

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 92/2020 upravené podle PR 2020/569	
Název projektu pokusů	
Výzkum alterace metabolismu v závislosti na funkci GCPII a GCPIII (glutamátcarboxypeptidasa II a III), specifické cílení GCPII a GCPIII v nervové tkáni	
Doba trvání projektu pokusů - v měsících	44 (do 1.9.2024)
Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾	Glutamátcarboxypeptidáza II, metabolomika, nervový systém, cílená léčba
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
☐	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	
Cílem projektu pokusů je:	
a) Zhodnotit změny metabolismu v organismu na metabolomické úrovni v závislosti na expresi proteinu GCPII a GCPIII v řadě kompartmentů (krev, moč, stolice, mozkomíšní mok, extracelulární tekutina, orgány). b) Najít nanostruktury (nejspíše lipidického charakteru) umožňující efektivní cílení/inhibici GCPII v nervové tkáni a studium jejich farmakokinetických vlastností, včetně distribuce v nervové tkáni.	
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)	
GCPII též PSMA je klíčový protein jehož inhibice vykazuje neuroprotektivní efekt, vzhledem k inhibici degradace neuroprotektivního neurotransmiteru NAAG. Touto studií chceme mimo jiné posoudit efekt na jiné tkáně a tudíž i potencionální vedlejší účinky inhibice GCPII a současně prohloubit porozumění funkce GCPII v ostatních tkáních. Doposud známe inhibitory vykazují špatnou dostupnost skrze mozko-míšň bariéru, studium nových struktur umožňujících inhibice <i>in vivo</i> může vést k vytvoření nových potencionálních léčiv, které by mohly zlepšit léčbu neurologických onemocnění jako jsou mimo jiné např. mozková mrtvice, amyotrofická laterální skleróza a schizofrenie.	
Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání	
Pro část projektu ad	
a) odběr mozkomíšního moku (cestou punkce cisterna magna) a odběr krve kardiopunkcí, vše v terminální anestezii, kdy zvíře nenabude vědomí, neinvazivní odběry stolice a moči b) aplikace experimentální látky/nanostruktury cestou intaperitoneální, itavenozní event. sunkutánní injekce (jedna cesta na myš), seriový odběr krve technikou ostrížení konce ocásku (výkon v celkové a lokální anestezii) po dobu max. 48 hod, odběry viz. bod a)	
Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) a doba trvání těchto účinků	
Pro část projektu ad	
a) dopady minimální, pouze v důsledku podání terminální anestezie – zvíře nenabude vědomí	

- b) dopady mírné – mírná bolestivost po aplikaci injekce, pokles hmotnosti v důsledku celkové anestezie (korigováno i.p. rehydrací) – max 48 hod, event. bolest po odstřížení konce ocásku (korigováno lok. anestezií) - max. 48 hod, teoretické příznaky po aplikaci experimentální látky/nanostruktury – vzhledem k cílení do nervové soustavy možné neurologické příznaky – změna chování, – max. doba trvání vzhledem k délce trvání experimentu do 120 hod

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			
		Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Myš laboratorní (Mus musculus)	510	300	210		
Zvolte položku.					
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 – *uved'te*

Vzhledem k terminálnímu charakteru odběru mozkomíšního moku a následnému odběru tkání není možné zvířata znovu použít či navrátit.

Uplatňování 3R

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

V první části projektu ohledně alterace metabolismu, nelze zvířecí model nahradit, vzhledem ke komplexitě probíhajících fyziologických pochodů daných funkcí všech orgánů. Přestože v druhé části projektu budou všechny testované látky a nanostruktury budou před aplikací do zvířat otestovány na cytotoxicitu pomocí validovaných esejí na buněčných liniích pro snížení rizika nežádoucích účinků, tak tyto experimenty nám ovšem stále nemohou říci, zda tyto látky budou fungovat v systému *in vivo*, již jen z důvodu, že v současné době neexistuje *in vitro* model všech funkcí nervového systému. Alternativní metoda bez použití zvířat se stejnou spolehlivostí v kontextu fyziologie nervového systému tudíž neexistuje. Taktéž není v současné době možné bez užití zvířat úplně predikovat vedlejší účinky aplikovaných látek. Možnosti využití alternativních metod byly čerpány z elektronických databází - pubmed, Web of science, Go3Rs, ECVAM/FRAME.

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).*

Uvedený počet zvířat je maximální a lze předpokládat menší množství použitých zvířat. Počet zvířat bude omezen preselekcí používaných látek pomocí experimentů na buněčných kulturách. O průběhu a výsledcích všech provedených experimentů budou pečlivě vedeny protokoly, výsledky budou průběžně hodnoceny k optimalizaci experimentální strategie a snížení počtu potřebných experimentálních zvířat. Pro zajištění minimalizace počtu zvířat budou experimenty primárně provedeny nejprve v menších kohortách. Pokud již na tomto množství bude dosaženo statistické signifikance či výrazných nežádoucích účinků, pokus bude ukončen. Až pokud statistické signifikance dosaženo nebude, bude experiment doplněn do plného plánovaného počtu jedinců. Společné využití zvířat při tomto pokusu není možné vzhledem k ovlivnění fyziologických pochodů zvířete studovanými látkami a vzhledem k plánovaným terminálním odběrům.

Šetrné zacházení se zvířaty - *uved'te 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*

Se zvířaty bude nakládáno podle zásad bezbolestného zacházení se zvířaty, během experimentů bude zajištěn dostatek potravy a vody, při bolestivých zákrocích budou použita anestetika. Všechny operační zákroky budou prováděny v celkové anestezii s využitím běžně užívaných anestetických látek u hlodavců ve veterinární medicíně. Pro zmenšení pooperační bolestivosti bude při odběrech krve krom celkové anestezie i užito lokálního dlouhodobého anestetika. Technické vybavení užívané v experimentu odpovídá parametrům užívaným v humánní, resp. veterinární medicíně. Stav zvířat bude pravidelně denně kontrolován vedoucím pokusů, nebo jím pověřenou kvalifikovanou osobou, experiment bude ukončen při prvních klinických známkách zhoršení zdravotního stavu zvířete (např. klinické známky

bolesti, neurologické příznaky, změna chování, pokles hmotnosti atp.) tak, aby nedocházelo k jejich utrpení. Dodržování předpisů ochrany zvířat bude kontrolovat pravidelně vedoucí pokusů nebo jím pověřená kvalifikovaná osoba.

Použité druhy zvířat - vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií

Myš byla vybrána z důvodů existence myšího genetického modelu deficiencie proteinu GCPII a GCPIII, blízkosti k člověku (savec), velikosti (množství spotřebovaných látek). Pro část a) jsou studované věkové skupiny, v rámci změn metabolismu po většinu života zvířete (tj. 8–90 týdnů), pro část b) budou užita dospělá zvířata tj. 12–40 týdnů.

- 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