

NETECHNICKÉ SHRNU TÍ PROJEKTU POKUSŮ	
Název projektu pokusů	
Protinádorová terapie pomocí nanočástic citlivých na reaktivní formy kyslíku s imunomodulačním účinkem u myší	
Doba trvání projektu pokusů	do 04/2020.
Klíčová slova - <i>maximálně 5</i>	Polymerní nanočástice, imunomodulace, doxorubicin, protinádorová terapie.
Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka	
	základní výzkum
<input checked="" type="checkbox"/>	translační nebo aplikovaný výzkum
	vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
	zachování druhů
	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
	trestní řízení a jiné soudní řízení
Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)	
<p>Doxorubicin je jedním z nejpoužívanějších protinádorových přípravků v klinické praxi. Bohužel, zkušenost ukázala, že samotné léčivo má několik závažných nežádoucích účinků a v mnoha případech není účinné dostatečně. Pro překonání těchto problémů je snaha vyvinout specifický nosič, který by dopravil a udržel léčivo v nádorové tkáni. Námi navrhované nanočástice jsou založeny na blokovém kopolymeru tvořeném z esteru kyseliny borité a metakrylamidu, který představuje nosič vázající doxorubicin (dvě varianty nanočástic, zkráceně „MRE a MRI“ dle typu vazby). Vazba těchto nanočástic s léčivem je velice stabilní a narušuje se až v místě o kyselém pH (kolem 5,5) a v místě s nadměrnou tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS). Mnoho lidských nádorů představuje právě takové prostředí s vysokou koncentrací ROS a nízkým pH. Závislost nanočástic na ROS a pH by zabezpečila, aby se doxorubicin uvolnil až v nádorové tkáni, čímž bychom se vyhnuli toxickému působení na zdravé tkáně. To, aby se nanočástice dostaly do nádorové tkáně, umožňuje jejich specifická velikost (kolem 100 nm), díky které se akumulují preferenčně v nádoru pomocí tzv. EPR efektu (enhanced permeability and retention effect). Naše in vitro experimenty ukazují, že účinnost takového nanočásticového systému s doxorubicinem může být navíc posílena současným podáním tzv. imunomodulátorů, které jsou schopné v organizmu zvýšit produkci CD8+ lymfocytů (buňky imunitního systému ničící buňky nádorů). Výsledkem takového komplexního působení by měla být tzv. chemo-immunomodulační terapie nádorového onemocnění.</p>	
Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů (jak by mohlo být dosaženo pokroku ve vašem vědním oboru nebo jaký přínos by z něj člověk či zvířata mohli mít)	
<p>Doxorubicin je jedním z nejvíce používaných chemoterapeutik při léčbě nádorových onemocnění, bohužel s početnými nežádoucími účinky (únava, ztráta vlasů, průjem, jaterní změny, změny kůže, srdeční selhání a jiné). Nežádoucí účinky nejenom doxorubicinu jsou většinou způsobeny systémovým působením (léčivo je malá molekula vychytávána i zdravými tkáněmi). Díky námi navrhovaným nanočásticím by se mělo léčivo dopravit a z nosiče uvolnit pouze v nádorové tkáni, čímž by došlo k významné redukci vedlejšího působení doxorubicinu. Navíc chceme použít současné podání imunomodulátorů (tumor specifické antigeny a α-galaktosylceramid) s léčivem, který podporuje imunitní systém organizmu k zvýšené produkci specifických CD8+ lymfocytů, které působí cíleně proti nádorovým buňkám. Z těchto důvodů proto očekáváme účinnější terapii s významnou redukcí objemu nádorové tkáně, ev. i jeho celkové vymizení.</p>	
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá	
<p>V rámci testování protinádorové aktivity navrhnutých nanočástic je nutné ověřit jejich aktivitu přímo na živém organizmu. Tento typ studie není možné realizovat jinak, než s použitím laboratorních zvířat a v současné době neexistuje žádný alternativní systém či model, kterým by bylo možné laboratorní zvířata nahradit. Na pokus budou použity myši kmene C57BL/6, samice, věk 8 týdnů, SPF kvalita. Tento druh byl vybrán na základě toho, že jde o běžný kmen používaný při biodistribučních, toxikologických či terapeutických studiích nových testovaných přípravků. Navíc je syngenní s nádorovými liniemi EL4, B16F10 a B16F10-Ova, které se plánují v pokusu použít. Tento kmen je zároveň lehce dostupný, nevyžaduje speciální podmínky chovu a při větším použitém množství cenově přijatelný. Na pokus je plánováno použití maximálně 120 ks zvířat.</p>	
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?	
<p>Navrhované nanočástice by měly být dobře přijímány nádorovými buňkami díky specifické úpravě velikosti částic. Zároveň by mělo docházet k jejich snadnému vyloučení z těla ledvinami, proto se předpokládá biokompatibilita s živými tkáněmi. Akutní toxicita vysoké dávky vzhledem k chemické povaze látky může být způsobena vyšší viskozitou, což se projeví oběhovými selháními. To lze vyřešit správným naředěním vzorku. Chronická toxicita se může projevit ukládáním nanočástic do různých orgánů a jejich následným selháváním, což se ale díky jejich velikosti a při nižších dávkách nepředpokládá. U terapeutického pokusu s nádory může dále dojít k zhoršení zdravotního stavu vlivem růstu nádoru, což ale lze omezit předčasným usmrcením zvířete při dosažení objemu 2 cm³. Kromě i.v., s.c aplikací a odběrů krve z retroorbitálního plexu nejsou plánovány žádné další zákroky. Míra závažnosti pokusu se proto hodnotí jako střední. Co se týče další manipulace se zvířaty, bude se jednat především o pravidelné vážení jejich hmotnosti, měření velikosti nádorů a sledování celkového zdravotního stavu. Po skončení pokusů budou zvířata usmrcena předávkováním anestetika.</p>	
Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)	
Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití	

