

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 85/2020

upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

Výzkum nádorové biologie lymfomů a identifikace nových terapeutických a prediktivních cílů

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

60

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾

lymfomogeneze, signalizace, buněčný cyklus, epigenetická regulace

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

Cílem studie je popis nádorových specifíků a molekulárních interakcí u lymfomů se zaměřením na potenciál jejich využití v léčbě lymfomů jako terapeutické cíle či bioarkery odpovědi na již dostupné specifické inhibitory. Podrobnější cíle zahrnují: 1) popis kináz a koreceptorových molekul, které jsou nezbytné pro aktivaci a transmisí BCR signalizace, 2) nalezení a popis mechanismů, které jsou nádorově specifické a vedou k aktivaci AKT signalizace a popis mechanismů a dějů, které jsou v nádorových buňkách těmito signály regulovány, 3) důsledky epigenetické dysregulace se zaměřením na nově popsaný kandidátní gen PHIP a skupinu dalších proteinů ovlivňujících genovou expresi, např. CREBBP, 4) popis souvislosti a regulace mezi nádorově specifickou AKT signalizací a buněčným cyklem a 5) popis na nádorové signalizaci a mutacích závislých změn metabolismu.

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)

Navrhovaná studie má velký potenciál k získání nových, vysoce specifických terapeutických cílů. Také z ní lze vyvodit i predikci odpovědi na stávající léčbu. Vzhledem k obtížně modelovatelným charakteristikám růstu nádorových buněk in vivo (např. mikroprostředí, imunitní systém) je výzkum zčásti nezbytně provádět na myších modelech. Pokusy na živém organismu jsou zcela zásadní taktéž pro určení vhodnosti k terapeutickému využití.

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

1) Model využívající A20 nádorové buňky: 1x podkožní aplikace nádorových buněk, maximálně 2x zobrazení velikosti nádorů pomocí detekce fluorescence nádorových buněk v celkové anestezii se snímáním speciální kamerou.

2) Model využívající lidské lymfomové nádorové linie: 1x podkožní aplikace nádorových buněk, maximálně 2x zobrazení velikosti nádorů pomocí detekce fluorescence nádorových buněk v celkové anestezii se snímáním speciální kamerou. Perorální či intraperitoneální aplikace inhibitorů po 10-20 dnech růstu nádoru (dle typu nádorových buněk). Aplikace dle průběžných výsledků studie, např. 3x týdně intraperitoneálně dva týdny.

3) Experimentální terapie s využitím PXD modelů: 1x podkožní aplikace nádorových buněk. Perorální či intraperitoneální aplikace inhibitorů po 10-20 dnech růstu nádoru (dle typu nádorových buněk). Aplikace dle průběžných výsledků studie, např. 3x týdně intraperitoneálně dva týdny.

Všechny modely: měření velikosti podkožního nádoru pomocí kaliperu ve třech na sebe kolmých rozměrech a celkového stavu myši včetně hmotnosti

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

Nežádoucí účinky u zvířat neočekáváme. Podkožní aplikace nádorových buněk je spojena s diskomfortem při aplikaci. Podkožní růst nádorů není provázen nežádoucími účinky. Předpokládáme, že experimentální léčba bude spojena pouze s diskomfortem při perorálním či intraperitoneálním podávání léčiv. Myši budou eticky usmrceny dle aktuálních doporučení dříve, než budou vykazovat celkové klinické symptomy nádorového onemocnění, známky utrpení či bolesti.

Při podkožní aplikaci nádorových buněk a pokračujícím růstu nádorů bude pokus ukončen nejdéle 60 dnů po aplikaci buněk, ve chvíli, kdy velikost nádoru ještě nebude způsobovat obtíže či bolest.					
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)	1000			1000	
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena					
Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití					0
Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu					0
Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu					0
Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - uveďte					
Uplatňování 3R					
Nahrazení používání zvířat - uveďte, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu					
V současné době neexistuje rovnocenný alternativní relevantní systém pro provedení navrhovaných experimentů a posouzení růstu nádorových buněk a jejich vlastností v živém organismu. Testování v buněčných kulturách je příliš vzdálené normálnímu prostředí růstu nádorových buněk a neumožňuje adekvátní experimentální posouzení k možnosti skutečného chování a léčby nádorů. Tuto skutečnost jsme ověřili také 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, 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).					
Počet zvířat ve skupině vychází z předchozích zkušeností a kvalifikovaného odhadu. Je volen tak, aby byl dostatečný k předpokládanému statistickému zpracování, a zároveň nebylo používáno více jedinců, než je absolutně nezbytné. V pilotní fázi bude experimentální strategie ověřena na malém počtu jedinců s cílem eliminovat nutnost opakování pokusů.					
Šetrné zacházení se zvířaty - uveďte 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					
Experimenty budou prováděny v akreditovaném zvířetníku Ústavu molekulární genetiky AV ČR v souladu se zákonem a s ohledem na maximální welfare zvířat. Během experimentu bude sledována velikost nádorů a zdravotní stav zvířat - v případě neuspokojivého zdravotního stavu zvířete bude pokus ukončen a zvíře usmrceno. Podkožní aplikace nádorových buněk je nejšetrnější možností jak posuzovat jejich růst in vivo.					
Použití druhů zvířat - vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií					
A20 nádorová buněčná linie byla odvozena z BALB/c myšího kmene. Tento kmen je tak zcela geneticky kompatibilní a je nutné ho využít k výzkumu chování tohoto nádoru in vivo. Imunodeficientní NSG (NOD-SCID-gamma) myši mají deficit imunity (T i B buněčné imunity i poruchy nespecifické imunity), což umožňuje přijetí (xenotransplantaci) lidských lymfomových buněk nebo lidských nádorových linií v myším organismu a studium jejich chování in vivo. Použity budou samice ve věku po odstavu.					

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