

NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

PSTPIP2 a autoinflatorní osteomyelitida u myších modelů a lidských pacientů

Doba trvání projektu pokusů v měsících	60	
Klíčová slova	Chronická rekurentní multifokální osteomyelitida	
PSTPIP2	0	
0	0	

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Imunitní systém [PB7]

Translační a aplikovaný výzkum: Poruchy imunity u lidí [PT28]

0

0

Cíle projektu pokusů

Chronická rekurentní multifokální osteomyelitida (CRMO) je chronické onemocnění dětského věku s výraznou genetickou složkou, pro které jsou charakteristické autoinflatorní léze v kostech a další zánětlivé poruchy. Molekulární podstata onemocnění není známa. Nejdůležitějším modelem tohoto onemocnění je myší kmen Pstpip2cmo, který v důsledku ztráty proteinu PSTPIP2 trpí podobnými chronickými záněty kostí zejména zadních končetin a ocasu. Jednou z nejdůležitějších dosud nevyřešených otázek v oblasti výzkumu PSTPIP2 a CRMO v současné době je, do jaké míry jsou myší modely s mutacemi v genu pro PSTPIP2 relevantní pro lidskou CRMO a zda množství informací o mechanismech autoinflatce získaných s využitím tohoto modelu, může být užitečné pro porozumění této nemoci u lidí a pro její léčbu. Molekulární mechanismy a signální dráhy vedoucí ke spuštění zánětlivé dráhy neutrofilních granulocytů u CRMO pacientů a u myší s různými mutacemi v PSTPIP2. Budeme sledovat vliv různých mutací na charakteristické rysy nemoci a porovnávat s poruchami u pacientů. Dále chceme stanovit důsledky ztráty PSTPIP2 v lidských buňkách a testovat schopnost lidských PSTPIP2 deficientních buněk způsobit autoinflatorní onemocnění v humanizovaném

Potenciální přínosy projektu pokusů

V krátkodobém časovém horizontu projekt povede k získání nových poznatků o molekulární podstatě autoinflatorní osteomyelitidy u myších modelů s mutacemi v PSTPIP2 a o regulaci zánětlivé odpovědi obecně. V závislosti na získaných poznatcích mohou mít výsledky projektu okamžitý vliv i na strategii léčby pacientů, kteří neodpovídají na standardní léčbu. V delším časovém intervalu pak očekáváme, že výsledky tohoto projektu umožní uplatnění dat získaných studiem myších modelů s mutacemi v PSTPIP2 při léčbě lidské CRMO. Z dat získaných na myších modelech vyplývá řada nových potenciálních léčebných postupů a očekáváme, že další vyplynou i z této studie. Bez zhodnocení podobnosti mechanismů lidského a myšího onemocnění není možné zvažovat využití těchto dat v návrzích nových terapií. Ve výsledku tedy očekáváme, že získané výsledky zlepší možnosti stratifikace pacientů pro různé typy léčby a povedou k návrhům nových léčebných strategií na základě myších modelových studií.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

1. Chov transgenních nebo mutantních myších kmenů nezbytný pro vytvoření nebo udržení geneticky modifikované nebo mutantní linie (do 13 měsíců věku zvířat) 2. Chov těchto kmenů, který bude ukončen usmrcením experimentálních zvířat za účelem odběru orgánů a buněk pro další analýzu molekulárních mechanismů patologického zánětu (od 4 do 40 týdnů věku zvířat). 3. Transplantace kostní dřeně nebo leukocytárních progenitorů, případně adoptivní transfer charakterizovaných buněčných populací. Transplantována budou zvířata 8 -13 týdnů stará, experiment bude ukončen do 24 týdnů po transplantaci. 4. Injekční aplikace látek do peritoneální dutiny (5-fluorouracil, LPS, thioglykolát), experiment bude ukončen 1 hod - 5 dnů po injekci. 5. Odběr krve z tváře nebo ocasní žíly 1x-4x v různých obdobích života nebo v rámci dalších zde popsaných experimentů. 6. Mikropočítačová tomografie v anestezii (1 hod, jednorázově nebo 2x měsíčně) 7. Podávání léčiv (Dasatinib, Fostamatinib) žaludeční sondou, 1-2x denně 4-6 týdnů.

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata, a doba trvání těchto účinků

Kmeny s různými mutacemi v genu Pstpip2 trpí záněty kostí a okolních měkkých tkání tlapek a ocasu, které se u nich rozvinou ve druhém měsíci života, případně i později v závislosti na typu mutace. Nicméně fenotyp není natolik závažný, aby ovlivňoval délku života těchto myší nebo jejich rozmnožování, zvířata neztrácí hmotnost a nepozorujeme výrazné změny chování. Může dojít k omezení hybnosti postižených končetin. Předpokládáme, že dochází i k mírné bolesti i když její účinky na chování zvířat nepozorujeme. Mírná krátkodobá bolest doprovází i injekční aplikace látek. Transplantace kostní dřeně nebo hematopoetických kmenových a progenitorových buněk je stresovou zátěží pro organismus a zvyšuje riziko infekce. To je zvýšené též u imunodeficientních myších kmenů používaných v tomto projektu. Při vysoké čistotě našich chovů, však zvýšenou nemocnost typicky nepozorujeme. Po transplantaci jsou též zvířatům podávána profylaktická antibiotika.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
myš laboratorní (Mus musculus) [A1]	0	7500	2500	0

