

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569	
Název projektu pokusů	
Studium potenciálních diagnostik a terapeutik Alzheimerovy choroby u laboratorních myší	
Doba trvání projektu pokusů - v měsících	60
Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾	Alzheimerova choroba, neurotoxicita, Aβ plakety, mutace v APP a PS1 genech, behaviorální testy
Účel projektu pokusů - zaškrtněte políčko; možno i více možností	
☒	základní výzkum
☐	translační a aplikovaný výzkum
☐	kontrola kvality (včetně zkoušení bezpečnosti a účinnosti šarže)
☐	legislativní účely
☐	jiné zkoušení účinnosti a tolerance
☐	a běžná výroba
☐	zkoušení toxicity a jiné zkoušky bezpečnosti včetně farmakologie
☐	běžná výroba
☐	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
☐	zachování druhů
☐	vyšší vzdělávání
☐	odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí
☐	trestní řízení a jiné soudní řízení
☐	udržování populací ustálených geneticky upravených zvířat, která nebyla použita v jiných pokusech
Cíle projektu pokusů - např. řešení některých vědeckých neznámých nebo vědeckých či klinických potřeb	
Naše práce je primárně zaměřena na identifikaci a testování nových potenciálních terapeutik. Cílem studie je aplikovat tyto látky transgenním myším, u kterých se Alzheimerova choroba vyvine během krátké doby a sledovat zda dochází, a jestli ano, v jaké míře k pozdějšímu nástupu onemocnění, tj. zpomalení tvorby Aβ plaků a snížení zánětlivých procesů. Součástí projektu je studium farmakokinetiky a farmakodynamiky vybraných radioaktivně značených ligandů pro včasnou diagnostiku Alzheimerovy choroby pomocí zobrazovacích metod (PET/CT). Tomografická vyšetření (PET) umožňují prostorová zobrazení funkčních vlastností jednotlivých tkání a orgánů. S výhodou se využívá kombinace s CT, které detailně vykreslí tvary a strukturu jednotlivých orgánů.	
Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů - jak by mohlo být dosaženo vědeckého pokroku nebo jaký přínos by z něj člověk, zvířata či životní prostředí mohli mít; v příslušných případech rozlišujte mezi krátkodobými (v době trvání projektu) a dlouhodobými přínosy (mohou se projevit až po skončení projektu)	
Případná identifikace látek, které by měli možnost ovlivnit/zpomalit tvorbu Aβ plaků a zánětlivých procesů, resp. zmírnit vliv choroby na chování transgenních myší, hlavně jejich prostorovou orientaci a paměť, posune dané látky do dalšího stupně výzkumu a současně může znamenat progres v léčbě pacientů s Alzheimerovou chorobou.	
Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání	
V pokusu bude testován nejvhodnější (1) způsob podání; (2) dávka a (3) doba podávání potenciálního léčiva, farmakokinetika. Maximálně jednorázově podaný objem látky: i.v. - max. 5 ml/kg do laterální ocasní žíly, s.c. - max. 40 ml/kg, i.p. - max. 2 ml, i.m. - max. 0,03-0,05 ml na stranu, r.o. - max. 200 µl (maximálně 2-krát do jednoho očního splavu s denním odstupem), p.o. - max. 10-20 ml/kg. Výše uvedené aplikace nevyžadují anestezii ani tlumení bolesti, jedná se o běžnou injekční aplikaci s dodržением zásad sterilní aplikace s výjimkou retroorbitálního podání (r.o.), které se vykoná v celkové inhalační anestezii. Perorální aplikaci může předcházet (a) hladovění: laboratorní myš – 4 hodiny; a (b) restrikce krmiva po aplikaci: zvířata zůstávají 3 - 4 hodiny bez potravy po perorální aplikaci testované látky. Případné větší objemy budou aplikovány frakcionovaně po dobu 24 hodin. Studované látky budou pokusným zvířatům podávány ve formě izotonických roztoků s fyziologickým pH. U experimentů s radioaktivně značenými látkami budou pokusným zvířatům jednorázově i.v. podávány radioaktivně značené látky o objemech max. 5 ml/kg do laterální ocasní žíly nebo max. 200 µl retroorbitálně. Studované látky budou pokusným zvířatům podávány ve formě izotonických roztoků s fyziologickým pH v maximálně µg množstvích.	

Čestnost podání:

a) v případě i.v., i.m. a p.o. aplikace maximálně 1x denně po dobu 5 dní, poté bude následovat minimálně 2 denní přestávka,

b) v případě s.c. a i.p. aplikace maximálně 2x denně po dobu 5 dní, poté bude následovat minimálně 2 denní přestávka.

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) **a doba trvání těchto účinků**

Očekávané nežádoucí účinky u zvířat: úbytek hmotnosti (max. 7 dní), zvýšená tělesná teplota (max. 7 dní), apatie (max. 7 dní), krátkodobá mírná bolest způsobená vpichem jehly nebo zaváděním žaludeční sondy (pár sekund).

