

## NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

### Název projektu pokusů

Stimulace Müllerových buněk a BDNF/TrkB signalizace v myším modelu: nový terapeutický cíl autoimunitního zánětu sítnice

Doba trvání projektu pokusů v měsících

40

Klíčová slova

Experimentální autoimunitní uveoretinitida

Müllerovy buňky

BDNF (mozkový neurotrofický faktor)

Regenerace sítnice

Zraková dráha

### Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Smyslové orgány (kůže, oči a uši) [PB9]

0

Základní výzkum: Nervová soustava [PB3]

0

### Cíle projektu pokusů

Cílem tohoto projektu je objasnit vliv vizuální stimulace na proliferační, diferenciací a regenerační aktivitu Müllerových buněk v podmínkách autoimunitního zánětu sítnice a zkoumat úlohu signální dráhy BDNF/TrkB aktivovanou ve zrakových oblastech mozku nebo přímo v sítnici na tyto procesy.

### Potenciální přínosy projektu pokusů

Zadní autoimunitní uveitida je zánětlivé nitrooční onemocnění, které je jedním z hlavních příčin slepoty u lidí v produktivním věku. Etiologie tohoto onemocnění není úplně známa, což omezuje možnosti pro vytvoření cílené terapie. Experimentální autoimunitní uveoretinitida u myši sdílí mnoho společných znaků se zadní autoimunitní uveitidou u lidí, a tudíž představuje vhodný model pro hledání nových terapeutických cílů tohoto onemocnění. Očekávaným přínosem projektu je nalezení mechanismu působení neurotrofické signální dráhy BDNF/TrkB na zánětem poškozenou sítnici, která má potenciál pro regeneraci sítnice přes ovlivnění aktivity Müllerových buněk a jejich schopnosti diferenciací v neurony. Dalším předpokládaným přínosem je charakterizace možností modulace působení BDNF/TrkB v sítnici prostřednictvím stimulace viditelným světlem. Navrhované experimenty jsou důležité pro identifikaci nových strategií v prevenci a terapii chronického zánětu sítnice.

### Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Indukce experimentální autoimunitní uveoretinitidy vyžaduje jednorázovou aplikaci retinálního antigenu a Freundova adjuvans subkutánní cestou do báze ocasu a intravenózní aplikaci pertusového toxinu do ocasní žíly opakovanou jedenkrát. Tyto postupy proběhnou v celkové inhalační anestezii.

Podání látek do center zrakové dráhy bude provedeno jednorázovou stereotaktickou aplikací intracerebrální mikroinjekce v celkové inhalační anestezii posílené použitím lokálních analgetik.

Jednorázová intravitreální mikroinjekce látek bude prováděna v celkové inhalační anestezii doplněné lokálním analgetikem.

Vyšetření očního pozadí s využitím neinvazivní endoskopické techniky předpokládá použití mydriatik a celkové anestezie.

Vizuální stimulace (12 hod denně po dobu 2 týdnů) a behaviorální testy zrakové ostrosti (15-20 min s opakováním max. sedmkrát po dobu 2 týdnů) budou prováděny v optokinetickém bubnu a vyžadují jednotlivé umístění myši do experimentálních nádob. V průběhu vizuální stimulace budou mít zvířata volný přístup ke krmení a vodě ve formě hydrogelu.

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

Pokusy zahrnují krátkodobý chirurgický zákrok v celkové anestézii za účelem podání intravenózní, subkutánní, intravitreální nebo intracerebrální injekce. Po odeznění anestezie/analgezie použité pro chirurgický zákrok mohou zvířata pociťovat v traumatizovaném místě dočasnou bolest, která obvykle odezní do 24 hod. Podání pertusového toxinu a kompletního Freundova adjuvans obsahujícího *Mycobacterium tuberculosis* vyvolá mírný systémový zánět. Zároveň se v místě subkutánního podání emulze retinálního antigenu a kompletního Freundova adjuvans může vytvořit kožní iritace, svědění a bolest. Od doby nástupu klinických projevů uveoretinitidy (10. den po imunizaci antigenem) mohou zvířata pociťovat bolest oka a zhoršení vizu. Z tohoto důvodu většina experimentů bude ukončena 14. den po imunizaci. Podobně, po provedení intravitreálních a intracerebrálních injekcí budou zvířata ponechána naživu max. 4 dny, na umožnění působení zkoumaných látek.

Během experimentů zaměřených na vizuální stimulaci (12 hod denně po dobu 2 týdnů) budou zvířata umístěna jednotlivě do experimentálních nádob, kde mohou pociťovat stres v souvislosti se sociální izolací a zmenšením prostoru k pohybu, který bude omezený na velikost plochy experimentální nádoby v rozsahu 177 cm<sup>2</sup>.

