

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ	
Název projektu pokusů	
Úloha pozdních progenitorů v regeneraci krvetvorné tkáně.	
Doba trvání projektu pokusů	3 roky <i>do 12/2021</i>
Klíčová slova - maximálně 5	krvotvorné kmenové buňky, regenerace krvetvorby, myeloidní progenitory
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 se týká poznání biologické podstaty bezprostřední tkáňové odpovědi na její poškození a následné počáteční fáze regenerace.	
Cílem projektu je vysvětlení podstaty výrazného a dosud nepochopeného fenoménu spočívajícího v tom, že při společné transplantaci regenerujících a normální kostní dřeně, se regenerující kostní dřeň nepřijímá.	
Hypotéza, kterou bude projekt ověřovat, předpokládá, že vysvětlením paradoxního selhání regenerující kostní dřeně v případě její společné transplantace s normální kostní dřeně, je chybění buněk kmenových v regenerující kostní dřeně a jejich přechodná náhrada aktivovanými buňkami progenitorovými.	
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)	
Navrhovaný projekt se týká poznání biologické podstaty bezprostřední tkáňové odpovědi na její poškození a následné počáteční fáze regenerace. Jedná se o jednu z nosných výzkumných problematik pracoviště a významnou součást nově se rozvíjející oblasti medicíny (regenerační lékařství).	
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá	
Použity budou transgenní myši linie exprimující GFP (green fluorescent protein) pod ubiquitinovým promotorem (UBC-GFP: C57Bl/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J;(Schaefer et al., 2001)) a myši kmene B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ (CD45.1) nebo C57Bl/6J (CD45.2), které mají všechny stejné genetické pozadí a jejich kostní dřeň lze mezi nimi dobře transplantovat. Odhadovaný počet myši použitých za celou dobu řešení je 300. Odhadovaný počet vychází z předpokladu 5 pokusů v jednom roce řešení, přičemž pokus zahrnuje 5 dárců kostní dřeně a 15 transplantovaných příjemců. Jedná se o dospělé jedince obojího pohlaví.	
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?	
Pokusná zvířata, inbrední myši, budou vystaveny experimentálním zákrokům, které zahrnují vystavení účinkům ionizujícího záření (subletálními dávkami – 6 Gy - nebo dávkou letální – 8 Gy až 9 Gy gamma záření ze ⁶⁰ Co zdroje, se spontánní rekonstitucí krvetvorného systému nebo s rekonstitucí z transplantované syngenní kosti dřeně). Během ozáření, trvajícím méně než 20 minut, nebudou omezeny v pohybu. Buňky kostní dřeně budou podány intravenózní injekcí cestou ocasní žíly nebo retroorbitálního venózního plexu, obojí v lehké inhalační narkóze. Budou jim odebrány vzorky krve v množství asi 50 mikrolitrů z retroorbitálního venózního plexu rovněž v narkóze. Usmrceny budou zlomením vazů v lehké inhalační anestézii a mrtvým myším budou vyjmuty dlouhé kosti dolních končetin, případně slezina, které budou sloužit k získání krvetvorné tkáně. Počet zvířat ve skupině je volen tak, aby umožnil kvalitní a podložené statistické zpracování, ale přitom nebyla zvířata k pokusům používána ve zbytečně velkém počtu. Experimenty nemohou být standardizovány do neměnného a opakujícího se uspořádání pro celou dobu řešení, protože musí být uzpůsobeny průběžně získaným výsledkům. Porovnání výsledku transplantace studovaných buněk vyžaduje skupinu 7 příjemců transplantátu z důvodu biologické variability. Počet pokusných zvířat bude asi 100 za rok, zcela fixní počet by nebylo seriózní uvést. Bude samozřejmě snahou použít pokusných zvířat co nejméně.	
Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)	
Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.	
Projekt zahrnuje i primokultury buněk kostní dřeně, přičemž bude porovnáván regenerační potenciál různých populací buněk kontrolní a ozářené kostní dřeně.	
Pokusy mají objasnit základní mechanismy, které podmiňují regeneraci tkáně. Jedná se o komplexní tkáňové reakce řízené nejen místními, ale i systémovými mechanismy, které proto nelze napodobit nebo nahradit alternativními metodami.	
Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.	
Počet vyšetřovaných zvířat v analyzované experimentální a kontrolní skupině je volen tak, aby umožnil kvalitní a podložené statistické zpracování, ale přitom nebyla zvířata k pokusům používána ve zbytečně velkém počtu. Zahrnutí buněčných kultur může pomoci omezit počet potřebných zvířat.	
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.

Projekt sám vyžaduje co nejšetrnější zacházení s pokusnými zvířaty. V průběhu experimentu nebudou prováděny žádné bolestivé zákroky, aplikace a odběry představují pouze malé zatížení zvířete. Po ozáření submyeloablativními dávkami nebo dávkou letální s následnou transplantací syngenní kostní dřeně nebo kmenových/progenitorových buněk nejsou u myší patrné změny chování. Po celou dobu experimentu budou zvířata umístěna v chovných nádobách konvenčního chovu, budou mít přístup k potravě a vodě ad libitum a jejich stav bude pravidelně kontrolován.