

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 10-2021-P
upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

Role signalizace Wnt/ β -katenin v neurogenezi a gliogenezi vyvolané ischemickým poškozením mozku

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

60

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾

Fokální cerebrální ischemie, signální dráha Wnt/ β -katenin, NG2 glie, neurogeneze

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 |
| ☐ | jiné zkoušení účinnosti a tolerance |
| ☐ | 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

Hlavním cílem tohoto projektu je prohloubit znalosti o roli kanonické signální dráhy Wnt v neurogenezi dospělého mozku a při hojení fokálního cerebrálního ischemického poranění. Jde především o detailní ujasnění populací či subpopulací buněk, které produkují liganďy Wnt, buněk s aktivní Wnt dráhou a jejich role v neurogenezi. Dalším cílem je charakterizace N2 glií, vyhodnocení jejich plasticity a diferenciálního potenciálu při hojení ischemického poranění a popis subpopulací, které z těchto buněk vznikají.

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)

Získané znalosti by měly přispět k tvorbě účinnější terapie, která pomůže zmírnit dopady ischemického poranění na kognitivní, motorické a senzorické funkce pacientů. Použití aktivátorů Wnt dráhy v kombinaci se stávající léčbou je v posledních letech předmětem studia a detailní znalosti o funkci této dráhy v různých buněčných typech a v různých časových intervalech po poranění umožní lépe nastavit potenciální léčbu.

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

Indukce rekombinace loxP-Cre pomocí tamoxifenu: 2 aplikace s odstupem 24 hodin, podání intraperitoneální injekcí či orálně metodou gavage

Přerušování střední koronární arterie metodou koagulace: chirurgický zákrok v celkové anestezii s následným podáním antibiotik a analgetik. Kontrolní zvířata budou podrobena stejné operaci bez

přerušení mozkové arterie. Odběr tkání je plánován v časových intervalech 1,3,7,14, 21 a 28 dní od indukce.

Transkardiální perfuze myši v celkové anestezii následovaná usmrcením zvířete dekapitací pro odběr tkání.

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

Podání tamoxifenu obvykle nemá žádný pozorovatelný dopad na celkový zdravotní stav zvířat. Přerušení přívodu krve do jedné části mozku zvířat může trvale narušit motorické a senzorické funkce zvířat, obvykle však dopady nebývají tak závažné, aby zvířata vykazovala bolestivost či nebyla schopná příjmu potravy.

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

Druh zvířat ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhado- vaný počet	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
		Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Myš laboratorní (Mus musculus)	1500		300	1200	
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 - *uveďte*

Všechna zvířata budou na konci pokusu usmrcena, jejich opětovné použití není možné z důvodu aktivace reportérové alely v NG2 gliích.

Uplatňování 3R

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

Nahrazení zvířat je možné pouze kultivací a diferenciací kmenových a progenitorových buněk *in vitro*, tyto buňky je však třeba vždy nově izolovat ze zvířete a jejich přežívání v tkáňové kultuře je značně omezené. Stejně tak kultivace NG2 glií má prozatím zásadní limity.

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).*

Navržené pokusy jsou vždy dopředu optimalizovány z hlediska statistických metod, aby použité množství zvířat bylo minimální nezbytné k získání reprodukovatelných dat. Použité metody jsou rutinně používány zkušenými operátory.

Šetrné zacházení 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 experimenty budou prováděny zkušenými pracovníky a jejich trvání bude omezeno na nezbytně nutnou dobu. Operace budou prováděny v aseptickém prostředí v celkové anestezii, zvířata budou do zotavení po narkóze uložena na vyhřívané plotýnce, následně jim budou podána

antibiotika a analgetika. Zvířata budou na denní bázi sledována experimentátory i pracovníky zvěřince a jejich zdravotní stav bude pravidelně kontrolován.

Použité druhy zvířat - vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií

Budou použiti dospělí jedinci Myši laboratorní. Jedná se o nejčastěji používaný savčí model, který je geneticky i fyziologicky blízký člověku a tudíž poznatky získané studiem myši jsou potenciálně aplikovatelné i v lidské medicíně. Výhodou tohoto modelového organismu je dobře definované genetické pozadí a krátká generační doba, jako i značný počet mláďat.

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