

ŽÁDOST O SCHVÁLENÍ PROJEKTU POKUSŮ

podle § 16a zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů

IDENTIFIKAČNÍ ÚDAJE

1.	Název (případně evidenční číslo) projektu pokusů, studie, případně označení grantu Úloha nervové aktivity sítnice v patogenezi autoimunitní uveitidy (GAČR 18-11795Y)		
2.	Identifikační údaje uživatele pokusných zvířat		
	Zadatel - název právnické osoby nebo jméno, popřípadě jména, a příjmení fyzické osoby, která provozuje zařízení 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze		
	IČ, bylo-li přiděleno	00 216 208	Registrační číslo hospodářství ¹⁾ CZ 11760274
	Adresa sídla nebo místa podnikání žadatele (včetně PSČ) 100 00 Praha 10, Ruská 87		
	Adresa místa, kde hodlá vykonávat uživatel pokusných zvířat svoji činnost, včetně přesného umístění, názvu, případně jiného označení jednotlivých prostor, kde má být činnost prováděna; pokud má být na základě žádosti v rozhodnutí stanoveno, že je možno používat pokusná zvířata i mimo zařízení, uveďte žadatel specifikaci místa, kde bude činnost prováděna, zejména zda bude činnost prováděna ve volné přírodě a na jakém území 120 00 Praha 2, Ke Karlovu 4 Zvířata jsou umístěna ve zvěřinci v suterénu budovy, vstup dveřmi č. S1 a dveřmi označenými ZVĚŘINEC, pokusy na zvířatech probíhají ve vyhrazené místnosti (místnosti jsou označeny jako: manipulační místnost, CATWALK, Morrisovo vodní bludiště), nebo v příslušných laboratořích Ústavu (v suterénu dveře S5 a S6, v přízemí dveře č. 5, 8, 9 a v 2. nadzemním podlaží dveře č. 42, 48 a 51)		
	Statutární orgán žadatele - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení děkan: prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.		
	Osoba zmocněná k zastupování žadatele ve správním řízení²⁾ - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.		
	Adresa pro doručování 100 00 Praha 10, Ruská 87		
	Telefon	E-mail	Datová schránka
	+420267102233	michal.andel@lf3.cuni.cz	ID DS piy9b4
	Číslo jednací a spisová značka rozhodnutí o udělení oprávnění k používání pokusných zvířat a doba jeho platnosti Č. j.: 74089/2017-MZE-17214 Spisová značka: 16OZ16573/2017-17214 Doba platnosti 5 let (do 31. 12. 2022)		
3.	Seznam osob, které se na projektu pokusů podílejí		
	Vedoucí projektu pokusů - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení a číslo osvědčení podle § 15d odst. 3 nebo § 15e odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb. PharmDr. Andrea Štofková, Ph.D., osvědčení č.: CZ 02293		
	Zástupce vedoucího projektu pokusů, je-li ustanoven - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení a číslo osvědčení podle § 15d odst. 3 nebo § 15e odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb. Mgr. Ivana Hřebíčková, osvědčení č. CZ 03368		
	Osoba odpovědná za péči o pokusná zvířata - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení a číslo osvědčení podle § 15d odst. 3 nebo § 15e odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb. PharmDr. Magdalena Šustková, CSc. CZ 02294		
	Určený veterinární lékař, příp. kvalifikovaný odborník - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení; u kvalifikovaného odborníka uveďte rovněž číslo osvědčení podle § 15d odst. 3 nebo § 15e odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb. Doc. MVDr. Šimon Vaculín, Ph.D. KA 0000664		
	Osoba, která řídí činnost odborné komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení a číslo osvědčení podle § 15d odst. 3 nebo § 15e odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb. Doc. MVDr. Šimon Vaculín, Ph.D. CZ 02426		
	Ostatní osoby - držitelé osvědčení podle § 15d odst. 3 nebo § 15e odst. 1 nebo § 15d odst. 4 nebo § 15e odst. 2 zákona č. 246/1992 Sb.		
	Žadatel prohlašuje, že všechny osoby podílející se na tomto projektu pokusů jsou odborně způsobilé podle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, k příslušné činnosti s pokusnými zvířaty - správnou variantu zaškrtněte (x) do prázdného políčka		
	<input checked="" type="checkbox"/>	Ano	
	<input type="checkbox"/>	Ne	
NAVRH PROJEKTU POKUSŮ			
4.	Účel plánovaných pokusů podle § 18 zákona č. 246/1992 Sb. - odpovídající zařazení zaškrtněte (x) do prázdného políčka		

X	a) základní výzkum
	b1) translační nebo aplikovaný výzkum s cílem zabránit a předejít onemocnění, špatnému zdravotnímu stavu nebo jiným anomáliím nebo jejich následkům u lidí, zvířat nebo rostlin a diagnostikovat je nebo léčit
	b2) translační nebo aplikovaný výzkum s cílem posoudit, zjistit, regulovat nebo upravit fyziologické předpoklady lidí, zvířat nebo rostlin
	b3) translační nebo aplikovaný výzkum s cílem zlepšit životní podmínky a podmínky produkce zvířat chovaných k zemědělským účelům
	c) jakýkoli z cílů uvedených v písmenu b) při vývoji, výrobě nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
	d) ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví nebo dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
	e) výzkum zaměřený na zachování druhů
X	f) vyšší vzdělávání nebo odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí
	g) trestní řízení a jiné soudní řízení

5. Význam a zdůvodnění pokusů - podrobná charakteristika cílů studie s uvedením konkrétního očekávaného přínosu, včetně charakteristiky aplikovaných látek, nebo zařazení látek do indikačních skupin

Autoimunitní zadní uveitida je CD4+ T buňkami vyvolané zánětlivé onemocnění cévnatky a sítnice, které vede k oslepnutí (Horai R and Caspi RR. J Interferon Cytokine Res 2011;31:733-744). Etiologie onemocnění není přesně známá a v současnosti neexistuje žádná účinná terapie, která by mohla onemocnění vyléčit (Prete M. et al. J Ophthalmic Inflamm Infect 2014;4:17). Protože porušení hemato-retinální bariéry (HRB) je významným časným faktorem pro rozvoj onemocnění (Crane IJ and Liversidge J. Semin Immunopathol 2008;30:165-177), cílem projektu je přispět k pochopení mechanismů, které regulují tento patologický proces a k navržení nové preventivní a léčebné strategie, které by zabránily postižení sítnice.

