

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Nízkoteplotní 3D tisk biofunkcionalizovaných keramických kostních implantátů s nastavitelnými mechanickými vlastnostmi. TAČR TO01000309 – in vivo studie na potkanech

Doba trvání projektu pokusů v měsících	30
Klíčová slova	potkan, kostní implantát, 3D tisk
0	0
0	0

Účely projektu pokusů

0
0
0
0

Cíle projektu pokusů

Cílem studie je testovat a charakterizovat biologicky aktivní materiál pro nízkoteplotní 3D tisk kostních implantátů specifických pro pacienta. Materiál bude na bázi tixotropního polymerně-keramického kostního cementu (dále jen „cement“) vyvinutého na VUT Brno a chráněného EU patentem. Bezpečnost a funkce samostatného kostního cementu je již otestována v rámci projektu pokusů číslo MŠMT-13658/2018-2. 3D tištěné implantáty budou obohaceny o bioaktivní polysacharid chitosan a bioaktivní termostabilní protein FGF2 (fibroblastový růstový faktor 2) a antibakteriální peptid na bázi lyzostafinu (LYSSTAPH), které vylepší jeho osteointegrační, hojivé, mechanické a antibakteriální vlastnosti. Příklady studií všech 3 aditiv dokládající opodstatněnost níže navržených testů a zamýšlených aplikací jsou následující a všechny tyto uvedené studie byly realizovány členy tohoto týmu. Chitosan - <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.043>; FGF2 - <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00331>; lyzostafin - <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080519>.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Testovaný biologicky aktivní inkoust pro nízkoteplotní 3D tisk kostních implantátů specifických pro pacienta navazuje na již testovaný kostní cement (MŠMT-13658/2018-2), avšak nikdy nebyl testován ve formě 3D vytisknutého implantátu. Obohacení implantátu o chitosan, FGF2-STAB a LYSSTAPH mu dává originální vlastnosti, které nebyly doposud testovány a popsány. Vyvinutý inkoust pro 3D tisk kostních náhrad umožní připravovat kostní náhrady na míru pacientovi, zejména při komplikovaných lebečních a obličejových poraněních. 3D vytisknuté kostní náhrady budou mít vhodné mechanické a strukturní vlastnosti podobné kosti a budou zajišťovat optimální osteointegraci materiálu do zdravé kosti.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Operačním postupem fáze I a II bude implantace materiálu do dutiny vytvořené ve spongióze proximálního kondylu pravého i levého femuru. Pro implantaci materiálů bude použit minimální invazivní přístup, který spočívá ve vytvoření cca 15 mm přístupu mezi vastus fibularis a biceps femoris a obnažení dané části femuru. Následně bude vrtákem a frézou vytvořen v kondylu otvor o průměru 2-2,5 mm. Vytvořená kavita bude kompletně vyplněna testovaným 3D vytisknutým kostním implantátem nebo bude defekt ponechán prázdný (v případě kontrolních zvířat). Tyto operační postupy budou provedeny na 258 potkanech a každý zákrok bude trvat cca 30 min. Operačním postupem fáze III bude následující. V kraniální oblasti bude nejprve provedena šetrná incize kůže a podkoží, následně bude frézováním pod operačním mikroskopem provedena kontrolovaná kraniotomie v částečném profilu stěny parietální kosti, tak aby nezasahovala do dura mater. Předpokládaný maximální rozsah kraniotomie bude 4 x 4 x 1 mm. Do takto vytvořeného defektu bude vsazen vytisknutý implantát, který bude fixován kostním voskem, jenž současně zamezí i případnému nežádoucímu prorůstání fibroblastů z kůže a měkkých tkání. Tyto operační postupy budou provedeny na 120 potkanech a každý zákrok bude trvat cca 60 min.

