

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Role deficiencie jednotlivých členů ORMDL rodiny a jejich kombinací v zánětlivých onemocněních.

Doba trvání projektu pokusů v měsících	50
Klíčová slova	ORMDL
sfingolipidy	anafylaktická reakce
dermatitida	metabolism

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Imunitní systém [PB7]

Základní výzkum: Gastrointestinální systém včetně jater [PB5]

0

0

Cíle projektu pokusů

Cílem studia je přispět k objasnění funkce jednotlivých členů ORMDL rodiny v zánětlivých onemocněních a příjmu glukózy. V tomto projektu budeme testovat naši hypotézu, že všechny proteiny rodiny ORMDL spolupracují při syntéze bioaktivních lipidů, imunoreceptorové signalizaci a v zánětlivých procesech, včetně ovlivnění jejich migrace in vivo (homing). Za tímto účelem prozkoumáme zánětlivé jevy a vlastnosti žírných buněk z nově izolovaných myší s deficitem jednotlivých členů ORMDL rodiny a kombinovaných absencí členů ORMDL rodiny in vitro a in vivo. Experimenty popisující vliv dermatitidy indukované imiquimodem mají vztah k aktivaci žírných buněk, která dle literárních dat předchází všem následným projevům. Imiquimodem indukovaná dermatitida má také vztah k úrovni sfingolipidové produkce. Zaměříme se proto na roli ORMDL rodiny, která sfingolipidy reguluje.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Naše předchozí výsledky ukázaly, že ORMDL3 je významným regulátorem syntézy lipidů a že tyto proteiny mohou mít důležité, doposud neobjasněné úlohy ve fyziologii žírných buněk. Pro studium biologické funkce jednotlivých členů ORMDL rodiny (ORMDL1, ORMDL2 a ORMDL3) in vivo je vhodný myší model. Získané výsledky budou důležitým východiskem pro výzkum ORMDL rodiny u pacientů se změnami v expresi ORMDL rodiny a jiných proteinů ovlivňujících metabolismus sfingolipidů. V odborné literatuře byly také popsány výsledky naznačující vztah ORMDL rodiny a diabetu I. typu u lidí. Test glukózové tolerance souvisí s metabolismem glukózy a diabetem, zaměříme se tedy na stanovení IPGTT u myší s ORMDL1 KO, ORMDL3 Ko a ORMDL1,3 dKO a příslušných kontrol.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) - 1 subkutánní injekce, 1x intravenózní; Systémovou anafylaktickou reakci (PSA) - 2x i.v. Injekce, případně 1x i.p. A 1x i.v.; active cutaneous anaphylaxis (ACA) - 3x i.p. Injekce kombinovaná s 1x i.v.; Imiquimodem indukovaná dermatitida - vyholení zad; IPGTT - i.p. inikace 1x; homing (in vivo sledování migrace) - 1x i.v. injekce

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

Nebudou prováděny zásahy, které by překročily bolest spojenou s injekcí s.c., i.p. nebo i.v. V případě intradermálního vpichu u PCA a ACA a při holení v rámci imiquimodem indukované dermatitidy, budou myši krátce znehybněny 5% isofluoranovou anestézií, aby se předešlo nadbytečnému vystavení stresu. Imiquimodem indukovaná dermatitida vykazuje v prvních třech dnech po aplikaci masti s imiquimodem systémovou odpověď doprovázenou slabostí, poklesem hmotnosti a příjmu tekutin. V tomto případě budou pro zvýšení komfortu a vitality přidány do klece zvlhčené pelety.

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	650	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

Po provedení pokusu budou zvířata utrácena

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat

Zkoumání úlohy jednotlivých genů v komplexním prostředí celého organismu není možné pomocí alternativních metody neboť nepostihují složitost zkoumané problematiky a proto nemohou nahradit navrhované pokusy. Také případný terapeutický účinek protilátek proti ORMDL rodině na anafylaxi je možný pouze v in vivo systému. Snížení počtu zvířat bude dosaženo mimo jiné tím, že izolované prekurzory žírných buněk budou dále kultivovány a množeny a následně je bude možné používat k pokusům in vitro prostředí. Předběžné pokusy pro získání odhadu optimálních koncentrací jednotlivých reagentů budou prováděny na buněčných liniích.

Omezení používání zvířat

Pro pokusy bude použito pouze minimální množství zvířat dostatečných pro výpočet signifikance rozdílů mezi jednotlivými skupinami. Hlavnímu experimentu bude předcházet pilotní pokus na menší skupině zvířat. Po jeho vyhodnocení se uvaží, zda má smysl v daném experimentu pokračovat. Využití skupin obsahujících jednotlivé členy ORMDL rodiny a jejich kombinací bude srovnávána oproti myším divokého typu v jednom experimentu. Izolace prekurzorů žírných buněk z kostní dřeně bude prováděna simultánně s izolací zralých žírných buněk z peritonea. Tkáně myši použitých pro experimenty budou po jejich usmrcení co nejefektivněji využity, aby se minimalizoval počet opakování. Prekurzory žírných buněk a zralé žírné buněk je také nutné izolovat přímo z usmrcených zvířat. Snížení počtu pokusných zvířat bude docíleno následnou kultivací (a množením) buněčných prekurzorů v podmínkách in vitro.

Šetrné zacházení se zvířaty

Nebudou prováděny zásahy, které by překročily bolest spojenou s injekcí s.c., i.p. nebo i.v. V případě intradermálního vpichu do uší u PCA a ACA, a holení při nanesení imiquimodem indukované dermatitidě, budou myši krátce znehybněny 5% isofluoranovou anestézií, aby se předešlo nadbytečnému vystavení stresu. Myši s kombinovanou delecí ORMDL1 a ORMDL3 (ORMDL1,3 dKO) jsou menšího věku, vykazují neurologický fenotyp doprovázený občasným třasem, který jim ztěžuje udržet se na mřížce klece a tím i přístupu k potravě. Tyto myši poté chřadnou. Do klecí se jim proto bude přidávat pravidelně malé množství zvlhčeného krmení, které jim umožní přijímat potravu ad libitum a jejich zdravotní stav se stabilizuje. Imiquimodem indukovaná dermatitida vykazuje v prvních třech dnech po aplikaci masti systémovou odpověď. Dehydrataci se zabrání přidáním zvlhčených pelet.

Použité druhy zvířat - vysvětlení

Většina experimentů bude probíhat na myších starých 6-12 týdnů. Vyjímkou jsou myši O1,3 dKO vykazující škodlivý fenotyp. Pro generování myší O1,3 dKO vykazující škodlivý fenotyp je potřeba zavést větší počet chovných párů a většina experimentů bude provedena na myších starých 6 týdnů.