

## NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ

### Název projektu pokusů

**Studium epigenetických regulací na modelu embryotransferu u transgenních myší**

Doba trvání projektu pokusů *do* 31. 12. 2022

Klíčová slova - maximálně 5 Oocyt, spermie, embryotransfer, epigenetika

**Účel projektu pokusů** - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka

x	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)

Cílem předkládaného projektu pokusu je izolovat gonády, gamety a embrya v různém stádiu vývoje. Pro efektivní získání oocytů/embryí a tak redukci počtu potřebných zvířat v experimentu bude použito hormonální stimulace gonadotropiny. Biologický materiál bude následně analyzován s ohledem na cílové studované proteiny. Pro účely studia maternálního efektu bude použito embryotransferu zygot, 2-buněčných embryí anebo blastocyst. Embrya budou pocházet z přirozeného *in vivo* oplození anebo *in vitro* oplození oocytů získaných pro tento účel z hormonálně stimulovaných samic. Pro embryotransfer budou připraveny pseudopregnantní samice pomocí vasektomovaných samců.

Experimentální zvířata budou použita pro produkci gonád, gamet a embryí. Za účelem studia vybrané buněčné signalizace (odvozené od SIRT1 a/nebo gasotransmise sulfanem) budou experimentální zvířata ošetřena i. p. aplikací inhibitorů/aktivátorů vybraných proteinů (histon deacetylázy), nebo modulátory hladiny gasotransmiterů (např. donor sulfanu GYY4137 apod.). Přítomnost použitých látek bude sledována v tělních tekutinách: v moči, mateřském mléce a v krvi (odebraná *post mortem*).

**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)

Přínosem studie bude základní poznání buněčné signalizace ve vyvíjejících se zárodečných buňkách, gametách a časných embryích. Tyto poznatky budou vycházet ze studia vybraných signálních kaskád a biologických fenoménů, tedy zapojení histon deacetyláz a gasotransmise sulfanu v procesech oplození, mitofágie, epigenetických změn a reaktivace embryonálního genomu. Kombinace *in vivo* a *in vitro* experimentů umožní transfer poznatků do reprodukční medicíny a asistované reprodukce. Poznání buněčného cyklu a stability chromatinu (výsledek epigenetických regulací a gasotransmise sulfanem) přispěje vývoji postupů šetrnější asistované reprodukce, efektivnější *in vitro* techniky (včetně tkáňového inženýrství) a hlubší poznání mitochondriálních chorob s návrhy jejich terapie.

**Druhy a přibližné počty zvířat**, jejichž použití se předpokládá

Maximální počet myší pro experimenty v 1 každém roce řešení bude: 750 pro outbrední kmen ICR (30 samců, 720 samic) a 750 myší inbredních kmenů na bázi C57BL6 (210 samců, 540 samic). Uvedený počet zvířat je maximální, kterého bude v experimentu použito (tabulka 1). Od započetí experimentu bude po celou dobu jeho trvání vyhodnocována úspěšnost použitých technik a počet potřebných zvířat bude podle toho případně korigován (t. j. snížen). Zvířata budou určena pro hormonální stimulaci za účelem odběru oocytů a embryí (C57BL6 a ICR), pro získávání spermií (C57BL6), jako pseudopregnantní příjemkyně dárcovských embryí pomocí embryotransferu (ICR) a vasektomie samců (ICR) pro přípravu pseudopregnantních samic.

**Tabulka 1:** Časový plán a plánovaná maximální potřeba zvířat v experimentu. Plán představuje rozvahu pro kombinaci použitých kmenů myší ICR a C57BL6 (včetně případných transgenních linií na genetickém podkladu C57BL6). Uvedený počet zvířat je nejvyšší možný a nebude překročen. Maximální počet zvířat kalkuluje s faktory, které mohou negativně ovlivnit průběh experimentů: úbytek zvířat během provedení zákroku a během rekonvalescence (vasektomie, popř. embryotransfer), slabá odpověď na hormonální stimulaci, nízká výtěžnost při izolaci oocytů/embryí a/nebo sezónní vlivy během přirozené plemenitby.

Rok řešení	Samice (C57BL6) pro hormonální stimulaci (získávání oocytů a embryí)	Samci (C57BL6) pro získávání spermií	Samice (ICR) pro hormonální stimulaci (získávání oocytů a embryí)	Pseudogravidní samice (ICR) určené pro embryotransfer	Vasektomování samci (ICR)	Počet zvířat celkem (ICR/C57BL6)
1.	540	210	525	195	30	750/750
2.	540	210	525	195	30	750/750
3.	540	210	525	195	30	750/750
4.	540	210	525	195	30	750/750
ošetření	i. p. PMSG/hCG; i. p. modulátorů/donoru	N/A; i. p. modulátorů/donoru	i. p. PMSG/hCG	Embryotransfer v celkové anestézii	Vasektomie v celkové anestézii	

Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?

Nejsou předpokládány vedlejší nežádoucí účinky použití postupu intraperitoneální aplikace, vasektomie myších samců a embryotransferu. Úroveň závažnosti je vzhledem k chirurgickým zákrokům u některých zvířat střední. Kadavery budou zlikvidovány v souladu se schválenými předpisy pracoviště – zmrazení a předání veterinární asanační službě.

**Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)**

Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.

Použití živého zvířete je nezbytné a alternativní model pro simulaci produkce potomstva vzniklého *in vivo* oplozením není dostupný. Laboratorní hlodavci jsou optimální zvířecí model pro svou velikost, snadnost chovu a vysokou efektivitou získávání oocytů v dostatečném počtu. Stejně tak biologické mechanismy embryonálního vývoje, zahrnující epigenetické regulace a jejich transgenerační dědičnost, nelze kompenzovat tkáňovými kulturami somatických buněk.

Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.

Pro experiment budou využita zvířata plodných kmenů myši s vynikající reprodukční schopností, které umožňují redukovat počet použitých zvířat na minimum. Experiment je navržen tak, aby data mohla být průběžně vyhodnocována za účelem redukce počtu experimentálních zvířat. Pro vasektomii bude použit nejmenší možný počet samců, kdy v první fázi bude připraveno 5 vasektomovaných samců; další samci budou takto připraveni pouze pro obnovu samců určených k vyřazení (maximální počet vasektomovaných samců tak bude 30). Proces embryotransferu, jehož úspěšnost je vyjádřena podílem narozených mláďat z přenesených embryí, bude optimalizován tak, aby potřeba příjemkyň byla nejnižší možná.

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.

Myši budou drženy a chovány v podmínkách, které odpovídají standardům chovu laboratorních zvířat. Invazivní zákroky vasektomie a embryotransferu budou provedeny za celkové anestézie optimalizované s ohledem na dosavadní úroveň poznání a zvolený druh.