

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Studium transportu a biodistribuce nanoformulací reaktivátorů cholinesteras v experimentálním modelu laboratorní myši (*Mus musculus*) (GAČR 19-13628S)

Doba trvání projektu pokusů v měsících	8
Klíčová slova	Feritin
Cílená léčba	Reaktivátory cholinesteras
Nanomedicína	0

Účely projektu pokusů

Translační a aplikovaný výzkum: Nervové a duševní poruchy u lidí [PT24]

0

0

0

Cíle projektu pokusů

Cílem projektu je výzkum nových typů biokompatibilních transportérů založený na rekombinantních feritinech nesoucích syntetické reaktivátory cholinesteras na bázi oximů kovalentně konjugovaných s látkami umožňujícími jejich zobrazování pomocí fluorescenční detekce (BODIPY) a magnetické rezonance (Gd-DOTA). Feritiny vykazují dlouhý eliminační poločas z krevního oběhu a zvýšenou prostupnost (transcytózy) do nervové tkáně a mohou tak sloužit jako vhodné transportéry pro reaktivátory cholinesteras, jenž se mimo jiné využívají jako antidota při otravě nervovými plyny.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Primárním přínosem plánovaných experimentů bude především potvrzení či vyvrácení využitelnosti nové generace rekombinantních feritinů pro efektivní transport reaktivátorů cholinesteras do nervové tkáně (především mozek). I přes vysokou účinnost syntetizovaných reaktivátorů *in vitro* je jejich využitelnost na úrovni organismu komplikována špatnou biodostupností a nízkou stabilitou při cirkulaci krevním řečištěm, což značně komplikuje jejich využití jakožto antidota při otravě nervovými plyny či organofosfáty. Rekombinantní feritiny připravené pro účely studie vykazují vlastnosti, které lze považovat za velmi slibné a jejich validace v preklinickém modelu *in vivo* může přinést celé spektrum dalších možných aplikací. Výsledky získané těmito experimenty následně uveřejníme v recenzovaných časopisech a připravíme nové technologické postupy, které předpokládáme chránit formou užitého vzoru, případně patentu.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Laboratorním myším budou aplikovány biokompatibilní transportéry založené na feritinech, různého původu (lidský, myší, archeální) s enkapsulovanými modifikovanými reaktivátory cholinesteras, které budou kovalentně značené s fluorescenční próbou (BODIPY) či kontrastní próbou (Gd-DOTA) pro magnetickou rezonanci. Pro zvýšení bioakumulace apoferitinu v nervové tkáni, se budou testovat také modifikované feritiny, na jejichž povrch budou vázány peptidy stimulující procesy zapojené v transcytózy přes hematoencefalickou bariéru. V rámci plánovaného projektu bude porovnávána biodistribuce a farmakokinetika povrchově modifikovaných a nemodifikovaných feritinů s neenkapsulovanými reaktivátory cholinesteras. Feritiny a neenkapsulovaná reaktivátory cholinesteras budou dávkovány na základě již získaných zkušeností a budou podávány intravenózně (i.v.) nebo intraperitoneálně (i.p.), a to buď v jedné dávce (bolusově) nebo v několika dávkách, nejčastěji pak ve třech dávkách každý třetí den (maximální délka experimentu bude 10 dní). Objem jedné intravenózní či intraperitoneální dávky bude maximálně 300 μ L, nejčastěji však 250 μ L. Systémová toxicita (pokud by nastala) bude kontrolována pravidelným sledováním tělesné váhy a celkového welfare myši v pokusu. Dávky dosud netestovaných feritinů, pokud by to situace vyžadovala, budou předem ověřeny na minimálním počtu

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

Nežádoucí účinky u testovaných zvířat se mohou projevit poškozením orgánů či patologickou odezvou imunitního systému jakožto reakcí na administraci feritinů s enkapsulovanými reaktivátory. Projekt je klasifikován s mírou závažnosti jako mírný. Zvířata budou po ukončení pokusu usmrcena předávkováním anestetikem či cervikální dislokací.

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 (<i>Mus musculus</i>) [A1]	2	1	0	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				
Eutanázie (isofluran, předávkování anestetikem, cervikální dislokace), Dle technologických postupů jsou kadavery ukládány do označeného kafilerního mrazicího boxu. Poté jsou odváženy asanační službou, se kterou má pracoviště smlouvu, ASANACE, s.r.o. Medlov. Opětovné použití zvířat není plánováno.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Navrhované schéma pokusu nelze nahradit jiným modelem, nelze provést na buněčném ani jiném modelu neboť sledujeme patofyziologickou odpověď celého organismu a akumulace léčiv v nervové tkáni.				
Omezení používání zvířat				
Plánování experimentů předcházelo důkladné studium již publikovaných vědeckých výsledků, aby se předešlo opakováním experimentů a nadměrné spotřebě zvířat. Zvířata budou používána v minimálních počtech, které umožní statistické vyhodnocení rozdílů mezi skupinami. Pokud to bude možné, budou sdíleny vzorky získané v experimentech. Analýzou většího počtu parametrů najednou (použití moderních, citlivých metod) docílíme další redukce potřebného počtu zvířat.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Myši inbredních kmenů jsou vhodnými modely pro studium dané problematiky, a to z důvodu homogenní odpovědi na aplikaci, ale také z důvodu jednoduché manipulace s jedinci. Veškerá manipulace se zvířaty bude co nejohleduplnější a co nejméně narušující přirozené potřeby zvířat. Aplikace nanoformulací reaktivátorů cholinesteras či volných reaktivátorů bude vždy probíhat pod celkovou anestezií, stejně tak jako následné zobrazování distribuce nanoformulací. Jiné stresující zákroky nejsou plánovány.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Myši inbredních kmenů BALB/c, C56BL/6, C3H/HeN nebo DBA/2 jsou vhodnými modely pro studium dané problematiky. Myši imunodeficientní (např. athymické nu/nu myši) jsou vhodné pro analýzu vlivů léčby bez účasti imunitního systému hostitele. Tyto myší modely umožní jak přímé sledování bioakumulace a biodostupnosti reaktivátorů cholinesteras enkapsulovaných ve feritinech bez účasti imunitního systému, tak komplexní hodnocení těchto procesů s aktivním zapojením procesů imunitního systému.