

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ

Název projektu pokusů

Role Hsp90 (Heat shock protein 90) u vybraných revmatických onemocnění

Doba trvání projektu pokusů 12/2019

Klíčová slova - maximálně 5 sklerodermie, HSP90, bleomycin, léčba, kožní fibróza

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)

Navrhovaný projekt vychází z našich dosavadních výsledků, kde jsme prokázali zvýšenou lokální expresi Heat shock proteinu 90 (HSP90) ve fibrotické kůži pacientů se systémovou sklerodermií, dále významnou profibrotickou roli této molekuly u SSc a zejména účinnost farmakologické inhibice HSP90 v zabránění rozvoje experimentální kožní fibrózy (ve třech různých modelech systémové sklerodermie (SSc)) - Tomcik M et al. Ann Rheum Dis. 2014 Jun;73(6):1215-22.

Cílem navrhovaného projektu je navázat na naše dosavadní poznatky a analyzovat účinnost inhibitoru HSP90 (17-DMAG, derivát geldanamycinu; již analyzován v klinických hodnoceních u pacientů s hematologickými onemocněními) v léčbě již etablované experimentální kožní fibrózy - pomocí modifikovaného modelu bleomycinem indukované kožní fibrózy.

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)

Získaná data mohou dále objasnit roli HSP90 jako profibrotické molekuly v patogenezi SSc a v případě pozitivních výsledků by se farmakologická inhibice HSP90 mohla stát kandidátem antifibrotické terapie SSc, případně posléze i jiných fibrotických onemocnění, u kterých dosud neexistuje kauzální léčba.

Analýza účinnosti farmakologické inhibice HSP90 v léčbě již etablované kožní fibrózy na experimentálním myším modelu SSc je logickým dalším krokem (tj. běžný výzkumný postup u většiny recentně studovaných nových kandidátních molekul léčby fibrózy u SSc) s je nevyhnutná k poskytnutí důkazů pro zahájení dalšího kroku – klinického hodnocení, tzv. „proof of concept study“, u pacientů se systémovou sklerodermií (jak tomu bylo i u nyní probíhajících klinických hodnocení typu „proof of concept study“ u pacientů se SSc např. s terguridem, riciglatem - www.clinicaltrials.gov).

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Druh zvířat: myši, samci, kmene DBA/2J.

Přibližný počet myši: 48

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

U studovaného inhibitoru HSP90 (17-DMAG) jsme v naší recentní práci (Tomcik M et al. Ann Rheum Dis. 2014 Jun;73(6):1215-22.) nepozorovali v použitých dávkách (5mg/ml v PBS, celkový objem 100ul i.p. každý třetí den po dobu 3 týdnů) žádné závažné nežádoucí účinky (týdenně sledována hmotnost, aktivita myši, kvalita kůže). Obdobně nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky u tyrozinkinázového inhibitoru nintedanibu (Huang J et al. Ann Rheum Dis. 2015 Apr 9. [Epub ahead of print], v dávce 60mg/kg p.o. 1x denně po dobu 3 týdnů), jenž plánujeme použít jako pozitivní léčebnou kontrolu (ve zmíněné práci byla popsána jeho účinnost v prevenci indukce i v léčbě různých experimentálních myších modelů SSc, navíc účinně zpomalil progresi idiopatické plicní fibrózy v klinických hodnoceních fáze 3 a vstupuje do klinického hodnocení u SSc). Navrhovaná míra závažnosti – mírná (budou používány nejtenší jehly („inzulinky“)). Zvířata budou po usmrcení a odebrání tkání pro plánované analýzy předány veterinární asanační službě k neškodnému odstranění.

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.

V současné době neexistuje rovnocenný alternativní systém pro ověření efektivity nových antifibrotických preparátů in-vivo než je model laboratorního zvířete, proto budou použity vhodné linie laboratorních myši. Tuto skutečnost jsme ověřili také v databázi validovaných alternativních metod schválených a přijatých Evropskou společností pro alternativní metody (European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)).

Jedná se o standardní postup v oboru bazálního, preklinického výzkumu u SSc, jenž předchází následnému klinickému hodnocení nových potenciálních antifibrotických strategií u této nemoci, u které dosud neexistuje účinná kauzální léčba a účinná antifibrotická léčba. Studie na experimentálních myších modelech SSc (tj. v současnosti nejrozšířenější preklinické modely této nemoci) patří k nezbytným krokům k ověření významu zkoumaných molekul v patogenezi SSc, a při jeho potvrzení posléze ke zkoumání účinnosti prevence indukce experimentálně navozené fibrózy a posléze k analýze účinnosti léčby již etablované kožní fibrózy (která lépe připomíná běžnou klinickou praxi u pacientů se SSc). Tyto kroky nelze v současnosti nahradit jinými metodami bez použití zvířat k získání dostatečných důkazů pro zahájení klinických

hodnocení, tzv. „proof of concept study“ u pacientů se SSc.

Omezení používání zvířat: Vysvětlíte, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.

Pokusná zvířata budou použita pouze v nejnutnějším počtu nezbytném pro efektivní řešení grantového projektu. Počet zvířat v experimentálních skupinách se řídí minimálními nároky na statistickou průkaznost získaných výsledků. Z dosud publikovaných prací i z našich dosavadních zkušeností je etablovaný minimální počet myši na jednu zkoumanou skupinu 8, který je dostatečný pro získání statisticky i věcně významných rozdílů ve sledovaných parametrech ve skupině s indukovanou kožní fibrózou a v kontrolní skupině s normální kůží, nebo u myši s indukovanou kožní fibrózou léčených účinnou antifibrotickou terapií a představuje zároveň nejnutnější počet nezbytný pro efektivní řešení projektu.

Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlíte volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů.

Vysvětlíte obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.

Model bleomycinem indukované kožní fibrózy u myši pomocí opakovaných subkutánních injekcí bleomycinu je nejvíce používaným, ekonomicky a organizačně výhodným, dobře etablovaným modelem napodobujícím zánětlivé změny přítomné v časně fázi SSc, které vedou k rozvoji lokální dermální fibrózy, která histologicky připomíná změny v kůži u pacientů se SSc. Tento model je standardem pro zkoumání etiopatogeneze v bazálním, preklinickém výzkumu SSc. Vzhledem k navození pouze lokální dermální fibrózy pomocí standardně používaných dávkovacích schémat nebyly pozorovány žádné závažné celkové nežádoucí účinky, na rozdíl o dalších modelů, kde je fibróza navozena genetickou mutací a většinou systémová s progredujícím orgánovým postižením.

Veškeré manipulace s pokusnými zvířaty budou vždy prováděny pracovníkem s osvědčením dle § 17 zákona č. 246/1992 Sb.). Se zvířaty bude zacházeno s maximální ohleduplností.