Vyplňujte jen bílé kolonky!

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

NETECHNICKÉ SHRNUTÍ PROJEKTU POKUSŮ

Název projektu pokusů

Studium senescence jako potenciální bariéry maligní progrese.

Doba trvání projektu pokusů	2014-do konce akreditace v roce 2016, v případě prodloužení akreditace do konce roku 2019
Klíčová slova - *maximálně 5*	Senescence, DNA polymeráza γ, p16, luciferáza, tdTomato fluorescenční protein

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

x	základní výzkum
x	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)

Na fibroblastových liniích (odvozených z netransgenních i transgenních myší) budou v *in vitro* experimentech testovány látky za účelem hodnocení jejich schopnosti indukovat a urychlit senescenci případně senescenci zpomalit nebo úplně zastavit. U těchto látek bude dále v *in vitro* experimentech analyzován jejich vliv na reparaci DNA, proliferaci buněk a regulaci buněčného cyklu.

Látky vyhodnocené v *in vitro* testech jako aktivní budou následně v *in vivo* experimentech aplikovány netransgenním i transgenním myším. U těchto aktivních látek bude jednak *in vivo* studována jejich farmakokinetika, farmakodynamika, toxicita a metabolizace a jednak hodnocena jejich využitelnost jako ponteciálních terapeutik v klinické praxi. Pro pochopení vzájemného propojení rané tumorigeneze a senescence budou netransgenním myším injikovány vybrané nádorové linie, hodnocena jejich tumorigeneze a aktivace promotoru genu CDKN2A. Pro analýzu vlivu vybraných aktivních látek na reparaci DNA budou netransgenní i transgenní myši lokálně ozařovány jak pomocí ionizujícího záření, tak pomocí UV záření. Lokálně bude ozařována kůže ve vyholené oblasti na hřbetu zvířete nebo v případě myších xenograftů budou ozařovány nádory.

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)

Zjištění patofyziologického podkladu senescence a případná příprava látek, které ovlivňují primární patogenetické momenty senescence. Senescence je jedna z potenciálních bariér umožňujících zpomalení (případně zastavení) maligní progrese. Současné studie naznačují možnost zpomalit (případně zastavit) tumorigenezi v její rané fázi (tedy fázi preneoplázie a neoplázie).

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

V průběhu řešení projektu (2014-2019) použijeme maximálně 900 netransgenních myší a 900 transgenních myší.

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

Nežádoucí účinky léčiv budou minimalizovány stanovením maximální tolerované dávky jednotlivě i v kombinacích. U plánovaných studií se nepředpokládá, že by vyvolávaly u pokusných zvířat utrpení. Zvířata mohou pociťovat mírnou krátkodobou bolest při vpichu injekční jehly a nebo aplikaci gastrické sondy. Utracená pokusná zvířata budou uskladněna v mrazicím boxu v místnosti.

Eutanazie bude vykonána:

- zlomením vazu,
- dekapitaci, bez využití celkové anestezie za účelem získaní chemicky (anestetikum) nekontaminovaných tělních tekutin, orgánů a nepoškozeného mozkového tkaniva,
- vykrvením v celkové anestezii (plexu axillaris, v. cava caudalis).

Ověření smrti laboratorního zvířete:

- trvale zastavení krevního oběhu (přiložením prstu na hrudní kost není cítit srdeční úder),
- zvíře nemá dýchací pohyby (hrudní koš se neroztahuje),
- zvíře má fixované oční bulvy (oči se nepohybují) a permanentní rozšíření očních pupil (nereagují na světelný podnět),
- vymizení rohovkového reflexu (po jemném dotyku prstem na rohovku uhynuté zvíře nereaguje mrknutím).

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

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

Studium transgenních myších modelů patří mezi základní přístupy pro zjištění patofyziologického podkladu závažných lidských onemocnění a přípravu takových léčiv, jež ovlivňují primární patogenetické momenty onemocnění. Myš a člověk sdílejí významnou homologii biologických mechanismů, a proto modelování myši je prioritou pro studium genetických a epigenetických mechanismů závažných lidských onemocnění.

