

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

Úloha tukové tkáně kostní dřeně (TTKD) při regulaci metabolismu kosti a celého těla

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

60

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾

Tuková tkáň kostní dřeně, kost, obezita, kmenové buňky kostní dřeně, energetický metabolismus

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 jiné zkoušení účinnosti a tolerance☐ a běžná výroba 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 návrhu je pomocí intervenčního přístupu v preklinických zvířecích modelech prozkoumat metabolický fenotyp tukové tkáně kostní dřeně (TTKD) a kmenových buněk kostní dřeně ve vztahu k metabolismu kostí a celého těla při obezitě, a také zda manipulace metabolické aktivity TTKD (dietní nebo farmakologická) může přispět ke snížení lámavosti kostí vyvolané obezitou a sníženého senescenčního mikroprostředí kostní dřeně. Náchylnost k obezitě u myších kmenů C57Bl/6 a A/J podle našich dosavadních výsledků negativně koreluje s metabolickým fenotypem TTKD a sníženou denzitou kostí, což naznačuje význam interakce mezi kostní a tukovou hmotou v kostní dřeni při rozvoji osteoporózy a zvyšuje riziko lámavosti kostí.

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)

Výsledky předkládaných pokusů mají napomoci identifikaci mechanismů řídících metabolismus TTKD, jež mohou mít potenciálně i terapeutické využití při léčbě metabolických onemocnění kosti, včetně osteoporózy a fraktur kostí.

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

V průběhu jednotlivých pokusů budou prováděny některé z následujících in vivo fenotypizačních analýz: injekční aplikace subkutánní nebo intravenózní (např. glukózy, inzulínu, inhibitorů a stimulátorů specifických testovaných látek s účinkem na metabolismus kosti a celého těla apod.), chirurgické zákroky (zavádění čipu pro nepřímou kalorimetrii, mikropumpy pro hyperinzulinemický-euglykemický clamp, aplikace AAV).

Zvířata budou do pokusu nasazovaná postupně v letech 2021- 2025 s tím, že detailní rozvržení bude mj. ovlivněno průběžnými výsledky. Obecně se předpokládá, že v první fázi proběhnou pilotní experimenty s aplikací 2H₂O, nepřímou kalorimetrií a testováním AAV přenosu. V dalších letech pak budou předběžné výsledky využity při navržení optimalizovaných protokolů kombinujících jednotlivé přístupy.

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

V průběhu operačních zákroků (implantace čipu před nepřímou kalorimetrií, aplikace AAV) budou zvířata v celkové anestezii navozené inhalací 1-3% isofluranu z vaporizeru a analgezií navozené injekcí Rimadylu subkutanne (5 mg carprofenu / kg BW). Zákroky budou trvat nejvýše 20 minut a poté bude zvíře do

probuzení umístěno pod dohledem do teplého prostředí. Možné nepříznivé účinky chirurgických zákroků (např. bolest, snížená hybnost) budou tlumeny použitím analgetik (Rimadyl; 5 mg carprofenu / kg BW). V průběhu vyšetření na CT/PET nebo DEXA skeneru budou zvířata uspaná pomocí inhalace 1-3% isofluranu nebo aplikací pentobarbitalu (80-100 mg/kg i.p.). Před usmrcením na konci pokusů budou zvířata uspaná rychlou inhalací dietyléteru nebo 3% isofluranem.

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
Myš laboratorní (Mus musculus)	3000	500		2500	
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

Počty zvířat v jednotlivých experimentálních skupinách vycházejí z předchozích experimentů, které stanovily minimální velikost skupin 6-10 myši/skupinu k dosažení statisticky významných rozdílů v daném pokuse, pokud jsou tyto přítomny. V případě provádění metody hyperinzulinemického-euglykemického clampu se na základě předchozích experimentů ukázala nutnost zvýšit počet zvířat v jednotlivých skupinách na 16, neboť technická náročnost metody a zvýšená citlivost obézních myši k anestezii může vést k vyšší úmrtnosti zvířat. Naopak využití špičkového technického a přístrojového vybavení pro další neinvazivní in vivo analýzy typu mikroCT/PET skener a nepřímá kalorimetrie umožňuje snížit potřebný počet zvířat v jednotlivých skupinách na obvyklou velikost (6-10 myši/skupinu). Operační zákroky budou prováděny v celkové anestezii a analgesii. Pro některé pokusy bude nutné vyšetřovat myši pomocí neinvazivních technik opakovaně v průběhu pokusu pro analýzu kontinuálních změn metabolismu.

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

Jedná se o studium komplexních mechanismů regulace metabolismu kosti, TTKD a energetické rovnováhy organismu, které nelze studovat např. s pomocí in vitro modelu.

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).

Počty zvířat v jednotlivých skupinách vycházejí z předchozích experimentů i ze studia odborné literatury (zdroj: databáze PubMed), které pro většinu měřených parametrů stanovily minimální velikost skupin 6-10 myši na skupinu tak, aby se dosáhlo statisticky významných rozdílů v daném pokuse, pokud jsou tyto přítomny.

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

V průběhu operačních zákroků (instalace čipu pro nepřímou kalorimetrii, mikropump pro clamp, aplikace AAV) budou zvířata v celkové anestezii navozené inhalací isofluranu a analgezií navozené subkutánní injekcí Rimadylu. U zvířat v anestezii bude dbáno na prevenci podchlazení použitím vyhřívacích podložek nebo zvýšené teploty prostředí. V pooperačním stadiu budou myši umístěny v chovných nádobách po jedné s volným přístupem k vodě a krmivu, které bude pro usnadnění přístupu umístěno přímo na dně chovné nádoby. Zvířata budou v pooperačním období 1-2 krát denně kontrolována. V průběhu vyšetření na CT/PET nebo DEXA skeneru budou zvířata uspaná inhalací isofluranu nebo pomocí injekce pentobarbitalu (viz dále). Před usmrcením na konci pokusu budou zvířata dle potřeb jednotlivých experimentů uspaná buď dietyléterem, isofluranem, pentobarbitalem, případně kombinací anestetik Ketamin/Xylazin.

Použité druhy zvířat - vysvětlíte výběr druhů a souvisejících životních stadií

Myš (Mus musculus) je ideálním modelem pro studium obezity a jejích účinků na metabolismus kosti, stejně jako pro studium prevence a léčby metabolických onemocnění kostí asociovaných s obezitou. Mezi hlavní

výhody využití myší patří relativní nenáročnost jejich chovu a dostupnost inbredních a mutantních myších kmenů.

- 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