

NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Výzkum klinicky relevantních substrátů proteazomové degradace u MDS (myelodysplastický syndrom).
Identifikace pevnodistat specifických biomarkeru u PDX modelu.

Doba trvání projektu pokusů v měsících	48
Klíčová slova	myelodysplastický syndrom (MDS)
proteazomová degradace	pevnodistat (PEVO)
neddylace	patient derived xenografts (PDX)

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Onkologie [PB1]

Translační a aplikovaný výzkum: Rakovina u lidí [PT21]

0

0

Cíle projektu pokusů

Identifikovat skupinu PEVO-specifických substrátů v kontextu myelodysplastického syndromu (MDS) použitím PDX modelů. PEVO je specifický inhibitor postranlační modifikace, tzv. neddylace a kvůli jeho pleiotropním účinkům je důležité identifikovat konkrétní ligázu, jež zprostředkovává jeho účinek specifický u MDS. V tomto cíli budeme generovat expresní profily Cullin-dependentních ligáz a jejich substrátů závislých na podání PEVO. V současné době lze identifikovat přibližně 200 takových ligáz na základě podobnosti sekvence. Naší ambicí je sestavit seznam těchto ligáz vyjádřených v MDS a identifikovat ty, ve kterých po léčbě PEVO nastanou změny v genové expresi nebo mutační změny.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Identifikovat skupiny proteinů, které jsou deregulovány při degradaci Cullin-dependentními ligázami prostřednictvím PEVO-specifického mechanismu po aplikaci léčiva. Skupiny mRNA a proteinů budou identifikovány pomocí globálních přístupů (hmotnostní spektrometrie, celoxomové sekvenování (WES) a sekvenace transkriptomu (RNAseq)) a budou dále validovány pomocí sady experimentů v menším měřítku.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Pro transplantaci leukemických buněk budou myši anestetizovány pomocí přípravku Aerrane (Aerrane, Isofluranum: 4% koncentrace v inhalační nádobě (0,20 ml/1 l). Transplantováno bude minimálně 1x10⁶ buněk pacientské tkáně. Transfer buněk bude proveden intrafemorálně v max. 200 ul PBS v anestezii (Aerrane, Isofluranum: 4% koncentrace v inhalační nádobě (0,20 ml/1 l).

Vážení, měření, odběr krve z očního plexu, faciální vény nebo ocasní vény, značení, palpační kontrola hydratace, měření tlaku v sedaci, měření srdeční a dechové frekvence aspekci či palpačně, palpce a aplikace léčiv (analgetik po 6-8h hodinách během prvních 24-48 hodin po i.f aplikaci). Odběr krve je prováděn ve velmi krátké anestezii isofluranem 1-3% ve směsi se vzduchem 0,5l/min (na základě mechanismu účinku funguje na GABAA receptory a má myorelaxační účinek (Effects of isoflurane and enflurane on GABAA and glycinerceptors contribute equally to depressant action on spinal ventral horn neurones in rats, British Journal of Anaesthesia, C. Grasshoff a B. Antkowiak, 2006) vzhledem k tomu, že je rychle vydýchán, myš se vrací do plného vědomí během několika sekund, postačují 2-4 kapky krve (myš) ne častěji než v týdenním intervalu a ne více jak 4x během celého pokusu. Jednotlivý odběr je tedy hluboko pod 10% objemu krve. Měření velikosti nádoru kaliperem; hledání metastáz v

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata, a doba trvání těchto účinků

Zvířata budou denně monitorována, především s ohledem na možný výskyt poruch chování, ztráty tělesné hmotnosti (max. 20%) či jiných známek utrpení nebo nemoci. V případě výskytu těchto známek budou myši usmrceny metodou cervikální dislokace a budou následně analyzovány. Zvířata netrpí důsledkem pokusů. Veškeré manipulace s imunodeficientními myši nebo ostatními myši po ozáření budou probíhat v laminárních boxech. O celém průběhu je pořízen písemný záznam.

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

Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
myš laboratorní (Mus musculus) [A1]	0	385	385	30

0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0

Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi

Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat		
	Opětovné použití	Navrácení do chovu, do přírodního stanoviště	Do zájmového chovu
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty

Ukončení experimentu - zvířata budou usmrcena za následujících podmínek k eliminaci jejich utrpení:

- pokles BCS (body condition score) pod 2 a snížení váhy o 15% nebo BCS 2 a pokles váhy o více jak 20% -uběhnuté 4 měsíce od ukončení léčby
- nádor větší než 1,5 (2)* cm pohmatem
- příznaky bolestivosti nebo zhoršení zdravotního stavu

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat

Žádný podobný model, který by dosahoval takové komplexity a současně byl velmi blízce geneticky příbuzný k člověku neexistuje. Při plánování tohoto projektu pokusů byly prohledány databáze s alternativami.

Omezení používání zvířat

V pokusech bude použito pouze takové množství zvířat, které zajistí statistickou průkaznost získaných dat.

Šetrné zacházení se zvířaty

Utrpení, bolest a stres myši budou vždy omezeny na minimum, zacházení s myši je v souladu s doporučeními uvedenými na stránkách Norecopa. Myši budou chovány v optimálních podmínkách, které jsou stanoveny současnými regulacemi EU a místními zákony a vyhláškami. Zvířata budou denně monitorována, především s ohledem na možný výskyt poruch chování, ztráty tělesné hmotnosti či jiných známek utrpení nebo nemoci. V případě výskytu těchto známek budou myši usmrceny metodou cervikální dislokace a budou následně analyzovány. Veškeré manipulace s imunodeficitními myši nebo ostatními myši po ozáření budou probíhat v laminárních boxech.

Opatrné zacházení s myši je nezbytným předpokladem úspěšného pokusu.

Použité druhy zvířat - vysvětlení

Pro pokus je nutné použít humanizovaný imunodeficientní myší kmen NSG-SGM3 (NOD.Cg-Prkd^{scid}; Il2rg^{tm1Wjl}; Tg(CMV-IL3,CSF2,KITLG)1Eav/MloySzJ) exprimující lidský interleukin-3, GM-CSF a SCF pro požadovaný engraftment lidských leukemických buněčných linií a primárních patientských vzorků. Pro tvorbu xenograftů budou použity dospělé myši ve věku 8-20 týdnů.