

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 83/2019

Název projektu pokusů

Role Toll-like receptorové signalizace v iniciaci sterilního zánětu

Doba trvání projektu pokusů 5 let

Klíčová slova - *maximálně 5* PSTPIP2, chronická multifokální osteomyelitida, autoinflatorní choroba, MyD88, Trif

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 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)

Cílem projektu je stanovit roli Toll-like receptorové signalizace ve vzniku a rozvoji autoinflatorní osteomyelity u Pstpip2-deficientních myší.

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)

Hlavním přínosem bude rozšíření našich poznatků o molekulárních mechanismech a patofyziologii autoinflatorních chorob, zejména chronické multifokální osteomyelity a příbuzných nemocí. Výsledky mohou být důležité i pro budoucí vývoj nových léčebných strategií. Poznatky získané v rámci tohoto projektu budou také přispívat k našemu obecnému chápání regulace zánětu na molekulární úrovni a přispějí k poznání, jakými mechanismy Toll-like receptory přispívají ke sterilní zánětlivé odpovědi.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

V projektu pokusů bude využito několik unikátních inbredních kmenů myši domácí (*Mus musculus*) a jejich kříženci konkrétně půjde o (přibližně za rok):

- 1) Mutantní myši kmen CMO (Cg-Pstpip2cmo/J) s bodovou mutací v genu Pstpip2 (c.293T→C), jeho varianta vzniklá zpětným křížením na genetické pozadí C57BL/6 a jejich kříženci s kmeny uvedenými v bodech 2-3: 300
- 2) Knock-out myši s inaktivovaným genem Myd88 kódujícím adaptorový protein MyD88:100.
- 3) Knock-out myši s inaktivovaným genem Trif (Ticam-1) kódujícím adaptorový protein TRIF:100.
- 4) Kontrolní kmeny C57BL/6 a Balb/C: 150.

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

Tento projekt pokusů zahrnuje experimenty, které by mohly způsobit zvířatům utrpení, bolest nebo nadměrný stres maximálně v mírné nebo střední míře. Zvířata budou pravidelně monitorována tak, aby byla minimalizována bolest a utrpení a taktéž bude kontrolováno, jestli mají snadný přístup k potravě a vodě. Pro pokusy se nebudou využívat prostředky snižující bolest. Po skončení pokusu budou zvířata usmrcena odpovídající metodou (cervikální dislokace). Likvidace zvířat bude provedena asanační službou, se kterou má pracoviště smlouvu.

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

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

Alternativní metody nepostihují složitost zkoumané problematiky, a proto nemohou nahradit navrhované pokusy. Pokud se objeví nová alternativní metoda nezahrnující použití zvířat, bude použit tento přístup. Hlavním důvodem pro použití zvířat v tomto projektu je potřeba sledovat vliv ztráty signalačních molekul MyD88 a TRIF na vznik a rozvoj autoinflatorní choroby a její průvodní znaky, které lze sledovat pouze na organismální úrovni. Toto pozorování není možné uskutečnit na buněčných liniích ani jinými alternativními metodami. Navíc nejdůležitějším buněčným typem, který se podílí na vzniku nemoci v PSTPIP2 deficientních myších jsou neutrofilní granulocyty. Jde o krátce žijící buňky, pro které neexistuje buněčná linie, která by dostatečně věrně reprezentovala jejich vlastnosti zásadní pro rozvoj autoinflatorní CMO a kterou by bylo možné diferencovat do plnohodnotných neutrofilních granulocytů. Pokud tedy mají naše výsledky mít vysokou vypovídací hodnotu, potenciál pro využití v klinické praxi a šanci na publikaci v renomovaných časopisech, bude nezbytné i pro experimenty na molekulární a buněčné úrovni využívat primární neutrofile izolované z myší kostní dřeně. Nicméně i tak se budeme snažit o maximální využití buněčných linií v případech kdy jejich nedostatky neohroží hodnotu našich výsledků.

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

Počet zvířat použitých pro jednotlivé experimenty bude omezen na minimum. Experimenty budou pečlivě plánovány a bude použit minimální počet myší potřebný pro dosažení biologické a statistické signifikance a udržování jednotlivých myších linií v chovu. Všude, kde to bude možné, budeme u in vivo experimentů po usmrcení zvířat zároveň získávat tkáň pro další analýzy in vitro (takto redukuje celkový počet použitých myší na minimum).

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.

Utrpení, bolest a stres myši budou vždy omezeny na minimum. Myši budou chovány v optimálních podmínkách, které jsou stanoveny současnými regulacemi EU a místními zákony a vyhláškami. Myši budou pravidelně kontrolovány a ošetřovány proškolenými ošetřovateli. V případě zjevného utrpení, stresu nebo projevu nemoci přesahující deklarovanou závažnost pokusu budou pokusná zvířata okamžitě usmrcena odpovídající metodou (tedy cervikální dislokace podle Nařízení z roku 2010/63/EU Evropského parlamentu a Rady pro ochranu zvířat použitých pro vědecké účely) a následně budou analyzována. Odběr krve bude prováděn jenom zkušenými výzkumnými pracovníky. Při transplantačních studiích budou myši transplantovány při inhalační anestezii prostřednictvím retroorbitální injekce nebo injekcí do ocasní žíly bez anestezie. Transplantace bude provádět opět jenom osoba zkušená a trénovaná, čímž se míra utrpení a bolesti omezí na minimum.