

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Získávání oocytů a embryí laboratorních myší pro studium mechanismů buněčného dělení.

Doba trvání projektu pokusů v měsících	43
Klíčová slova	embryo
oocyt	buněčné dělení
aneuploidie	0

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Další základní výzkum [PB13]

0
0
0

Cíle projektu pokusů

Poruchy spojené s nesprávným dělením chromozomů u embryí jsou u savců velmi časté a u člověka např. představují vážná zdravotní rizika typu vývojových poruch, jako Downův syndrom. Představují také nejčastější důvod ukončení časného vývoje u člověka a vyšších savců. Molekulární mechanismy buněčného dělení byly detailně studovány na nižších organismech, včetně kvasinek, *Drosophila* a *C. elegans*. Cílem naší studie je ověření poznatků získaných dříve studiem nižších modelových organismů na modelu savcím. U regulačních mechanismů dělení chromozomů unikátních pro savčí buňky, jako například specificky fungující regulační bod sestavení dělicího vřeténka, je dále naším cílem zjistit zákonitosti jejich fungování. V současné době se ukazuje jako závažný problém zvýšená frekvence aneuploidií, jejichž vznik je úzce spjat s poruchami buněčného dělení, v samičích zárodečných buňkách v závislosti na zvyšujícím se věku matky. Pro pochopení mechanismů vedoucích k tomuto jevu je nutné podrobné studium jednotlivých stádií zárodečných buněk a embryí na savčím modelovém organismu.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Předběžné studie zabývající se příčinou nesprávného dělení chromozomů byly provedeny na nižších organismech (kvasinky, *Drosophila*, *C. elegans*, *Danio*, *Xenopus* atd.). Vzhledem k daleko větší složitosti savčího organismu bylo prokázáno, že ne všechny poznatky získané studiem těchto organismů mohou být uplatnitelné na člověka. Naše studie tedy mají za úkol ověřit, zda a do jaké míry regulační mechanismy objevené u těchto druhů platí také pro vývoj savčích vajíček a embryí. Vzhledem k tomu že se věnujeme problematice specifické pro vajíčka a časná embrya, které mají zcela unikátní vlastnosti, nelze bohužel ve většině našich experimentů použít jako náhradu in vitro kultivované savčí buňky, tyto mají vlastnosti zcela odlišné, což by vedlo ke zkresleným výsledkům a nesprávnosti studie. Zisk oocytů a časných embryí z myší je pro plnění naší studie nezbytný, a to z důvodů odlišností regulačních procesů segregace chromozomů v in vitro a in vivo získaných buňkách. Naše studie je cílena zejména na poruchy dělení chromozomů v zárodečných buňkách a embryích, jež se vyskytují ve vysoké míře a jejich příčina není zcela známa. Dlouhodobým přínosem naší studie bude bližší objasnění vysokého výskytu poruch v dělení chromozomů a tím pádem vzniku aneuploidií u savců, což může pomoci zlepšit aplikaci in vitro fertilizačních technik u lidí, ale i u zvířat a dále také přispět k

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Zvířata budou použita k následujícím účelům:

- A. Izolace GV oocytů po stimulaci gonadotropním hormonem PMSG – pregnant mare serum gonadotropin (dále jen PMSG).
- B. Izolace MII oocytů po stimulaci PMSG v kombinaci s luteinizačním hormonem hCG – human chorionic gonadotropin (dále jen hCG).
- C. Izolace různých vývojových stádií preimplantačních embryí (do stádia blastocysty) po stimulaci PMSG, hCG a připuštění k samci.

V obou případech stimulace, jak PMSG, tak i hCG, se použije vodný roztok hormonálního přípravku v objemu maximálně 0.1 ml, aplikovaný intraperitoneálně. Samicím bude aplikováno buď samotné PMSG, nebo PMSG a následně po 44-56 hodinách hCG. Pro zisk embryí bude po hormonální stimulaci následovat připuštění samice k samci přes noc za účelem fertilizace, zvířata budou ráno oddělena po kontrole vaginálních zátek. Každé zvíře bude takto využito pouze jednou, poté dojde k jeho utracení zlomením vazů a následně k postmortálnímu vyjmutí vaječníků, vejcovodů či dělohy. V průběhu pokusů budou zohledňována hlediska humánního

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

Na zvířatech nebudou prováděny žádné experimenty intravitálně, s výjimkou intraperitoneální administrace malého množství (100µl) aktivních hormonů ovlivňujících zrání folikulů. Tato stimulace bude prováděna zkušenými a zručnými pracovníky a osobně jsem se nesetkal za 20 let praxe s negativní reakcí na podání hormonů. V průběhu pokusů budou zohledňována hlediska humánního zacházení s pokusnými zvířaty, zejména s ohledem na umožnění jejich adaptace, návyk na uchopení rukou, klidné zacházení, tichý přístup a používání pomůcek, které nezpůsobí zvířeti strach, bolest a utrpení. Zvířata budou pod denní kontrolou technického personálu a v případě např. úrazu způsobeného jiným zvířetem bude takový jedinec bezodkladně utracen.

