

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Molekulární mechanismy ovládání normální a leukemické krvetvorby

Doba trvání projektu pokusů v měsících	52
Klíčová slova	hematopoetický systém
leukemie	zánět
hematopoetická kmenová buňka	0

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Kardiovaskulární krevní a lymfatický systém [PB2]

0

Základní výzkum: Imunitní systém [PB7]

0

Cíle projektu pokusů

Regulace krvetvorby je z velké části stále neznámá a mnohé poruchy krvetvorby (anémie, myelodysplastický syndrom, leukémie) jsou léčitelné jen u části pacientů. Výsledky in vivo experimentů (1) určí důležitost role klíčových molekul v procesu obnovy hematopoetických kmenových buněk, (2) definují jejich funkci při diferenciaci buněk, (3) stanoví, jakou roli mají v průběhu leukemické transformace a při procesu obnovy leukemických kmenových buněk, (4) preklinicky zhodnotí aktivitu a účinnost některých potenciálních léčiv pro léčbu leukemie u lidí.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Výsledky získané v rámci tohoto projektu přispějí k poznatkům o klíčových regulačních molekulách a poskytnou základní znalosti pro vývoj nových terapií při léčbě leukémie.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Většina pokusů bude spočívat pouze v chovu myších kmenů nezbytném pro vytvoření nebo udržení geneticky modifikované linie a chovu, který bude ukončen usmrcením experimentálních zvířat za účelem odběru orgánů a buněk pro další analýzu. Mezi použité invazivní postupy patří odbírání krve z tváře, transplantace a injekční aplikace. Krev z tváře bude odbírána maximálně jednou týdně. Při transplantaci jsou myši nejdříve subletálně nebo letálně ozářené (vždy při rekonstituci imunitního systému), transplantace je prováděna injekcí do retroorbitálního plexu při inhalační anestezii nebo intravenózní (i.v.) injekcí do ocasní žíly. Počet injekcí a trvání léčby leukemických myší léčivami závisí na použitém léčivu - L-asparagináza: i.p., 5-krát týdně, 4 týdny, celkově 20 dávek, vincristine: i.p., jednou týdně, 4 týdny, celkově 4 dávky, dexamethasone: i.p., 5-krát týdně, 4 týdny, celkově 20 dávek, daunorubicin: i.v. do ocasní žíly, jednou týdně, 4 týdny, celkově 4 dávky, doxorubicin: denně, den 9-11 po transplantaci, i.v. do ocasní žíly, celkově 3 dávky, cytosin β -D-arabino-furanosid denně nebo obden, počínaje druhým dnem po transplantaci, i.v. do ocasní žíly, maximálně 5 týdnů, dimate třikrát týdně počínaje druhým dnem po transplantaci, i.v. do ocasní žíly nebo i.p., maximálně 5 týdnů, 2-deoxy-D-glukoza denně, počínaje druhým dnem po transplantaci, po dobu 20 dní i.p. nebo orální gaváž nebo 2-bromopyruvate

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

Závažnost osteomyelitidy myší kmene CMO spojené s otoky zadních tlapek a ocasu může v některých případech dosáhnout až střední zátěže, nicméně nemusí.

Pátý až desátý den po transplantaci myši trpí post-iradiačními nepříznivými účinky, mezi které patří ztráta tělesné hmotnosti a utlumení imunitního systému. Dokud není imunitní systém obnoven, myši jsou senzitivnější vůči oportunistickým infekcím. U xenotransplantací může vzácně dojít k reakci štetu vůči hostiteli. Aby byla doba trvání těchto účinků co nejkratší, pokud jsou u myši po transplantaci přítomny příznaky reakce štetu vůči hostiteli (bolest projevující se shrbením, nečinnost, neupravená srst), pokus je ukončen a myši jsou usmrceny.

Transplantace leukemických buněk vede u myši k vzniku leukémie. Pro myši je zatěžující také následná léčba různými léčivy. Zhoršení zdravotního stavu se projevuje ztrátou hmotnosti, oslabením nebo paralýzou zadních končetin a u některých leukémií také anémií detekovatelnou díky bledým končetinám. Zvířata jsou při těchto pokusech pravidelně monitorována jednou týdně a

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 (Mus musculus) [A1]	0	3100	2000	0

0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0

Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi			
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

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty

Pracujeme pouze s laboratorními zvířaty, které nemohou být navráceny do přírody, protože by nebyla schopna přežít.