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

Druh zvířat ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhadovaný počet	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
		Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Myš laboratorní (Mus musculus)	1800			1800	
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					

Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena

Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití	0
Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu	0
Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu	0

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - *uved'te*

N/A

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat - *uved'te, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu*

Alternativní metody pro ověření aktivních látek, které mají stejnou spolehlivost a vypovídací hodnotu jako *in vivo* experimenty, nám nejsou známy a nenašli jsme je ani v možných zdrojích (OECD, EURL ECVAM, European Pharmacopoeia) uvedených v pokynech pro vyplňování žádosti o schválení projektu pokusů. Studium jejich cytotoxické a fotodynamické aktivity, farmakokinetiky a farmakodynamiky, toxicity, biodistribuce a metabolizace v živém organismu nemůže být jinou metodou plně nahrazeno.

Omezení používání zvířat - *vysvětlete, jaký počet zvířat byl pro tento projekt stanoven. Popište kroky, které byly podniknuty ke snížení počtu používaných zvířat, a zásady použité k vytvoření studie; případně popište postupy, které budou používány po celou dobu trvání projektu za účelem minimalizace počtu používaných zvířat a které odpovídají vědeckým cílům (mezi tyto postupy mohou patřit např. pilotní studie, počítačové modelování, sdílení tkání a opakované použití).*

Jednotlivé pokusy budou probíhat striktně v souladu s dodržováním pravidla 3R a experimentální zvířata budou vydávána jen proti platnému projektu pokusu. Všechny testované látky budou před *in vivo* použitím testované na *in vitro* buněčných systémech. Pro aplikaci zvířatům budou vybrány pouze ty, s prokázaným *in vitro* efektem. Pro omezení množství používaných zvířat se budeme při navrhování pokusu opírat o předchozí *in vivo* experimenty (n=20-30 na experimentální skupinu; 10-15 samic + 10-15 samců aby bylo možné vyloučit nebo zachytit rozdíly ve výsledcích v důsledku rozdílného pohlaví) s podobnými látkami, resp. zářením a o informace získané v odborné literatuře:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

1. Morgan D. Cognitive Impairment in Transgenic Mouse Models of Amyloid Deposition. In: Levin ED, Buccafusco JJ, editors. Animal Models of Cognitive Impairment. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2006. Chapter 10. PMID: 21204370.
2. Ferguson SA, Sarkar S, Schmued LC. Longitudinal behavioral changes in the APP/PS1 transgenic Alzheimer's disease model. Behav Brain Res. 2013 Apr 1;242:125-34. doi: 10.1016/j.bbr.2012.12.055. Epub 2013 Jan 4. PMID: 23295401.
3. Weitzner DS, Engler-Chiurazzi EB, Kotilinek LA, Ashe KH, Reed MN. Morris Water Maze Test: Optimization for Mouse Strain and Testing Environment. J Vis Exp. 2015 Jun 22;(100):e52706. doi: 10.3791/52706. PMID: 26132096; PMCID: PMC4545046.
4. Georgevsky D, Retsas S, Raoufi N, Shimoni O, Golzan SM. A longitudinal assessment of retinal function and structure in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Transl Neurodegener. 2019 Oct 1;8:30. doi: 10.1186/s40035-019-0170-z. PMID: 31592131; PMCID: PMC6774218.
5. Foley AM, Ammar ZM, Lee RH, Mitchell CS. Systematic review of the relationship between amyloid- β levels and measures of transgenic mouse cognitive deficit in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2015;44(3):787-95. doi: 10.3233/JAD-142208. PMID: 25362040; PMCID: PMC4346318.
6. Sacher C, Blume T, Beyer L, Peters F, Eckenweber F, Sgobio C, Deussing M, Albert NL, Unterrainer M, Lindner S, Gildehaus FJ, von Ungern-Sternberg B, Brzak I, Neumann U, Saito T, Saido TC, Bartenstein P, Rominger A, Herms J, Brendel M. Longitudinal PET Monitoring of Amyloidosis and Microglial Activation in a Second-Generation Amyloid- β Mouse Model. J Nucl Med. 2019 Dec;60(12):1787-1793. doi: 10.2967/jnumed.119.227322. Epub 2019 Jul 13. PMID: 31302633; PMCID: PMC6894380.

