

Vyplňujte jen bílé kolonky!

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

NETECHNICKÉ SHRNUTÍ PROJEKTU POKUSŮ	
Název projektu pokusů	Nové postupy pro záchranu ohrožených populací hospodářských zvířat (QK1910156)
Doba trvání projektu pokusů	1.1.2019 – 31.12.2023
Klíčová slova - maximálně 5	oocyty, spermie, embrya, genetické zdroje
Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka	
<input type="checkbox"/>	základní výzkum
<input type="checkbox"/>	translační nebo aplikovaný výzkum
<input type="checkbox"/>	vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
<input type="checkbox"/>	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
<input checked="" type="checkbox"/>	zachování druhů
<input type="checkbox"/>	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
<input type="checkbox"/>	trestní řízení a jiné soudní řízení
Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)	DNA hlavičky spermie je vysoce kondenzovaná, což znemožňuje její detailní hodnocení a posouzení normality. K dekonzaci hlavičky spermie dojde přirozeně po oplození v oocytu, kdy se utvoří samčí prvojádro. DNA prvojádra je natolik dekonzovaná, že lze hodnotit její různé parametry ve značných detailech – stupeň methylace DNA, poškození atd. Zejména stupeň poškození DNA je kritický pro následný vývoj embrya. Na poškození DNA hlavičky spermie mohou mít vliv různé faktory, které jsou však minimálně prozkoumány. Jsou to např. vlivy toxických látek, u zvířat pak sezónnost, metoda odběru spermií, metoda kryokonzervace, atd. Obecně platí, že běžné hodnocení spermií (morfologie, pohyblivost) nemusí odrážet kvalitu DNA a naopak. Možnost hodnocení poškození DNA spermií spolehlivým a jednoduchým postupem by byla velkým přínosem pro ŽV, záchranu ohrožených druhů (genetické zdroje) a humánní medicínu (onkologie).
Cílem projektu je vyvinout postup, který by v krátkém časovém intervalu (48 – 72hod.) přinesl dostatečné údaje o kvalitativních parametrech DNA spermie. Spermie zvolených druhů budou injikovány do ovulovaných oocytů myši a po jejich dekonzaci bude hodnocen stupeň poškození DNA a další parametry (γH2AX, 5-MeC, H3K9, atd.). Při prvním mitotickém dělení bude hodnocen rovněž karyotyp spermie a po dělení do dvoubuněčného stádia i přítomnost mikrojader, které indikují rovněž normalitu DNA.	
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)	Přínos řešení je evidentní především pro oblast Genetické živočišné zdroje, kde bude navrženými postupy možné detekovat stupeň poškození DNA spermie; tím pak její následné využití pro záchranu zvoleného druhu. Toto poškození může odrážet vliv sezóny, metodu odběru spermií, postup kryokonzervace, apod. Logicky lze využít předpokládat v ŽV, a to zejména tam, kde jsou dosud nevyřešeny postupy kryokonzervace samčích pohlavních buněk. Navržený postup by měl výrazně zkrátit časové období, které by mělo ukázat vhodnost využití konzervovaného spermatu pro další použití.
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá	Myš BDF1 a CD1. Přibližně 600 ks na rok (samice – BDF1 300ks, CD1 300 ks). Pro celou dobu řešení tedy 3 000 ks.
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?	Ze zvířat budou použity pouze pohlavní buňky (ovulované oocyty) a z nich produkována mezidruhová embrya in vitro. Zvířatům nebudou aplikovány žádné škodlivé látky. Míra závažnosti: mírná
Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)	Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat. Gamety, spermie a embrya jsou svým způsobem specifické buňky. Nelze je tak nahradit buňkami somatickými, kde se fyziologické pochody zásadně liší. Oocyt představuje v současné době jediné prostředí, které je schopno dediferencovat kompletně spermii. Použití oocytů z jatečného materiálu (skot, prase) neumožňuje precizní hodnocení – oocyty by musely zrát in vitro, jejich populace není homogenní. Intracytoplasmatická injekce spermií nefunguje u těchto druhů. Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat. Počet zvířat bude omezen na minimum, které bude dáno požadavky pokusu. Zajištění tohoto minima lze zajistit jen precizní prací pracovníků projektu. 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.
K pokusu budou zvoleny myši výše uvedených kmenů (BDF1 a CD1). Tyto kmény běžně používáme a máme s nimi největší zkušenosti (kultivace oocytů, oplození in vitro, přenosy jader, atd.). Pro jiné kmény bychom museli znovu dané postupy vyvíjet, tím by se navýšil počet zvířat. Využití buněk hospodářských zvířat (oocytů) má svá omezení v dostupnosti a kvantu získaného materiálu – navíc by zde nebyla možnost komplexnosti řešení. V pokusu chceme ověřit zcela nová schémata, kde následně předpokládáme využití při záchraně ohrožených druhů (genetické zdroje) a ŽV.	

Zvířatům nebude působena újma nad běžný rámec – stimulace superovulace a ovulace. Pracovníci projektu absolvovali příslušná školení a mají odpovídající osvědčení. Navíc mají i speciální osvědčení o absolvování kurzů práce na myších z Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA.

6

10