Naše předchozí studie ukázaly, že lokální aktivace specifických senzorických nervových vláken interaguje se sympatickou inervací endotelových buněk hematoencefalické bariéry (HEB) a indukuje vznik prozánětlivého fenotypu endotelu s následným porušením HEB v myším modelu roztroušené sklerózy (Arima Y. et al. Cell. 2012;148:447-457; Arima Y. et al. Elife. 2015;4:e08733; Arima Y. et al., Elife. 2017;6:e25517). Předpokládáme, že obdobný mechanismus by mohl ovlivňovat i integritu HRB u autoimunitní uveitidy. V tomto projektu použijeme myší model autoimunitní zadní uveitidy, experimentální autoimunitní uveoretinitidu (EAU), ve které budeme testovat hypotézu, že lokální nervová aktivita sítnice indukuje vznik prozánětlivého fenotypu endotelových buněk HRB s následným porušením HRB a infiltrací imunitních buněk do sítnice. Vzhledem k tomu, že světlo je hlavním senzorickým stimulem sítnice, a že světelná intenzita určuje charakter nervových odpovědí v sítnici, očekáváme, že fenotyp endotelových buněk, permeabilita HRB a projevy EAU se budou lišit v závislosti na světelné intenzitě. Další plánované analýzy s využitím farmakologických a genetických intervencí naznačí mechanismus působení imunomodulačních neurotransmiterů sítnice v indukci změn HRB v závislosti na světelné intenzitě.

Specifické cíle a očekávané výsledky:

1) Testovat hypotézu, že nervová aktivita sítnice v závislosti na světelné intenzitě ovlivní infiltraci imunitních buněk přes HRB během rozvoje EAU

Světlo působí přímo na tři typy fotoreceptivních buněk v sítnici savců: tyčinky, čípky a světlocitlivé sítnicové gangliové buňky exprimující melanopsin (ipRGCs; z angl. intrinsically photosensitive retinal ganglion cells) (Yau KW and Hardie RC. Cell. 2009;139:246-64). V závislosti na intenzitě osvětlení a aktivitě fotoreceptorů jsou aktivovány různé nervové dráhy v sítnici. Při fotopické úrovni osvětlení se uplatňují dráhy vycházející z čípků, při skotopické úrovni osvětlení (1 foton) jsou aktivní sítnicové dráhy z tyčinek, zatímco při mezopických světelných intenzitách jsou aktivní čípkové i tyčinkové dráhy v odlišném poměru podle hladiny osvětlení (Asteriti S. et al., eLife 2014;3:e01386; Zele AJ and Cao D. Front Psychol 2015; 5:1594; Yau KW and Hardie RC. Cell. 2009;139:246-64). Další sítnicové nervové dráhy vycházejí z ipRGCs a jsou citlivé na různou světelnou intenzitu od jasného světla až po minimální úroveň osvětlení (Do MT. et al., Nature 2009; 457:281-287). Předpokládáme, že zapojení různých nervových okruhů v rámci sítnice v závislosti na světelné intenzitě (fotopická, skotopická a mezopická) bude mít vliv na vznik a rozvoj EAU. Protože dlouhodobé vystavení stálé tmě (skotopické hladině osvětlení) narušuje cirkadiánní rytmus, což má dopad na systémovou imunitní odpověď, vystavíme zvířata v tomto projektu pouze fotopickým a mezopickým hladinám osvětlení.

V naší pilotní studii (nepublikované výsledky studie, kterou jsme provedli na Hokkaido University v Japonsku, ve spolupráci s laboratoří Prof. Masaakiho Murakamiho) jsme zjistili, že mezopické osvětlení (3 lux) během dne zvyšuje infiltraci imunitních buněk v sítnici a závažnost EAU ve srovnání s fotopickým osvětlením (230 lux). Pro potvrzení výsledků z pilotní studie a zjištění mechanismu, zda mezopická světelná intenzita v denní fázi zhoršuje rozvoj EAU přes lokální působení v sítnici nebo přes ovlivnění systémové imunitní odpovědi, budeme analyzovat i rozdíly v počtu imunitních buněk a aktivačním stavu CD4+ T lymfocytů v periferních lymfatických orgánech jako je slezina a lymfatické uzliny u myší vystavených mezopickému a fotopickému osvětlení. Tyto změny v systémové imunitní odpovědi budeme dále korelovat s lokální infiltrací imunitních buněk v sítnici a s klinickým skóre EAU a imunohistochemickými nálezy v sítnici, změnami genové a proteinové exprese prozánětlivých cytokinů a chemokinů v endotelových buňkách HRB a změnami v permeabilitě HRB. Očekáváme, že mezopické osvětlení nebude výrazně stimulovat systémovou imunitní odpověď, ale že ovlivní lokální nervovou aktivitu sítnice s následným účinkem na integritu HRB a infiltraci imunitních buněk do sítnice.

