

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 3-2021-P

upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

Mechanismy regulace hematopoézy a imunitní odpovědi transmembránovým adaptorovým proteinem WBP1L

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

60

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾

Mobilizace kostní dřeně, transplantace kostní dřeně, imunitní odpověď, hematopoetické kmenové a progenitorové buňky, WBP1L

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 tohoto projektu je charakterizace mechanismů, kterými adaptorový protein WBP1L reguluje hematopoézu a efektivitu mobilizace a transplantace hematopoetických kmenových a progenitorových buněk, celularitu thymu a aktivitu CXCR4. Dalším cílem pak je stanovit jeho roli v regulaci imunitní odpovědi.

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)

Výsledky tohoto projektu nám pomohou lépe porozumět regulačním procesům ovlivňujícím účinnost klinicky zásadně důležitých postupů mobilizace a transplantace hematopoetických kmenových a progenitorových buněk. Zlepší také naše znalosti o regulaci hematopoézy a o regulaci imunitní reakce na infekci.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání

Injekční aplikace: Tamoxifen, intraperitoneálně, 5 dávek po dobu 5 dnů; G-CSF, intraperitoneálně, 4 dávky po dobu 4 dnů nebo 6 dávek po dobu 3 dnů; AMD3100, subkutánně, 1 dávka; transplantace kostní dřeně nebo hematopoetických kmenových a progenitorových buněk, intravenosně, 1 dávka; BrdU, intraperitoneálně, 1-2 dávky v rozmezí 24 hod; Listeria monocytogenes, intravenosně nebo intraperitoneálně, 1 dávka; imunizace modelovými antigeny, 2-3 dávky v rozmezí 6 týdnů
Odběry krve: z tváře nebo z ocasní žíly 1 odběr nebo odběry ve 2-4 týdenních intervalech po dobu maximálně 24 týdnů

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

Injekční aplikace látek jsou provázeny mírnou bolestí a stresem v okamžiku vpichu a krátce po něm většinou v řádu minut až hodin. V případě imunizace modelovými antigeny může být místo vpichu mírně bolestivé po dobu několika dnů až týdnů, podobně jako při očkování u lidí. Infekce subletální dávkou L. monocytogenes může vést k příznakům systémového infekčního onemocnění, jako je, slabost, apatie, ztráta hmotnosti. Experiment bude ukončen po 2 - 10 dnech. Transplantace kostní dřeně představuje celkovou zátěž a stres a zvyšuje riziko infekce mikroorganismy z prostředí. Tyto faktory se uplatňují hlavně v prvních 2 týdnech od transplantace.

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
Myš laboratorní (Mus musculus)	600			x	
Myš laboratorní (Mus musculus)	1900		x		
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena					
Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití					0
Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu					0
Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu					0
Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - uveďte					
-					
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					
V případě analýz na buněčné a molekulární úrovni mohou být využívány buněčné linie a imortalizované leukocytární progenitory a buňky z nich diferencované in vitro. Ty však nelze použít pro experimenty, kdy je potřeba sledovat vliv ztráty WBP1L na účinnost transplantace a mobilizace kostní dřeně a na vývoj a fyziologické funkce leukocytů a imunitního systému. Takovéto funkce a parametry lze sledovat pouze na úrovni organismu a na primárních buňkách. Imunitní a hematopoetický systém je extrémně složitý a zatím jeho funkce není možné modelovat in vitro. Primární buňky jsou také v mnoha případech nenahraditelné, protože rakovinné a jinak imortalizované linie mají často výrazně pozměněné fyziologické funkce a vypovídací hodnota experimentů na těchto buňkách je jen omezená. Nicméně i tak se budeme snažit o maximální využití buněčných linií v případech kdy jejich nedostatky neohrozí hodnotu našich výsledků a pro pilotní studie.					
Omezení používání zvířat - vysvětlíte, 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).					
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 signifikance. Odhadujeme, že ročně použijeme asi 2500 myší. Tento počet nám umožní udržování jednotlivých myších linií v chovu, provedení všech in vivo testů a taktéž z těchto myší budeme moci získat tkáň pro další analýzy in vitro. Pokud to podmínky experimentu umožní, budeme se snažit využít maximum orgánů a tkání z jednoho experimentálního zvířete najednou a tkáň sdílet mezi experimenty.					
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					
Utrpení, bolest a stres myší budou vždy omezeny na minimum. Myši budou chovány v optimálních podmínkách, které jsou stanoveny současnými lokálními a EU regulacemi. Zvířata jsou pravidelně monitorována (jak ošetřovateli tak i výzkumníky), jestli se u nich nevyskytují známky utrpení nebo nemoci. V případě, že zvířata jeví známky nemoci nebo nadměrného stresu, budou usmrcena odpovídající metodou (tedy cervikální dislokace podle Nařízení z roku 2010/63/EU Evropského parlamentu a Rady pro ochranu zvířat použitých pro vědecké účely). Odběr krve bude prováděn jenom zkušenými výzkumnými pracovníky. Při transplantacích studiích budou myši transplantovány nejšetrnější dostupnou metodou injekce do ocasní žíly. Transplantace bude provádět opět jenom osoba zkušená a trénovaná, čímž se míra utrpení a bolesti omezí na minimum. Podávání látek myším bude prováděno jenom zkušenými pracovníky injikováním látky do peritonea, subkutánně, intradermálně nebo do ocasní žíly.					
Použité druhy zvířat - vysvětlíte výběr druhů a souvisejících životních stadií					
Využití myši domácí (Mus Musculus) v tomto projektu pokusu je odůvodněné: - Genetickou příbuzností myši a člověka					

- Podobností hematopoietického a imunitního systému myši a člověka
- Myši jsou nejlepším nepřímým modelem vhodným pro studium krvetvorby a imunitní odpovědi
- Neúspěšnými snahami o nalezení alternativních metod bez využití pokusých zvířat
- Výsledky studie mohou být přínosné pro vědeckou komunitu ve smyslu dalšího bádání
- Projekt pomůže přímo nebo nepřímo zlepšit zdravotní stav lidské populace

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