

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

Studium vlivu hem arginátu na průběh a patogenezi infekce koronavirem SARS-CoV-2 u transgenních myši s lidským ACE2

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

10

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾

SARS-CoV-2, cytoprotektivní efekt, hem arginát

Účel projektu pokusů - zaškrtněte políčko; možno i více možností

☐ základní výzkum

☒ translační a aplikovaný výzkum

☐ kontrola kvality (včetně zkoušení bezpečnosti a účinnosti šarže)

☐ legislativní účely jiné zkoušení účinnosti a tolerance

☐ a běžná výroba zkoušení toxicity a jiné zkoušky bezpečnosti včetně farmakologie

☐ běžná výroba

☐ ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat

☐ zachování druhů

☐ vyšší vzdělávání

☐ odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí

☐ trestní řízení a jiné soudní řízení

☐ udržování populací ustálených geneticky upravených zvířat, která nebyla použita v jiných pokusech

Cíle projektu pokusů - např. řešení některých vědeckých neznámých nebo vědeckých či klinických potřeb

1/ Ověřit in vivo na transgenních myších exprimujících lidský ACE2 inhibiční efekt hem arginátu na replikaci a šíření SARS-CoV-2 pozorovaný in vitro

2/ Ověřit in vivo, zejména v plicním parenchymu, cytoprotektivní efekt hem arginátu pozorovaný in vitro na buňkách infikovaných SARS-CoV-2

3/ Stanovit in vivo efekt hem arginátu na imunitní odpověď proti SARS-CoV-2, především na rozvoj cytokinové bouře

Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů - jak by mohlo být dosaženo vědeckého pokroku nebo jaký přínos by z něj člověk, zvířata či životní prostředí mohli mít; v příslušných případech rozlišujte mezi krátkodobými (v době trvání projektu) a dlouhodobými přínosy (mohou se projevit až po skončení projektu)

Přínosem tohoto projektu bude in vivo ověření velmi slibných efektů hem arginátu (léčivo Normosang schválené k použití u lidí při léčbě akutních atak jaterních porfyrií) na inhibici replikace SARS-CoV-2 a na inhibici virem způsobené apoptózy pozorované in vitro. Výsledky tohoto projektu budou podkladem pro plánované klinické hodnocení efektu Normosangu na pacientech s COVID-19. Normosang, jako již schválené léčivo, má potenciál rychlého využití v indikovaných případech.

V současnosti neexistuje jednoznačně efektivní, specifická léčba COVID-19. Kromě symptomatické léčby se u těžkého, komplikovaného průběhu onemocnění používá Remdesivir, původně vyvinutý proti Ebole, a Dexamethazon; avšak jejich účinnost není tak vysoká, jak by bylo třeba.

Nejzávažnější případy COVID-19 vyžadují umělou plicní ventilaci, progredují do těžkého poškození plicní tkáně a končí multiorgánovým selháním v důsledku deregulace imunitní odpovědi, tzv. cytokinové bouře. Mimotělní oběh nevede k dostatečné saturaci krve kyslíkem. Úmrtnost na toto onemocnění je celosvětově kolem 4 % z hlášených případů.

Hem arginát má potenciál pozitivně ovlivnit tento průběh několika způsoby:

1/ snížení množství viru v organismu a zmírnění poškození infikovaných tkání

2/ potlačení příznaků cytokinové bouře

3/ zvýšení koncentrace hemu a hemoglobinu v organismu, a tedy vylepšení červeného krevního obrazu a saturace hemoglobinu kyslíkem

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání

1x celková anestezie Avertinem (injekční aplikace intraperitoneálně; i.p.) – cca 30 min

V této anestezii
1x infekce SARS-CoV-2 (intranazálně pipetou)

Celková anestezie inhalační (Narkotan, isofluran)
1x, 2x či 4x (dle pokusných skupin) inhalační anestezie

V této anestezii

1x, 2x či 4x (dle pokusných skupin) aplikace hem arginátu či kontrolního antivirotika (injekční aplikace do retroorbitálního žilního splavu nebo i.p.)

