

Vyplňujte jen bílé kolonky!

Formulář vyplňujte na počítači; kolonky se zvětší automaticky podle množství textu.

NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ	
Název projektu pokusů	
Molekulární etiopatogeneze apikální periodontitidy a odontogenních cyst – laboratorní myš	
Doba trvání projektu pokusů	5/2020 – 12/2024
Klíčová slova - maximálně 5	zvířecí model, odontogeneze, cysty, ciliopatie
Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka	
☒	základní výzkum
☐	translační nebo aplikovaný výzkum
☐	vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
☐	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
☐	zachování druhů
☐	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
☐	trestní řízení a jiné soudní řízení
Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)	
Ciliopatie zahrnují širokou skupinu onemocnění způsobenou defekty v morfologii či funkci primárních cilií. Primární cilie, známé také jako nepohyblivé cilie, jsou orgány přítomné téměř v každé savčí buňce, které slouží ke komunikaci mezi buňkami a s tím souvisejícím transportem signálních molekul. Uplatňují se v řadě klíčových procesů jak v průběhu ontogeneze, tak při udržování homeostázy dospělého organismu. V současné době je známa řada ciliopatických onemocnění u lidských i zvířecích pacientů, které jsou podmíněny mutací genů kódujících některý z ciliárních proteinů. Tato onemocnění často zahrnují různé, částečně se překrývající skupiny symptomů. Ciliopatie jsou však nejčastěji spojeny s fibrocystickými změnami ledvin a jater nicméně postihují i řadu dalších orgánů jako jsou kraniofaciální struktury či končetiny. Cílem projektu je objasnění mechanismů podílejících se na vzniku odontogenních cyst a keratocyst včetně objasnění molekulárních procesů podílejících se na jejich iniciaci, progresi či možné léčbě. Pro podrobnější studium mechanismů podílejících se na vzniku odontogenních cyst jsme zvolili dvě myši linie s vyblokovanou funkcí genu <i>NIMA related kinase 8</i> (C57BL/6J-Nek8jck/J) a <i>Patch 1</i> (B6.129-Ptch1^{tm1Zim/Cnrm}), u nichž dochází v průběhu života k iniciaci cyst v čelistech, ale i v jiných orgánech jako jsou ledviny, játra či plíce. Jde tedy o stejné příznaky, které můžeme pozorovat i u lidských pacientů. V průběhu řešení projektu budou nejdříve popsány morfologické odlišnosti mezi wt a deficientními zvířaty se zaměřením na vznik cyst nejen v ledvinách a játrech, ale také mandibulárních cyst. Dále budou analyzovány změny proteinové a molekulární signalizace, které vznik cyst provázejí. Následně budou do myši aplikovány inhibitory ovlivňující morfologii a funkci primárních cilií či signalizaci s ní související.	
Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů (jak by mohlo být dosaženo pokroku ve vašem vědním oboru nebo jaký přínos by z něj člověk či zvířata mohli mít)	
Ptch- a Jck-transgenní myši představují unikátní model pro studium poruch funkce primárních cilií, které pomohou nejen odhalení příčin vzniku vývojových defektů u lidských pacientů s abnormální expresí těchto genů, ale umožní nám analyzovat nové látky, které se dají využít jako potenciální léky v budoucnosti.	
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá	
Studie bude prováděna na dvou liniích myši: C57BL/6J-Nek8jck/J a B6.129-Ptch1 ^{tm1Zim/Cnrm}	
Předpokládaný počet odebraných zvířat je:	
C57BL/6J-Nek8jck/J: 60 prenatalních stádií a 288 postnatálních stádií	
B6.129-Ptch1 ^{tm1Zim/Cnrm} : 60 prenatalních stádií a 288 postnatálních stádií	
Aplikace léků do C57BL/6J-Nek8jck/J: 450 myši	
Aplikace léků do B6.129-Ptch1 ^{tm1Zim/Cnrm} : 450 myši	
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu? Cysty se objevují u zvířat během rané postnatální periody (4. - 10. týden). Rozvoj cyst postupně u starších zvířat vede k úhynu zvířat (20. - 25. týden) jde tedy o závažnou zátěž. Odběry budou probíhat i v pozdějších fázích onemocnění až do 25. týdne, kdy předpokládáme rozvoj nemoci. Pro vyhodnocení experimentu bude experimentální zvíře nejprve humaně usmrceno. Zdravotní stav pokusných zvířat bude kontrolován na denní bázi a při známkách utrpení zvířete bude experiment ukončen.	
Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)	
Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.	
Pro ověření funkce proteinu v živém organismu nelze zvolit alternativní přístup (dle publikací v databázi PubMed). Následné morfologické a molekulární analýzy budou prováděny <i>in vitro</i> na odebraných buněčných liniích.	
Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.	
Plánované počty zvířat v experimentu jsou minimální a plánované pro statistické analýzy.	
Prenatální odběry jsou plánovány každý druhý den – tedy celkem 5 časových odběrů z 6 zvířat. Tento počet je nezbytný vzhledem k možné variabilitě fenotypu mezi jedinci, a tedy z zajištění dostatečného množství konzistentních dat.	
Při aplikacích inhibitorů/aktivátorů primárních cilií plánujeme 3 časové body pro injekci látek a pro každý experiment 5	

časových odběrů. V tomto případě navyšujeme počet analyzovaných zvířat na 10 vzhledem k očekávané možné variabilitě intenzity odpovědi na léčbu a tedy opět zajištění dostatečného množství dat pro statistické analýzy.

Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlete volbu druhu zvířat, a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů.

Vysvětlete obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.

Myš byla vybrána jako standardizovaný laboratorní živočich splňující nutné podmínky (např. *savec*) pro dosažení očekávaných výsledků experimentu. Se zvířaty bude zacházeno šetrně a odborně. Bolestivé zákroky a utrpení zvířat se nepředpokládají. Při chovu zvířat budou brány ohledy na jejich klinický stav a potřeby. Odběry tkání budou provedeny *post mortem*.