

NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Validace nového testu učení a paměti pro posouzení kognitivních schopností laboratorních myši.

Doba trvání projektu pokusů v měsících	60
Klíčová slova	clockwise test
learning and memory	IntelliCage
enhanced memory	spatial and working memory

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Nervová soustava [PB3]

0
0
0

Cíle projektu pokusů

Cílem projektu je ověřit nový test učení a paměti myši (ve směru hodinových ručiček, ang. clockwise), který umožní posoudit jemné změny v chování geneticky modifikovaných a/nebo negeneticky modifikovaných myši. K tomuto účelu budou zvířatům podávány farmakologické sloučeniny. Test ve směru hodinových ručiček je založen na apetitivním posílení předkládaného pití, t.j. čisté vody různými sladidly. Upřednostňování sladkých roztoků se sacharózou nebo sacharinem, se používá jako míra citlivosti hlodavců k odměně. Odměna - v každém rohu jsou dvě napáječky, které se otevírají, pouze když si zvíře vybere vhodný roh. Po každém pití ve vhodném rohu se poloha změní ve směru hodinových ručiček. Analyzuje se kinetika učení a zapamatování si vzorce dostupnosti rohů studijní a kontrolní skupinou. Vstup do správného rohu je signalizován LED diodou, která se rozsvítí, když senzor načte číslo myši.

Koncové body chování při hodnocení chodu hodinových ručiček jsou:

1) Posouzení pracovní paměti, které spočívá v osvojení pravidla rotujícího přístupu k vodě/ slazené vodě ve směru hodinových

Potenciální přínosy projektu pokusů

Mezi výhody projektu patří především návrh testů s účinnější neurobehaviorální fenotypizací, která eliminuje faktory prostředí zatížené konvenčními testy. IntelliCage umožňuje minimalizovat účast experimentátora při kontaktu s hlodavci a také navrhovat testy chování nepřetržitě (24/24 hodin) po dobu týdnů, tj. jak v aktivní (tma), tak neaktivní (světlo) denní fázi zvířat. Chceme vytvořit opakovatelný, validní, vysoce výkonný a citlivý test v podmínkách podobných standardním v bohatém prostředí (domy, rohy, do kterých mohou zvířata vstoupit). Nastavení postupu umožní v budoucnu ověřit vliv farmakologických léčiv na kognitivní funkce myši a v předklinických studiích sledovat negativní nebo pozitivní účinek léčiva. V základním výzkumu geneticky modifikovaných organismů umožní test účinnější stanovení funkcí analyzovaných aktivních nebo odstraněných genů na kognitivních schopnostech.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Po skončení adaptačního období bude prováděno pozorování pokusných zvířat všech skupin. S každou skupinou zvířat bude manipulovat experimentátor. Zvířata budou aklimatizována po dobu 6 dnů, a poté bude postup proveden v IntelliCage 4 až 5 týdnů (v závislosti na učení myši a jejich paměťových dovednostech). Před umístěním do IntelliCage myším bude implantován transpondér RFID (subkutánně mezi lopatkami), ten slouží k odeslání signálu, když se zvíře přiblíží k rohu s vodou. Zvířatům bude podána anestézie, aby se transpondér aplikoval důkladně a aby se zabránilo možné chybné aplikaci transpondéru a bolesti. Po aplikaci čipů budou zvířata pozorována po dobu nejméně 3 dnů.

Systém IntelliCage umožňuje otestovat chování každé myši (antény RFID rozpoznávají jednotlivé myši) žijící v sociální skupině. Umožňuje navrhnout behaviorální testy nepřetržitě (24/24 hodin) po dobu několika týdnů. Kromě toho počítačový software ovládá klece, což snižuje manipulaci experimentátorem a minimalizuje stres spojený s manipulací se zvířaty. Systém se skládá ze standardní klece na potkany o rozměrech 610 mm x 435 mm se 4 trojúhelníkovými oddíly umístěnými v rozích. V každém rohu jsou 2 lahve na pití. V závislosti na testované skupině budou lahve obsahovat vodu nebo slazenou vodu. Lahve se sladkou vodou

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

Pokus nebude mít vliv na zdraví zvířat, ale budou pociťovat dočasné nepohodlí během uchopení a imobilizace, stejně jako během implantačního postupu transpondéru.

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	1344	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				
Na konci experimentu budou zvířata humánně usmrcena a jejich mozky odebrány pro histologickou analýzu. Histologická sklíčka budou také sloužit jako kontrola pro studie prováděné na geneticky modifikovaných zvířatech a/nebo léčených léčivými látkami.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Projekt se týká validace metody a přípravy zkušebního protokolu behaviorálních metod prováděných na myších, proto je použití zvířat nevyhnutelné. Bohužel, k provedení neurobehaviorální analýzy je nutné použít zvířecí modely k simulaci například lidských neurodegenerativních onemocnění. Pro získání spolehlivých výsledků je nutné provést experiment in vivo, protože studie kultivace in vitro nejsou schopny odrážet změny probíhající během procesů učení. Zvířecí model je nutný pro monitorování změny chování po modifikacích, např. genové mutace.				
Omezení používání zvířat				
Pro experiment bude použit minimální počet zvířat nezbytných k získání spolehlivých výsledků umožňujících ověření testu. Po dokončení experimentu bude mozek zvířat odebrán pro histologickou analýzu. Myši budou humánně usmrceny, tak aby nebyly vystaveny stresu a bolesti.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Cílem je snížit utrpení a stres zvířat spojené s prováděnými postupy. Behaviorální experimenty se provádějí za využití automatických IntelliCage systémů s minimalizací vnějších zásahů (pouze doplnění vody a potravy a výměna steliva). IntelliCage poskytují podmínky, které se co nejvíce blíží přirozeným s obohaceným prostředím (velký prostor a rohy, do kterých lze vstoupit). Myši jsou umístěny společně ve skupinách od 14 do 16 ks zvířat v místnosti s omezeným přístupem zaměstnanců a přiměřeným osvětlením. Místnosti pro chování jsou navrženy tak, aby umožňovaly regulaci teploty (optimální pro myši 20 – 24 °C) a denní cyklus 12h světlo/12h tma. Zvířata jsou chována v průhledných klecích, které umožňují vizuální kontakt s jinými zvířaty. Před implantací transpondéru budou zvířata uvedena do krátkodobé inhalační anestézie 20 – 60 sekund. Laboratorní zvířata budou denně monitorována kompetentními odborníky (vedoucí projektu, pověřená osoba, veterinární lékař nebo technik) a nebudou cíleně vystavena utrpení. Všechny úkony včetně eutanázie (dle OECD) jsou vykonávány licencovaným veterinárním lékařem a osobami odborně způsobilými pro práci s laboratorními zvířaty majícími příslušné osvědčení, dle zákona č. 246/1992 Sb. v platném znění. Experimenty budou				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Myší experimentální model byl zvolen pro standardizování postupů a systém IntelliCage pro snížením vlivu vnějších proměnných. Myš je dobře charakterizovaný savčí model vhodný pro monitorování a průběh změn v těle způsobených nebo vyplývajících z genetické mutace.

Validujeme testovací postupy pro nejčastěji používané myší kmeny C57Bl/6J a C57Bl/6N. V experimentech se často používají oba kmeny zaměnitelně, ale jsou genotypicky odlišné a také mají různé reakce v testech chování.

Test komplexně validujeme u zvířat obou pohlaví. Budeme provádět testy na zvířatech ve věku od 6 do 30 týdnů.