Jako jednu z možných alternativních metod použijeme *in vitro* studie na myších fibroblastových liniích odvozených z transgenních a netransgenních přirozeně stárnoucích myší. Na fibroblastových liniích (odvozených z netransgenních i transgenních myší) budou v *in vitro* experimentech testovány látky za účelem hodnocení jejich schopnosti indukovat a

urychlit senescenci případně senescenci zpomalit nebo úplně zastavit. U těchto látek bude dále v *in vitro* experimentech analyzován jejich vliv na reparaci DNA, proliferaci buněk a regulaci buněčného cyklu.
Látky vyhodnocené v *in vitro* testech jako aktivní budou následně v *in vivo* experimentech aplikovány netransgenním i transgenním myším, bude studována jednak jejich farmakokinetika, farmakodynamika, toxicita a metabolizace a jednak hodnocena jejich využitelnost jako ponteciálních terapeutik v klinické praxi. Alternativní metody pro ověření aktivních látek, které mají stejnou spolehlivost a vypovídací hodnotu jako *in vivo* experimenty, nám nejsou známy a nenašli jsme je ani v možných zdrojích (OECD, EURL ECVAM, European Pharmacopoeia) uvedených v pokynech pro vyplňování žádosti o schválení projektu pokusů.

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

Pro omezení množství používaných zvířat se budeme při navrhování pokusu opírat o předchozí experimenty s podobnými látkami, zářením a nádorovými liniemi. Způsob, schéma a dávkování studovaných látek bude stanoven na základě plánovaného stanovení toxicity a farmakokinetiky, v případě že se nám v odborné literatuře (viz. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, www. webofknowledge.com) nepodaří dohledat potřebné informace. Budeme používat minimální množství zvířat na skupinu, které je nezbytné pro následnou statistickou analýzu: v případě toxikologických studií a farmakokinetiky obvykle 3 zvířata na skupinu, v případě vytváření nádorového zvířecího modelu 6 zvířat na skupinu. Při vytváření nádorového zvířecího modelu bude suspenze nádorových buněk transplantována na obě strany hrudníku zvířete, čímž se zdvojnásobí množství ovlivňovaných nádorů pro statistickou analýzu.

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

Studium transgenních myších modelů patří mezi základní přístupy pro zjištění patofyziologického podkladu závažných lidských onemocnění a přípravu takových léčiv, jež ovlivňují primární patogenetické momenty onemocnění. Myš a člověk sdílejí významnou homologii biologických mechanismů, a proto modelování myši je prioritou pro studium genetických a epigenetických mechanismů závažných lidských onemocnění.
Aby nedošlo k rejekci lidských nádorových buněk bude studie provedena také na imunodeficientních laboratorních myších kmene max. 8-12 týdnů starých. Většina nádorových modelů (s výjimkou karcinomů prostaty) se provádí na samicích těchto kmenů z důvodu menší agresivity a sebepoškozování. Zvířata budou v kvalitě SPF.
Laboratorní zvířata budou denně monitorována kompetentními odborníky (vedoucí projektu, pověřená osoba, veterinární lékař nebo technik) a nebudou cíleně vystavena utrpení.
V případě znaků morbidity se zintenzívní četnost kontrol zdravotního stavu zvířat a v případě moribundních znaků budou zvířata z pokusu vyřazena a z humanitárních důvodů utracena.
Experiment bude přerušen a zvířata utracena v případě:
- silného poškození kůže a nehojící se léze,
- ztráty tělesné hmotnosti v rozsahu 25 % přetrvávající 7 dní,
- úplné anorexii: doba trvaní anorexie u malých hlodavců delší než 24 hodin,
- částečné anorexii: v případě kdy příjmem krmiva získává zvíře méně než 50 % kalorické hodnoty po dobu 3 dnů,
- slabosti / neschopnosti zvířat získávat krmivo nebo vodu trvající dobu delší než 24 hodin,
- při velikosti nádoru >20% hmotnosti zvířete.
- kožních nehojících se ran, opakované automutilace,
- bolestivých stavů nereagujících na analgetika.

Po celotělovém ozáření pomocí RTG budou zvířata humánně usmrcena max. do 4 hodin po ozařování, delší než 4 hodinové sledování zvířat po celotělovém RTG ozáření neplánujeme.

