

# NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 109/2020

upravené podle PR 2020/569

## Název projektu pokusů

HD MINIPIG – MINIPRASATA PRO MODELOVÁNÍ HUNTINGTONOVY NEMOCI

Doba trvání projektu pokusů - v měsících 60 měsíců, od schválení do 31. 12. 2025

Klíčová slova - maximálně pět <sup>1)</sup> Huntingtonova choroba, knock-in, transgeneze, terapie

## Účel projektu pokusů - zaškrtněte políčko; možno i více možností

- |                                     |                                                                                                   |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | základní výzkum                                                                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | translační a aplikovaný výzkum                                                                    |
| <input type="checkbox"/>            | kontrola kvality (včetně zkoušení bezpečnosti a účinnosti šarže)                                  |
| <input type="checkbox"/>            | legislativní účely                                                                                |
| <input type="checkbox"/>            | a běžná výroba                                                                                    |
| <input type="checkbox"/>            | jiné zkoušení účinnosti a tolerance                                                               |
| <input type="checkbox"/>            | zkoušení toxicity a jiné zkoušky bezpečnosti včetně farmakologie                                  |
| <input type="checkbox"/>            | běžná výroba                                                                                      |
| <input type="checkbox"/>            | ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat         |
| <input type="checkbox"/>            | zachování druhů                                                                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | vyšší vzdělávání                                                                                  |
| <input type="checkbox"/>            | odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí                      |
| <input type="checkbox"/>            | trestní řízení a jiné soudní řízení                                                               |
| <input type="checkbox"/>            | 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

Hlavním cílem studie je tvorba a charakterizace terapeutických transgenních a knock-in modelů Huntingtonovy choroby u miniaturních prasat. Vytvoření terapeutických modelů a jejich dlouhodobé sledování přinese nové poznatky o patogenezi a možné terapii Huntingtonovy nemoci. Dále charakterizace a udržení chovu linií miniaturního prasete s HD s potenciálním klinickým obrazem podobným lidskému onemocnění Huntingtonovou nemocí. Cílem studie je detailní charakterizace těchto transgenních nebo knock-in linií v in vivo a in vitro režimu nebo post mortem. Dalším cílem je testování účinnosti a bezpečnosti potenciálních terapeutických přístupů snižujících mutovaný huntingtin u těchto GMO a kontrolních miniprasečích linií.

## 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 projektu je detailní charakterizace modelu neurodegenerativních změn Huntingtonovy nemoci na velkém zvířecím mozku a vývoj a testování potenciálního terapeutického přístupu.

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

1. Tvorba terapeutických modelů - Stereotaktická injekce AAV vektorů nebo nanočástic (s DNA či RNA, CRISPR CAS editace) nebo siRNA do až 4 částí mozku (Nucleus cadatus, Putamen, Neocortex a Thalamus). Po ukončení experimentů po max 24 měsících budou zvířata utracena a odebrány vzorky na biochemickou a imunohistochemickou analýzu.
2. Aplikace i.m. apomorfínu prasatům za účelem indukce dyskineze po aplikaci konstruktů do mozku.
3. Odběr ovarii, vejcovodů, případně dělohy po utracení zvířat k získání oocytů, embryí 1-3d., případně fétů ve stáří 30-90 dní.
4. Odchov zvířat a zařazení zvířat, která budou post mortem použita k odběru vzorků mozku pro izolaci nervových kmenových buněk, přípravu histologických preparátů a odběru dalších tkání, vše pro biochemickou a imunohistochemickou analýzu.



5. Sledování chování zvířat kamerovým systémem (během ustájení) a vyšetřování zvířat pomocí magnetické rezonance v celkové anestezii (platí pro F0, F1, F2, F3, Fn generaci a všechny transgenní a terapeutické skupiny).
6. Implantace vysílačů a sond telemetrického systému v celkové anestezii pro monitoraci biopotenciálů (EEG, ECG, EMG, teplota atd.) v rámci charakterizace transgenních zvířat (platí pro F0, F1, F2, F3, Fn generaci a všechny transgenní a terapeutické skupiny)).
7. Behaviorální studie na prasatech (platí pro F0, F1, F2, F3, Fn generaci a všechny transgenní a terapeutické skupiny).
8. Opakované biopsie kůže, odběry krve (vč. kostní krve pro izolaci MSCs), cerebrospinální tekutiny a jiných tělesných tekutin (ejakulát) budou realizovány z důvodu monitorování zdravotního stavu, vývoje onemocnění a ověření transgeneze, v intervalech po 1 měsíci (terapeutické modely) nebo 6 měsíců (charakterizace mateřských linií)..
9. Opakované neinvazivní sledování změn CNS pomocí magnetické rezonance v celkové anestezii v intervalu 6 měsíců anebo déle.

