

NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569	
Název projektu pokusů	
Upřesnění automatizovaného odhadu objemu individuálních ostrůvků	
Doba trvání projektu pokusů - v měsících	12
Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾	Pankreas; Langerhansovy ostrůvky; Transplantace; Kvantifikace ostrůvků; Automatická analýza obrazu; Stereologie; Kontrola kvality;
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	
Cílem projektu je vyvinout automatizovaný algoritmus pro odhad objemu individuálních izolovaných Langerhansových ostrůvků (LO) z jejich jedné projekce. K optimalizaci a validaci algoritmu je potřeba nasnímat a rekonstruovat alespoň 1000-2000 samostatných ostrůvků tak, aby byly poměrně rovnoměrně zastoupeny všechny velikosti včetně těch největších. Z jednoho potkana lze nasnímat 50-100 ostrůvků. Velké ostrůvky jsou vzácné. Abychom ušetřili zvířata, bude část potkanů krmena vysokoenergetickou dietou s cílem dosáhnout inzulinové resistance a kompenzatorního zvětšení ostrůvků. Prostorové obrazy ostrůvků budou snímány pomocí Light sheet mikroskopie, rekonstruovány in silico a touto cestou budou změřeny jejich přesné objemy. Budou vytvořeny projekce odpovídající poloze ostrůvků v misce. Na těchto projekcích bude stávající algoritmus optimalizován a následně validován. Algoritmus takto optimalizovaný a následně ověřený na potkaních ostrůvcích bude mít dvojí využití: a) pro experimentální transplantaci k reprodukovatelné kvantifikaci štěpu ostrůvků u zvířecích modelů; b) bude otestována jeho aplikovatelnost na ostrůvky lidské, které jsou podobné, avšak méně dostupné.	
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)	
V současné době představuje transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků jednu z možností léčby diabetu 1. typu, zejména syndromu nerozpoznané hypoglykemie. Přesná a objektivní kvantifikace ostrůvků před transplantací umožní standardizaci transplantace a správné dávkování štěpu a tímlepší klinický výsledek.	
Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání	
Krmení vysokotukovou dietou po dobu 3 měsíců. Intravenózní glukózový toleranční test - i.v. aplikace glukózy v maximální objemu 1 ml kanylou do ocasní žíly v krátkodobé inhalační anestezii (isofluran) a následné měření glykémie v 10., 20, 30., 40., 50. a 60. minutě., měření glykémie z kapky krve z ocasní žíly 1x týdně, vážení 1x měsíčně. Izolace LO: Izolace se provádí v celkové anestézii (Dexdomitor 0,25 – 0,5 mg/kg a Narketan 50 mg/kg i.m.). Střední laparotomií je otevřena břišní dutina. Duodenum je zafixováno pomocí cévní svorky nad ústím ductus choledochus a krátkým stříhem je na protilehlé straně otevřeno. Přes tento otvor je zavedena do vývodu ductus choledochus kanyla. Následně je zvíře vykrveno přestřihnutím dolní duté žíly a cévní svorkou je	

uzavřeno jaterní ústí choledochu. Přes kanylu je pankreas naplněn roztokem kolagenázy (1 mg/ml). Naplněný pankreas je opatrně odpreparován nůžkami od okolních tkání z těla dárce.

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

Neočekáváme nežádoucí účinky krátkodobé vysokoenergetické diety. Míra závažnosti diabetických komplikací plynoucí z 3 měsíce působící mírné hyperglykemie je nízká. Pokusná zvířata budou při izolaci usmrcena přerušením cirkulace v celkové anestezii a nenabudou vědomí.

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
Zvolte položku.	40	20	20		
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					

Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena

Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití

Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu

Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - *uveďte*

Všechna zvířata budou na konci pokusu usmrcena z důvodu izolace Langerhansových ostrůvků.

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*

Izolace Langerhansových ostrůvků je možné provádět pouze na tkáni odebrané z čerstvě usmrcených zvířat.

Omezení používání zvířat - *vysvětlete, 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).*

Celkové počty experimentálních zvířat byly zvoleny na nejnižších počtech umožňujících získání dat z ostrůvků, které umožní statistické vyhodnocení přesnosti nově vyvinutého algoritmu.

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 pokusech budou využity operační standardy dle akreditace pracoviště v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů tak, aby byla zajištěna maximální pohoda a dobrý zdravotní stav pokusných zvířat. Izolace Langerhansových ostrůvků bude prováděna v celkové anestezii a zvířata již nenabudou vědomí. Zvířata budou mít volný přístup k potravě a vodě. Glykémie se bude měřit z minimálního množství kapky krve odebrané tenkou jehlou z ocasní žíly.

Použité druhy zvířat - *vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií*

Budou použity inbrední kmeny relevantní pro výzkum transplantace a diabetu a kmeny outbrední pro zvýšení heterogenity tvarů LO. Jedná se o potkany kmenů Lewis a Wistar, samce hmotnosti 250 – 350 g. Odhadovaný počet potkanů je 40 ks ve věku 3-12 měsíců (20x Lewis, 20x Wistar).

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