Protože mezopická světelná intenzita na rozdíl od fotopické intenzity aktivuje ne jenom čípky a ipRGCs, ale i tyčinky

(Zelev AJ and Cao D. Front Psychol 2015; 5:1594), domníváme se, že zánětlivé signály, které podporují infiltraci imunitních buněk u myši vystavených mezopickému osvětlení, pocházejí z nervové aktivity zprostředkované tyčinkami nebo z interakcí mezi tyčinkovými a čípkovými dráhami sítnice. Abychom objasnili možný dopad nervové aktivity zprostředkované tyčinkami na rozvoj EAU, budeme selektivně inhibovat tyčinkovou fototransdukční kaskádu pomocí utlumení exprese genu GNAT1 (guanine nucleotide binding protein, alpha transducing 1) v sítnici, který hraje klíčovou roli při aktivaci fosfodiesterázy 6 (PDE6), enzymu potřebného pro fototransdukcí tyčinek (Ebrey T and Koutalos Y. Prog Retin Eye Res. 2001;20:49-94). K utlumení exprese GNAT1 v sítnici použijeme krátkou interferující RNA (siRNA), specifickou pro myšičí gen GNAT1, kterou budeme podávat v intravitreální injekci těsně před nástupem symptomů EAU u myši vystavených mezopickému osvětlení. Pro zjištění vlivu interakcí mezi tyčinkovými a čípkovými dráhami sítnice na EAU, budeme u myši vystavených mezopickému osvětlení tyto interakce blokovat inhibitory gap junctions, oktanolem a karbenoxolem (Heikkinen H. et al. J Neurophysiol 2011;105: 2309–2318; Ayer R. et al. Brain Res. 2010;1315:150-8), abychom zabránili přenosu nervových vzruchů z tyčinek na čípky v době začátku rozvoje EAU. V této experimentální části budeme také hodnotit, zda výše uvedené genetické a farmakologické přístupy selektivně utlumí zánět sítnice, aniž by ovlivnili systémovou imunitní odpověď.

2) Testovat mechanismus jakým specifická světelná intenzita ovlivní vznik prozánětlivého fenotypu cévního endotelu sítnice a poškození HRB

Cílem druhé části tohoto projektu je zjistit jakým mechanismem předpokládaná tyčinková aktivita v sítnici během mezopického osvětlení přispívá k vzniku prozánětlivého fenotypu endotelových buněk sítnicových cév a porušení HRB. Integrita HRB závisí na funkci neurovaskulární jednotky, která je dána interakcemi mezi neurony, gliálními buňkami, pericyty, buňkami hladké svaloviny a endotelovými buňkami. Vaskulární buňky HRB jsou parakrinně regulovány různými neurotransmitery v závislosti na jejich lokalizaci (Newman EA. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015;370(1672); Drake CT and Iadecola C. Brain Lang. 2007;102:141-52). Na základě dosavadních studií, předpokládáme, že plexus kapilár ve vrstvě gangliových buněk bude přímo ovlivněn neurotransmitery gangliových buněk, zatímco povrchový plexus vnitřní jaderné vrstvy bude zejména regulován neurotransmitery amakrinních buněk a hluboký plexus vnitřní jaderné vrstvy neurotransmitery horizontálních buněk. Vzhledem k tomu, že tyčinky mají synapse s horizontálními buňkami a přes bipolární buňky komunikují i s amakrinními a gangliovými buňkami, je pravděpodobné, že nervová aktivita tyčinek při mezopickém osvětlení může ovlivňovat uvolňování různých neurotransmiterů, které udržují homeostázu neurovaskulární jednotky sítnice (Provis JM. et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41:2827-36; Usui Y. et al. J Clin Invest. 2015;125:2335-46). Proto budeme analyzovat změny hladin různých neurotransmiterů sítnice (dopamin, noradrenalin, adrenalin, substance P, CGRP (calcitonin gene-related peptide), VIP (vasoactive intestinal peptide), nNOS (neuronální syntáza oxidu dusnatého), glutamát a acetylcholin) a jejich buněčný zdroj. Po odhalení potenciálního neurotransmiteru, jehož hladina se bude významně lišit během mezopického osvětlení ve srovnání s fotopickým osvětlením budeme dále zkoumat význam tohoto neurotransmiteru v patogenezi EAU během mezopického osvětlení pomocí genetických a/nebo farmakologických přístupů. V těchto experimentech budeme podávat EAU myším vystaveným mezopickému osvětlení systémově nebo intravitreálně blokátory receptorů příslušného neurotransmiteru nebo siRNA, která utlumí genovou expresi daných receptorů.

Tento projekt poskytne nové informace o vlivu světelné intenzity na rozvoj autoimunitního zánětu sítnice a o regulačních nervových dráhách, které hrají úlohu v porušení homeostázy sítnice a v patogenezi autoimunitní uveitidy. Výsledky tohoto projektu by tak mohly určit nové rizikové faktory pro vznik uveitidy a rovněž přispět k novým terapeutickým strategiím chronického zánětu sítnice.

<p>6. Zdůvodnění výběru a používání pokusných zvířat, včetně jejich odhadovaného počtu, druhů a stadií vývoje</p> <p>V pokusech během tří let bude použito maximálně 600 inbredních myši kmene C57BL/6J s haplotypem H-2^b ve věku 6 až 8 týdnů (samci a samice). Tato zvířata jsou citlivá k rozvoji experimentální autoimunitní uveitidy indukované lidským uveitogenním antigenem: interphotoreceptor binding protein (IRBP). Onemocnění se vyvine u obou pohlaví konzistentně a je dobře reprodukovatelné. Počet myši byl zvolen s ohledem na použití minimálního počtu zvířat potřebných pro statistickou analýzu výsledků (5-8 zvířat na skupinu).</p>
<p>7. Prohlášení žadatele o průkazu nezbytnosti pokusů nebo uvedení právního předpisu, který provedení pokusů ukládá, včetně zdůvodnění, proč nelze pokus na pokusném zvířeti nahradit alternativními metodami</p> <p>Pokus je nezbytný z důvodů (§ 15 odst. 3 zák. č. 246/92 Sb.) předcházení, poznání nebo léčení nemoci a k poznání ovlivnění fyziologických stavů a funkcí člověka a zvířete.</p> <p>Prohlašujeme, že kompletní integrované projevy autoimunitních onemocnění a reakce na zánět je nezbytné sledovat na živém modelu, protože biologickou odpověď organismu není možné sledovat alternativními modely in vitro.</p>
<p>8. Zabránění případnému neodůvodněnému opakování pokusů - byl tento pokus na zvířatech již někdy v minulosti proveden? Pokud ano, odůvodněte, proč je nutné opakování; pokud ne, uveďte způsob, který jste použili pro ověření, že tento pokus nebyl dosud proveden</p> <p>Pokus byl naplánován na základě literární rešerše (databáze Medline) a žádný takový pokus dosud proveden nebyl. Jednotlivé experimenty nebudou opakovány. Výsledky experimentů budou publikovány v mezinárodních časopisech, aby se předešlo opakováním experimentů v jiných laboratořích.</p>
<p>9. Činnost s pokusnými zvířaty</p> <p>Podrobný popis pokusů a činnosti s pokusnými zvířaty</p> <ul style="list-style-type: none"> Model experimentální autoimunitní uveitidy (EAU): myšim se aplikuje do ocasní žíly pertusový toxin (PTx) v objemu 200 µl a následně se subkutánně podá 100 µl emulze antigenu IRBP₁₋₂₀ (peptidu o sekvenci 20 aminokyselin: GPTHLFQPSLVLDMAKVLDD) a kompletního Freundova adjuvans do oblasti báze ocasu; dva dny po imunizaci se zopakuje intravenózní aplikace 200 µl PTx.

