

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569**Název projektu pokusů**

Vliv modulace kaskád nukleárních receptorů na fibrózu a regeneraci jater u myši.

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

33

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾

NASH, NAFLD, fibróza, regenerace jater; myši.

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 studie je zhodnotit terapeutický potenciál látek ovlivňujících kaskádu nukleárních receptorů na myším modelu NASH, fibrotizující cholangitidy a regenerace jater.

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)

Očekávaným přínosem projektu je identifikace nových terapeutických možností závažných a častých jaterních onemocnění a současně rozšíření znalostí o farmakodynamice stávajících a potenciálních léčiv.

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

- Z důvodu parciální hepatektomie zvíře podstoupí operační zákrok v celkové anestezii isofluranem. Již během zákroku bude podán buprenorfin s pomalým uvolňováním (250 µg/kg, s.c.) pro zajištění pooperační analgezie. V pooperační analgesii bude pokračováno po dobu následujících 7 dnů – 1x denně buprenorfin s pomalým uvolňováním (250 µg/kg, s.c.).
- U NASH skupiny bude 23. týden diety proveden glukózový toleranční test spočívající v 18 h hladovění s následným i.p. podáním glukózy (1 g/kg BW) a navazujícími odběry kapky krve z drobné incise konce ocasu v čase 15-30-60-120 min po aplikaci glukózy.
- Zvířata ze všech experimentálních skupin na konci pokusu podstoupí odběr žluče v celkové anestézii indukované inhalačně podaným isofluranem s následnou aplikací pentobarbitalu 50 mg/kg i.p. Zvířata se už z této anestezie neprobudí a budou v ní usmrcena předávkováním anestetika.
- U zvířat s parciální hepatektomií bude každý den provedeno vyšetření ultrazvukem v celkové anestezii inhalačně podaným isofluranem. Zvířata z NASH studie absolvují od 12. do 23. týdne jednou za 14 dní neinvazivní obrazovou analýzu jater na přístroji IVIS Spectrum a UZ vyšetření jater v celkové anestezii inhalačně podávaným isofluranem. U DDC diety budou obě zobrazovací vyšetření realizovány v týdenních intervalech, kdy budou zvířata opět v celkové anestezii indukované a udržované inhalačně podaným isofluranem.

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

Průběžný zdravotní stav a komfort zvířat bude každodenně monitorován a udržován zaměstnanci Vivária. Aplikovaná vysokotuková dieta vede k hmotnostním přírůstkům bez objektivních nežádoucích účinků. Aplikovaná DDC dieta rovněž není spojena s objektivními známkami nežádoucích účinků. Parciální resekce jater prováděná v celkové anestezii (isofluran + pentobarbital) nevede k mortalitě zvířat, hlavním problémem je pooperační bolest, která bude tlumena opioidním analgetikem (buprenorfin). Odběry krve pro glukózový toleranční test ze špičky ocasu jsou subjektivně nepříjemné, ale při zkušeném provedení nevyvolávají u zvířat bolestivou reakci. Diagnostické výkony na přístrojích IVIS spectrum a UZ Vevo budou provedeny v inhalační anestezii isofluranem a nelze u nich předpokládat nepříznivé dopady. Nežádoucí účinky experimentální léčby jsou vysoce nepravděpodobné, jelikož se jedná o látky, jejichž mechanismy nejsou spojeny se závažnými systémovými nežádoucími účinky. Diskomfort působený p.o.

podáváním léčiv u zvířat bude krátkodobý a bude minimalizován opatrným přístupem vycházejícím z bohatých zkušeností zapojených pracovníků.					
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)	744		504	240	
Zvolte položku.					
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					
Navrhované schéma pokusu nelze nahradit jiným modelem nebo <i>in vitro</i> experimentem, protože sledujeme průběh rozvoje zánětu, fibrózy a regenerace jaterního parenchymu v závislosti na podáváných dietách a testovaných léčivech. Jedná se o interakci řady buněčných typů v čase, kterou nelze spolehlivě reprodukovat v <i>in vitro</i> podmínkách. Současně je účinek léčiva modifikován reálnými změnami v profilech koncentrací testovaných látek, což <i>in vitro</i> podmínky nedokáží spolehlivě reflektovat.					
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).					
Budou použity minimální nezbytné počty zvířat nutné ke správnému statistickému zhodnocení účinku dvou látek a daných modelových patologií. Plán pokusu reflektuje interindividuální variabilitu odpovědi zvířat na léčbu při daném patologickém stavu. Struktura experimentů je navržena po důkladné teoretické přípravě a navazuje na dlouhodobé zkušenosti realizujícího týmu. Všechny odebrané vzorky budou dlouhodobě skladovány v hlubokomrazicích boxech (-80 °C) pro možnost dodatečných analýz bez nutnosti opakování experimentu.					
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					
Zvolené myši modely jsou standardním přístupem ke studiu problematiky NASH, fibrotizujících cholangiopatií a jaterní regenerace a jsou v literatuře široce diskutovány, a proto byly vybrány i pro naši studii. Tento přístup má největší pravděpodobnost uplatnění pro publikování takto získaných dat a jejich potenciální interpolaci do humánní medicíny. Snížení újmy zvířatům bude zabezpečeno vysokou kvalitou péče ve Viváriu LFHK postavené na zkušeném personálu, pravidelném denním režimu a používání anestetik a analgetik v odpovídajících dávkových schématech. Se zvířaty bude experimentováno až po náležité aklimatizaci.					
Použité druhy zvířat - vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií					
K experimentům budou použiti dospělí myši wild-type (WT) samci kmene C57BL/6J (od 10. týdne věku), u kterých je v literatuře dobře popsána přítomnost hodnocených receptorů a také spolehlivost zamýšlených modelových patologií. Pro ověření mechanismu účinku budou navíc použity myši s knockoutovaným Nrf2 genem – kmen Nfe2l2tm1Ywk (Jackson laboratories). Počet zvířat bude maximálně 744 myši. Každá skupina vyžaduje použití dostatečného množství zvířat pro zajištění statistického hodnocení dat. Nároky časopisů na statistické hodnocení a značná interindividuální variabilita v reakci na prováděné experimenty nás vedou k plánování 12 jedinců na experimentální skupinu. Budou použita hlediska humánního zacházení se zvířaty: a) adaptace; b) klidné zacházení; c) tichý přístup; d) návyk na uchopení rukou.					

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