

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 43/2020

Název projektu pokusů

Podpora hojení chronických ran pomocí krycích materiálů na bázi hyaluronanu

Doba trvání projektu pokusů 1. červenec 2020 - 31. prosinec 2023

Klíčová slova - *maximálně 5* chronické rány, hojení, hyaluronan

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

☒	základní výzkum
☒	translační nebo aplikovaný výzkum
☒	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
☐	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
☐	trestní řízení a jiné soudní řízení

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

Chronická rána je rána, u níž je normální reparativní proces narušen a akutní rána tak přechází v ránu chronickou. Typickým příkladem jsou bércové 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).

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)

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, přínosem projektu tedy mohou být také snížení ekonomických nákladů za dlouhodobou léčbu pacientů.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Studie bude provedena na dospělých samcích myši kmene C57Bl/6J, k tomuto účelu vhodných a běžně používaných. Z důvodů nutného statistického hodnocení je v průběhu řešení projektu plánováno použití celkem 200 myší, a to včetně kontrolních jedinců.

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

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 opiát nalbupin v 1 ml fyziol.roztoku, což zároveň zajistí hydrataci pokusného zvířete. Následně v průběhu celého pokusu bude nalbupin podáván v pitné vodě (koncentrace 2,5 mg/100 ml). Alternativně bude podáván nalbupin (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 kardipunkcí a zvířata již nenabudou vědomí.

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití 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: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.
Počet zvířat bude omezen na množství minimálně nutné pro statistické vyhodnocení dat získaných z pokusů, které budou průběžně vyhodnocovány. Na každém pokusném zvířeti bude vytvořeno více samostatných excisních ran, což omezí množství potřebných pokusných zvířat. Počet zvířat ve skupině nepřekročí 10 jedinců. Celkový počet zvířat nepřekročí 200 myší, a to včetně kontrolních jedinců.
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.
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 změni kvalitu jeho života, bude takové zvíře neprodleně vyřazeno z pokusu a utraceno.