- **Design experimentu:** všechny myši budou vystaveny mezopickému osvětlení (3 lux v prostředí klece) ve 12-hodinové světelné fotoperiodě od 0. do 10. dne po imunizaci, kdy podle naší pilotní studie nastává první infiltrace CD4+ T lymfocytů do sítnice, avšak zatím nejsou patrné klinické změny na sítnici. Poté budou myši rozděleny do dvou skupin a budou vystaveny buď mezopické (3 lux) nebo fotopické (230 lux) světelné intenzitě v 12-hodinové světelné fotoperiodě až do 14. dne po imunizaci, kdy dochází ke klinickým změnám na sítnici u myši vystavených mezopickému osvětlení. Ve všech pokusech bude během 12-ti hodinové noční fáze udržována světelná intenzita 0 lux. LED žárovky s plně spektrálním denním světlem budou použity jako světelný zdroj pro fotopické světelné podmínky a 4 W kompaktní zářivky budou použity k dosažení mezopických podmínek. Světelná intenzita bude měřena denně digitálním luxmetrem uprostřed klece.
- **Klinické hodnocení EAU:** budeme provádět vyšetření očního pozadí pomocí endoskopu spojeného s digitálním fotoaparátem podle publikované metodiky Topical Endoscopy Fundus Imaging (TEFI) u myši (Paques M. et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007;48:2769-74) a digitální snímky očního pozadí budou následně vyhodnoceny podle klinického hodnocení systému pro TEFI (Xu H. et al. Exp Eye Res. 2008;87:319-26). Během vyšetření budou zvířata krátkodobě anestetizována 2,5 % izofluranem ve směsi vzduchu obohacené kyslíkem (s průtokem kyslíku 0,4 l/min) inhalovaným maskou a zornice budou dilatovány pomocí očních kapek s 1% tropikamidem a 1% atropin sulfátem (Paques M. et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007;48:2769-74). Vyšetření provedeme jeden den před imunizací (-1. den) a na 14. den imunizace, těsně před ukončením experimentu.
- **Ukončení experimentu:** myši budou usmrceny i.p. injekcí pentobarbitalu 250 mg/kg a následnou transkardiální perfúzí 0,01 M PBS (solný roztok pufovaný fosfátem). Zvířata budou podle skupin usmrcena ve fotopických nebo mezopických světelných podmínkách ve světelné části dne a ve stejnou hodinu. Po usmrcení budou odebrány cervikální lymfatické uzliny, slezina a obě oči, ze kterých budou pod mikroskopem izolovány sítnice. Provedení perfuze je nutné pro odběry sítnice bez kontaminace krvními leukocyty v sítnicových cévách.
- **Intravitreální injekce:** u EAU myši vystavených mezopické světelné intenzitě budeme 10. den po imunizaci aplikovat do jednoho oka intravitreální injekci Accell siRNA (GE Dharmacon, Lafayette, CO), která vyvolá utlumení exprese GNAT1 nebo receptoru pro vybraný neurotransmiter, jehož koncentrace v sítnici se ukáže být zvýšena během mezopického osvětlení. Do druhého oka bude aplikována kontrolní Accell siRNA, nekódující žádný gen. Objem intravitreální injekce bude 1 µl a dávka siRNA bude 100 µM rozpuštěných ve sterilním a RNáz zbaveném 0,01 M PBS. K injekci použijeme skleněnou kapiláru o průměru 100 µm. Během provádění intravitreální injekce budou myši anestetizovány 2,5% isofluranem ve směsi kyslíku inhalovaného maskou. Po injekci bude na místo vpichu aplikováno lokální anestetikum 0,5% bupivakain a oční antibiotická mast s obsahem bacitracinu. Myši budou poté opět umístěny pod mezopickým osvětlením až do 14. dne po imunizaci.
- **Intraperitoneální (i.p.) injekce:** u EAU myši vystavených mezopické světelné intenzitě budeme aplikovat denně inhibitory gap junctions: oktanol (300 mg/kg) a karbenoxolon (100 mg/kg) i.p. od 10. až 14. dne po imunizaci. Oktanol bude rozpuštěný ve sterilním triglyceridovém oleji a karbenoxolon v 0,9 % fyziologickém roztoku. Tyto dávky byly vybrány na základě předchozích publikovaných výsledků (Ayer R et al. Brain Res. 2010; 1315: 150-158). Antagonisté receptorů pro vybraný neurotransmiter, jehož koncentrace v sítnici se ukáže být zvýšena během mezopického osvětlení, budou podávány i.p. od 10. až 14. dne po imunizaci, v dávkách podle literárního zdroje z Medline. Kontrolní skupina EAU myši vystavených mezopické světelné intenzitě dostane i.p. injekci rozpouštědel účinných látek.
- **Stanovení permeability HRB:** na závěr experimentu (den 14 po imunizaci) budou EAU myši anestetizovány 2,5% isofluranem ve směsi kyslíku inhalovaného maskou a následně bude podán do ocasní žíly roztok Evansovy modře v dávce 30 mg/kg. Po 90 minutách cirkulace barviva budou myši usmrceny i.p. injekcí pentobarbitalu 250 mg/kg. Následně bude otevřena hrudní dutina a myši budou transkardiálně perfundovány normálním fyziologickým roztokem dle publikovaného postupu (Xu H et al. Exp Eye Res. 2008; 87(4):319-26). Ihned po perfúzi budou obě oči enukleovány a odebrány sítnice pro stanovení koncentrace Evansovy modře.
- **Chirurgické odstranění horních krčních ganglií:** myši ve věku 6 týdnů podstoupí bilaterální odstranění horních krčních ganglií v izofluranové anestézii v koncentraci 2,5% ve směsi kyslíku inhalovaného maskou. Ganglia budou vyříznuta transekcí cervikálních sympatických preganglionických nervů a postgangliových nervů vedoucích k vnitřní a zevní karotidě dle publikované metodiky (Savastano LE. et al. J Neurosci Methods 2010; 192:22-33). U kontrolních myši bude provedena sham operace bez odstranění ganglií. EAU bude navozena jeden týden po chirurgickém zákroku a myši budou umístěny v mezopických světelných podmínkách až do 14. dne po imunizaci. Odstranění horních krčních ganglií provedeme pouze v případě, když zjistíme významně změněné hladiny noradrenalinu nebo adrenalinu (jako potenciálních neurotransmiterů ovlivňujících fenotyp endotelových buněk) v sítnici v odpovědi na mezopickou intenzitu osvětlení. Tento experiment bude nutný, abychom vyloučili vliv světelné intenzity na sympatický nervový systém, protože zdrojem noradrenalinu a adrenalinu v sítnici mohou být jak amakrinní nebo horizontální buňky sítnice (Chen Z et al., Curr Eye Res. 1999;18:39-48; Hadjiconstantinou M et al., J Neurochem 1983;41:1440-1444; Ishimoto I et al., Neurosci Res 1989;7:257-263; Park DH et al., Brain Res 1988;460:352-355), tak postgangliová vlákna horních krčních ganglií, která inervují nejněvnitřnější vrstvu sítnicových cév (Furukawa H. Invest Ophthalmol Vis Sci 1987;28:1752-1760).

