

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

Význam genetických modifikátorů v procesu leukemogeneze a nové terapeutické možnosti v eliminaci (pre)maligní myeloproliferace a v inhibici akutní leukémie (AML) u myších modelů

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

31. prosince 2025

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾

MLL-ENL onkogen, JAK2 R1063H/E846D varianta, MLL-ENL-ER/JAK2-R1063H_E846D myši model, onkogenní signalizace, inhibitory onkogenních kináz

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

Charakterizace molekulárního mechanismu kooperace JAK2 R1063H/E846D genetické varianty a MLL-ENL onkogenu v procesu leukemogeneze.

Testování účinků inhibitorů klíčových signálních drah na průběh a progresi (pre)maligní myeloproliferace a možnosti cílené inhibice molekul onkogenní signalizace u AML.

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)

Navržené experimenty přispějí k rozšíření poznatků o významu germinální JAK2 R1063H/E846D varianty v molekulárním mechanismu iniciace, průběhu a progresu premaligní myeloproliferace do AML s dominantním MLL-ENL onkogenem. Testování účinků inhibitorů klíčových signálních drah na průběh a progresi (pre)maligní myeloproliferace povede k odhalení nových cílených terapeutických přístupů, které přispějí k zefektivnění terapie nemocných s AML s dominantním MLL-ENL onkogenem a AML s JAK2 R1063H/E846D predisponující genetickou variantou.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání

1. Postupy u GMO kříženců:

Biopsie ocasu u myši starších 3 týdnů za účelem zjištění genotypu – jednorázově u všech kříženců, se vykoná v celkové inhalační anestezii a analgezií. Při biopsii ocasu se po dezinfekci ustříhne konec ocasu o délce max. 0,5 cm. Opakovaná biopsie je nežádoucí. Následně se provede hemostáze hemostatickým práškem nebo kauterizací.

Odběry vzorku krve z ocasní žíly nebo retroorbitálního očního splavu za účelem kontroly krevního obrazu, u všech kříženců. Maximální jednorázový odebraný objem krve je 7,5% z celkového objemu cirkulující krve (výpočet celkového objemu krve: průměr 72 ml krve / kg živé hmotnosti zvířete), při odběru 1x za týden. Při odběru 1x za 14-28 dní může být maximální odebraný objem krve až 10% z celkového objemu cirkulující krve. Frekvence odběru z retroorbitálního očního splavu jednoho oka je 3x po uplynutí 14 dní od prvního odběru vždy v celkové anestezii s použitím analgetik.

Pro analýzu buněčného cyklu bude dospělým všech genotypů jednorázově intraperitoneálně aplikován BrdU (popř. EdU) 0,5 mL v PBS (10 mg/mL) 60 min před sběrem tkání.

Pro testování protinádorových účinků plánujeme testování 3-6 látek popř. jejich kombinace na skupinách 30-50 myši všech genotypů. Tyto látky budou aplikovány myším ve formě roztoku opakovaně, přičemž jednorázová aplikace nepřesáhne v případě per os aplikace objem 10-40 ml/kg (v potravě, vodě). V případě aplikace sondou se použije rigidní kovová aplikační jehla (do 14 g zvířete velikost jehly 24G, 15 – 20 g jehla 22G, 20 – 25 g jehla 20G, ≤ 25 g jehla 18G). Délka se volí na základě vzdálenosti mezi ústním koutkem a processus xyphoideus. Maximálně jednorázově podaný objem 10 ml/kg, maximálně možné opakované podání 3 × / 24hodin. V případě intraperitoneální aplikace 40-80 ml/kg; v případě subkutánní aplikace 40 ml/kg a v případě intravenózní aplikace (laterální ocasní vena) 5 ml/kg, v množství odpovídajícím předpokládaným terapeutickým dávkám (přibližně 1-50 mg/kg/den), v intervalu 12-48 hodin po dobu 1-6 týdnů. Kontrolním myším bude podávána pouze látka použitá jako rozpouštědlo (PBS/DMSO aj.) ve stejném schématu.

