

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Podpora hojení chronických ran pomocí krycích materiálů na bázi hyaluronanu

Doba trvání projektu pokusů v měsících	38
Klíčová slova	chronické rány
hojení	hyaluronan
0	0

Účely projektu pokusů

Translační a aplikovaný výzkum: Jiné poruchy u lidí [PT32]

0
0
0

Cíle projektu pokusů

Chronická rána je rána, u níž je normální reparativní proces narušen a akutní rána tak přechází v ránu chronickou. Typickým příkladem jsou bérkové vředy. Nejčastěji je vznik chronických ran zapříčiněn infekcemi, přidruženými onemocněními či základním stavem pacienta.

Při léčbě chronických ran je kombinována řada přístupů, jež zahrnují jak diagnostiku příčiny chronické rány, tak ošetření rány a jejího okolí a následné krytí a udržování „čistoty“ rány. Hyaluronan je základní složkou extracelulární matrix a v reparačních procesech může podporovat proces hojení zejména v jeho počátečních fázích. V rámci našeho výzkumu se zabýváme definováním mechanismů vzniku a rozvoje chronických ran a vývojem nových krycích prostředků kombinujících pro-reparativní účinky hyaluronanu s antiseptickými účinky. Tento výzkum probíhá ve spolupráci s firmou Contipro (Dolní Dobrouč, ČR).

Potenciální přínosy projektu pokusů

Hlavními cíli projektu jsou I. pochopení mechanismu vzniku a rozvoje chronických ran v kontextu nadměrné imunitní reakce, II. vývoj nových krycích prostředků kombinujících pro-reparativní účinky hyaluronanu s antiseptickými účinky. V rámci projektu proběhne in vivo testování vyvíjeného zdravotního prostředku na modelovém organismu myši na excisních ranách, které budou překryty testovaným materiálem. Při testování bude kladen důraz na sledování všech 3 fází hojení chronických ran: I. čistící/zánětlivou fázi, II. granulační fázi a III. epitelizační fázi. Rány budou hodnoceny makroskopicky, ve vybraných časových intervalech budou na odebraných vzorcích tkáně rány provedeny histologické analýzy řezů, analýza exprese genů a proteinové koncentrace markerů spojených s regulací hojení. V plasmě budou analyzovány systémové koncentrace zánětlivých mediátorů. Očekávaným přínosem projektu bude pochopení mechanismů vzniku chronických ran, prevence a jejich léčba pomocí účinnějších strategií zamezujících jejich vzniku a rozvoje. Znalost příčiny rány, procesu hojení a faktorů, které mohou hojení nežádoucím způsobem ovlivnit, jejich eliminace, využití všech dostupných léčebných metod, postupů a podpůrných intervencí jsou základními podmínkami pro stanovení správného přístupu k léčbě všech chronických ran. Chronické rány se vyznačují dlouhou dobou hojení,

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

U zvířat budou v celkové narkóze navozené inhalační anestézií vytvářeny dvě excisní rány na hřbetu. Rány budou překryty samolepícím obvazem na rány, který bude fixován leukoplastem. Injekčně bude podán opiját nalbufin. Při ukončení experimentu bude opět navozena celková narkóza inhalační anestézií. Odebraná bude krev ze srdce kardiopunkcí a pomocí chirurgických nástrojů také vybrané vnitřní orgány a rány i s okolní tkání.

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

Vytvoření excisních ran může i přes použití analgetika vést k indukci mírného stresu u zvířete. Při operačních zákrocích a při ukončování pokusů bude používána inhalační anestezie (Isoflurane, 2,5-5%). Proti bolesti bude podáván ještě před vyvedením zvířete z anestézie injekčně opiját nalbufin v 1 ml fyziol.roztoku, což zároveň zajistí hydrataci pokusného zvířete. Následně v průběhu celého pokusu bude nalbufin podáván v pitné vodě (koncentrace 2,5 mg/100 ml). Alternativně bude podáván nalbufin (0,5 mg/kg) v kombinaci s NSAIDS carprofen (5 mg/kg) v 0,5 ml fyziol. roztoku IP každých 12 h. Na konci pokusu budou zvířata opět uspána inhalačním anestetikem, budou odebrány vzorky tkání, nakonec bude odebráno maximální množství krve kardiopunkcí a zvířata již nenabudou vědomí.

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	320	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

Z důvodu odběru vnitřních orgánů a ran budou zvířata usmrcena expozicí inhalační anestezie (Isoflurane, 2,5-5%) a následným odběrem maximálního množství krve kardiopunkcí.

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat

Za účelem vývoje krycích materiálů na bázi hyaluronanu budou tyto nejprve testovány na in vitro primárních epiteliálních buněk a lidských dermálních fibroblastů. Pouze nejperspektivnější prostředky budou vybrány pro testování v in vivo modelech. Zmíněným experimentům předchází rozsáhlé testování na in vitro modelech, nicméně plánované pokusy na zvířatech nelze nahradit alternativními metodami. Podmínky in vitro nejsou vhodné pro testování komplexních dějů, jako jsou reparační a zánětlivé procesy, jelikož nedostatečně simulují odpověď mnohobuněčného savčího organismu. Studium v podmínkách in vivo je tedy jedinou možností, jak vznik chronických ran a možnosti jeho zamezení, navíc v kontextu specifického mikroprostředí a imunitního systému, popsat.

Omezení používání zvířat

Počet zvířat bude omezen na množství minimálně nutné pro statistické vyhodnocení dat získaných z pokusů, které budou průběžně vyhodnocovány. Na každém pokusném zvířeti budou vytvořeny dvě samostatné excisní rány, což omezí množství potřebných pokusných zvířat. Počet zvířat ve skupině nepřekročí 10 jedinců. Celkový počet zvířat nepřekročí 320 myši, a to včetně kontrolních jedinců.

Šetrné zacházení se zvířaty

Během všech experimentů bude se zvířaty zacházeno šetrným způsobem tak, aby jim nebyla působena nadměrná bolest, stres, strach a utrpení. Se zvířaty bude zacházeno klidně. Pro operační zákroky a ukončování pokusů budou zvířata udržována v celkové anestezii, po celou dobu pokusu jim budou podávána analgetika pro zmírnění bolesti. Vytvoření excisních ran může ve zvířatech vyvolat stres. V případě, že některý pokusný zásah způsobí zvířeti obtíže, které významně změní kvalitu jeho života, bude takové zvíře neprodleně vyřazeno z pokusu a utraceno.

Použité druhy zvířat - vysvětlení

Studie bude provedena na dospělých samcích myší kmene C57Bl/6J, k tomuto účelu vhodných a běžně používaných. Z důvodů nutného statistického hodnocení je v průběhu řešení projektu plánováno použití celkem 320 myší, a to včetně kontrolních jedinců.