Časový plán jednotlivých fází pokusů na pokusných zvířatech včetně předpokládaného data jeho ukončení

Pokus se uskuteční od 12. 2. 2018 do konce roku 2020. Před vlastním pokusem proběhne minimálně týdenní aklimatizace zvířat.

Rok 1 (2018):

- (1) Vyhodnocení vlivu mezopické a fotopické světelné intenzity na rozvoj EAU (počet zvířat: 60): v bodech (i) až (iv) proběhne 4x indukce EAU v mezopických podmínkách a na 10. den po imunizaci rozdělení zvířat na skupiny – EAU a/nebo neimunizovaná kontrola v mezopických podmínkách a EAU a/nebo neimunizovaná kontrola ve fotopických podmínkách
- (i) analýza klinického skóre EAU s využitím digitálních obrazů očního pozadí (in vivo, -1. a 14. den EAU), usmrcení zvířat (14. den EAU) a odběr sítnice pro histologickou analýzu: celkem 10 zvířat (2 EAU skupiny; 5 zvířat na skupinu)
- (ii) usmrcení zvířat (14. den EAU) a odběr sítnice pro analýzu počtu imunitních buněk CD4+, CD8+ a CD11b+ infiltrovaných v sítnici průtokovou cytometrií nebo fluorescenční imunohistochemií a odběr sleziny a cervikálních uzlin pro analýzu počtů imunitních buněk a aktivačního stavu CD4+ T lymfocytů v slezině a cervikálních lymfatických uzlinách: celkem 16 zvířat (2 EAU skupiny; 5 zvířat na skupinu a 2 skupiny neimunizovaných kontrol; 3 zvířata na skupinu)
- (iii) usmrcení zvířat (14. den EAU) a odběr sítnice pro izolaci endotelových buněk sítnicových cév ke zjištění míry zánětlivého fenotypu – genové exprese prozánětlivých cytokinů a chemokinů: celkem 12 zvířat (2 EAU skupiny; 6 zvířat na skupinu) a proteinové exprese prozánětlivých cytokinů a chemokinů: celkem 12 zvířat (2 EAU skupiny; 6 zvířat na skupinu)
- (iv) stanovení permeability HRB – usmrcení zvířat (14. den EAU) a odběr sítnice pro zjištění koncentrace Evansovy modře v sítnici: celkem 10 zvířat (2 EAU skupiny; 5 zvířat na skupinu)
- (2) Výzkum vlivu nervové aktivity zprostředkované tyčinkami na zánět sítnice a infiltraci imunitních buněk u EAU myši exponovaných mezopickému osvětlení - vyhodnocení rozvoje EAU po inhibici fototransdukce v tyčinkách (intravitreální injekce siRNA pro gen GNAT1) a po aplikaci inhibitorů přenosu signálu z tyčinek na čípky (i.p. oktanol a karbenoxolon). V těchto experimentech provedeme pro každou genetickou nebo farmakologickou intervenci stejné analýzy jako v bodě 1 (i) až (iv) s použitím pouze 2 skupin zvířat (5 – 6 zvířat na skupinu) – EAU v mezopických podmínkách s intervencí a bez intervence (počet zvířat pro všechny 3 intervence: 162).

Rok 2 (2019):

- (3) Určení změny hladin neurotransmiterů sítnice během mezopického a fotopického osvětlení. Skupiny: neimunizované kontroly v mezopických podmínkách, které budou od 10. dne rozděleny na 2 skupiny – kontroly ustájeny v mezopických podmínkách a kontroly ustájeny ve fotopických podmínkách. Na 14. den pokusu budou zvířata usmrcena a následně budou odebrány sítnice pro přípravu homogenátů, ve kterých se bude stanovovat koncentrace 9 neurotransmiterů (viz zdůvodnění pokusu). Vzhledem k velikosti sítnice se budou muset vzorky poolovat dohromady (aspoň 4 sítnice, tj. 2 zvířata) a pro analýzu každého neurotransmiteru bude nutné pokus s 8 zvířaty na skupinu opakovat. Celkem použijeme 144 zvířat.
- (4) Určení buněčného zdroje neurotransmiterů sítnice ovlivněných mezopickým osvětlením. Skupiny: neimunizované kontroly v mezopických podmínkách, které budou od 10. dne rozděleny na 2 skupiny – kontroly ustájeny v mezopických podmínkách a kontroly ustájeny ve fotopických podmínkách. Na 14. den pokusu budou zvířata usmrcena a následně budou odebrány sítnice pro imunohistochemické analýzy (minimálně 10 různých fluorescenčních barvení). Použijeme 4 zvířata na skupinu pro každý neurotransmiter (v případě analýzy buněčného zdroje 9 neurotransmiterů použijeme celkem 72 zvířat).