Péče o zvířata po celotělovém ozáření:

A. Zvířata po expozici RTG zářením se umístí do sterilních chovných IVC nádob a je jim podávané sterilní krmivo a sterilní napájecí voda a to minimálně 14 dní po expozici.
B. Personál bude poskytovat zvláštní péči: v prvních 14 dnech se kontroluje a dokumentuje zdravotní stav zvířat denně a nebo minimálně 3x týdně. V tomto období (zejména v prvním týdnu) se péče o zvířata zaměřuje na welfare, udržování čistého prostředí a hydrataci a je vhodné podávat vlhčené krmivo.
C. Použití antibiotik v pitné vodě: antibiotikum SulfaTrimetoprim se přidává do napájecí vody několik dní před plánovaným ozařováním (aby si zvířata zvykla na chuť) a po dobu nejméně 14 dní a maximálně 28 dní po ozařování.
D. Napájecí voda musí být neustále k dispozici.
E. Sledování hmotnosti: v období prvních 7-14 dní po ozařování může dojít ke ztrátě tělesné hmotnosti až 25%, kterou by zvířata měla znovu získat 14-21 den po ozařování.
F. Poskytování změkčeného krmiva: podává se do fáze zotavení, vhodné je práškové krmivo smíšené s vodou a umístěné v Petriho misce na podlaze chovné nádoby (vlhčené granule se nedoporučují protože rychle vyschnou).
G. Eutanázie: jestliže 14 den po ozařování nedojde ke zlepšení zdravotního stavu zvyšuje se četnost kontrol zdravotního stavu. Pokud zhoršený zdravotní stav přetrvá do 21 dne po ozařování a nedojde ke zlepšení, je nařízená eutanázie, jestliže projekt pokusu neurčuje jinak.
H. Spotřeba vody: 15 ml/ 100 g/ 24 hodin = 150 ml/ 1 kg/ 24 hodin.
I. Příprava zásobního roztoku orální suspenze Sulfatrimetophrimu: 200 mg sulfamethoxazol + 40 mg trimethoprim /5 ml = 240 mg sulfatrimotophrim / 5 ml.
Zásobní roztok: 3,5 ml **zásobního** roztoku → 250 ml voda = 168 mg **Sul**fatrim/250 ml →**0,672 mg/ml**

Výpočet dávky pro myš: 1 ml zásobního roztoku (0.672 mg Sulfatrim) x 150 ml / kg H_2O = 150 ml roztoku (100 mg Sulfatrim) / kg / 24 hodin.

Všechny úkony, léčba a eutanázie (dle OECD) jsou vykonávané licencovaným veterinárním lékařem a osobami odborně způsobilými pro práci s laboratorními zvířaty mající příslušné osvědčení, dle zákona č. 359/2012.
Experimenty budou probíhat v souladu s dodržováním pravidla 3R. S laboratorními zvířaty se nakládá dle pravidel uvedených v zákonu č. 359/2012 a vyhlášce č. 419/2012, kde je jasně vymezen způsob o nakládání s laboratorními zvířaty.
V případech, kdy zvíře může být vystaveno stresu nebo zákroku vyvolávajícímu bolest, bude před a během zákroku použita sedace. V případech, kdy bude předpoklad bolesti v období po zákroku, bude zvířeti podávané analgetikum. Dané úkony budou pod kontrolou licencovaného veterinárního lékaře, vedoucího pokusu nebo jiné oprávněné osoby.

- Zoohygienické podmínky: teplota prostředí 20-24°C, relativní vlhkost prostředí 40-70%, světelný režim: 12 hodin světlo a 12 hodin tma.
- Podmínky jsou monitorovány 24 hodin denně a zaznamenávaný ã 1 hodina monitorovací ústřednou MS5. Výměna vzduchu 10-12x/ hodinu.
- Krmení: kompletní krmní směs pro potkany a myši – ad libitum.
- Napájení: kohoutková voda – ad libitum.
- Čištění chovných nádob: dle potřeby, nejméně 1x týdně.
- Čištění a výměna pítka (celá láhev): 1x týdně.
- Kontrola zdravotního stavu: denně.
- Kontrola spotřeby krmiva, doplnění vody a krmiva: denně.

Všichni pracovníci jsou odborně způsobilí pro práci s laboratorními zvířaty a mají příslušné osvědčení, dle zákona č. 359/2012.
Uživatelské zařízení je vyhovující pro příslušný druh a množství pokusných zvířat. Pravidelně jsou vykonávané kontroly Krajskou veterinární správou.