

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ 103/2020

upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

Tvorba, rozmnořování, charakterizace a genová terapie geneticky modifikovaných miniprasat pro Stargardtovo onemocnění

Doba trvání projektu pokusů - v měsících 60 měsíců, od schválení do 31. 12. 2025

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾ geneticky modifikované miniprase, Stargardtova nemoc, genová terapie

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

Vytvoření miniprasečího modelu pro Stargardtovo onemocnění s bodovou mutací v prasečím ABCA4 genu; Rozmnořování a fenotypová charakterizace tohoto modelu;

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)

Přínosem projektu bude vytvoření in vivo modelového systému miniprasete, který odpovídá mutaci u lidí a která vede k poškození fotoreceptoru v oblasti sítnice. To umožní pochopení molekulárních mechanismů, které jsou základem dysfunkce fotoreceptorů u juvenilní makulopatie asociované s mutací genu ABCA4 a vývoj léčebných strategií.

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

1. Hormonální stimulace prasníček a jejich usmrcení pro získání zygot, v kterých bude in vitro provedena cílená editace genomu (indukce ABCA4 mutace)

2. Hormonální stimulace prasníček pro získání příjemkyň editovaných raných embryí.

3. Laparoskopický embryotransfer do pseudopregnantních prasníček získaných v kroku 2 (bude prováděn embryotransfer zygot nebo vícebuněčných embryí po kultivaci in vitro).

4. Behaviorální studie na ABCA4 modifikovaných prasatech a odpovídající kontrolách. Morfologické testy sítnice pomocí fundus kamery, optical coherence tomography (OCT) a ERG. Testování bude probíhat v pravidelných intervalech přibližně každý měsíc v celkové anestezii.

5. Opakované biopsie kůže, odběry periferní krve, cerebrospinální tekutiny (CSF) a jiných tělesných tekutin (ejakulát) budou realizovány z důvodu monitorování zdravotního stavu, vývoje onemocnění a ověření genové modifikace. Odběry budou prováděny v intervalu 3 měsíců.

6. Některá zvířata budou z důvodu potřeby charakterizace utracena v hluboké celkové anestezii pomocí celotělové perfuze ledovým PBS. Oči, míšní tkáň, mozek a další tkáň nebo orgány budou zpracovány pro biochemické a histologické vyšetření.

7. Vybraná zvířata budou vyčleněna do chovného stáda a budou využívána pro reprodukci.

8. In-vivo terapie kontrolních a modifikovaných miniprasat – oprava ABCA4 genu pomocí genové editace, či vnesení funkčního ABCA4 genu a testování efektivního přenosu všech složek opravného mechanismu.

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

U geneticky modifikovaných prasat se předpokládá zhoršené vidění, až úplná ztráta zraku. Klasifikace závažnosti je závažná z důvodu předpokládané trvalé ztráty zraku.

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
Prase domácí (Sus scrofa domesticus)	500				500
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					

Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena

Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití	50
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

Jedná se o odchované jedince, kteří nebudou nést požadovanou mutaci. Většina tak bude nevhodná pro další studium Stargardtovy nemoci v rámci tohoto PP, mohou být ale následně zařazeni do jiného PP, kumulativní dopad na zvíře bude zanedbatelný.

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

Pro důležité preklinické testy léčby Stargardtovy choroby je tento zvířecí model nepostradatelný. Neexistuje alternativní způsob bez vytvoření preklinického zvířecího modelu Stargardtovy nemoci, jak otestovat efektivnost a bezpečnost budoucí terapie, která by v budoucnu měla být klinicky testována a případně využita.

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).

Počet modifikovaných prasat a experimenty na nich budou vykonávány v minimální možné míře pro uspokojení statistických potřeb charakterizace modelu. Vytvoření ABCA4 bodové mutace, která odpovídá mutaci u lidí umožní testovat potenciální terapii na co nejvíce relevantním modelu a tím pádem snížit počet použitých modelových zvířat.

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

Miniprasata všech generací budou držena na hluboké podestýlce. Chirurgické zákroky a testování budou prováděny v celkové anestezii. Zvířata budou po chirurgických zákrocích dostávat léky s protizánětlivým a analgetickým účinkem. Odběry biologického materiálu budou vykonávány v anestezii nebo *post mortem*.

Použité druhy zvířat - vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií

Miniaturní prase je charakterem tkání a anatomií oka blízké člověku.

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