Rok 3 (2020):

- (5) Vyhodnocení významu identifikovaného neurotransmiterového systému (body 3 a 4) pro indukci zánětlivého fenotypu endotelových buněk HRB a vznik EAU – zjištění účinku podávání blokátorů receptorů identifikovaného neurotransmiteru (i.p. injekce) a/nebo siRNA (intravitreální injekce), která utlumí genovou expresi příslušných receptorů a/nebo efektu odstranění horních krčních ganglií na rozvoj EAU během mezopického osvětlení. V těchto experimentech použijeme 2 skupiny zvířat – EAU v mezopických podmínkách s terapeutickou intervencí a bez intervence a pro každou intervenci provedeme stejné analýzy jako v bodě 1 (i) až (iv) s počtem zvířat 54 na 1 intervenci (celkem na 3 intervence: 162 zvířat).

Pokusné nebo pozorovací strategie a statistický plán pro minimalizaci počtu pokusných zvířat, jejich bolesti, utrpení a strachu a případného dopadu na životní prostředí

<p>Plán pokusů vznikl na základě předchozích výsledků naší pilotní studie a na základě dat z dosud publikované literatury. Pokusy jsou naplánovány tak, abychom minimalizovali počet pokusných zvířat. Vzhledem k malé velikosti tkáně sítnice je nutné pro každou analýzu v sítnici (histologickou, fluorescenční imunohistochemickou analýzu, průtokovou cytometrii, analýzu permeability HRB, izolaci endotelových buněk sítnicových cév, stanovení genové či proteinové exprese, stanovení koncentrace neurotransmiterů) odebrat celou sítnici. Pro každou výše uvedenou analýzu použijeme maximálně 5-8 zvířat na skupinu, což je nevyhnutný počet pro standardní statistickou analýzu (t-test). Abychom minimalizovali počet zvířat použitých v tomto projektu, nebudeme používat skupiny intaktních (neimunizovaných) zvířat v analýzách vlivu mezopické a fotopické světelné intenzity na EAU, tedy použijeme pouze 2 skupiny: myši s EAU vystavené mezopickému osvětlení a fotopickému osvětlení. Za účelem minimalizace bolesti a utrpení budeme sledovat akutní fázi EAU (den 14. po imunizaci; první klinické příznaky EAU nastávají od 11. dne) a ne chronickou. Všechny chirurgické zákroky budeme provádět v celkové anestézii a po ukončení zákroku budeme podávat na traumatizované místo lokální anestetika (např. bupivakain) a antibiotika (např. bacitracin). Stav myši budeme denně monitorovat a v případě rozvoje závažných bolestivých stavů nebo infekce, bude zvíře neprodleně usmrceno cervikální dislokací. Rovněž neinvazivní vyšetření očního pozadí provedeme v celkové anestézii, abychom předešli strachu a stresové reakci zvířat. Dále pro minimalizaci počtu zvířat s EAU použijeme v analýzách vlivu mezopického a fotopického osvětlení na koncentraci neurotransmiteru v sítnici pouze intaktní (neimunizované) myši. Hodnocení účinku neurotransmiteru, jehož koncentrace se bude vlivem světelné intenzity měnit, na fenotyp vaskulárních endotelových buněk, budeme testovat na buněčné kultuře endotelových buněk. Až po identifikaci vhodného neurotransmiteru, který bude vykazovat prozánětlivý účinek na fenotyp endotelových buněk, budeme inhibovat příslušný neurotransmiterový systém v sítnici EAU myši vystavených mezopickému osvětlení.</p>												
<p>10. Navrhovaná klasifikace závažnosti pokusů - odpovídající zařazení zaškrtněte (x) do prázdného políčka; v pravé části návrh zdůvodněte</p> <table border="1" data-bbox="159 757 1492 981"> <tr> <td data-bbox="159 757 247 790"></td> <td data-bbox="247 757 624 790">Zvíře nenabude vědomí</td> <td data-bbox="624 757 1492 790"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="159 790 247 824"></td> <td data-bbox="247 790 624 824">Mírné</td> <td data-bbox="624 790 1492 824"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="159 824 247 947">X</td> <td data-bbox="247 824 624 947">Střední</td> <td data-bbox="624 824 1492 947">Pokusy zahrnují krátkodobý chirurgický zákrok v celkové anestézii za účelem podání intravitreální injekce nebo odstranění horních krčních ganglií. Podání Evansovy modře do ocasní žíly a vyšetření očního pozadí rovněž vyžaduje celkovou anestézii.</td> </tr> <tr> <td data-bbox="159 947 247 981"></td> <td data-bbox="247 947 624 981">Závažné</td> <td data-bbox="624 947 1492 981"></td> </tr> </table>		Zvíře nenabude vědomí			Mírné		X	Střední	Pokusy zahrnují krátkodobý chirurgický zákrok v celkové anestézii za účelem podání intravitreální injekce nebo odstranění horních krčních ganglií. Podání Evansovy modře do ocasní žíly a vyšetření očního pozadí rovněž vyžaduje celkovou anestézii.		Závažné	
	Zvíře nenabude vědomí											
	Mírné											
X	Střední	Pokusy zahrnují krátkodobý chirurgický zákrok v celkové anestézii za účelem podání intravitreální injekce nebo odstranění horních krčních ganglií. Podání Evansovy modře do ocasní žíly a vyšetření očního pozadí rovněž vyžaduje celkovou anestézii.										
	Závažné											
<p>11. Uplatnění metod v zájmu nahrazení a omezení používání pokusných zvířat a šetrného zacházení s nimi (3R)</p> <p>Nahrazení zvířat (Replacement) Možnosti nahrazení zvířat alternativními metodami byly důkladně prohledány v databázi Medline. Na základě vyhodnocení současné literatury a poznatků, prohlašujeme, že vzhledem k charakteru pokusu, ve kterém budou studovány projevy EAU (např. infiltrace imunitních buněk z cirkulace do sítnice, zánět sítnicových cév a sklivce, odtok papily optického nervu, odchlípení sítnice) a vliv světelné intenzity, tyčinkové nervové dráhy, nebo neurotransmiterového systému na tyto patologické změny, není možné pokusná zvířata nahradit alternativními modely in vitro/in situ a ani pokus modelovat počítačovým programem. V případě stanovení účinku neurotransmiteru, jehož koncentrace se bude vlivem světelné intenzity měnit, na fenotyp vaskulárních endotelových buněk, nahradíme zvířata buněčnou kulturou endotelových buněk.</p> <p>Omezení počtu zvířat (Reduction) Snížení počtu zvířat je dosaženo plánovaným designem pokusu, využitím inbredních myši kmene C57BL/6J, které jsou citlivé k rozvoji EAU a použitím vhodné statistiky.</p> <p>Šetrné zacházení se zvířaty (Refinement) Se zvířaty budou pracovat a manipulovat zkušení pracovníci, anestezie bude monitorována (dechová a srdeční frekvence, korneální reflex, teplota těla, obranné reflexy) a každých 15 min vyhodnocována. Pooperačně bude aplikován rehydratační roztok (Ringerův roztok 10 ml/kg s.c.) a zvířata budou sledována do úplného probuzení. V případě intravitreální injekce bude pooperačně na traumatizované místo aplikováno lokální anestetikum (bupivakain) a antibiotická mast (bacitracin).</p>												
<p>12. Plánované použití znečitlivění, prostředků snižujících bolest nebo jiných metod tlumících bolest; zdůvodnění jejich případného nepoužití</p> <p>Vyšetření očního pozadí, intravitreální injekce, podání Evansovy modře do ocasní žíly a odstranění horních krčních ganglií proběhnou pod celkovou inhalační anestézií 2,5% isofluranem ve směsi vzduchu obohacené kyslíkem (s průtokem kyslíku 0,4 l/min) inhalovaném maskou. Po odstranění horních krčních ganglií bude bolest tlumena jednorázovým podáním lidokainu (2 mg/kg) do místa incize a dále po dobu 2 dní subkutánní injekcí buprenorfinu (0,1 mg/kg každých 12 hod).</p>												
<p>13. Hlavní operační vybavení, operační postupy a způsoby pooperační péče minimalizující bolest a stres zvířete</p> <p>Ústav plně disponuje operačním vybavením pro operační techniky a pooperační péči. Do zotavení z anestezie budou zvířata pod zvýšeným dohledem, případná pooperační bolest bude tlumena pouze krátkodobě, aplikací lokálních anestetik (např. bupivakain), kvůli možnému ovlivnění systémové imunitní reakce.</p>												
<p>14. Způsob naložení s pokusnými zvířaty po ukončení pokusu - usmrcení, převedení do chovu (jakého?), opětovné použití, při opětovném použití jeho kumulativní dopad na daná pokusná zvířata</p> <p>Zvířata budou na závěr pokusu předávkována anestetiky, transkardiálně perfundována a usmrcena.</p>												
<p>15. Metody usmrcování pokusných zvířat - odpovídající metody zaškrtněte (x) do prázdného políčka</p> <table border="1" data-bbox="159 2029 1492 2094"> <tr> <td data-bbox="159 2029 247 2063">x</td> <td data-bbox="247 2029 1492 2063">Předávkování anestetikem</td> </tr> <tr> <td data-bbox="159 2063 247 2094"></td> <td data-bbox="247 2063 1492 2094">Upoutaný projektil</td> </tr> </table>	x	Předávkování anestetikem		Upoutaný projektil								
x	Předávkování anestetikem											
	Upoutaný projektil											