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat

Pokud existuje alternativní metoda nezahrnující použití zvířat, bude tento přístup použit. Při plánování tohoto projektu pokusů byly pro vyhledávání možných alternativ využity následující zdroje: vědecké publikace, databáze 3R (<http://www.nc3rs.org.uk/>) a ALTBIB (<https://www.nlm.nih.gov/enviro/altbib.html>). Pro případ, že by se objevily nové alternativní metody, bude vyhledávání pokračovat také v průběhu projektu pokusu. Pro omezení experimentů na myších budou využity alternativní metody jako buněčné kultury, tkáňové kultury a in vitro modely. V případě analýz na buněčné a molekulární úrovni budou v maximální možné míře využívány imortalizované leukocytární progenitory a buňky z nich diferencované in vitro. Primární buňky z usmrcených zvířat budou použity jen v míře nezbytně nutné pro potvrzení získaných výsledků a pro experimenty, které na imortalizovaných progenitorech nebo buněčných liniích nebude možné provést tak, aby výsledky měly dostatečnou informační hodnotu. Alternativní in vitro metody nepostihují složitost zkoumané problematiky, a proto nemohou nahradit navrhované pokusy. Hlavním důvodem pro použití zvířat v tomto projektu je potřeba zkoumat jak funguje hematopoetický systém jako celek, a jak je jeho funkce při leukémiích nebo zánětech narušena na organismální úrovni. Imunitní a hematopoetický systém je extrémně složitý a zatím jeho komplexní funkce není možné

Omezení používání zvířat

V pokusech bude použito pouze takové množství zvířat, které zajistí statistickou průkaznost získaných dat. Při sestavování pokusných skupin budeme vycházet z našich dlouholetých zkušeností s minimalizací počtů zvířat pro jednotlivé typy experimentů a ze statistických analýz předběžných dat. Pokud by se provádění některých plánovaných experimentů ukázalo jako zbytečné (např. z důvodu publikace stejných dat jiným vědeckým týmem) experimenty prováděny nebudou. Na experimentálních zvířatech bude prováděno maximální množství analýz zároveň, tak jak to umožní podmínky experimentu a naše pracovní kapacity. Tkáňe a orgány z usmrcených zvířat budou využívány v maximální míře umožněné podmínkami experimentu. V rámci každého experimentu bude shromažďováno maximum možných dat, aby nedocházelo k neopodstatněným opakováním. Získané výsledky budou použity k designu navazujících experimentů takovým způsobem, aby bylo použito jen nezbytně nutné množství pokusných zvířat. Dále bude v pokusech použito pouze takové množství zvířat, které zajistí statistickou průkaznost získaných dat. Počet myší bude určen tak, aby bylo dosaženo 90% síly testu s hladinou významnosti 5% při pozorované směrodatné odchylce.

Šetrné zacházení se zvířaty

Utrpení, bolest a stres myší budou vždy omezeny na minimum. Myši budou chovány v optimálních podmínkách, které jsou stanoveny současnými regulacemi EU, místními zákony a vyhláškami. Myši budou pravidelně kontrolovány a ošetřovány proškolenými ošetřovateli. V případě zjevného utrpení, stresu nebo projevu nemoci přesahující deklarovanou závažnost pokusu budou pokusná zvířata okamžitě usmrcena odpovídající metodou (tedy cervikální dislokace podle Nařízení z roku 2010/63/EU Evropského parlamentu a Rady pro ochranu zvířat použitých pro vědecké účely), a následně budou analyzována. Odběr krve bude prováděn jenom zkušenými výzkumnými pracovníky. Při transplantačních studiích budou myši transplantovány injekčně do ocasní žíly. Transplantace bude provádět pouze zkušené a trénované osoby, čímž se míra utrpení a bolesti omezí na minimum. Podávání látek myším bude prováděno jenom zkušenými pracovníky injektováním látky do peritonea, ocasní žíly, gaváže nebo intradermálně. Důležité je, že experimenty nebudou provedeny, pokud předběžné výsledky nepotvrdí opodstatněnost navrhované práce.

Použité druhy zvířat - vysvětlení

Využití myši domácí (Mus Musculus) v tomto projektu pokusu je odůvodněné:

- Genetickou příbuzností myši a člověka
 - Podobností hematopoetického systému myši a člověka
 - Myši jsou nejlepším neprimátním modelem vhodným pro studium poruch krvetvorby a leukémií
 - Neúspěšnými snahami o nalezení alternativních metod bez využití pokusných zvířat
 - Výsledky studie mohou být přínosné pro vědeckou komunitu ve smyslu dalšího bádání
 - Projekt pomůže přímo nebo nepřímo zlepšit zdravotní stav lidské populace
 - Významností výzkumu pro lidstvo ve srovnání s hodnotou zvířat pro výzkum vybraných
- Budou použity pouze dospělé jedince myši domácí, protože zkoumáme zralý hematopoetický systém.