2. Analýzy u imunodeficitních myši:

Pro testování syntetické letality budou využity NOD/SCID a NU/NU myši modely s transplantovanými leukemickými hematopoetickými buňkami/nádorovými liniemi nebo primárními patientskými buňkami, maximální počet 200 myši. Nádorové buňky budou do NOD/SCID a NU/NU myši aplikovány buď subkutánně na boční stranu hrudníku (maximální jednorázový objem < 40.0 ml.kg-1/stranu), intraperitoneálně (maximální jednorázový aplikovaný objem: < 40.0 – 80,0 ml.kg-1) nebo intravenózně (v maximálním objemu 0,125 ml na myš). Aplikace testovaných látek s očekávaným protinádorovým účinkem bude podle stejného protokolu jako uvedeno výše, s doplněním intratumorální aplikace, kde bude objem dané látky přiměřený objemu tumoru. Aplikace začne u NOD/SCID a NU/NU myši se subkutánně transplantovanými nádorovými buňkami při objemu 0,5 cm³ a u NOD/SCID a NU/NU myši s intraperitoneálně/intravenózně transplantovanými buňkami na druhý až čtyřicátý den od aplikace nádorových buněk a bude sledována inhibice tumorigenicity resp. zvýšení přežití zvířat bez příznaků choroby.

V průběhu pokusu se bude NOD/SCID a NU/NU myším kontrolovat krevní obraz, jak je popsáno výše u kříženců.

Pro analýzu buněčného cyklu bude NOD/SCID a NU/NU myším intraperitoneálně aplikován BrdU, jak je popsáno u kříženců.

Zvířeti (kříženci i imunodeficitní myši) se před eutanazií odebere krev z plexus axillaris v celkové hluboké anestezii (ketamin/xylazin nebo O2/isofluran) a hned po odběru se vykoná eutanázie zlomením vazů, takže zvíře nenabude vědomí.

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

Model JAK2-R1063H_E846D může rozvinout mírné znaky kongenitální polycytémie, které však nevedou k výrazné patologii zvířete. MLL-ENL-ER myši a kříženci MLL-ENL-ER/JAK2-R1063H_E846D mohou rozvinout myeloproliferativní onemocnění, které však nemusí vést k bezprostřednímu úmrtí zvířete; u některých zvířat však dojde po období latence k rozvoji AML. Po rozvoji onemocnění budou myši usmrceny a bude analyzována jejich hematopoetická tkáň.

V případě nutnosti dlouhodobé intraperitoneální aplikace inhibitorů klíčových signálních drah se může u myši rozvinout peritonitida; tyto myši budou bezprostředně utraceny. NOD/SCID/NU/NU myši s transplantovanými nádorovými buňkami, u nichž bude nádor přesahovat 25% tělesné hmotnosti (měřeno v případě subkutánní transplantace nádoru kaliperací a vážením zvířete) nebo které budou vykazovat známky moribundity, budou také usmrceny předčasně z humanitárních důvodů.

U myšiho kmene C57Bl/6 nepředpokládáme žádné nežádoucí účinky, budou sloužit pouze ke křížení s kmenem MLL-ENL-ER jako negativní kontroly.

Po skončení pokusu bude likvidace kadaverů zvířat probíhat v zařízení SITA CZ a. s., provoz Olomouc

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

Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti

Druh zvířat ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhado- vaný počet	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Myš laboratorní (Mus musculus)	1600		1200	200	200
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					

Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena

Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití 100

Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu

Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu

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

Myši kmen C57Bl/6 bude sloužit pouze ke křížení s kmenem MLL-ENL-ER, proto mohou být zvířata opakovaně používána.

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*

Laboratorní myš je evolučně nejbližší laboratorní model pro studium lidské hematopoézy; myši a lidská hematopoéza podléhají stejné regulaci a řada hematopoetických růstových faktorů a jejich receptorů jsou navzájem kompatibilní. Specifické vědecké otázky tohoto výzkumu mohou být zodpovězeny pouze za použití myších modelů (včetně geneticky modifikovaných myší) a za použití krevních buněk derivovaných z těchto modelů. Takovéto použití pro zodpovězení obdobných (srovnatelných) vědeckých otázek je uváděno v současné odborné literatuře. Jiné metody jako využití buněčných linií není možné z důvodu systémové regulace organismu, která se podílí na rozvoji daného onemocnění, a proto k odhalení molekulární patofyziologie nemocí (včetně myeloproliferace) neexistuje jiná alternativa.

