

# NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

## Název projektu pokusů

Ustanovení produkční kolonie myši transgenního kmene Separase a kříženců kmenů B6D2F1 a CD1

|                                        |                |
|----------------------------------------|----------------|
| Doba trvání projektu pokusů v měsících | 43             |
| Klíčová slova                          | embryo         |
| oocyt                                  | buněčné dělení |
| aneuploidie                            | 0              |

## Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Další základní výzkum [PB13]

0  
0  
0

## Cíle projektu pokusů

Cílem tohoto projektu pokusu je ustanovení kolonií produkujících jedince kmene Separase, a také křížence kmenů B6D2F1 a CD1 pro následné studie zaměřené na segregaci chromozomů během časného vývoje.

### 1. Transgenní kmen Separase

Tento kmen je klíčový pro úspěšné zakončení experimentů probíhajícího projektu GAČR 20-25850S, dalšího navrhovaného projektu 22-29045S a návazných projektů DKRVO a CEITEC. Kmen Separase je unikátní, komerčně nedostupná, geneticky modifikovaná linie *Mus musculus*. Genetická modifikace spočívá ve vnesení loxP míst do obou alel genu pro separázu. Tato modifikace nepřináší žádný fenotypový projev a nemá vliv na zdraví a chování zvířat a projeví se pouze po současné expresi Cre recombinasy. V našich experimentech počítáme výhradně s použitím tkáňově specifického promotoru ZP3, řídicího expresi Cre recombinasy a exprimovaného POUZE v oocytech. V konečném důsledku je tedy genetická modifikace omezena na oocyty a nemá projev v celém organismu, neovlivňuje tedy zdraví ani chování zvířat.

## Potenciální přínosy projektu pokusů

Předběžné studie zabývající se příčinou nesprávného dělení chromozomů byly provedeny na nižších organismech (kvasinky, *Drosophila*, *C. elegans*, *Danio*, *Xenopus* atd.). Vzhledem k daleko větší složitosti savčího organismu bylo prokázáno, že ne všechny poznatky získané studiem těchto organismů mohou být uplatnitelné na člověka. Naše studie tedy mají za úkol ověřit, zda a do jaké míry regulační mechanismy objevené u těchto druhů platí také pro vývoj savčích vajíček a embryí. Vzhledem k tomu že se věnujeme problematice specifické pro vajíčka a časná embrya, které mají zcela unikátní vlastnosti, nelze bohužel ve většině našich experimentů použít jako náhradu in vitro kultivované savčí buňky, tyto mají vlastnosti zcela odlišné, což by vedlo ke zkresleným výsledkům a nesprávnosti studie. Získání oocytů a časných embryí z myši je pro plnění naší studie nezbytný, a to z důvodů odlišností regulačních procesů segregace chromozomů v in vitro a in vivo získaných buňkách. Naše studie je cílena zejména na poruchy dělení chromozomů v zárodečných buňkách a embryích, jež se vyskytují ve vysoké míře a jejich příčina není zcela známa. Dlouhodobým přínosem naší studie bude bližší objasnění vysokého výskytu poruch v dělení chromozomů a tím pádem vzniku aneuploidií u savců, což může pomoci zlepšit aplikaci in vitro fertilizačních technik u lidí, ale i u zvířat a dále také přispět k

## Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

1. Kmen Separase - Během chovu bude posuzována březost samic, a to určením/potvrzením přítomnosti vaginální zátky, zvýšenou hmotností a změnou v chování. Od prokázání březosti bude samice odstavena od samce a druhá další samice bude k samci připuštěna. Na základě genotypování budou zvířata s žádoucím genotypem použita k dalším experimentům, které jsou popsány v žádosti o schválení projektu pokusů „Získávání oocytů a embryí laboratorních myši pro studium mechanismů buněčného dělení“. V experimentech bude převažovat použití samic, nadbyteční samci a zvířata s nevhodným genetickým pozadím se utratí v souladu s dovolenými metodami, a to zlomením vazy ve věku kdy je možná identifikace pohlaví (cca 20 dní).

2. Kříženci kmenů B6D2F1 a CD1 - Během chovu bude březost samic posouzena určením/potvrzením přítomnosti vaginální zátky, zvýšenou hmotností a změnami v chování. Od prokázání březosti bude samice odstavena od samce a druhá další samice bude k samci připuštěna. Vniklý kříženci budou použiti k dalším experimentům, které jsou popsány v žádosti o schválení projektu pokusů „Získávání oocytů a embryí laboratorních myši pro studium mechanismů buněčného dělení“. V experimentech bude převažovat použití samic a nadbyteční samci se utratí v souladu s dovolenými metodami, a to zlomením vazy ve věku kdy je možná

## Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata, a doba trvání těchto účinků

Na zvířatech v chovech nebudou prováděny žádné experimenty intravitálně, pouze u kmene Separase plánujeme odběr tkáně spojený s vrubováním uší (označení transgenních zvířat). V rámci šetrného zacházení se zvířaty bude tento materiál později využit ke genotypování zvířat. V průběhu chovu a odběru tkání budou zohledňována hlediska humánního zacházení s pokusnými zvířaty, zejména s ohledem na umožnění jejich adaptace, návyk na uchopení rukou, klidné zacházení, tichý přístup a používání pomůcek, které nezpůsobí zvířeti strach, bolest a utrpení. Zvířata budou pod denní kontrolou technického personálu a v případě např. úrazu způsobeného jiným zvířetem bude takový jedinec bezodkladně utracen.