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

Nejsou očekávány závažné nežádoucí účinky u zvířat. Klasifikace závažnosti je střední z důvodu provádění chirurgických a dalších zákroků v celkové anestezii. Vzhledem k dosavadní absenci klinických příznaků Huntingtonovy nemoci u prasete je míra závažnosti z důvodu rozsahu projevů nemoci jen mírná. Při jakémkoliv výrazném zhoršení zdravotního stavu budou zvířatům podána analgetika a v nevyhnutných případech budou bezodkladně utracena. Zvířata budou při ukončení experimentu v tomto projektu pokusů usmrcena za účelem získání tkání pro biochemické a histologické analýzy.

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

| Druh zvířat <sup>2)</sup><br>- vyberte ze seznamu | Odhadovaný počet | Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti |       |         |         |
|---------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------|-------|---------|---------|
|                                                   |                  | Nenabude vědomí                          | Mírná | Střední | Závažná |
| Prase domácí (Sus scrofa domesticus)              | 800              |                                          |       | 800     |         |
| Zvolte položku.                                   |                  |                                          |       |         |         |
| Zvolte položku.                                   |                  |                                          |       |         |         |
| Zvolte položku.                                   |                  |                                          |       |         |         |
| Zvolte položku.                                   |                  |                                          |       |         |         |

**Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena**

|                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití                                             | 300 |
| 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*

Jedná se o jedince mateřských linií, kteří budou po charakterizaci vybráni pro navazující specifické projekty pokusů. Následné opětovné použití v navazujícím PP bude mít nízký kumulativní dopad z důvodu dlouhého intervalu (6M) mezi invazivními postupy při monitoringu fenotypu a odběrech tkání, které jsou vždy prováděny v anestezii.

Dále se to týká jedinců, kteří nebudou zcela vhodní k použití v tomto PP. Převážně se to týká WT jedinců nenesoucích mutovanou alelu, kteří tvoří polovinu potomstva. Tito jedinci mohou být následně zařazeni do jiného PP, kumulativní dopad na zvíře bude zanedbatelný.

**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*

Pro dlouhodobé sledování neurodegenerativních změn mozku, které u Huntingtonovy choroby nastupují ve vyšším věku, neexistuje alternativní způsob, který by nahradil použití velkého zvířecího (prasečího) modelu



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Huntingtonovy nemoci. Prasečí linie jsou bez klinických projevů Huntingtonovy nemoci a jejich charakterizace tak probíhá nadále. Vzhledem k patologii Huntingtonovy nemoci, která postihuje především mozkové struktury, je odůvodněné vytvoření a využití terapeutických prasečích modelů, na kterých je možné testovat bezpečnost a účinnost potenciální terapie na mozku s člověku podobnými strukturami.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Omezení používání zvířat</b> - vysvětlíte, 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 a tudíž i odběry biologického materiálu budou opakovaně a po delší období vykonávány za účelem zachycení fenotypu modelu v delším časovém období. Tento přístup významně redukuje počet použitých zvířat. Geneticky nevhodná zvířata, především WT pak budou využita v jiných experimentech nebo budou usmrcena pro odběr tkání. Získané vzorky různých tkání a data jsou sdíleny s dalšími pracovišti a institucemi.                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Šetrné zacházení</b> 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                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Všechny věkové kategorie prasečích linií jsou dosud bez klinických projevů nemoci, bez problémů přijímají krmivo a celkově prospívají. Jsou držena na hluboké podestýlce. Behaviorální testy probíhají na principu dobrovolnosti, jako motivace je používán pamlsek. Operace a invazivní zákroky budou probíhat v celkové anestézii po premedikaci v kotci. Chirurgický zákrok by neměl významně ovlivnit kvalitu života zvířete. Restrikce příjmu potravy bude omezena pouze na noc před operačním výkonem. Zvířata budou po operaci dostávat léky s protizánětlivým a analgetickým účinkem Vetalgín nebo Flunixin (i.m.). Při výrazném zhoršení zdravotního stavu bude zvířatům podáván Tramal (i.m.) nebo budou bezodkladně utracena. |
| <b>Použité druhy zvířat</b> - vysvětlíte výběr druhů a souvisejících životních stadií                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Miniaturní prase je charakterem tkání a anatomii blízké podmínkám humánní medicíny.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

<sup>1)</sup> Včetně vědeckých pojmů, které se mohou skládat z více než pěti jednotlivých slov, a s výjimkou druhů zvířat a účelů uvedených jinde v dokumentu

<sup>2)</sup> 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