

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ

Název projektu pokusů

Vývoj a komplexní hodnocení nové injekčně aplikovatelné, resorbovatelné, porézní kostní náhrady s řízeným uvolňováním antimikrobiálních látek

Doba trvání projektu pokusů

Zahájení se předpokládá v okamžiku nabytí právní moci rozhodnutí o schválení projektu pokusů, ukončení k 31. 12. 2021

Klíčová slova - maximálně 5

Kostní cement; osteointegrace; uvolňování léčiv; osteomyelitida; antibiotika

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

	základní výzkum
<input checked="" type="checkbox"/>	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 komplexní zhodnocení injekovatelného tixotropního kostního cementu s časově regulovaným uvolňováním antibiotika s optimální degradací, mechanickými vlastnostmi a velikostí pórů. Výsledný cement má za cíl eliminovat možnosti kostní infekce, aktivně stimulovat regeneraci kostní tkáně a umožnit minimální invazivní aplikaci, což vede ke snížení zátěže chirurgického zákroku na pacienta. Tixotropní polymerně-keramický kostní cement bude využitelný zejména v případě známých infekcí protetických kloubů nebo jako preventivní postup týkající se primární náhrady kloubů v potenciálně infikovaném místě. Experimenty na laboratorních zvířatech chceme ověřit:

- Toxicitu CP-polyF cementu včetně osteointegrace in-vivo na zvířecích modelech (laboratorních potkanů a prasat).
- míru osteointegrace nového materiálu u laboratorních potkanů a prasat.
- antibakteriální účinnost nového materiálu nasyceného antimikrobiální látkou jako lokálního nosiče antibiotika při léčbě anebo prevenci osteomyelitidy.

Přínosem pokusů je ověření účinnosti a bezpečnosti testovaných materiálů za anatomicky, fyziologicky a histologicky relevantních podmínek, čehož lze dosáhnout jen s použitím zvířecího modelu.

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)

Řešení kostních defektů v ortopedii je zásadní pro úspěšnou terapii komplikací jak poúrazových, tak po ortopedických operacích především u kloubních náhrad včetně infekčních onemocnění v ortopedii a traumatologii. Projekt umožní získat poznatky uplatnitelné pro nové terapie a léčebné postupy. Kostní cementy s obsahem antibiotika by se v budoucnosti mohly stát zdravotnickým prostředkem první volby v ortopedii a traumatologii pro pacienty s odůvodněným očekáváním infekční zánětlivé reakce, která v současnosti vede k selhání léčby. Pro tyto pacienty v současnosti neexistuje spolehlivé řešení a v nezanedbatelném počtu případů pak dochází k reoperaci v důsledku uvolnění implantátů.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Laboratorní potkani v množství 80 ks a miniprasata v množství 20 ks.

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

Implantace bude provedena tak, aby se zvíře mohlo po zotavení plnohodnotně pohybovat a zatěžovat končetiny. Předpokládá se, že zvířata mohou bezprostředně po zákroku pociťovat bolest, ta však bude adekvátně tlumena analgetiky. Infekce (v případě potkanů ve studii zaměřené na testování antibakteriální účinnosti) by měla být lokální, navíc se předpokládá antimikrobiální působení zkoušených materiálů. Ve výjimečných případech však nelze vyloučit rozvoj infekce v místě aplikace vzorků, v krajním případě nelze vyloučit ani systémovou infekci. Za tímto účelem bude zdravotní stav zvířat pečlivě monitorován a v těchto krajních případech bude pokus ihned ukončen. Klasifikace závažnosti je střední. Po ukončení experimentu budou zvířata usmrcena podáním letální dávky Thiopentalu a KCl intrakardiálně v celkové anestézii. Po usmrcení budou kadavery zlikvidovány dle schválených postupů.

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

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

Pro zavedení nového injekovatelného tixotropního kostního cementu s časově regulovaným uvolňováním antibiotika s optimální degradací, mechanickými vlastnostmi a velikostí pórů do klinické praxe je nutné nejprve otestovat jeho 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. Vzhledem k absenci vlivu imunitního systému není možné rovněž získat informace o zánětlivých a imunologických procesech po implantaci. Pro komplexní hodnocení stanovené hypotézy se doporučuje testování na více než jednom druhu zvířat. Pro tyto účely bude použit minimální invazivní přístup, který spočívá v šetrném vložení studovaného materiálu do intramedulárního prostoru nebo otvoru v kortikální a spongiózní kosti, a ověřování antimikrobiálního účinku se suspenzí bakterií v dostatečné koncentraci způsobující zánět, podobně jak popisuje studie, v níž byl potkan využit jako model chronické osteomyelitidy (Rissing JP et al. *Infection and Immunity*. 1985;47(3):581-586.). Cílem pokusu je sledovat také profylaxi, účinnost při prevenci v indikovaných případech, proto nebude u zvířat prováděna druhá operace pro zavedení implantátu po vytvoření zánětu, ale inokulum bude zaváděno současně s implantátem, obdobně jak to ve své studii prováděli Y. Yang a kol., kde byl do kavity femuru potkana vkládán implantát s potenciálními antimikrobiálními vlastnostmi a současně injektována suspenze izolátu *Staphylococcus aureus* v koncentraci 1×10^5 CFU/ml a celkovém objemu 50ml (Yang Y et al. *International Journal of Nanomedicine*. 2016;11:2223-2234.). V rámci šetrného zacházení se zvířaty nebude stejně tak využito invazivního modelu se standardizovaným poškozením kosti, ani nebude použita kombinace traumatu a infekce. Vývoj a bezpečná klinická implementace nových terapeutických strategií si vyžadují použití zvířecích modelů, neexistuje alternativní metoda testování, která by napodobila komplexnost nebo složitost živého organismu.

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

Při plánování pokusu jsme se zaměřili na omezení počtu pokusných zvířat především na základě předchozích experimentů a studií, ve kterých jsme počty experimentálních zvířat optimalizovali (*Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2000;11(12):793-798.; *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2005;16(2):143-148.). V posledním prováděném experimentu jsme navrhli a odzkoušeli variantu kombinace implantovaného experimentálního materiálu s materiálem kontrolním, čímž jsme dosáhli podstatného omezení počtu pokusných zvířat (*Science of Advanced Materials*. 2013;5(5):484-493.). Uvedený počet zvířat je nezbytný z důvodů možné variabilní odpovědi jedinců na zákrok a následnou terapii.

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.

Pokus je navržen tak, aby veškeré invazivní a bolestivé zákroky byly provedeny na začátku, v celkové anestézii. Pooperační bolest bude tlumena analgetiky. Pooperační a následná péče bude zajišťována kvalifikovaným personálem. Pouze u potkanů v části zaměřené na ověření antibakteriální účinnosti jako lokálního nosiče antibiotik bude odebrána krev. Pro snadnější a bezstresovou manipulaci bude odběr prováděn v lehké inhalační narkóze isofluranem v O_2 , místo punkce bude předem ošetřeno lidokainovým gelem.