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 (<i>Mus musculus</i>) [A1]	0	10300	0	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				
Zvířata budou utracena zlomením vazů. U samic budou po utracení odebrány vaječníky, vejcovody a děloha.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Předběžné analýzy byly provedeny na nižších organismech (kvasinky, Drosophila, C. elegans, Danio, Xenopus atd). Vyšší počet genů a komplexnější organizace savčího organismu nás nutí k použití tkání získaných ze savců. Vzhledem k tomu že se věnujeme problematice specifické pro vajíčka a časná embrya, které mají zcela unikátní vlastnosti, nelze bohužel ve většině našich experimentů použít jako náhradu in vitro kultivované savčí buňky, tyto mají vlastnosti zcela odlišné, což by vedlo ke zkresleným výsledkům a nesprávnosti studie. Zárodečné buňky ani embrya nelze získat v tkáňových kulturách, z tohoto důvodu je nezbytné použití materiálu odebraného ze zvířat pro správné provádění experimentů zaměřených na studium problematiky dělení chromozomů v těchto buňkách.				
Omezení používání zvířat				
Mezikmenovým křížením bude dosaženo vyššího výtěžku zárodečných buněk z každého zvířete. Bylo zjištěno, že u kříženců B6D2F1xCD1 lze získat větší počet samičích zárodečných buněk a mají vyšší úspěšnost fertilizace. Tímto lze dosáhnout výrazného snížení počtu pokusných zvířat pro jednotlivé experimenty. Počty chovných zvířat budou udržovány v minimálních množstvích pro chov i experimenty. Experimenty budou průběžně vyhodnocovány v závislosti na používané metodice a sledovaném jevu tak, aby bylo použito pouze takové množství zvířat, které je k prokázání sledovaného jevu za daných podmínek nezbytné. Dále bude dosaženo minimalizace počtu zvířat použitím adekvátních metod biostatistiky. V našich experimentech počítáme s využitím maximálně 10 300 zvířat v průběhu pěti let: (1) 1800ks samic laboratorního kmene CD1 získaných od komerčních dodavatelů (2) 3500ks kříženců kmenů B6D2F1 a CD1 získaných chovem (3) 5000ks samic kmene Separase				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Každé zvíře bude použito k experimentu maximálně jednou. Pokusná zvířata nebudou opětovně používána. Na zvířatech nebudou prováděny žádné experimenty intravitálně, s výjimkou intraperitoneální administrace malého množství aktivních hormonů ovlivňujících zrání folikulů. Tato stimulace bude prováděna zkušenými a zručnými pracovníky a osobně jsem se nesetkal za 20 let praxe s negativní reakcí na podání hormonů. V průběhu pokusů budou zohledňována hlediska humánního zacházení s pokusnými zvířaty, zejména s ohledem na umožnění jejich adaptace, návyk na uchopení rukou, klidné zacházení, tichý přístup a používání pomůcek, které nezpůsobí zvířeti strach, bolest a utrpení. Zvířata budou pod denní kontrolou technického personálu a v případě např. úrazu způsobeného jiným zvířetem bude takový jedinec bezodkladně utracen.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Myší zárodečné buňky úzce reflektují zárodeční buňky lidské, a proto jsou nenahraditelným modelovým systémem pro základní výzkum studia vzniku reprodukčních poruch zvířat i člověka. Model laboratorní myši se v podobných studiích používá zejména pro standardizaci chovu, malé nároky na prostor a v neposlední řadě vzhledem k běžně dostupným reagentům. U tohoto druhu zvířat je také známa organizace genomu a na základě této znalosti je dostupná celá řada dalších reagentů, včetně chromozomálních sond a RNAi sond. Vzhledem ke všem shora uvedeným faktům je použití tohoto druhu nejefektivnější jak z hlediska informací získaných během výzkumu, tak i z hlediska spotřeby zvířat a minimalizace jejich strádání.