

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569**Název projektu pokusů****Toll-like receptory v karcinogenezi a rezistenci vůči terapii u nádorového onemocnění prostaty**

Doba trvání projektu pokusů - v měsících 54 měsíců

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾ nádory prostaty; endokrinní terapie; chemoterapie; resistance; toll-like receptor;**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

Předkládaný projekt experimentů na zvířatech má za cíl navrhnout nové účinné terapeutické strategie pro efektivní eliminaci lidských nádorových buněk, s využitím vhodně zvolených chemoterapeutických látek a jejich kombinací s nově syntetizovanými molekulami včetně inhibitorů signálních drah hrajících roli ve vzniku a rozvoji nádorových onemocnění. Na myších modelech bude prověřena jejich relevance a účinnost v podmínkách komplexního prostředí savčího organismu.

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)

Experiment na zvířatech je nezbytný z důvodů základního výzkumu a dále z hlediska předcházení utrpení, tělesných nesnází či potenciálního poškození zdraví, rozpoznání fyziologických změn stavů u zvířete a člověka. Vědecké poznatky získané při analýze odpovědi experimentálních nádorů *in vivo* na navržené léčebné postupy budou důležitým předpokladem pro pochopení komplexních mechanismů regulace růstu/eliminace nádorů a navržení účinnějších a šetrnějších léčebných postupů.

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

V průběhu trvání projektu pokusů budou myším jednotlivých kmenů prováděny injekce suspenze buněčných linií, případně implantace kusů nádorových tkání subkutánně nebo do podpurné tukové tkáně mléčné žlázy a to bez místního či celkového znecitlivění. Také injekce suspenze buněčných linií do ocasní cévy budou prováděny bez znecitlivění. Následné vyšetření růstu nádorů pomocí neinvazivních metod (rentgen, optické metody) bude prováděno při navození celkové anestezie s využitím inhalační jednotky a isofluranu koncentraci 1-5 %. Za účelem vyšetření pomocí optických metod bude pokusným zvířatům intraperitoneálně podáván roztok netoxického bioluminiscenčního nebo fluorescenčního substrátu dle výrobcem předepsaného dávkování (Perkin Elmer).

Cílem je najít takové látky, případně jejich kombinace, které účinně potlačí růst nádoru uměle vytvořeného injikováním nádorovými buňkami. Testované terapeutické látky ve formě monoterapie, nebo jejich kombinace budou aplikovány pokusným zvířatům bez předchozí injekce nádorových buněk, a to v různých koncentracích a časech, za účelem sledování distribuce a akumulace těchto látek v organismu, anebo budou podávány během růstu nádorů. Rozpuštěná léčiva budou podávána v opakujících se cyklech injekcí do peritonea, intravenózně do ocasní žíly, aplikací přímo do žaludku, případně v pitné vodě. Mezi plánované terapeutické látky testované v kombinaci či jako monoterapie patří enzalutamide, docetaxel, gemcitabine, inhibitory kináz (např. Chk1, Mre11, Haspin) a rovněž nově syntetizované molekuly a jiná modifikovaná léčiva.

Při ukončení experimentu bude zvířatům v celkové anestezii navozené intraperitoneální injekcí kombinace ketamin/xylazin (80-100 mg/kg ketamin, 10 mg/kg xylazin) odebrána krev srdeční punkcí a/nebo budou zvířata šetrně usmrcena (cervikální dislokace, oxid uhličitý). Ze zvířat budou následně odebrány nádory, orgány (např. játra, slezina, ledviny, srdce, plíce, mozek), tkáň a tekutiny (krev) za účelem dalších analýz.

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) a doba trvání těchto účinků					
Utrpení zvířat v průběhu pokusů bude minimalizováno. Subkutánní injekce budou prováděny bez místního či celkového znecitlivění. Cílem experimentů bude analyzovat účinek testované terapie u kontrolních zvířat a zvířat s indukovanými nádory a následně monitorovat růst nádoru a jeho odpověď na navrženou léčbu. Nádory budou růst maximálně do velikosti 3 cm ³ , aby zvířatům nezpůsobovaly závažnější obtíže. Zvířata budou pravidelně monitorována, a pokud dojde k prokazatelnému zhoršení kvality jejich života, budou ihned z experimentu vyřazena a šetrně utracena. Po skončení pokusu budou zvířata utracena (pomocí cervikální dislokace či oxidu uhličitého) a budou jim odebrány nádory, orgány a vzorky tkání pro následnou analýzu. Všechny experimenty budou prováděny tak, aby utrpení zvířat bylo co nejmenší, při minimálním stresování pokusných zvířat, která nebudou vystavena nadměrné bolesti. Navrhovaná míra závažnosti je mírná až střední. Kadavery budou umístěny do kafilerního mrazicího boxu pro VŽP a následně odvezeny firmou Agris, s.r.o., záv. Medlov, Němčičky u Židlochovic.					
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)	800			x	
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena					
Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití					-
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 - <i>uved'te</i>					
Uplatňování 3R					
Nahrazení používání zvířat - <i>uved'te, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu</i>					
Navrhované experimenty <i>in vivo</i> využívající myši model tvoří důležitou součást plánovaného projektu, účelně doplňují experimenty <i>in vitro</i> a nelze je nahradit jinými alternativními přístupy. Testování odpovědi nádoru na působení navržených kombinací látek na myším modelu umožní vzít v úvahu komplexní reakci organismu, včetně úlohy mikroprostředí, čehož není možné dosáhnout v podmínkách <i>in vitro</i> buněčné kultivace.					
Omezení používání zvířat - <i>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).</i>					
Budou použity minimální nezbytné počty zvířat. Pro redukci celkového počtu zvířat a odhadu minimálního počtu zvířat nutného pro správné provedení experimentu a daného statistického testu zvířat bude využito power analýzy před samotným začátkem experimentu. Maximálně se bude jednat 10 myši na jednu experimentální skupinu v rámci daného experimentu zahrnující 2 a více takových skupin.					
Šetrné zacházení se zvířaty - <i>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</i>					
V průběhu pokusů budou zohledňována hlediska šetrného zacházení s pokusnými zvířaty, zejména s ohledem na umožnění jejich adaptace, klidné zacházení, tichý přístup, používání pomůcek, které nezpůsobí zvířeti strach, bolest a utrpení a návyk na uchopení rukou. Zvířata budou umístěna v neměnných definovaných podmínkách bariérového chovu ve sterilních klecích, v individuálně ventilovaných klecích. Během operačních zásahů budou zvířata pod celkovou anestezií a po operaci jim budou podávána analgetika pro tlumení bolesti. V případě, že některý experimentální zásah způsobí zvířeti obtíže, které nesouvisí s pokusem, a které budou zhoršovat jeho zdravotní stav, bude takové zvíře neprodleně vyřazeno z pokusu a šetrně utraceno.					
Použití druhů zvířat - <i>vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií</i>					
Experimenty budou prováděny na jedincích myších kmenů C57BL/6, BALB/c a CD-1 což jsou kmeny k tomuto účelu vhodné a běžně používané. Myši kmen SHO je zvolen z důvodu jeho imunodeficiency a dobré tolerance ke xenotransplantacím představují tak unikátní model pro komplexní studium chování nádoru v organismu a jeho reakce na navrhovanou léčbu. Navíc, jedinci kmene SHO jsou bez srsti, což usnadňuje monitorování růstu subkutánních nádorů. Nové poznatky získané s využitím uvedeného relativně jednoduchého modelu lze aplikovat na komplexnější organismy včetně člověka.					

-
- 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