0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi				
Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat			
	Opětovné použití	Navrácení do chovu, do přírodního stanoviště	Do zájmového chovu	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
0	0	0	0	
Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty				
Experimenty budou ukončeny usmrcením experimentálních zvířat, aby se zabránilo jejich dalšímu utrpení.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Chronická multifokální osteomyelitida je komplexní onemocnění, které nelze nijak simulovat in vitro. Studovat vliv mutací a léčiv na průběh tohoto onemocnění je možné pouze na zvířecím modelu. Nemoc je způsobena hlavně neutrofilními granulocyty, což jsou terminálně diferencované krátce žijící buňky, pro které neexistuje vhodná náhrada ve formě buněčné linie. Nicméně i tak se budeme maximálně snažit o využití alternativních metod, jako jsou buněčné kultury, tkáňové kultury a in vitro modely. Bohužel, naše dosavadní zkušenosti ukazují, že jejich využití je při studiu neutrofilních granulocytů možné jen v omezené míře. Naše laboratoř věnovala hodně času a prostředků k zavedení imortalizace progenitorů neutrofilních granulocytů, které by bylo možné použít k diferenciaci neutrofilních granulocytů s různými mutacemi v Pstpip2 in vitro, ale bohužel zatím neúspěšně, protože takto diferencované granulocyty mají pozměněnou celou řadu funkcí důležitých pro tento projekt. Pokud tedy mají naše výsledky mít vysokou vypovídací hodnotu, potenciál pro využití v klinické praxi a šanci na publikaci v renomovaných časopisech, bude nezbytné i pro experimenty na molekulární a buněčné úrovni využívat primární buňky izolované z myši krve, kostní dřeně a dalších lymfatických orgánů. Zároveň se budeme snažit zlepšit možnosti využití imortalizovaných leukocytárních progenitorů a buněk z nich				
Omezení používání zvířat				
V pokusech bude použito pouze takové množství zvířat, které zajistí statistickou průkaznost získaných dat. V chovech (asi 20 myších kmenů a jejich kříženci) budeme udržovat jen takové množství chovných párů, které zajistí dotatečnou produkci zvířat pro udržení těchto linií, pro experimenty a pro odběr primárních buněk, tkání a orgánů. Při sestavování pokusných skupin budeme vycházet z našich dlouholetých zkušeností s minimalizací počtů zvířat pro jednotlivé typy experimentů a ze statistických analýz předběžných dat. Pokud by se provádění některých plánovaných experimentů ukázalo jako zbytečné (např. z důvodu publikace stejných dat jiným vědeckým týmem) experimenty prováděny nebudou. Na experimentálních zvířatech bude prováděno maximální množství analýz zároveň, tak jak to umožní podmínky experimentu a naše pracovní kapacity. Tkáně a orgány z usmrcených zvířat budou využívány v maximální míře umožněné podmínkami experimentu. V chovech se budeme snažit o udržování stavů zvířat na nejnižší možné úrovni, která ještě dokáže zajistit dostatečný přísun zvířat vhodného věku a genotypů pro sestavení pokusných skupin a pro odběr tkání a orgánů tak, aby nedošlo k ohrožení úspěšnosti projektu. Chovné páry některých kmenů budou udržovány v heterozygotním stavu. To sice významně zvýší spotřebu experimentálních zvířat, zároveň to ale povede ke snížení				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Utrpení, bolest a stres myši budou vždy omezeny na minimum. Myši budou chovány v optimálních podmínkách, které jsou stanoveny současnými regulacemi EU a místními zákony a vyhláškami. Myši budou pravidelně kontrolovány a ošetřovány proškolenými ošetřovateli. V případě zjevného utrpení, stresu nebo projevu nemoci dosahující horní hranice deklarované závažnosti pokusu budou pokusná zvířata okamžitě usmrcena odpovídající metodou (tedy cervikální dislokace podle Nařízení z roku 2010/63/EU Evropského parlamentu a Rady pro ochranu zvířat použitých pro vědecké účely). Experimenty budou prováděny jenom zkušenými výzkumnými pracovníky nebo pod jejich přímým dohledem.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Využití myši domácí (Mus Musculus) v tomto projektu pokusu je odůvodněné:

- Genetickou příbuzností myši a člověka
- Podobností hematopoetického systému myši a člověka
- Myši jsou nejlepším nepřímým modelem vhodným pro studium poruch imunitní odpovědi
- Neúspěšnými snahami o nalezení alternativních metod bez využití pokusných zvířat
- Výsledky studie mohou být přínosné pro vědeckou komunitu ve smyslu dalšího bádání
- Projekt pomůže přímo nebo nepřímo zlepšit zdravotní stav lidské populace
- Významností výzkumu pro lidstvo ve srovnání s hodnotou zvířat vybraných pro výzkum