

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ 52/2020

Název projektu pokusů

Podpora hojení chronických ran pomocí krycích materiálů na bázi hyaluronanu

Doba trvání projektu pokusů 4 roky, 30. dubna 2024

Klíčová slova - *maximálně 5* revmatoidní artritida, autoimunitní onemocnění, protizánětlivá léčiva

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)

Cílem projektu je výzkum a testování terapeutického potenciálu nových biodegradovatelných hvězdicovitých polymerních nanoléciv pro cílenou terapii revmatických muskuloskeletálních onemocnění, především revmatoidní artritidy. Ke zvýšení terapeutické účinnosti budou nanoléciva obohacena směrujícími skupinami na bázi oligopeptidů nebo terapeutických protiláték. Polymerní systémy budou dále značeny fluorescenčními značkami pro současné sledování farmakokinetiky nanoléciva. Potenciál nových biodegradovatelných hvězdicovitých polymerních nanoléciv bude testován na modelu kolagenem indukované akutní a chronické artritidy při využití myši kmene DBA/1. Kolagenem indukovaná artritida u myši má imunologické a patologické rysy velmi podobné jako u lidské revmatoidní artritidy. Akutní artritida bude indukována podáním kompletního Freundova adjuvans spolu s čištěným nativním kolagenem typu II. Potenciál nových biodegradovatelných hvězdicovitých polymerních nanoléciv na průběh onemocnění kloubů bude hodnocen *in vivo* i *ex vivo* na základě analýzy řady parametrů včetně hodnocení otoku, zarudnutí a ztuhlosti tlapek, analýzy degradace kostní tkáně pomocí mikro- počítačové tomografie, hodnocení zánětlivého procesu pomocí luminiscenčního zobrazení, hematologické analýzy krve, a zánětlivých ukazatelů v plasmě. Distribuce a osud polymerních nosičů značených infračervenými fluorescenčními barviv.

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)

Revmatoidní artritida, odborně arthrititis rheumatica, je systémové zánětlivé autoimunitní onemocnění, které vede k chronickému zánětu synoviální tkáně, což má za následek nevratné poškození chrupavek a kostí kloubů. Revmatoidní artritida ovšem nepostihuje jen klouby, ale může vést i k závažným extraartikulárním projevům, kdy zánět může zasáhnout i oči, srdce a plíce a vést ke kardiovaskulárním a respiračním onemocněním. Záměrem projektu je výzkum a testování terapeutického potenciálu nových biodegradovatelných hvězdicovitých polymerních nanoléciv pro cílenou terapii revmatických muskuloskeletálních onemocnění, především revmatoidní artritidy. Terapie navrženým vysokomolekulárním polymerním nanolécivem je založena na třech synergických mechanismech – prodloužené a nastavitelné cirkulaci celého systému, zvýšené akumulaci léčiva v zánětlivé tkáni pomocí ELVIS efektu a jeho řízeném uvolnění za účelem zvýšení antirevmatické účinnosti. Ke zvýšení terapeutické účinnosti budou nanoléciva obohacena směrujícími skupinami na bázi oligopeptidů nebo terapeutických protiláték. Polymerní systémy budou dále značeny fluorescenčními značkami pro současné sledování farmakokinetiky nanoléciva. Tento multifunkční koncept umožní flexibilně přizpůsobovat léčbu danému revmatickému onemocnění a farmakokinetice nanoléciva s dopadem na dávkování a četnost aplikace. Celkově tedy přínosem projektu bude pochopení potenciálu nových biodegradovatelných hvězdicovitých polymerních nanoléciv v léčbě revmatoidní artritidy.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Studie bude provedena na dospělých samcích myši kmene DBA/1. Myši DBA/1 jsou vysoce citlivé na kolagenem indukovanou artritidu (výskyt artritidy 80-100%) a tak má tento model vysokou reprodukovatelnost. Počet zvířat bude omezen na množství minimálně nutné pro statistické vyhodnocení dat získaných z pokusů, které budou průběžně vyhodnocovány. Počet zvířat ve skupině nepřekročí 12 jedinců, což bylo vyhodnoceno jako dostačující pro statistické hodnocení. Celkový počet zvířat nepřekročí 552 myši, 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?

Při aplikaci látek, klinických vyšetřeních, detekci luminiscence a fluorescence a při ukončování pokusů bude prováděno při celkové anestezie myši dosažené expozicí inhalační anestezie (Isoflurane, 2,5-5%). Na konci pokusu budou zvířata opět uspána inhalačním anestetikem, bude odebráno maximální množství krve kardipunkcí a budou odebrány vzorky tkání. Zvířata již nenabudou vědomí. Pro zákrok budou používány sterilní nástroje, sterilní jehly a stříkačky, sterilní jednorázové šití. Během anestezie bude zachován tepelný komfort pomocí vyhřívané operační podložky. Po zákroku budou experimentální zvířata sledována, v případě, že některý pokusný zásah způsobí obtíže, které významně změní kvalitu jeho života, bude takové zvíře neprodleně vyřazeno z pokusu a utraceno.

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 a testování polymerních terapeutik pro pokročilou léčbu místně specifických revmatických onemocnění pohybového aparátu budou tyto nové nanoterapeutika nejprve testovány na <i>in vitro</i> modelech primárních imunitních buňkách a synoviocytech odebraných z tkáně pacientů s revmatoidní artritidou. Pouze nejperspektivnější nanoterapeutika budou vybrány pro testování v <i>in vivo</i> modelech. Zmíněným experimentům předchází rozsáhlé testování na <i>in vitro</i> modelech, nicméně plánované pokusy na zvířatech nelze nahradit alternativními metodami. Podmínky <i>in vitro</i> nejsou vhodné pro testování komplexních dějů, jako jsou reparační a zánětlivé procesy, jelikož nedostatečně simulují odpověď mnohobuněčného savčího organismu. Studium v podmínkách <i>in vivo</i> je tedy jedinou možností, jak patologii artrózy a možnosti jejího terapeutického ovlivnění, 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. Počet zvířat ve skupině nepřekročí 12 jedinců, což bylo vyhodnoceno jako dostačující pro statistické hodnocení. Celkový počet zvířat nepřekročí 552 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.
Studie bude provedena na dospělých samcích myší kmene DBA/1. Myši DBA/1 jsou vysoce citlivé na kolagenem indukovanou artritidu (výskyt artritidy 80-100%) a tak má tento model vysokou reprodukovatelnost. 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 aplikace látek, klinická vyšetření a ukončování pokusů budou zvířata udržována v celkové anestezii. V případě, že některý pokusný zásah způsobí zvířeti obtíže, které významně změní kvalitu jeho života, bude takové zvíře neprodleně vyřazeno z pokusu a utraceno.