

NETECHNICKÉ SHRNUTÍ PROJEKTU POKUSŮ	
<b>Název projektu pokusů</b>	
Stimulace proliferace pankreatických beta-buněk pomocí syntetických modifikovaných mRNA kódujících regulátory buněčného cyklu	
Doba trvání projektu pokusů	1.1. 2020 - 31.12. 2022
Klíčová slova - <i>maximálně 5</i>	beta-buňka, inzulín, diabetes, transplantace, buněčná terapie
<b>Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka</b>	
<input type="checkbox"/>	základní výzkum
<input checked="" 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
<b>Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)</b>	
Cílem projektu je vývoj a ověření nové metody léčby diabetu, založené na stimulaci proliferace pankreatických beta-buněk. K tomuto účelu budou použity syntetické mediátorové RNA kódující regulátory buněčného cyklu.	
<b>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)</b>	
Obnova inzulín produkující tkáně prostřednictvím stimulace proliferace pankreatických beta-buněk patří mezi jeden z nadějných způsobů léčby diabetu. Hlavním úskalím tohoto terapeutického přístupu je omezená míra přirozené proliferace beta-buněk, která dosahuje maximální úrovně 0,5%. Jako neefektivnější způsob stimulace proliferace beta-buněk se osvědčila aktivace exprese regulátorů buněčného cyklu. Po navození exprese vybraných regulátorů buněčného cyklu je možné dosáhnout proliferace až u 20-30% beta-buněk. Hlavní nevýhodou tohoto přístupu je nutnost vnesení genetické informace kódující příslušný gen do buňky. Vnesení příslušné genetické informace do buňky je zajištěno prostřednictvím virových nosičů, které mohou vyvolat řadu nežádoucích účinků, jako jsou zánětlivá imunitní odpověď, apoptóza či nádorové bujení. V rámci předloženého projektu hodláme využít zcela bezpečný způsob exprese regulátorů buněčného cyklu, založený na použití syntetických mediátorových RNA kódujících regulátory buněčného cyklu. Na rozdíl od stávajících způsobů stimulace proliferace beta-buněk založených na využití virových nosičů se jedná o principiálně bezpečnou metodu, u které nemůže dojít k ovlivnění buněčné DNA a tím ani k potenciálnímu vyvolání nádorového bujení. Vzhledem k vysoké míře incidence diabetu se jedná o výzkum, který by mohl výrazně rozšířit stávající způsoby léčby tohoto závažného onemocnění.	
<b>Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá</b>	
Navrhovaný projekt předpokládá s využitím potkanů kmene Brown-Norway/Crl jako dárců Langerhansových ostrůvků/pankreatických beta-buněk a imunodeficitních myši kmene Crl:CD1-Foxn1nu jako diabetických příjemců beta-buněk expandovaných <i>ex vivo</i> . Pro účely získání Langerhansových ostrůvků/pankreatických beta-buněk bude během celého projektu použito 150 potkanů. Pro ověření schopnosti <i>ex vivo</i> expandovaných beta-buněk vyléčit experimentální diabetes bude použito celkem 60 imunodeficitních myší. Myši budou rozděleny do 4 skupin. Po navození diabetu bude v celkové anestezii provedena transplantace Langerhansových ostrůvků/ <i>ex vivo</i> expandovaných beta-buněk pod renální kapsulu. Pro ověření schopnosti <i>ex vivo</i> expandovaných beta-buněk vyléčit experimentální diabetes bude průběžně monitorována glykémie v průběhu 1 měsíce po transplantaci a bude rovněž proveden intraperitoneální glukózový toleranční test.	
<b>Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?</b>	
Jediným nežádoucím účinkem plynoucím z navrhovaného projektu je možnost vyvolání hyperglykemie po navození diabetu. Míra závažnosti plynoucí z přetrvávající hyperglykemie je vzhledem k poměrně krátké době pokusu nízká až střední. Po ukončení pokusu budou zvířata usmrcena v souladu se zákonem č.246/92 Sb. přerušením cirkulace v celkové anestezii. Likvidace těl zvířat usmrcených během pokusu a po ukončení experimentu je zajištěna asanační firmou - odvoz do kafilerie.	
<b>Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)</b>	
<b>Nahrazení používání zvířat:</b> Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.	
Navrhovatel prohlašuje, že projekt nelze nahradit alternativní technikou, protože neexistuje žádný <i>in vitro</i> model, který by uměl ověřit schopnost <i>ex vivo</i> expandovaných beta-buněk vyléčit diabetes. Rovněž neexistuje stabilní buněčná linie, kterou by bylo možné využít jako zdroj pankreatických beta-buněk pro studium stimulace jejich proliferace.	
<b>Omezení používání zvířat:</b> Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.	
V rámci studie bude využit minimální počet zvířat nutných pro vytvoření statisticky významného souboru. V seznamu	

ECVAM schválených alternativních metod neexistuje žádný alternativní model, který by mohl nahradit *in vivo* model léčby experimentálního diabetu.

**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.**

Imunodeficitní Crl:CD1-Foxn1nu nude myš je ideálním modelem pro studium xenotransplantovaných buněk pocházejících od jiných živočišných druhů. CD-1 Nude myši postrádají thymus a nejsou tudíž schopny produkovat T-lymfocyty. Tím je zabráněno vzniku rejekce po transplantaci buněk jiného živočišného druhu. CD-1 Nude myši jsou vhodné rovněž z hlediska snadného navození diabetu pomocí podání streptozotocinu.

Potkani kmene Brown-Norway/Crl byli zvoleni jako vhodní dárci z důvodů možnosti získat dostatečné množství Langerhansových ostrůvků, které je potřebné pro ověření schopnosti *ex vivo* expandovaných beta-buněk vyléčit experimentálně navozený diabetes.

Všechny operační výkony budou prováděny v celkové anestezii, pooperační péče bude prováděna v dostatečné analgezií. Zvířata budou mít volný přístup k potravě a tekutinám. Glykémie se bude měřit z minimálního množství kapky krve odebrané tenkou jehlou z ocasní žíly. V pokuse budou využity operační standardy shodné s humánní medicínou a manipulace se zvířaty bude prováděna v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, tak aby byla zajištěna maximální pohoda a dobrý zdravotní stav pokusných zvířat.