

NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Experimentální model imunodeficientní myši s lidským karcinomem pankreatu

Doba trvání projektu pokusů v měsících	60
Klíčová slova	Karcinom pankreatu
CDX model	PDX model
Taxany	SB-T taxanové deriváty

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Onkologie [PB1]

Translační a aplikovaný výzkum: Rakovina u lidí [PT21]

0

0

Cíle projektu pokusů

Mezi solidními nádory zaujímá karcinom pankreatu jedno z předních míst z hlediska úmrtnosti. Tento fakt je dán zpravidla pozdní diagnózou a špatnou citlivostí nádorů na podanou chemoterapeutickou léčbu. Zejména nízká citlivost karcinomu pankreatu vůči používané léčbě pacientů se solidními nádory je v současné době hlavní překážkou v úspěšné terapii nádorových onemocnění. Nalezení nejvhodnějších léčiv a modifikovaných terapeutických režimů, stejně jako nových buněčných terapeutických cílů, které by byly účinné i na rezistentní nádory, je jedinou možností, jak zlepšit výsledky léčby těchto závažných nádorových onemocnění. Hlavním cílem projektu pokusů je zavést zvířecí model, který by umožnil testování citlivosti nádorových buněk a také nádorů přímo získaných od jednotlivých pacientů s karcinomem pankreatu na terapii a prostudovat nové, potenciálně účinné, terapeutické režimy na bázi konvenčních taxanů, které se jako jedny z mála léčiv osvědčily v klinických studiích právě u pankreatických nádorů. Dalším cílem je studium účinnosti nových taxanových derivátů, které jsou sledovány v preklinickém výzkumu jako potenciální léčba rezistentních forem nádorů (např. SB-T taxany) a které na in vitro úrovni prokázaly vysokou účinnost právě u rezistentních forem buněk. In vivo studie jsou dalším navazujícím krokem před selekcí a doporučením ke klinickému testování těchto nových slibných

Potenciální přínosy projektu pokusů

Hlavními přínosy podávaného projektu pokusů bude zavedení CDX a PDX zvířecích modelů karcinomu pankreatu pro studium účinnosti terapeutických režimů na bázi konvenčních a nových experimentálních SB-T taxanových derivátů. Z hlediska krátkodobých přínosů přímo v době trvání projektu pokusů nám úspěšné zavedení takovýchto modelů poskytne nové informace o chování nádorů a o mechanismu účinku cytostatik, která se používají k léčbě nádorových pacientů a o citlivosti nádorů na podávané terapeutické režimy využívající taxanové deriváty. Získáme obecné informace o potenciálně využitelných nových terapeutických režimech nádorů se špatnou prognózou a zároveň získáme informace o in vivo chování nádorů přímo z buněk konkrétních nádorových pacientů. V dlouhodobé perspektivě tento výzkum přispěje k prohloubení našich znalostí o chování nádorů vůči cytostatikům a k definici buněčných cílů pro budoucí vývoj individualizované léčby solidních nádorů.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Fáze I: V první fázi bude vytvořen myší experimentální CDX (cell line-derived xenograft) model karcinomu pankreatu, kde budou imunodeficientní myši subkutánně aplikovány buňky standardizovaných linií karcinomu pankreatu v množství 1-5*10⁶ v objemu 100μl.

Fáze II: V druhé souběžně probíhající experimentální fázi bude vytvořen myší experimentální PDX (patient-derived xenograft) model karcinomu pankreatu s využitím patientských nádorových fragmentů, kde bude imunodeficientní myším s.c. aplikovány přímo fragmenty nádorových buněk patientských karcinomů pankreatu o velikosti cca 3x3mm získaných z operačních resektátů. Tímto vznikne F0 generace myšek o počtu 1-3 jedinci na základě velikosti primárního nádoru a úspěšnosti uchycení aplikovaného nádoru. Při úspěšném uchycení nádoru trvá 1-6 měsíců, než nádor doroste do vhodné velikosti (100 - 150mm³). Poté je nutné pře transplantování nádoru stejným způsobem do dalších jedinců tak, abychom získali dostatečný počet jedinců v každé testované skupině pro získání validních dat a zároveň aby bylo využito pokud možno minimálního množství jedinců. Postupným pře transplantováním tak vznikají další generace F1, F2, F3 až FX. Mezi každou následující generací od generace F1 očekáváme

