupů, jakožto velký zvířecí model s mozkovými strukturami podobnými strukturám lidského mozku. V poslední době je stále více důkazů o tom, že indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs) nebo od iPSCs odvozené neurální prekurzory (iPS-NPCs) a genová terapie (downregulace prozánětlivých cytokinů nebo upregulace neurotrofických faktorů) můžou zlepšit neurologické funkce v hlodavčích modelech ischemického poškození mozku. Přínosem této studie, bude stanovení do jaké míry iPS-NPCs mohou přispět ke zlepšení neurologického deficitu v miniprasečím modelu mozkového poranění a simulovat lidskou konkrétní situaci.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Miniaturní prasata v množství maximálně 500 ks za celé období.

Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?

Následky traumatického poškození mozku u prasete/miniprasete jsou studovány a charakterizovány různými vědeckými týmy (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26123115, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25907868). Miniprasata s námi popisovanou traumatickou mozkovou lézi by měly bez problémů přijímat krmivo a přibírat na tělesné hmotnosti. Budou držena na hluboké podestýlce. V případě krátkodobě (1-3 dni) trvajícího zhoršení klinického stavu spojeného s výskytem ataxie, zhoršení motorického skóre nebo ojedinělým výskytem epileptických záchvatů (1-3x denně) budeme zvířata léčit symptomaticky. V případě zhoršení klinického stavu budou zvířata bezodkladně utracena předávkováním barbituráty. Klasifikace závažnosti je střední. Po ukončení experimentu budou některá zvířata usmrcena podáním letální dávky Thiopentalu a KCl a následně vykrvena nebo použita pro další pokus, ve kterém již zvíře nenabude vědomí.

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.

Pro zavedení buněčné a/nebo genové terapie do klinické praxe je nutné otestovat její bezpečnost a terapeutický účinek na velkém zvířecím modelu. Jako model pro poškození mozku použijeme modifikovanou metodiku poškození mozku pomocí Fogartyho katétru (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842194) nalezenou v databázi (http://www.gopubmed.org/web/go3r/). Miniaturní prase je z etických a ekonomických důvodů nejvhodnější alternativou. Model poškození mozku na hlodavcích má své anatomické omezení (velikost mozku a jeho struktur). Neexistuje alternativní metoda bez použití zvířecích modelů pro testování buněčné a/nebo genové terapie, která by napodobila

komplexnost nebo složitost zvířecího organizmu a jeho mozku.
Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.
V předchozích studiích na miniprasatech a hlodavcích jsme optimalizovali počty experimentálních zvířat v jednotlivých skupinách (3-5ks) a také počty a objemy injekcí a koncentrace buněk a virových konstruktů nebo imunosupresi. Uvedený počet zvířat je nezbytný pro možnou variabilní odpověď jedinců na traumatické poškození mozku a následnou terapii nebo transplantační zákrok.
Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlete volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů. Vysvětlete obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.
Následky traumatického poškození mozku u prasete/miniprasete jsou studovány a charakterizovány různými vědeckými týmy (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26123115, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25907868). Miniprasata s námi popisovanou traumatickou mozkovou lézi by měly bez problémů přijímat krmivo a přibírají na tělesné hmotnosti. Budou držena na hluboké podestýlce. Veškeré chirurgické úkony jsou prováděny v celkové anestezii. Průběh zotavení a jeho parametry budou stanovovány neinvazivními telemetrickými metodami, MRI a analýzou odebrané krve. V případě krátkodobě (1-3 dni) trvajícího zhoršení klinického stavu spojeného s výskytem ataxie, zhoršení motorického skóre nebo ojedinělým výskytem epileptických záchvatů (1-3x denně) budeme zvířata léčit symptomaticky. V případě zhoršení klinického stavu budou zvířata bezodkladně utracena předávkováním barbituráty. V předchozích experimentech jsme také optimalizovali dávkovaní imunosupresivních látek (*takrolimus, mykofenolá mofetilt, dexametazon*) miniaturním prasatům a tím v budoucích experimentech omezíme jejich nežádoucí vedlejší účinky (ztráta hmotnosti, nechutenství, poškození ledvin, srdce a jater) na minimum. Zvířata budou po navození traumatického poškození mozku dostávat léky s protizánětlivým a analgetickým účinkem Vetalgin nebo Flunixin (i.m.).