	Oxid uhličitý
	Zlomení vazů
	Tupý úder do hlavy
	Oddělení hlavy od trupu
	Omráčení elektrickým proudem
	Inertní plyny (Ar, N ₂)
	Zastřelení volným projektilem odpovídající střelnou zbraní a střelivem
	Jiná metoda - žádost o udělení výjimky - níže zdůvodněte
16.	Původ pokusných zvířat - uveďte všechny předpokládané zdroje; u pokusných zvířat z volné přírody udávejte co nejpřesněji lokalitu (lokality) jejich odchytu
	Chovatelské a dodavatelské zařízení: VELAZ, s.r.o. Osvědčení číslo: č.j. 70029/2013-MZE-17214 ze dne 29. 10. 2013 na dobu 5 let. Sídlo: Únětice č.p. 139, 252 62 Únětice Odběr zvířat: Lysolajské údolí 15/53, 165 00 Praha 6 IČO: 25691970 DIČ: CZ25691970 Kontaktní zástupce: Mgr. Marek Baxa
17.	Podmínky umístění a chovu pokusných zvířat a péče o ně včetně obohacení prostředí
	Zvířata budou ustájena v samostatné místnosti zvěřince Ústavu normální, patologické a klinické fyziologie, 3. LF UK s kontrolovanou stálou teplotou (22 ± 2 °C), vlhkostí (40 - 60%) a světelným režimem (12 h světlo (230 lux nebo 3 lux)/ 12 h (0 lux) tma) splňujícím standardní požadavky chovu myši. Zvířata budou skupinově umístěna do chovných nádob (4-5 myši/nádoba) z transparentního polykarbonátu (365 x 205 x 140 mm) a drátěným víkem s integrovaným krmítkem a dělicí příčkou pro nádobu na vodu. Standardní krmná směs pro myši a voda budou dostupné ad libitum. Do chovných nádob budou umístěny tunely z kartonu pro obohacení prostředí. Čištění chovných nádob a výměna podestýlky proběhne 2-3x týdně, čištění místnosti 1x týdně.
18.	Způsob značení pokusných zvířat v pokusu
	Označení uší pomocí ušních děrovacích kleští pro myši + označení chovných nádob.
19.	Uvedení zdravotního rizika pro další pokusná zvířata a pro zaměstnance
	Bez zvláštních/specifických rizik.
20.	Pokus bude proveden za podmínek správné laboratorní praxe (je-li to požadováno jinými právními předpisy – např. zákon o léčivech, zákon o chemických látkách a chemických přípravcích) - <i>správnou variantu zaškrtněte (x) do prázdného políčka</i>
	Ano
	<input checked="" type="checkbox"/> Ne
21.	Datum
	Razítko a podpis žadatele
	prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.
	Podpis vedoucího projektu pokusů