1x anestezie inhalační na závěr pokusu – humánní utracení pokusných zvířat předávkováním inhalačním anestetikem

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) **a doba trvání těchto účinků**

Dopady na zvířata budou minimalizovány prováděním všech zákroků v celkové anestezii.

Předpokládané projevy infekce SARS-CoV-2:

ztráta hmotnosti, zvýšená teplota a zjevení srsti, nečinnost / snížená hybnost, pokles hmotnosti.

V předpokuse bude pro stanovení letální dávky použito 6-12 myší, které budou ponechány spontánně uhynout v důsledku infekce SARS-CoV-2. Předpokládaná doba infekce 5-10 dnů.

V pokusech budou myši při poklesu hmotnosti o více než 25% původních hodnot či při výrazném snížení hybnosti humánně utráceny předávkováním inhalačním anestetikem. Předpokládaná doba infekce 5-10 dnů. Po 14-21 dnech budou všechna přeživší pokusná zvířata humánně utrácena.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

Druh zvířat ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhadovaný počet	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
		Nenabud e vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Myš laboratorní (Mus musculus)	25-30/ 1 pokus Opakování max. 4x			25-30/1 pokus Celkem max. 120 myši	
Myš laboratorní (Mus musculus)	6-12 myší				Celkem 6-12 myši
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					

Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena

Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití 0

Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu 0

Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu 0

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - uveďte

N/A

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat - uveďte, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu

V současné době neexistuje rovnocenný alternativní relevantní systém pro testování antivirotik proti SARS-CoV-2 v živém organismu, proto je nutno použít laboratorní myši.

Omezení používání zvířat - vysvětlete, jaký počet zvířat byl pro tento projekt stanoven. Popište kroky, které byly podniknuty ke snížení počtu používaných zvířat, a zásady použité k vytvoření studie; případně popište postupy, které budou používány po celou dobu trvání projektu za účelem minimalizace počtu používaných zvířat a které odpovídají vědeckým cílům (mezi tyto postupy mohou patřit např. pilotní studie, počítačové modelování, sdílení tkání a opakované použití).

Experimenty jsou plánovány tak, aby byl zajištěn minimální počet zvířat pro pilotní ověření inhibičního efektu hem arginátu na šíření a patogenезi SARS-CoV-2 (skupiny po 3-5 zvířatech, cca 25-30 zvířat/pokus). Pokus bude opakován ideálně 1x, v případě potřeby doplnění informací max. cca 3x.

Šetrné zacházení se zvířaty - uveďte příklady konkrétních opatření (např. zvýšené pozorování, pooperační péče, tlumení bolesti, výcvik zvířat) přijatých v souvislosti s postupy k minimalizaci dopadů na dobré životní podmínky zvířat; popište mechanismy k přijímání vznikajících zmírňujících postupů v době trvání projektu

Experimenty budou prováděny v akreditovaném zvířetníku 1. LF UK v souladu se zákonem a s ohledem na maximální pohodu zvířat. Analgetika nelze použít z důvodu možného ovlivnění výsledku pokusu. Během experimentu bude sledován stav zvířat. Při poklesu váhy pod 25% výchozí váhy nebo při závažných změnách hybnosti budou myši humánně utraceny předávkováním inhalačním anestetikem.

Použité druhy zvířat - vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií

Myš laboratorní transgenní pro lidský ACE2, který je receptorem pro SARS-CoV-2
stáří 6 týdnů až 6 měsíců

- ¹⁾ Včetně vědeckých pojmů, které se mohou skládat z více než pěti jednotlivých slov, a s výjimkou druhů zvířat a účelů uvedených jinde v dokumentu
- ²⁾ Druhy zvířat v souladu s kategoriemi statistického vykazování v příloze III prováděcího rozhodnutí Komise 2020/569 s doplňkovou možností „**nespecifikovaného savce**“ pro zachování anonymity ve výjimečných případech