

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569**Název projektu pokusů**

Rozmnožování a charakterizace knock-in KI-86CAG HD linie miniprasat

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

60 měsíců, od schválení do 31. 12. 2025

Klíčová slova - *maximálně pět 1)*

Huntingtonova choroba, knock-in prasečí model

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

Hlavními cíly projektu jsou:

1. Rozmnožování KI-86CAG HD linie miniprasat - odchov F1, F2 až F5 generace miniprasat pro pokusné účely a navazující experimentální studie.
2. Dlouhodobá charakterizace KI-86CAG HD linie miniprasat všech generací (F0, F1 až F5) za účelem charakterizace linie v dlouhém časovém období.
3. Vybraná zvířata mohou být ještě v průběhu tohoto PP přefazena do samostatného experimentu, který bude probíhat podle pro ten účel schváleného specifického PP.

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, který bude dále využit v navazujícím preklinickém 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. Sledování chování zvířat kamerovým systémem (neinvasivní sledování během ustájení).
Neinvasivní vyšetřování zvířat pomocí magnetické rezonance (NMR) v celkové anestezii v pravidelných intervalech přibližně každých 6 měsíců. V případě zhoršení klinického stavu spojeného s nástupem příznaků Huntingtonovy nemoci se frekvence vyšetření upraví na každý měsíc.
2. Implantace vysílačů a sond telemetrického systému v celkové anestezii pro monitoraci biopotenciálů (EEG, ECG, EMG, teplota atd.) v rámci charakterizace „knock-in“ zvířat. Zvířata budou vyšetřována v pravidelných intervalech přibližně každých 6 měsíců. V případě zhoršení klinického stavu spojeného s nástupem příznaků Huntingtonovy nemoci častěji přibližně každý měsíc.
3. Behaviorální studie na prasatech. Nácvik miniprasat na provádění behaviorálních studií bude probíhat intenzivně každý pracovní den, po dobu jednoho měsíce. Behaviorální studie zahrnují volnou chůzi jedince po stáji v manipulační chodbičce mezi kotci a v experimentální místnosti, přivolání a lákání na pamlsek (piškot, apod.), nášlap a stání na váze, hledání pamlsku, chůze po běžícím pásu a přechod přes balance-beam. Následně bude další opakované testování probíhat v pravidelných intervalech přibližně každý

měsíc nebo podle potřeby.

4. Opakované biopsie kůže, odběry periferní krve (vč. kostní krve pro izolaci MSCs), cerebrospinální tekutiny (CSF) a jiných tělesných tekutin (ejakulát) budou realizovány z důvodu monitorování zdravotního stavu, vývoje onemocnění a ověření transgeneze. Odběry budou prováděny v pravidelných intervalech přibližně každých 6 měsíců. V případě zhoršení klinického stavu spojeného s nástupem příznaků Huntingtonovy nemoci častěji přibližně každý měsíc.

5. Některá zvířata budou z důvodu potřeby charakterizace patologických změn utracena v hluboké celkové anestezii pomocí celotělové perfuze ledovým PBS a míšní tkáň, mozek a další tkáně nebo orgány budou zpracovány pro biochemické a histologické vyšetření. Usmrcení zvířat různých věkových kategorií na odběry orgánů budou prováděny v intervalech 6 měsíců věku. V případě zhoršení klinického stavu spojeného s nástupem příznaků Huntingtonovy nemoci častěji přibližně každý měsíc.

6. Vybraná zvířata budou vyčleněna do chovného stáda KI-86CAG HD linie a budou využívána pro reprodukci.

7. Charakterizovaná zvířata (vhodného genotypu, věku atp.) budou přerazována do navazujících projektů pokusů.

Činnosti 1-6 mohou být prováděny u všech zvířat po celou dobu platnosti tohoto PP nebo do jejich usmrcení anebo přerazení do jiného PP. Provádění charakterizace bude koordinováno tak, aby činnosti uvedené v bodech 1,4,5 byly provedeny současně v průběhu jedné anestezie.

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. F0 generace knock-in kanců ve věku 58 měsíců je zatím bez klinických známek Huntingtonovy nemoci. 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 ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhadovaný počet	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
		Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Prase domácí (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	652			652	
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					

Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena

Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití	400
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

Jedná se o jedince, 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 - uveďte, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč

<i>nemohou být použity pro účely tohoto projektu</i>
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.
Omezení používání zvířat - 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.
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 věkové kategorie knock-in modelu jsou dosud bez klinických projevů nemoci, bez problémů přijímají krmivo a celkově prospívají. F0 generace knock - in kanců ve věku 58 měsíců je zatím bez klinických známek Huntingtonovy nemoci. 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 Vetalgin nebo Flunixin (i.m.). Při výrazném zhoršení zdravotního stavu bude zvířatům podáván Tramal (i.m.) nebo budou bezodkladně utracena.
Použité druhy zvířat - vysvětlíte výběr druhů a souvisejících životních stadií
Miniaturní prase je charakterem tkání a anatomií blízké podmínkám humánní medicíny.

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

