

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 1/2019

Název projektu pokusů	
Signální kaskády a genetické změny při vzniku neurovývojových a neurodegenerativních onemocnění	
Doba trvání projektu pokusů	5 let
Klíčová slova - <i>maximálně 5</i>	Signální kaskády, autismus, epilepsie, Alzheimerova choroba
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)	
<p>Cílem studie je lepší pochopení molekulární podstaty neurovývojových a neurodegenerativních chorob jako autismus, epilepsie, schizofrenie a Alzheimerova choroby (A.ch.) a role genů rodiny CRMP (collapsin response mediator protein) v jejich pathogenezi. Mutace, či změny proteinů rodiny CRMP, či jejich signální dráhy byly totiž popsány u všech výše vyjmenovaných chorob. Nám se v rámci předešlých projektů podařilo připravit unikátní myší modely deficiencie genu CRMP2 (totální, nebo jen jedné z jeho izoform). Jejich křížením s mutacemi myšími liniemi dalších genů zapojených do CRMP signální kaskády (např. CDK5-p25 transgenní myši, Pin1knockoutní myši) a markerovými liniemi (např. YFP-transgenní myši pod neuron-specifickým promotorem) jsme vytvořili nové modely, umožňující detailní analýzu CRMP signální kaskády a jejich členů jednotlivě či kombinovaně, i jejich roli v patogenezi neurovývojových a neurodegenerativních onemocnění, jež je hlavním cílem předkládaného projektu pokusu.</p>	
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)	
<p>Prevalence neurovývojových chorob jako autismus, či neurodegenerativních chorob jako A.ch. v dnešní společnosti významně stoupá. Příčiny tohoto nárůstu nejsou jasné, je však důležité, že bylo ukázáno, že na molekulární úrovni mají obě skupiny onemocnění mnoho společného. Jedním z těchto průsečíků jsou regulátory metabolismu mikrotubulů – rodina CRMP, zapojená do regulace růstu a navádění axonů a dendritů během vývoje nervové soustavy a zároveň vytvářející nerozpustné agregáty u pacientů A.ch. Co způsobují defekty v těchto genech během vývoje nervové soustavy a co vede ke vzniku a šíření CRMP agregátů u A.ch. není ale jasné. My jsme vytvořili novou double mutantní myší linii s hyperaktivní kinázou CDK5 a chybějící prolyl izomerázou Pin1, jelikož podobné alterace těchto proteinů jsou typické i pro A.ch.. U těchto myší se nám podařilo ukázat zvýšenou akumulaci fosforylovaného mikrotubul-vázacího proteinu CRMP2 v nerozpustné frakci. CRMP2 protein je rovněž hyperfosforylován a agregován v mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou. Proto budeme v analýze této double mutantní myší linie pokračovat a v navrhovaných pokusech simulovat zvýšené riziko A.ch. indukci agregačních jader (injikace mozkových extraktů myších modelů A.ch) a traumatickým poškozením mozku. Výsledky těchto pokusů tedy významně přispějí k objasnění role proteinů CRMP rodiny v molekulárních změnách vedoucích k A.ch. in vivo. Analýza regulace této rodiny proteinů a její signální dráhy je proto významná pro pochopení patogeneze jak neurovývojových tak neurodegenerativních chorob.</p>	
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá	
<p>Pro pokusy budou využity mutantní (transgenní a gen-deficitní) inbrední linie myši laboratorní zapojené do CRMP signální dráhy jako:</p> <p>Pin1-KO myší linie deficitní na Pin1: 250 ks p25 tg (transgenní) myší linie (s hyperaktivní CDK5 kinázou): 250 ks. Pin1-KO x p25 tg double mutantní myší linie vzniklá křížením linií Pin1-KO a p25 tg.: 250ks CRMP2 KO myší linie deficitní na CRMP2: 300 ks CRMP2A KO myší linie deficitní na CRMP2A: 300 ks C57Bl/6J myší linie použita jako kontrola: 400ks BALB-C myší linie použita jako kontrola: 150ks YFP tg (transgenní) myší linie (reportérová linie s YFP (žlutý fluorescenční protein) pod neuron-specifickým</p>	

promotorem): 250 ks

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

Z důvodu modelování vážného traumatického poškození mozku u myši je projekt klasifikován v kategorii zavažný. U těchto pokusů může dojít k náhlému úmrtí zvířete. V případě mírného traumatického poškození mozku, injekcí mozkových extraktů, injekce protilátek, in utero elektroporace, či behaviorálních testů nejsou u myši očekávány žádné vážné nežádoucí účinky a obecně jsou tyto procedury dobře snášeny. Po skončení pokusu budou zvířata usmrcena a v žádném případě nebudou opětovně použita. Pracoviště má k dispozici veškeré nástroje a vybavení nezbytné pro provádění navrhovaných pokusů. Operace budou prováděny jen zkušeným personálem a s co nejmenším počtem zvířat. Operace budou prováděny na Fyziologickém ústavu AVČR, v akreditované místnosti pro práci se zvířaty (D050, D029). Po skončení pokusu budou zvířata usmrcena v souladu s vyhláškou 419/2012Sb.

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

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

Experimenty na pokusných zvířatech budou provedeny pouze tehdy, když jiná alternativní in vitro metoda nebude schopna použití pokusných zvířat nahradit. Transgenní a knockoutní myši linie jsou v současné době nejvhodnější modelové organismy pro studium molekulární podstaty vývoje, funkce (včetně chování) a patologie nervové soustavy savců. Definované mutace, cílené umlčování či nadprodukce specifických genů, umožňují studovat jejich specifické role při růstu neuronů, vytváření nervových spojů, jejich roli při tvorbě paměti, změnách chování, či vzniku neurodegenerativních onemocnění. Pro navrhované pokusy nelze kvůli komplexnosti vyvíjející se a dospělé nervové soustavy nahradit práci se zvířaty alternativními metodami. Dostupné in vitro modely nejsou pro tyto účely relevantní.

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 myši potřebný pro dosažení biologické a statistické signifikance. Ve všech případech, kdy to bude možné, budou použity in vitro testy na místo in vivo experimentů. Pro vytváření transgenních myši budou využívány inbrední linie, což sníží variabilitu a množství zvířat nutných pro dosažení statistické signifikance.

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.

Mutantní myši linie jsou v současné době nejrelevantnějším modelem pro skoumání patologií nervové soustavy. Myši budou chovány v optimálních podmínkách stanovených současnými lokálními a EU regulacemi. Zvířata budou po operaci umístěna na vyhřívanou podložku, bude jim zajištěn snadný přístup k vodě a potravě, a následně budou denně důsledně monitorována. Pro snížení bolesti jim bude podávána analgezie: Jednorázově po operaci subkutánně nesteroidní analgetikum Rimadyl (4mg/kg), lokálně Lidokain gel (u traumatických poškození mozku), a posléze Brufen do pitné vody po dobu 2-3 dnů (Brufen sirup, 20mg/kg, adekvátní množství přidané do lahvičky bude počítáno podle průměrného množství vypité vody/den – 4 ml. Vypité množství bude kontrolováno a v případě nutnosti bude upravena koncentrace analgetika v lahvičce). Experimenty budou prováděny jenom zkušenými výzkumnými pracovníky odborně způsobilými podle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.