Vyplňujte jen bílé kolonky!

Formulář vyplňujte na počítači; kolonky se zvětší automaticky podle množství textu.

NETECHNICKÉ SHRNUTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

Využití fosfodiesteráz k terapeutické manipulaci buněk chrupavky a kosti v myších modelech (grant AZV NV18-08-00567)

Doba trvání projektu pokusů - *v měsících*	56
Klíčová slova - *maximálně pět* [1])	fosfodiesterázy, chrupavka, kost, osteoporóza, osteoartróza

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

☒	základní výzkum	
☒	translační a aplikovaný výzkum	
☐	legislativní účely a běžná výroba	kontrola kvality (včetně zkoušení bezpečnosti a účinnosti šarže)
☐		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*

Osteoporóza, osteoartróza a revmatoidní artritida jsou závažná onemocněné pohybového aparátu a postihují přibližně ¼ lidí nad 50 let. Stav jejich pohybového aparátu by se mohl zlepšit podáváním inhibitorů, fosfodiesteráz (PDE), které jsou v současné chvíli schválené pro léčbu jiných onemocnění. PDE v buňkách regulují hladinu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), druhotných poslů využívaných řadou vnitrobuněčných signálních drah. Navíc je snížené množství cAMP v kostních buňkách a synoviu je spojováno s rozvojem artrózy a revmatoidní artritidy. cGMP hraje důležitou roli v signalizaci vyvolané natriuretickým peptidem C (CNP), který je navrhován jako terapeutikum v léčbě vývojové poruchy růstu kostí – achondroplasie. Terapeutickou manipulací aktivity PDE by tedy mohlo být možné nejen zpomalit degeneraci kostí a kloubů, ale i podpořit/zdokonalit léčbu achondroplasie. Posouzení vlivu regulace aktivity PDE (buď pomocí inhibitorů, nebo pomocí genetických myších modelů) na rozvoj degenerativních onemocnění kostí a kloubů je cílem předkládaného projektu pokusu.

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)*

Hlavním přínosem plánovaných pokusů bude zjištění, zda lze zvrátit katabolické procesy odehrávající se v kostech a kloubech postižených osteoartrózou, osteoporózou anebo revmatoidní artritidou podáváním inhibitorů PDE. Dále zjištění, zda je možné využít inhibitory PDE k léčbě achondroplasie, anebo jako podpůrnou terapii v léčbě achondroplasie analogem CNP BMN111. Poslední fáze pokusů, používání PDE deficientních myší má prokázat, specifickou úlohu dané PDE v metabolismu kostní a chrupavkové tkáně. Všechny přínosy lze označit za okamžité, neboť se projeví v době trvání projektu pokusu.

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

Na žádných pokusných zvířatech nebudou prováděny významné invazní zákroky, velká část z nich ani nebude dostávat žádné injekce. Malá část, (max. 30) myší dostane 1-2 imunizační injekce, max. 60 myší dostane 1-2 intraperitoneální injekce tamoxifenu. Malá skupina (max. 20 myší) bude dostávat obden podkožní injekce po dobu 4 týdnů. Velká část myší ($^1/_3$ – ½) bude využita pouze na rozmnožení kolonie, sběr tkání a získání dostatečného množství pokusných jedinců. Maximálně 360 myší bude dostávat v potravě inhibitory PDE, které jsou schválené pro lékařské použití.

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

Nepříznivé účinky vyvolané metodami popsanými v projektu pokusu se nepředpokládají. Nejzávažnější zhoršení zdravotního stavu se předpokládá u myších modelů degenerativních lidských onemocnění, a to u modelů artrózy a revmatoidní artritidy. Zhoršený zdravotní stav může trvat 4-8 týdnů.

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

		Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti

Druh zvířat [2]) *- vyberte ze seznamu*	Odhado-vaný počet	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Myš laboratorní (Mus musculus)	1120	-	1120	-	-
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					

Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena	
Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití	-
Odhadovaný počet zvířat, která budou navrácena do přírodního stanoviště či systému chovu	-
Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu	-
Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - *uveďte*	
Všechna zvířata budou na konci pokusu usmrcena.	

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*

Nejprve bude zjištěno, jaké PDE jsou v tkáních chrupavky a kosti a podle toho budou jejich příslušné inhibitory testovány na buněčných liniích. Pouze pokud nějaký inhibitor prokáže anabolický efekt na buněčných modelech a tkáňových explantátech kultivovaných *ex vivo*, a dosud nebyl testován na myším modelu (bude aktuálně ověřeno před započetím pokusu), tak bude testován na myších modelech dle projektu pokusu. Testování na myších je posledním krokem ověření terapeutické manipulace s určitou PDE, u kterého je sledována patofyziologická odpověď celého organismu, takže nelze nelze sledovaný efekt zkoumat na buněčném ani jiném modelu.

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).*

Během celé studie bude použito minimální množství zvířat, které bude nezbytné pro udržení produkční kolonie a současně bude dostačující pro opakování pokusů a správné statistické zhodnocení získaných výsledků. Pouze pokud nějaký inhibitor prokáže anabolický efekt na buněčných modelech a tkáňových explantátech kultivovaných ex vivo, a dosud nebyl testován na myším modelu (bude aktuálně ověřeno před započetím pokusu), tak bude testován na nezbytném množství myší. Odhadované množství 40-60 myší pro jeden PDE inhibitor je dáno heterogenitou projevů léčených degenerativních onemocnění.

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*

Během chovu bude se zvířaty zacházeno šetrným způsobem tak, aby jim nebyla způsobena nadměrná bolest, stres, strach a utrpení. V průběhu ustájení bude vybudován návyk na uchopení rukou, zvířata budou umístěna v chovných nádobách v samostatné místnosti nebo místnostech k tomu určených. Zvířata v chovu jsou každodenně kontrolována a v případě identifikace jakéhokoliv typu utrpení (např. obtíže s příjmem potravy, ztráta hmotnost, omezený pohyb, úraz jiným zvířetem), je takový jedinec bezodkladně usmrcen.

Použité druhy zvířat - *vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií*

Budou používány pouze laboratorní myši (Mus musculus), neboť u těchto zvířat existují kmeny modelující liská onemocnění a kmeny s cílenou inaktivací genů pro PDE. Pro studium úlohy PDE v degenerativních onemocněních pohybového aparátu budou používána zvířata stará 12 a více týdnů, myší modely vývojových poruch růstu kostí achondroplasie a thanatoforické dysplásie budou používány ve stáří 1 – 35 dní života.

[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