Omezení používání zvířat - *vysvětlíte, 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).*

Celkový maximální počet myší je 1600 ks a bude rozdělen do dvou etap; toto dělení na etapy je dáno datem ukončení oprávnění k používání pokusných zvířat (do 21. 9. 2022) a nutnosti podání žádosti o udělení nového oprávnění. V případě první etapy (do 21. 09. 2022) bude provedena analýza MLL-ENL-ER/JAK2-R1063H_E846D kříženců a jejich porovnání s MLL-ENL-ER a JAK2-R1063H_E846D. Maximální předpokládaný počet myší pro tuto dílčí etapu bude zahrnovat: MLL-ENL-ER: dospělé myši, 60 ks, JAK2 R1063H_E846D: dospělé myši, 60 ks, kříženci MLL-ENL-ER/JAK2-R1063H_E846D (heterozygoti pro dominantní MLL-ENL-ER onkogen, hetero- nebo homozygoti pro mírně aktivující JAK2-R1063H/E846D variantu): 60 ks, kontrolní C57Bl/6: 30 myší. Tato dílčí etapa tedy zahrnuje analýzy genotypů uvedených kříženců. V rámci této etapy bude dále probíhat transplantace nádorových buněk do NOD/SCID a NU/NU myších modelů s cílem zhodnotit protinádorové/terapeutické účinky inhibitorů klíčových signálních drah. Maximální předpokládaný počet NOD/SCID a NU/NU myších modelů v dílčí etapě: 70 myší.

Dílčí etapa od 21. 09. 2022 do 31. 12. 2025: V průběhu dalšího řešení projektu budou studovány účinky inhibitorů klíčových signálních drah na průběh a progresi (pre)maligní myeloproliferace na MLL-ENL-ER/JAK2-R1063H_E846D modelu. Účinky těchto látek budou dále ověřovány u NOD/SCID a NU/NU myších modelů. Maximální předpokládaný počet myší MLL-ENL-ER: dospělé myši, 340 ks, JAK2 R1063H_E846D: dospělé myši, 340 ks, kříženci MLL-ENL-ER/JAK2-R1063H_E846D (heterozygoti pro dominantní MLL-ENL-ER onkogen, hetero- nebo homozygoti pro mírně aktivující JAK2-R1063H/E846D variantu): 340 ks, kontrolní C57Bl/6: 170 myší. Maximální předpokládaný počet NOD/SCID a NU/NU myších modelů v dílčí etapě: 130 myší.

Celkový plán počtu použitých pokusných zvířat je stanoven s ohledem na rozsah a nutnost opakování z důvodu heterogenity fenotypu použitého myšího modelu i z důvodu nutnosti opakování následných in vitro analýz. Minimálně 5-10 zvířat daného genotypu a podmínky (použití určitého inhibitoru/definovaná fáze myeloproliferace) jsou nutná pro validaci experimentu.

Šetrné zacházení se zvířaty - *uved'te 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*

Šetrné zacházení a minimalizace traumatizace tkání je nezbytností pro úspěšné vytvoření myšího modelu. Myši budou denně monitorované veterinárním lékařem, především s ohledem na možné změny zdravotního stavu a pohody zvířete, a nebudou cíleně vystavené utrpení. Všechny invazivní zákroky se vykonávají v celkové anestezii s následnou aplikací analgetik. Zvířata s nádorem, se oddělí za účelem poskytnutí většího prostoru nebo zabránění kanibalismu ostatními zvířaty v chovné kleci anebo v případech, kdy vyžadují podpůrnou péči (kašovitě krmivo předkládáno na podlahu v chovné kleci). Případné přetrvávající utrpení zvířat (přetrvávající automutilace, krvácení z tělních otvorů, neschopnost přijímat potravu, atd.) bude indikací k usmrcení, vzhledem k tomu, že podávání analgetik v takových případech nemusí být dostatečné. Všechny úkony, léčba a eutanázie (dle OECD) jsou vykonávány licencovaným veterinárním lékařem. S laboratorními zvířaty se nakládá dle pravidel uvedených v zákonu č. 359/2012 a vyhlášce č. 419/2012, kde je jasně vymezen způsob o nakládání s laboratorními zvířaty.

Použité druhy zvířat - vysvětlíte výběr druhů a souvisejících životních stadií

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