

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Vliv benzimidazolů na chování lidských nádorových buněk odvozených z glioblastoma multiforme u athymických nu/nu myši

Doba trvání projektu pokusů v měsících

46

Klíčová slova

glioblastoma multiforme

primolinie

benzimidazoly

temozolomid

athymické nu/nu myši

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Onkologie [PB1]

0

0

0

Cíle projektu pokusů

Cílem projektu je zjistit mechanismy, kterými buňky glioblastomu regulují svůj růst a překonávají buněčnou smrt. Zároveň je naší snahou odhalit nové cíle pro efektivnější protinádorovou terapii glioblastoma multiforme. Tento nádor bude implantován v podobě buněk z nádoru získaného od pacienta po krátkodobé kultivaci in vitro. Pokročilou fází testování protinádorově působících látek, v našem případě benzimidazolových antihelmintik, je potvrzení jejich účinnosti in vivo a porovnání jejich účinnosti s běžně používaným chemoterapeutikem temozolomidem.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Implantace buněk glioblastoma multiforme od více dárců nám pomůže získat ucelené informace o biologických charakteristikách jednotlivých nádorů a jejich případném šíření do ostatních tkání. Tento model nám zároveň umožní zjistit přesnou distribuci a metabolizaci léčiva nejen v nádoru, ale také v ostatních tkáních.

Zásadním přínosem užitého modelu imunodeficientních myši je možnost implantovat buňky nádoru získaného od pacienta po krátkodobé kultivaci in vitro. Výhodou je také sledování citlivosti na léčbu benzimidazoly, u kterých bylo mezi jednotlivými vzorky.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Zvířata budou zpravidla používána k několika postupům: 1) implantace nádorových buněk s.c. - s použitím povrchového lokálního anestetika (Emla 5% drm. crm. – kombinace lidokainu a prilokainu) bude myši subkutánně injikováno 250 µl buněčné suspenze získané z kultury lidských nádorových buněk. 2) po 14 dnech od implantace (nebo podle nárůstu nádoru, maximálně však po 4 týdnech) bude sondou p.o. zaváděno léčivo každodenně po dobu 14 dnů. 3) Na konci pokusu budou myši usmrceny předávkováním inhalačním anestetikem isofluranem (5% koncentrace po dobu ≥5 minut).

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

Očekává se bolest v průběhu růstu nádoru. Aby se předešlo nadměrné bolesti a strachu, budou zvířata usmrcena dříve, než nádor nabude velkého rozsahu, nebo než dojde k výraznému zhoršení celkového zdravotního stavu. Myš s projevy bolesti bude usmrcena ihned.

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	0	330	0

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				
Laboratorní zvířata zařazená do pokusu nebudou opakovaně používána, neboť k výzkumu budou dále využity také jejich tkáně a orgány. Po usmrcení laboratorních zvířat budou zbytky těl uloženy do chladu v neprodyšných tmavých plastových pytlích a následně budou odvezeny speciálním autem do FNHK k likvidaci spaláním.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Navrhované schéma pokusu nelze nahradit jiným modelem nebo in vitro experimentem, neboť sledujeme průběh rozvoje navozeného onemocnění. Se zvířaty bude nakládáno šetrně v souladu se všemi předepsanými pravidly a manipulovat s nimi bude pouze proškolený a vysoce zkušený personál Lékařské fakulty v Hradci Králové. V databázi ECVAM není validovaná metoda, jež by mohla plánovaný pokus nahradit či redukovat.				
Omezení používání zvířat				
Budou použity minimální nezbytné počty zvířat nutné ke správnému statistickému zhodnocení účinku. Plán pokusu reflektuje i interindividuální variabilitu zvířat při navození patologického stavu. Struktura experimentů je navržena po důkladné teoretické přípravě a navazuje na dlouhodobé zkušenosti realizujícího týmu. Všechny odebrané vzorky budou dlouhodobě skladovány v hlubokomrazících boxech (-80 °C) pro možnost dodatečných analýz bez nutnosti opakování experimentu. Počet použitých zvířat bude záviset na odebraných nádorových liniích. Nádorové linie budou nejprve podrobeny podrobné in vitro charakterizaci, jako např. analýze markerů kmenovosti, schopnosti proliferace a migrace buněk apod. Na základě těchto výsledků budou teprve vybrány implantované linie a podle toho se bude odvíjet i počet použitých myší. Pro každou linii bude použito 12 myší (3 myši - s nádorem, bez léčby; 3 myši - s nádorem, léčba benzimidazoly; 3 myši - s nádorem, léčba temozolomidem; 3 myši - s nádorem, léčba benzimidazoly + temozololomidem). Pro kontrolu růstu bude použita buněčná linie U118MG (stabilizovaná linie odvozená z glioblastoma multiforme), u které máme 100% úspěšnost růstu nádorů. Tato kontrolní linie bude implantována do 2 myší.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Snížení újmy zvířatům bude zabezpečeno vysokou kvalitou péče ve Viváriu LFHK postavené na zkušeném personálu, pravidelném denním režimu a používání anestetik a analgetik v odpovídajících dávkových schématech. Se zvířaty bude experimentováno až po náležité aklimatizaci. Implantace nádorových buněk bude provedena s použitím povrchového lokálního anestetika (Emla 5% drm. crm. – kombinace lidokainu a prilokainu). V případě projevů bolesti, které nebude možno zvládnout standardní farmakoterapií, tj. podáním meloxicamu v dávce 5 mg/kg ž. hm. s.c. á 24 hod. (Meloxicam 5 mg/ml inj. sol., Bioveta) či rozpadu rány bude myš neprodleně usmrcena. Na konci pokusu budou myši usmrceny předávkováním inhalačním anestetikem isofluranem (5% koncentrace po dobu ≥5 minut). Růst nádorů bude sledován několikrát týdně. V případě, že by došlo k výraznému zhoršení zdravotního stavu, který bude denně kontrolován, bude myš neodkladně usmrcena.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Pro studium léčby lidských nádorů je třeba použít model imunodeficientních zvířat. Zlatým standardem onkologického výzkumu jsou athymické nu/nu myši.