

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Zinek-dependentní signalizace v buňkách karcinomu prsu v experimentálním modelu laboratorní myši (*Mus musculus*): implikace pro prognostické a terapeutické účely

Doba trvání projektu pokusů v měsících	8
Klíčová slova	Metalothionein
Metalomika	Karcinom prsu
Zinek	0

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Onkologie [PB1]

0
0
0

Cíle projektu pokusů

Cílem projektu je rozšířit poznatky o vztahu mezi intracelulárním zinkem a skupinou na cystein-bohatých proteinů – metalothioneinů, a to především se zaměřením na studium dopadu up- či down-regulace metalothioneinů na transdukcii signálu v zinek-dependentní signalizaci nádorových buněk. Pozorované mechanismy budou validovány i v dalších typech nádorových onemocnění, a to pro validaci toho zdali jsou mechanismy tkáňově specifické či ne. V rámci projektu budou pro regulaci exprese různých sub/isoform metalothioneinů (především pak MT1X, MT1H a MT2) využity metodologie stabilní či transientní transfekce plasmidové DNA s následným studiem chování buněk ve smyslu agresivity, invazivity a vnímavosti k cytostatikům. Na základě získaných dat budou také navrženy nové terapeutické modalities schopné cíleně ovlivňovat expresi metalothioneinů a následně také na zinku-závislou signální transdukcii. Dílčím cílem projektu je studium exprese sub/isoform metalothioneinu jako prognostických markerů ve vybraných subtypech karcinomu prsu. Podrobná metodika pokusů bude vycházet z in vitro experimentů.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Primárním přínosem plánovaných experimentů bude především objasnění důležitosti vybraných sub/isoform metalothioneinů pro zinek-dependentní signalizaci v buňkách karcinomu prsu. Nejen naše publikované a předběžné výsledky ukazují zásadní důležitost iontů zinku pro buňky karcinomu prsu, a to v různém rozsahu v závislosti na klinickém subtypu tohoto nádorového onemocnění. Předložený projekt tak bude zásadní pro validaci těchto výsledků na úrovni in vivo. Získané výsledky pak mohou poskytnout základnu pro další studium analýzy exprese metalothioneinů jakožto diagnostických a prognostických biomarkerů. Na základě molekulárních analýz také plánujeme derivovat buněčné a molekulární procesy, které by mohly sloužit jako vhodné cíle pro vývoj nových terapeutických modalit pro personalizovanou medicínu. Výsledky získané těmito experimenty následně uveřejníme v recenzovaných časopisech a připravíme nové technologické postupy, které předpokládáme chránit formou užitého vzoru, případně patentu.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Využijeme dobře standardizované nádorové modely: karcinom mléčné žlázy (myší buňky 4T1), kolorektální karcinom CT26 (kmen BALB/c), buněčný lymfom EL4 (C57BL/6), leukemii P388 a její variantu P388/MDR (kmen DBA/2), karcinom mléčné žlázy SKBR-3 a jeho variantu SKBR-3/PCTX, karcinomy prsu MDA-MB-231, MDA-MB-468 a T47D (kmen nu/nu). Nádory budou indukovány jednorázovým subkutánním (s.c.) injikováním 105 – 106 nádorových buněk ve 100 µL bezsérového média z kultury v den 0. Pro tyto účely budou využity pro účely kontrolní indukce wild-type (w.t.) buňky (tedy buňky bez zásahu do exprese metalothioneinů) a tyto budou porovnávány s buňkami s alterovanou expresí metalothioneinů (knock-out buňky – buňky upravené pomocí CRISPR/Cas9 a knock-in buňky – buňky s expresí metalothioneinů zvýšenou pomocí transfekce vektorem nesoucím gen, kódující metalothionein). Základem léčby budou cytostatika (cisplatina, oxaliplatina, karboplatina), která budou dávkována na základě již získaných zkušeností a budou podávány intravenózně (i.v.) nebo intraperitoneálně (i.p.) po vyvinutí nádoru (většinou 6.-12. den v závislosti na použitém nádorovém modelu, kdy průměr nádorového ložiska odpovídá velikosti cca 8 mm). Léčiva budou myším dávkována buď v jedné dávce (bolusově) nebo v několika dávkách, nejčastěji ve třech dávkách každý třetí den. Objem jedné

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

Nežádoucí účinky u testovaných zvířat se mohou projevit poškozením orgánů či patologickou odezvou imunitního systému. Projekt je klasifikován s mírou závažnosti jako střední. Zvířata budou po ukončení pokusu usmrcena předávkováním anestetikem či cervikální dislokací.

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 (<i>Mus musculus</i>) [A1]	2	0	400	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				
Po skončení pokusů bude provedena eutanázie, a to pomocí předávkováním anestetikem či cervikální dislokací. Dle technologických postupů jsou kadavery ukládány do označeného kafilerního mrazicího boxu. Poté jsou odváženy asanační službou, se kterou má pracoviště smlouvu, ASANACE, s.r.o. Medlov. Opětovné použití zvířat není plánováno.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Navrhované schéma pokusu nelze nahradit jiným modelem, nelze provést na buněčném ani jiném modelu, neboť sledujeme patofyziologickou odpověď celého organismu. Alternativní modely nám neumožňují sledovat růst nádoru a změny jeho mikroprostředí, interakci nádoru s hostitelem, ani vliv léčby na nádor. Některé dílčí experimenty (např. stanovení protinádorového efektu léčiv) budou nahrazeny experimenty in vitro, což umožní snížit potřebu pokusných zvířat.				
Omezení používání zvířat				
Plánování experimentů předcházelo důkladné studium již publikovaných vědeckých výsledků, aby se předešlo opakováním experimentů a nadměrné spotřebě zvířat. Zvířata budou používána v minimálních počtech, které umožní statistické vyhodnocení rozdílů mezi skupinami. Pokud to bude možné, tak budou sdíleny vzorky získané v experimentech. Analýzou většího počtu parametrů najednou (použití moderních, citlivých metod) docílíme další redukce potřebného počtu zvířat.				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Myši inbredních kmenů jsou vhodnými modely pro studium dané problematiky, a to z důvodu homogenní odpovědi na aplikaci, ale také z důvodu jednoduché manipulace s jedinci. Veškerá manipulace se zvířaty bude co nejohleduplnější a co nejméně narušující přirozené potřeby zvířat.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Myši inbredních kmenů BALB/c, C56BL/6, C3H/HeN a DBA/2 jsou vhodnými modely pro studium experimentálních myších nádorů. Myši imunodeficientní (např. athymické nu/nu myši) nebo geneticky modifikované (např. RAG2 KO, tzv. SCID fenotyp) jsou vhodné pro analýzu růstu nádorů a vlivů léčby bez účasti imunitního systému hostitele. Imunodeficientní myši mohou navíc sloužit jako hostitelé pro nádory lidského původu (xenografty).