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

| Druh zvířat                                  | Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti |       |         |         |
|----------------------------------------------|------------------------------------------|-------|---------|---------|
|                                              | Nenabude vědomí                          | Mírná | Střední | Závažná |
| myš laboratorní ( <i>Mus musculus</i> ) [A1] | 0                                        | 700   | 0       | 0       |

| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0                       | 0                                            | 0                  | 0 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------|--------------------|---|
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0                       | 0                                            | 0                  | 0 |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0                       | 0                                            | 0                  | 0 |
| <b>Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                         |                                              |                    |   |
| Druh zvířat                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Odhadovaný počet zvířat |                                              |                    |   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Opětovné použití        | Navrácení do chovu, do přírodního stanoviště | Do zájmového chovu |   |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0                       | 0                                            | 0                  |   |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0                       | 0                                            | 0                  |   |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0                       | 0                                            | 0                  |   |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0                       | 0                                            | 0                  |   |
| <b>Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                         |                                              |                    |   |
| Zvířata budou po poklesu fertility utracena zlomením vazů.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |                                              |                    |   |
| <b>Uplatňování 3R</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                         |                                              |                    |   |
| <b>Nahrazení používání zvířat</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                         |                                              |                    |   |
| Předběžné analýzy byly provedeny na nižších organismech (kvasinky, Drosophila, C. Elegans, Danio, Xenopus atd.). Vyšší počet genů a komplexnější organizace savčího organismu nás nutí k použití tkání získaných ze savců. Vzhledem k tomu, že doposud není možné získat zárodečné buňky ani embrya v tkáňových kulturách, je nutné provádět pokusy na materiálu odebraném ze zvířat.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                         |                                              |                    |   |
| <b>Omezení používání zvířat</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                         |                                              |                    |   |
| Mezikmenovým křížením B6D2F1 a CD1 bude dosaženo vyššího výtěžku zárodečných buněk z každého zvířete. Dále bude dosaženo minimalizace počtu zvířat použitím adekvátních metod biostatistiky.<br>V chovu počítáme s využitím následujícího počtu zvířat po dobu trvání projektu:<br>- 300ks zvířat rodičovských jedinců kmenů B6D2F1 a CD1 za 5 let zakoupených od komerčního dodavatele<br>- 400ks rodičovských zvířat transgenního kmene Separase získaných z předchozího chovu<br><br>Předpokládáme vytvoření zhruba 3500ks kříženců B6D2F1 a CD1 a 5000ks zvířat kmene Separase za 5 let, kteří budou dále využiti v projektu „Získávání oocytů a embryí laboratorních myší pro studium mechanismů buněčného dělení“, a nejsou tedy započítávány do počtu experimentálních zvířat v rámci tohoto projektu, který je zaměřen na vznik a udržení chovné kolonie. |                         |                                              |                    |   |
| <b>Šetrné zacházení se zvířaty</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                         |                                              |                    |   |
| Na zvířatech v chovech nebudou prováděny žádné experimenty intravitálně, pouze u kmene Separase plánujeme odběr tkáně spojený s vrubováním uší (označení transgenních zvířat). V rámci šetrného zacházení se zvířaty bude tento materiál později využit ke genotypování zvířat. V průběhu chovu a odběru tkání budou zohledňována hlediska humánního zacházení s pokusnými zvířaty, zejména s ohledem na umožnění jejich adaptace, návyk na uchopení rukou, klidné zacházení, tichý přístup a používání pomůcek, které nezpůsobí zvířeti strach, bolest a utrpení. Zvířata budou pod denní kontrolou technického personálu a v případě např. úrazu způsobeného jiným zvířetem bude takový jedinec bezodkladně utracen.                                                                                                                                            |                         |                                              |                    |   |
| <b>Použité druhy zvířat - vysvětlení</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                         |                                              |                    |   |

Myší zárodečné buňky úzce reflektují zárodeční buňky lidské, a proto jsou nenahraditelným modelovým systémem pro základní výzkum studia vzniku reprodukčních poruch zvířat i člověka. Model laboratorní myši se v podobných studiích používá zejména pro standardizaci chovu, malé nároky na prostor a v neposlední řadě vzhledem k běžně dostupným reagentům. U tohoto druhu zvířat je také známa organizace genomu a na základě této znalosti je dostupná celá řada dalších reagentů, včetně chromozomálních sond a RNAi sond. Vzhledem ke všem shora uvedeným faktům je použití tohoto druhu nejefektivnější jak z hlediska informací získaných během výzkumu, tak i z hlediska spotřeby zvířat a minimalizace jejich strádání.