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

Zvířata budou během všech zákroků včetně jednorázové aplikace nádorových buněk i následovné aplikace testovaných látek v celkové inhalační narkóze s využitím isofluranové anestezie. Při provedení incize pro aplikaci fragmentů nádorových buněk od pacientů budou myším subjektům současně aplikovány s.c. analgetika např. Meloxicam v dávce 2-3mg/kg, aby byla minimalizována jejich bolest a stres a aby byla maximální šance na úspěšné provedení pokusu a uchycení nádorů. Ze zkušeností z předchozích experimentů CDX experimentů snášejí myšky aplikaci a růst nádorů bez obtíží, bez ztráty chuti k jídlu či hmotnosti, bez snížené hybnosti, bez příznaků bolesti. Po aplikaci experimentální léčby může docházet k částečné ztrátě hmotnosti, exulceraci nádoru. Kritériem pro hodnocení zdravotního stavu infikovaných zvířat budou zejména klinická pozorování pod dohledem veterinárního lékaře, která jsou zaznamenávána a hodnocena dle závažnosti třibodovým systémem (hodnocení 0-3). Jedná se především o změny hmotnosti, celkového vzhledu (výživový stav, apod.), pohyblivosti, chování a reakci na experimentátora, aktivity zvířete, neurologické změny, patrné fyziologické změny a změny v příjmu potravy. Zvířata budou denně kontrolována a v případě zaznamenání nejvyššího stupně (3) budou zvířata ihned usmrcena, aby se zamezilo utrpení zvířat.

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	820	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				
Zvířata budou na konci pokusu usmrcena pomocí oxidu uhličitého. Jedná se o imunodeficientní myši, které mimo barierový chov nepřežívají. Součástí experimentu je pitva a laboratorní zpracování orgánů (zvláště jater, ledvin, střeva, nádorové tkáně) pro dosažení cílů experimentu. Viz cíle tohoto projektu.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Tento experiment zatím není možné provést jiným způsobem. Projekt pokusů navazuje na již provedenou in vitro část, na základě které je možné a nutné přistoupit k další in vivo fázi preklinického výzkumu. Mezi in vitro studiemi účinnosti nových cytostatik a in vivo daty je velký rozdíl a tento typ experimentu je jedinou vědeckou veřejností přijímanou variantou.				
Omezení používání zvířat				
Testované skupiny jsou nejmenší možné, aby bylo dosaženo validních výsledků. Bude použito 5 zvířat v každé pokusné skupině (kontrola nebo noxa). Zároveň bude vždy pro retransplantace použit vždy minimální možný počet jedinců pro získání úspěšně využitelného PDX modelu.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Se zvířaty bude po celou dobu jejich života zacházeno s maximálním možným ohledem na zmírnění všech forem utrpení. Zvířatům bude poskytováno krmivo vhodnou peletovou stravou pro imunodeficientní myši i tekutiny ad libitum. Veškeré zákroky budou prováděny v šetrné celkové anestezii a případné zákroky s vyšší bolestivostí než vpich jehlou budou kryty podáním analgetika. Zvířata budou žít v sociálních skupinách po 5 jedincích. Minimálně jednou denně bude kontrolován jejich zdravotní stav a případné změny chování a prováděna hygiena ubikací.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Pro tento experiment jsme zvolili imunodeficientní myši (např. nu/nu myši) pro CDX model a myši s výrazně narušenou imunitou (např. NOD/SCID) pro PDX model. Narušená imunita těchto jedinců je nezbytnou predispozicí pro uchycení aplikované nádorové tkáně. Experimenty budou probíhat s již vyvinutými jedinci.