

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ

Název projektu pokusů

Mechanismus ovlivnění cirkadiálního systému laboratorních myší světelnými stimuly

Doba trvání projektu pokusů 5 let

Klíčová slova - *maximálně 5* myš, suprachiasmatické jádro, světlo, cirkadiální systém

Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka

x	základní výzkum
	translační nebo aplikovaný výzkum
	vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
	zachování druhů
	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
	trestní řízení a jiné soudní řízení

Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)

Savčí biologické hodiny, uložené v suprachiasmatických jádrech hypotalamu (SCN) generují přibližně 24 h oscilace na principu regulačních smyček tzv. hodinových genů a řízené intercelulární komunikace mezi buňkami SCN. Přesné 24 h periody je docíleno synchronizací světlem, které působí na buňky SCN přes glutamátové synapse retinohypothalamického traktu. Působení světla mění expresi hodinových genů, mění sílu intercelulárních interakcí, ale způsobuje také změny na posttranslační a posttranskripční úrovni jednak hodinových genů a jednak genů zodpovědných za transdukcii světelného signálu na hodinový mechanismus jako jsou receptory a proteiny signálních kaskád. Projekt má za cíl zjistit míru a způsob změn na molekulární úrovni v suprachiasmatických jádrech a dalších orgánech a strukturách v závislosti na změně světelných podmínek ve vnějším prostředí.

Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů (jak by mohlo být dosaženo pokroku ve vašem vědním oboru nebo jaký přínos by z něj člověk či zvířata mohli mít)

Světlo je jedním z hlavních abiotických faktorů prostředí ovlivňujících fyziologické procesy ve všech organismech. Střídání světla a tmy během dne a noci je hlavním synchronizátorem pro cirkadiální systém, jež reguluje fyziologické procesy na molekulární a biochemické úrovni každé tkáně. Vlivem umělého osvětlení, prodlužováním světelné fáze dne a trvalým zvyšováním intenzity světla v nočním prostředí je narušována přirozená synchronizace cirkadiálních hodin, což má za následek patologické změny v metabolickém a imunitním stavu organismu. Výsledky plánovaného projektu rozšíří poznání o významu narušené synchronizace světlem pro funkci a vývoj cirkadiálního systému a na něm závislé orgánové fyziologie. Projekt zásadním způsobem přispěje k pochopení mechanismů adaptace na změněné světelné prostředí, např., při přeletu časových pásem, při práci na směny nebo v prostředí se silným světelným znečištěním.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Budou použiti dospělí samci (60 – 120 dní) myši s genetickým pozadím C57BL/6J a jejich varianty. Konkrétně PER2: LUC, Adar^{2+/+}Gria^{R/R}, Adar^{-/-}, a VIPR2^{-/-}. Odhadovaný počet je 100 ks zvířat na jeden kmen (tj cca 500 ks celkem) za celkové období 5 let.

Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?

Nežádoucí účinky neočekáváme žádné. Po skončení experimentu budou zvířata usmrcena rychlou dekapitací po celkové hluboké narkóze. Navrhovaná míra závažnosti pokusu: Mírná. Tkáň, zejména mozková bude zpracována na histologické řezy, tkáňové homogenáty nebo organotypické či primární kultury.

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.

Studium cirkadiálního systému a jeho synchronizace vyžaduje práci s intaktním cirkadiálním systémem, složeným z biologických hodin a jejich vstupních drah z oka a jiných morfologicky vzdálených oblastí mozku. Proto je nutný výzkum na *in vivo* modelu a nelze jej nahradit alternativními metodami.

Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.

Nejmenšího počtu zvířat lze docílit minimalizováním množství zvířat ve skupinách, které ještě má statistickou výpovědní hodnotu.

Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlete volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů.

Vysvětlete obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.

Myši PER2:LUC je transgenní kmen myši s genem pro luciferázu zařazenou za promotor hodinového genu Per2. Tyto myši jsou řadu let celosvětově vyhledávaným modelem pro studium cirkadiálních oscilací na organotypických kulturách SCN. V našich experimentech chceme přesně charakterizovat posttranskripční změny RNA v jejich SCN, aby mohly být v příštích experimentech využity pro cross-breeding studie. Myši Adar^{-/-} jsou knockout myši pro enzym adenosin deaminázu působící na RNA, které poslouží jako přímý model změn v cirkadiálním systému, způsobených nedostatečnou editací RNA v SCN. Myši Adar^{2+/-}Gria^{R/R} jsou kontrolní kmen k myším Adar^{-/-}. Kmen VIPR^{-/-} jsou knockout myši pro VIPR2 receptor, které slouží jako tradiční model pro studium vlivu narušené intercelulární synchronizaci mezi neurony v SCN na cirkadiální systém. Od tohoto modelu si slibujeme dokázat, že světlem indukovaná změna cirkadiálního systému organismu závisí na synchronizované elektrické aktivitě buněk v rámci SCN.

Veškeré manipulace s pokusnými zvířaty budou vždy prováděny pracovníkem s osvědčením dle § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb. S pokusnými zvířaty bude zacházeno s maximální ohleduplností a budou omezeny všechny formy utrpení pokusných zvířat.