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

Neočekáváme žádné dlouhodobé nepříznivé účinky na zvířata. Chirurgické zákroky budou prováděny v celkové anestezii. Po operačním výkonu budou minimálně po dobu 72 hod. podávána analgetika: v den operace bude zvířatům SC aplikován nalbufin (0,5 mg/kg) a carprofen (5 mg/kg). Ve dnech 1-3 po operaci bude podáván tramadol prostřednictvím medikované vody (10 mg / 100 ml). Příjem vody bude monitorován a v případě potřeby bude tramadol aplikován SC injekcí. Zvířata budou v experimentu přežívat max. 18 týdnů. Z předchozích podobných studií (MŠMT-13658/2018-2) víme, že zvířata zákrok velmi dobře snášejí a již den po operaci jsou plně pohyblivá bez omezení přístupu k potravě a vodě.

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
potkan laboratorní (Rattus norvegicus) [A2]	0	0	378	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				
0				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Pro zavedení 3D tisknutých odbouratelných kostních náhrad do klinické praxe je nutné nejprve otestovat jejich bezpečnost a terapeutický účinek na dostatečně velkém souboru pokusných zvířat. Výsledné údaje jsou podstatné pro řádnou charakterizaci a hodnocení zkoušeného materiálu v souvislosti s jeho určeným použitím v klinické praxi. Ve strategii zkoušení uplatňujeme hierarchický přístup. Na základě provedených in vitro testů regulujeme výsledný počet typů vhodných materiálů, abychom tak minimalizovali počet pokusných zvířat na minimum. Dle normy ČSN EN ISO 10993-6 musí být hodnoceno nejméně 10 zkušebních a 10 kontrolních vzorků pro každou dobu implantace, přičemž u každého zvířete smí být nejvýše 12 implantačních míst. Testy in vitro mohou poskytnout informace o biologické degradaci materiálu, jeho cytokompatibilitě a cytotoxicitě. Nemohou však poskytnout informace o procesu hojení, terapeutickém účinku nebo remodelaci kosti. Pro tyto účely bude použit minimální invazivní přístup, který spočívá v šetrném vložení studovaného materiálu do defektu vytvořeného ve spongiózní či lebeční kosti. Vývoj a bezpečná klinická implementace nových terapeutických strategií si vyžadují použití zvířecích modelů, a dle údajů databáze ECVAM neexistuje alternativní metoda testování, která by napodobila komplexnost nebo složitost živého organismu.				
Omezení používání zvířat				
Při plánování pokusu jsme se zaměřili na omezení počtu pokusných zvířat především na základě předchozích experimentů a studií, dle kterých jsme počty experimentálních zvířat optimalizovali (například Pešáková V et al. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2000;11(12):793-798.) nebo Pešáková V et al. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2005;16(2):143-148.). Kde to je možné, použijeme již zařazené kontrolní skupiny zvířat. Uvedený počet zvířat je nezbytný z důvodů možné variabilní odpovědi jedinců na zákrok a následnou terapii. V zavádění zvířat do experimentu zaujímáme přístup postupného zařazování zvířat v závislosti na dosažené statistické významnosti. První dvě fáze pokusu probíhají na femurech potkana, protože pro získání požadovaných informací o reakci kosti a o chování implantovaného materiálu budeme provádět histologické a biomechanické testy kosti. Oba testy jsou destruktivní, proto vždy jeden femur bude analyzován mechanicky a jeden histologicky. Pokud bychom dělali všechny testy od začátku na lebce (fáze III.), museli bychom použít dvojnásobný počet zvířat. To je z etického pohledu zbytečné a kapacitně skoro nemožné.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Pokus je navržen tak, aby veškeré invazivní a bolestivé zákroky byly provedeny na začátku pokusu v celkové anestézii. Pooperační bolest bude tlumena analgetiky. Pooperační a následná péče bude zajišťována kvalifikovaným personálem.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

3D tištěné kostní implantáty budou testovány na modelu laboratorního potkana kmene Wistar (samec, váha min. 400 g). Potkan bude mít ukončení růst z důvodů nežádoucího růstu kostí s implantáty. Mechanismy hojení kostních defektů jsou u všech savců podobné a přenositelnost získaných výsledků do humánní medicíny je tak velmi dobrá. Využití malého zvířecího modelu s sebou navíc nese výhody snadnějšího zacházení i chovu a možnost dosažení silné statistické významnosti pokusu za akceptovatelných finančních nákladů.