Poznámky:

- 1) § 2 písm. c) vyhlášky č. 136/2004 Sb., kterou se stanoví podrobnosti označování zvířat a jejich evidence a evidence hospodářství a osob stanovených plemenářským zákonem, ve znění pozdějších předpisů.
- 2) Vyplní se jen v případě, je-li odlišná od statutárního orgánu.

Tuto tabulku vyplňuje odborná komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat

STANOVISKO ODBORNÉ KOMISE PRO ZAJIŠŤOVÁNÍ DOBRÝCH ŽIVOTNÍCH PODMÍNEK POKUSNÝCH ZVÍŘAT K PŘEDLOŽENÉ ŽÁDOSTI		
Projekt pokusu odpovídá zákonu 246/1992 Sb.		
Členové odborné komise		Datum
Jméno, popřípadě jména a příjmení	Podpis	
Prof. MUDr. Romana Šlamberová, CSc.		
Doc. MVDr. Šimon Vaculín, Ph.D.		
Doc. MUDr. Miloslav Franěk, Ph.D.		

Tuto tabulku vyplňuje státní orgán příslušný ke schvalování projektů pokusů

Státní orgán příslušný ke schvalování projektů pokusů potvrzuje, že tento projekt pokusů byl schválen rozhodnutím – číslo jednací, spisová značka, ze dne	
Razítko a podpis státního orgánu příslušného ke schvalování projektů pokusů	

Přílohy žádosti:

- a) netechnické shrnutí projektu pokusů,
- b) plná moc osoby zmocněné k zastupování ve správním řízení,
- c) doložení kvalifikace (kopie potřebných dokladů) všech osob uvedených v bodě 3,
- d) veterinární podmínky pro provádění pokusů na pokusných zvířatech stanovené příslušnou krajskou veterinární správou v případech uvedených v jiném právním předpise (zákon č. 166/1999 Sb., veterinární zákon).

Tuto tabulku vyplňuje odborná komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat až po schválení projektu pokusů státním orgánem příslušným ke schvalování projektů pokusů

SOUHLAS ODBORNÉ KOMISE PRO ZAJIŠŤOVÁNÍ DOBRÝCH ŽIVOTNÍCH PODMÍNEK POKUSNÝCH ZVÍŘAT K ZAHÁJENÍ PROJEKTU POKUSŮ		
Členové odborné komise		
Jméno, popřípadě jména a příjmení	Podpis	Datum

NETECHNICKÉ SHRNU TÍ PROJEKTU POKUSŮ	
Název projektu pokusů	
Uloha nervové aktivity sítnice v patogenezi autoimunitní uveitidy	
Doba trvání projektu pokusů	02/2018 – 31/12/2020
Klíčová slova - maximálně 5	Experimentální autoimunitní uveitida, nervová aktivita, sítnice, hemato-retinální bariéra, světelná intenzita
Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka	
<input checked="" type="checkbox"/>	základní výzkum
<input type="checkbox"/>	translační nebo aplikovaný výzkum
<input type="checkbox"/>	vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
<input type="checkbox"/>	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
<input type="checkbox"/>	zachování druhů
<input checked="" type="checkbox"/>	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
<input type="checkbox"/>	trestní řízení a jiné soudní řízení
Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)	
1) Zodpovědět výzkumné otázky týkající se možnosti vlivu nervové aktivity sítnice stimulované různou světelnou intenzitou na porušení homeostázy hemato-retinální bariéry a patogenezi autoimunitní uveitidy. 2) Identifikovat nervovou dráhu, resp. neurotransmiterový systém sítnice zodpovědný za indukci prozánětlivého fenotypu endotelových buněk hemato-retinální bariéry a zvýšené riziko vzniku uveitidy.	
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)	
Přínos je zejména experimentální s možným využitím získaných poznatků pro určení nových rizikových faktorů a terapeutických strategií autoimunitní uveitidy u lidí.	
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá	
Laboratorní myš C57BL/6J, 600 zvířat během 3 let, samci a samice.	
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?	
Od doby nástupu klinických projevů uveitidy mohou zvířata pociťovat bolest oka. Všechny navrhované operační techniky, včetně podávání intravitreálních injekcí a vyšetření očního pozadí pomocí endoskopu proběhnou pod celkovou anestézií. Závažnost je střední. Pokusy budou ukončeny usmrcením zvířete předávkováním anestetik a následnou transkardiální perfúzí.	
Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)	
Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.	
Autoimunitní zánět sítnice a účinek nervové aktivity sítnice na homeostázu hemato-retinální bariéry a projevy uveitidy nelze nahradit alternativními modely in vitro. Sledování vlivu neurotransmiterů na fenotyp vaskulárních endotelových buněk bude provedeno na buněčné linii.	
Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.	
Použijeme minimální počet zvířat na skupinu (5-8 zvířat), který umožňuje validní statistické zpracování. Budeme používat inbrední kmen myši a operační zákroky bude provádět zkušený personál, čímž snížíme nutnost opakování pokusů.	
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.	
Uveitida u C57BL/6J myši je vhodným a často používaným modelem autoimunitní zadní uveitidy u lidí. Ve studii budeme sledovat pouze ranní fázi uveitidy, před dosažením vrcholu symptomů onemocnění, abychom minimalizovali utrpení zvířat. Pro aplikaci testovaných látek jsou zvoleny netoxické dávky. Zvířata budou denně monitorována zkušenými odborníky a v případě výskytu atypických příznaků bude jejich zdravotní stav konzultován s veterinárním lékařem.	