zvířat.

Výše uvedené pokusy vzhledem ke sledování biologických parametrů není možné otestovat pouze za podmínek in vitro, ale je nutno použít biologický model pokusného zvířete. V tomto směru neexistuje alternativní metoda. Tato skutečnost byla také ověřena v databázi validovaných alternativních metod schválených a přijatých Evropskou společností pro alternativní metody (European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)).

Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.

Počet zvířat je minimalizován tak, aby byly získané výsledky statisticky průkazné. K statistickému vyhodnocení výsledků bude použita zejména analýza rozptylu ANOVA, která umožňuje porovnávání více než dvou vzorků. Obvykle se u biologických testování používá počet testovaných vzorků $n = 6$, což je počet nutný k dosažení relevantní statistické významnosti výsledků. Proto je u všech pokusech stanoven právě tento počet laboratorních zvířat jako minimální. Co se týče sdílení zvířat s jiným pracovištěm, tento postup v navrhovaném projektu není možný, jelikož se jedná o nádorové onemocnění a nově testované látky, u kterých není zatím známý žádný účinek na organismus, resp. na jeho orgány. Mohlo by tak dojít k vzájemnému ovlivnění výsledků.

Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlete volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů.

Vysvětlete obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.

Během celého trvání pokusů bude se zvířaty manipulováno tak, aby se co nejvíc minimalizovala případná bolest a strach a pokus bude veden osobou kvalifikovanou v práci s pokusnými zvířaty. Zároveň se kromě odběrů krve neplánuje žádný zákrok, který by si vyžadoval použití přípravků na znecitlivění či analgetik. V případě jakékoliv nečekané změny a/nebo zhoršení stavu zvířete bude pokus předčasně ukončen. V případě vzniklých bolestí způsobených růstem tumoru se zváží podání vhodného analgetika. Při nárůstu nádorů do objemu 2 cm^3 budou zvířata předčasně usmrcena. Na pokus budou použity myši kmene C57BL/6, samice, věk 8 týdnů, SPF kvalita. Tento druh byl vybrán na základě toho, že jde o běžný kmen používaný při biodistribučních, toxikologických či terapeutických studiích nových testovaných přípravků. Navíc je syngenní s nádorovými liniemi EL4, B16F10 a B16F10-Ova, které se plánují v pokusu použít. Tento kmen je zároveň lehce dostupný, nevyžaduje speciální podmínky chovu a při větším použítém množství cenově přijatelný.