7. Medawar E, Benway TA, Liu W, Hanan TA, Haslehurst P, James OT, Yap K, Muessig L, Moroni F, Nahaboo Solim MA, Baidildinova G, Wang R, Richardson JC, Cacucci F, Salih DA, Cummings DM, Edwards FA. Effects of rising amyloid β levels on hippocampal synaptic transmission, microglial response and cognition in APP_{Swe}/PSEN1_{M146V} transgenic mice. *EBioMedicine*. 2019 Jan;39:422-435. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.12.006. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30555043; PMCID: PMC6354711.
8. Huber CM, Yee C, May T, Dhanala A, Mitchell CS. Cognitive Decline in Preclinical Alzheimer's Disease: Amyloid-Beta versus Tauopathy. *J Alzheimers Dis*. 2018;61(1):265-281. doi: 10.3233/JAD-170490. PMID: 29154274; PMCID: PMC5734131.
9. Stewart S, Cacucci F, Lever C. Which memory task for my mouse? A systematic review of spatial memory performance in the Tg2576 Alzheimer's mouse model. *J Alzheimers Dis*. 2011;26(1):105-126. doi:10.3233/JAD-2011-101827
10. Balducci C, Forloni G. APP transgenic mice: their use and limitations. *Neuromolecular Med*. 2011 Jun;13(2):117-37. doi: 10.1007/s12017-010-8141-7. Epub 2010 Dec 9. PMID: 21152995.
11. Kíryk A, Mochol G, Filipkowski RK, Wawrzyniak M, Lioudyno V, Knapska E, Gorkiewicz T, Balcerzyk M, Leski S, Leuven FV, Lipp HP, Wojcik DK, Kaczmarek L. Cognitive abilities of Alzheimer's disease transgenic mice are modulated by social context and circadian rhythm. *Curr Alzheimer Res*. 2011 Dec;8(8):883-92. doi: 10.2174/156720511798192745. PMID: 22171952.
12. Garthe A, Kempermann G. An old test for new neurons: refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci*. 2013 May 3;7:63. doi: 10.3389/fnins.2013.00063. PMID: 23653589; PMCID: PMC3642504.
13. Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp*. 2011 Jul 20;(53):2920. doi: 10.3791/2920. PMID: 21808223; PMCID: PMC3347885.
14. Ryan D, Koss D, Porcu E, Woodcock H, Robinson L, Platt B, Riedel G. Spatial learning impairments in PLB1 Triple knock-in Alzheimer mice are task-specific and age-dependent. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Jul;70(14):2603-19. doi: 10.1007/s00018-013-1314-4. Epub 2013 Mar 28. PMID: 23535719.
15. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 2006;1(2):848-58. doi: 10.1038/nprot.2006.116. PMID: 17406317; PMCID: PMC2895266.
16. Ohno M, Chang L, Tseng W, Oakley H, Citron M, Klein WL, Vassar R, Disterhoft JF. Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. *Eur J Neurosci*. 2006 Jan;23(1):251-60. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04551.x. PMID: 16420434.

www.webofknowledge.com

17. Stokin GB, Almenar-Queralt A, Gunawardena S, Rodrigues EM, Falzone T, Kim J, Lillo C, Mount SL, Roberts EA, McGowan E, Williams DS, Goldstein LS. Amyloid precursor protein-induced axonopathies are independent of amyloid-beta peptides. *Hum Mol Genet*. 2008 Nov 15;17(22):3474-86. doi: 10.1093/hmg/ddn240. Epub 2008 Aug 11. PMID: 18694898; PMCID: PMC2722897.

Budeme používat minimální množství zvířat na skupinu, které je nezbytné pro následnou statistickou analýzu: v případě farmakokinetiky a biodistribuce obvykle 3-5 zvířat na skupinu, v případě behaviorálního testování terapeutické odpovědi u zvířecího modelu Alzheimerovy choroby 30 zvířat na skupinu.

Šetrné zacházení se zvířaty - uveďte příklady konkrétních opatření (např. zvýšené pozorování, pooperační péče, tlumení bolesti, výcvik zvířat) přijatých v souvislosti s postupy k minimalizaci dopadů na dobré životní podmínky zvířat; popište mechanismy k přijímání vznikajících zmírňujících postupů v době trvání projektu

Laboratorní zvířata budou denně monitorována kompetentními odborníky a nebudou cíleně vystavena utrpení. V případě znaků morbidit se zintenzivní četnost kontrol zdravotního stavu zvířat a v případě moribundních znaků budou zvířata z pokusu vyřazena a humánně utracena. Všechny úkony, léčba a eutanázie jsou vykonávány osobami odborně způsobilými pro práci s laboratorními zvířaty majícími příslušné osvědčení, dle zákona č. 246/1992 Sb. v platném znění. V průběhu pokusů bude používána inhalační nebo injekční anestezie a aplikace testovaných látek i.v., i.m., i.p., r.o. nebo s.c. cestou nepřesahující rámec standardní injekční aplikace látek. Zvířata mohou pociťovat mírnou krátkodobou bolest při vpichu injekční jehly anebo aplikaci gastrické sondy. V případech, kdy zvíře může být vystaveno stresu, může být před a během testu použita sedace. Dané úkony budou konzultovány s veterinárním lékařem a pod kontrolou vedoucího pokusu nebo zástupce vedoucího pokusu.

Použité druhy zvířat - vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií

Transgenní myši modely použité v této studii nesou mutace v APP a PS1 genech, které jsou charakteristické pro familiární formu Alzheimerovy choroby. Transgenní myši budou použity k validaci a verifikaci výsledků *in vitro* studií.

- 1) Včetně vědeckých pojmů, které se mohou skládat z více než pěti jednotlivých slov, a s výjimkou druhů zvířat a účelů uvedených jinde v dokumentu
- 2) Druhy zvířat v souladu s kategoriemi statistického vykazování v příloze III prováděcího rozhodnutí Komise 2020/569 s doplňkovou možností „nespecifikovaného savce“ pro zachování anonymity ve výjimečných případech