### 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 ( <i>Mus musculus</i> ) [A1] | 0                                        | 15    | 287     | 0       |

| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0                       | 0                                            | 0                  | 0 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------|--------------------|---|
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0                       | 0                                            | 0                  | 0 |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0                       | 0                                            | 0                  | 0 |
| <b>Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                         |                                              |                    |   |
| Druh zvířat                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Odhadovaný počet zvířat |                                              |                    |   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Opětovné použití        | Navrácení do chovu, do přírodního stanoviště | Do zájmového chovu |   |
| myš laboratorní (Mus musculus) [A1]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0                       | 0                                            | 0                  |   |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0                       | 0                                            | 0                  |   |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0                       | 0                                            | 0                  |   |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0                       | 0                                            | 0                  |   |
| <b>Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                         |                                              |                    |   |
| Vzhledem k tomu, že všechny plánované pokusy budou provedeny za účelem odběru sítnic, mozku, příp. lymfatických orgánů, které budou následně podrobeny analýzám in vitro, nelze zvířata opakovaně použít.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                         |                                              |                    |   |
| <b>Uplatňování 3R</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                         |                                              |                    |   |
| <b>Nahrazení používání zvířat</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                         |                                              |                    |   |
| Z důvodu nahrazení zvířat bude testování vlivu stimulace Müllerových buněk viditelným světlem na jejich proliferační aktivitu a schopnost diferencovat se v nervové buňky provedeno in vitro. Ostatní experimenty vyžadují provedení in vivo, jelikož komplexní projevy autoimunitní uveoretinitidy a souhru mezi zrakovými oblastmi mozku a sítnicí není možné simulovat alternativními modely.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |                                              |                    |   |
| <b>Omezení používání zvířat</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                         |                                              |                    |   |
| Část experimentů bude probíhat in vitro, čímž se významně zredukuje počet zvířat o další skupiny, které by bylo nutné použít za účelem vizuální stimulace a sledování proliferační a diferenciační aktivity Müllerových buněk. Redukce počtu zvířat bude též dosaženo experimentálním designem studie, který klade důraz na provádění navazujícího experimentu pouze na základě pozitivního nálezu v předchozím experimentu. Rovněž použití inbredního kmene myši citlivého pro rozvoj experimentální autoimunitní uveoretinitidy a provádění chirurgických zákroků zkušenými odborníky snižuje pravděpodobnost nutnosti opakování pokusů a tím i počet zvířat pro budoucí pokusy.                                                                                                                                                                                      |                         |                                              |                    |   |
| <b>Šetrné zacházení se zvířaty</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                         |                                              |                    |   |
| Pokusy budou probíhat pouze u zvířat aklimatizovaných na prostředí zvířetníku a habituovaných na přítomnost experimentátora. Ve studii bude sledována především raná fáze uveitidy (do 14. dne po imunizaci) před dosažením vrcholu symptomů onemocnění, abychom minimalizovali utrpení zvířat. Akutní fáze uveitidy bude sledována pouze do 18. dne po imunizaci u omezeného počtu zvířat (24 až 48) na základě výsledků účinnosti látek v rané fázi uveoretinitidy. Pro aplikaci testovaných látek jsou zvoleny netoxické dávky. V případě chirurgických zákroků bude zabezpečena důsledná předoperační, perioperační a postoperační péče. Zvířata budou denně monitorována a v případě výskytu atypických příznaků bude jejich zdravotní stav konzultován s veterinárním lékařem. atypických příznaků bude jejich zdravotní stav konzultován s veterinárním lékařem. |                         |                                              |                    |   |
| <b>Použité druhy zvířat - vysvětlení</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                         |                                              |                    |   |

V projektu použijeme samce a samice laboratorní myši (*Mus musculus*) kmene C57BL/6J ve věku 6 až 8 týdnů, vzhledem k tomu, že v tomto vývojovém stadiu jsou zvířata nejcitlivější k indukci experimentální autoimunitní uveoretinitidy. Onemocnění se vyvine u obou pohlaví stejně a je dobře reprodukovatelné. Výhodou C57BL/6J myši je i jejich haplotyp H-2b, díky kterému jsou senzitivní na lidský uveitogenní antigen, peptid IRBP1-20 (interphotoreceptor binding protein), což splňuje biologickou blízkost k zadní autoimunitní uveitidě u člověka, a tedy získané poznatky z experimentů mohou mít využití i v lidské medicíně.