

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 48/2018

Název projektu pokusů

Molekulární mechanizmy ovládnání normální a leukemické krvetvorby

Doba trvání projektu pokusů 5 let

Klíčová slova - *maximálně 5* Hematopoetická kmenová buňka, leukemická kmenová buňka, buňky imunitního systému, diferenciace buněk

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)

Cílem tohoto projektu je určení funkce důležitých faktorů v hematopoetickém systému a také určení ich možné role v procesu leukemické transformace.

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)

Výsledky získané v rámci tohoto projektu přispějí k poznatkům o klíčových regulačních molekulách a poskytnou základní znalosti pro vývoj nových terapií při léčbě leukemie.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Pro pokusy jsou použity:

- 1) Mutantní myši kmen CMO (Cg-Pstpip2cmo/J) s bodovou mutací v genu Pstpip2 (c.293T→C), jeho varianta vzniklá zpětným křížením na genetické pozadí C57BL/6: 100
- 2) Kontrolní kmen C57BL/6: 50
- 3) Knock-out myši (KO) s inaktivovaným genem TCF7L2: 25
- 4) Knock-out myši (KO) s inaktivovaným genem Evi2b: 20
- 5) Knock-out myši (KO) s inaktivovaným genem C/EBPγ: 150
- 6) Transgenní myši se zvýšenou expresí dominantně negativního (dn) TCF7L2 genu: 100
- 7) Myši kmen sloužící jako příjemce při transplantacích kostní dřeně NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ: 125
- 8) Kontrolní kmen B6.SJL-*Ptprc^aPepc^b*/BoyJ: 425
- 9) CRE deleter transgenní myši VAVCRE a MX1CRE: 25

Pro dobu trvání projektu (5 let) předpokládáme roční spotřebu asi 1000 myší, což představuje za celé období asi 5000 zvířat.

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

Tento projekt pokusů zahrnuje experimenty, které by mohly způsobit zvířatům utrpení, bolest nebo nadměrný stres maximálně v mírné nebo střední míře. U zvířat se očekávají minimální nežádoucí účinky. Zvířata používaná pro transplantace kostní dřeně, dlouhodobé infekce kvasinkou *C. albicans* nebo myši po aplikaci lipopolysacharidu budou pravidelně monitorována tak, aby byla minimalizována bolest a utrpení a taktéž bude kontrolováno, jestli mají snadný přístup k potravě a vodě. V případě patrných známek nemoci budou zvířata utracena. Pro pokusy se nebudou využívat prostředky snižující bolest. Po skončení pokusu budou zvířata usmrcena odpovídající metodou (cervikální dislokace). Likvidace zvířat bude provedena asanační službou, se kterou má pracoviště smlouvu.

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

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

Pokud existuje alternativní metoda nezahrnující použití zvířat, bude použit tento přístup. Při plánování tohoto projektu pokusů byly pro vyhledávání možných alternativ využity následující zdroje: vědecké publikace, databáze 3R (<http://www.nc3rs.org.uk/category.asp?catID=3>), a ALTWEB (<http://altweb.jhsph.edu/resources/searchalt/index.html>). Pro případ, že by se objevily nové alternativní metody, bude vyhledávání pokračovat také v průběhu projektu pokusu. Pro omezení experimentů na myších budou využity alternativní metody jako buněčné kultury, tkáňové kultury a in vitro modely. Analýza obnovy hematopoietických kmenových buněk, iniciace jejich diferenciace do určité buněčné linie a také analýza samotné diferenciace buněk bude prováděna v co největší míře bez využití pokusných zvířat.

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

Počet zvířat použitých pro jednotlivé experimenty bude omezen na minimum. Experimenty budou pečlivě plánovány a bude použit minimální počet myší potřebný pro dosažení biologické a statistické significance. Odhadujeme, že ročně použijeme asi 1000 myší. Tento počet nám umožní udržování jednotlivých myších linií v chovu, provedení všech in vivo testů a taktéž z těchto myší budeme moct získat tkáň pro další analýzy in vitro (takhle redukuje celkový počet použitých myší na minimum).

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

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

Utrpení, bolest a stres myši budou vždy omezeny na minimum. Myši budou chovány v optimálních podmínkách, které jsou stanoveny současnými lokálními a EU regulacemi. Zvířata jsou denně monitorována (jak ošetřovateli tak i výzkumníky), jestli se u nich nevyskytují známky utrpení nebo nemoci. V případě, že zvířata jeví známky nemoci nebo ztrácejí tělesnou hmotnost, budou usmrceny odpovídající metodou (tedy cervikální dislokace podle Nařízení z roku 2010/63/EU Evropského parlamentu a Rady pro ochranu zvířat použitých pro vědecké účely) a následně budou analyzována. Odběr krve bude prováděn jenom zkušenými výzkumními pracovníky. Transplantace bude provádět opět jenom osoba zkušená a trénovaná, čímž se míra utrpení a bolesti omezí na minimum. Podávání léčiv myším bude prováděno jenom zkušenými pracovníky injekcím látky do peritonea nebo intravenózně.