

## NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

### Název projektu pokusů

Testování potenciální účinnosti přípravku přírodní membrány vaječné skořápky (NEM) na myším modelu kolagenem indukované artritidy.

|                                        |                       |
|----------------------------------------|-----------------------|
| Doba trvání projektu pokusů v měsících | 60                    |
| Klíčová slova                          | revmatoidní artritida |
| testování látek                        | léčba                 |
| myší model                             | 0                     |

### Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Imunitní systém [PB7]

Translační a aplikovaný výzkum: Poruchy imunity u lidí [PT28]

Použití pro legislativní účely a běžnou výrobu: Jiné zkoušení účinnosti a tolerance [PR71]

0

### Cíle projektu pokusů

Cílem navrhovaného projektu je zjistit potenciální terapeutickou a profylaktickou účinnost přírodní membrány vaječné skořápky (NEM) a jejích variant a derivátů a jednotlivých složek na revmatoidní artritidu, a to především s využitím její biologické bezpečnosti.

### Potenciální přínosy projektu pokusů

Očekávanými výstupy plánovaných pokusů jsou:

- 1) Prokázání účinnosti NEM proti revmatoidní artritidě s ohledem na úlevu od bolesti kloubů a ztuhlosti.
- 2) Zjištění terapeutických koncentrací posuzovaných látek.

### Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Veškeré stresující, či potenciálně bolestivé zákroky budou probíhat v anestezii.

Injekce: 1) i.d. kolagen s adjuvans pro indukci artritidy (vytvoření CIA modelu) – 2x. 2) i.p. Zoletil (zolazepam, tiletamine) (20mg/ml) a xylazine (1 mg/ml), dávkování 50mg/kg zoletil, 3,2 mg/kg xylazin – pro měření na mikroCT, 1-2x.

Orální podání léčiv: gavážovací sondou – opakování (denně, max. 42 dnů, v případě prodloužení experimentu max. 56 dnů) – testovaná substance (NEM) 2-max10 mg/20g myš a den, či pouze vehikulum (0.5% methyl celulosa); pozitivní kontrolní léčivo methotrexát bude aplikováno podkožní injekcí v koncentracích 1mg/kg/den.

Odběr krve: odebírá se jemnou skleněnou kapilárou při inhalační anestezii isofluran 4%.

Ostatní procedury nejsou bolestivé ani nadměrně stresující z podstaty experimentálního designu (plethysmometer, open field, analýza chůze).

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

Model kolagenem indukované artritidy (CIA) je jedním ze standardních modelů revmatoidní artritidy (RA) používaných v preklinickém výzkumu. Myší CIA model se shoduje v několika patologických rysech s RA, jako je porušení tolerance a tvorba autoprotilátek proti kolagenu, infiltrace synoviálních zánětlivých buněk, synoviální hyperplazie, destrukce chrupavky a eroze kostí. Pro testování potenciální účinnosti NEM na terapii a prevenci revmatoidní artritidy bude použit myší model artritidy indukované kolagenem II. typu u myší kmene DBA/1, stáří myší bude 8-max 14 týdnů. Experiment bude trvat 44-56 dní, a v případě dosažení hranice welfare bude ukončen humánním utrácením. Vzhledem k plánované délce studie neočekáváme závažnější dopady, protože artritida by v závěru pokusu u většiny jedinců neměla dosáhnout nejvyššího stupně (hodnoceno skórováním). Pokud by nicméně k vyšší bolestivosti došlo ještě před ukončením experimentu, tak bude po ukončení testů pohybu podávána analgezie.

### 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     | 1096    | 0       |

| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 0                       | 0                                            | 0                  | 0 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------|--------------------|---|
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 0                       | 0                                            | 0                  | 0 |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 0                       | 0                                            | 0                  | 0 |
| <b>Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                         |                                              |                    |   |
| 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                  |   |
| <b>Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                         |                                              |                    |   |
| Během experimentu na modelu RA (CIA, DBA/1 mice) bude docházet k zánětlivým změnám drobných kloubů. Zvířata budou kontrolována každý druhý den a v případě vývoje bolestivých příznaků ohrožujících welfare jednotlivých zvířat dojde k humanímu utracení. Po ukončení pokusu zvířata budou usmrcena předávkováním inhalačního anestetika, popř. cervikální dislokací. Následně bude ověřena posmrtná ztuhlost. Terminální procedura bude zahrnovat odběr krve z dolní duté žíly, očního plexu, ocasní žíly nebo srdeční punkcí, a po usmrcení bude proveden terminální odběr tkání pro histologické zpracování. Zvířata nebudou po ukončení pokusu ponechána naživu.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                         |                                              |                    |   |
| <b>Uplatňování 3R</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                         |                                              |                    |   |
| <b>Nahrazení používání zvířat</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                         |                                              |                    |   |
| Pokus je prováděn jako součást testování aktivity a profilu vyvíjených látek účinných proti revmatoidní artritidě RA. Získané poznatky jsou nenahraditelné a nelze získat alternativními metodami. V současné době nelze pokus na zvířeti nahradit žádnou validovanou alternativní metodou popsanou na webových stránkách Ministerstva zemědělství ČR, ( <a href="http://eagri.cz/public/web/mze/ochrana-zvirat/pokusna-zvirata/projekty-pokusu-1/">http://eagri.cz/public/web/mze/ochrana-zvirat/pokusna-zvirata/projekty-pokusu-1/</a> ) a dále na stránkách Evropské společnosti pro alternativní metody (ECVAM, <a href="https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam">https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam</a> ).                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                         |                                              |                    |   |
| <b>Omezení používání zvířat</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                         |                                              |                    |   |
| Během celé studie bude použito minimální množství zvířat, které bude nezbytné pro udržení produkční kolonie a současně bude dostačující pro opakování pokusů a správné statistické zhodnocení získaných výsledků. Testování látek pro potlačení fenotypu achondroplazie je také, pro snížení počtu pokusných zvířat, rozfázováno do tří etap, tak aby se postupným omezením neúčinných látek a koncentrací omezil počet pokusných zvířat.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                         |                                              |                    |   |
| <b>Šetrné zacházení se zvířaty</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                         |                                              |                    |   |
| Během křížení bude se zvířaty zacházeno šetrným způsobem tak, aby jim nebyla způsobena nadměrná bolest, stres, strach a utrpení. Se zvířaty bude zacházeno klidně, zvířata budou umístěna v chovných nádobách v samostatné místnosti nebo místnostech k tomu určených. V případě závažného zhoršení zdravotního stavu budou tato zvířata neprodleně vyřazena z pokusu a usmrcena. Zvířata v chovu jsou každodenně kontrolována a v případě identifikace jakéhokoliv typu utrpení (např. obtíže s příjmem potravy, omezený pohyb, úraz jiným zvířetem), je takový jedinec bezodkladně usmrcen v souladu s vyhláškou č. 419/2012 Sb., o ochraně pokusných zvířat. U zvířat vystavených potížím z vyvolané artritidy budou využity všechny možnosti přirozeného zmírnění utrpení, jako je obohacení podestýlky, snížené krmítko, menší počet jedinců v nádobě a pečlivá každodenní kontrola. V případě zaznamenané bolestivosti v závěrečné fázi pokusu bude po ukončení behaviorálních testů podávána analgezie. |                         |                                              |                    |   |
| <b>Použité druhy zvířat - vysvětlení</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                         |                                              |                    |   |

Vybraný model laboratorní myši kmene DBA/1. Model kolagenem indukované artritidy (CIA) je jedním ze standardních modelů revmatoidní artritidy (RA) používaných v preklinickém výzkumu