

NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Xenotransplantáty metastatických karcinomů jako nástroj pro preklinický výzkum, grant AZV NU21-08-00023

Doba trvání projektu pokusů v měsících

36

Klíčová slova

Karcinom

CTCs

CDXs

in vivo model

preklinický výzkum

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Onkologie [PB1]

0

0

0

Cíle projektu pokusů

Předkládaný projekt experimentů na zvířatech má za cíl navrhnout nové účinné terapeutické strategie pro efektivní individuální léčbu pacientů s pokročilým stadiem karcinomu prsu a prostaty s využitím vhodně zvolených chemoterapeutických látek a jejich kombinaci s nově syntetizovanými nosičovými molekulami a inhibitory signálních drah důležitých pro vznik a rozvoj nádorových onemocnění. Na myších modelech bude prověřena jejich relevance a účinnost v podmínkách komplexního prostředí savčího organismu.

Potenciální přínosy projektu pokusů

Experiment na zvířatech je nezbytný z důvodů základního výzkumu a dále předcházení, poznání nebo léčení nemocí, utrpení, poškození zdraví, tělesných nesnází nebo k poznání ovlivnění fyziologických stavů a funkcí člověka nebo zvířete. 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

Cirkulující nádorové buňky (CTCs) izolované z pacientů s pokročilým stadiem nádorového onemocnění prsu a prostaty budou implantovány do renální kapsuly laboratorním myším kmene NOD Cg-Rag1tm1Mom Il2rgtm1Wjl/SzJ (zkráceně NRG). V průběhu trvání projektu pokusů budou myším imunodeficientního kmene NRG prováděny implantace vyizolovaných patientských CTCs v 10ul matrigelu do renální kapsuly. Po provedení cca 1 cm stříhu kůže v oblasti ledviny, nastříhnutí peritonea a jemném narušení renální kapsuly uchycením pinzetou budou subkapsulárně injikovány buňky v matrigelu. Po operaci budou zvířata umístěna zpět do chovné místnosti a jejich zdravotní stav bude pravidelně monitorován. Manipulace se zvířaty bude probíhat v celkové anestezii navozené injekcí kombinace ketamin/xylazin (80-100 mg/kg ketamin, 10 mg/kg xylazin). V případě následného vyšetření růstu nádorů bude navození celkové anestezie probíhat inhalačně, pomocí isofluranu. V průběhu všech pokusů budou zvířata pravidelně monitorována, zda případný rostoucí nádor, nezpůsobuje zvířatům nepřiměřené zhoršení životních podmínek. Růst nádoru bude monitorován palpačně, případně pomocí neinvazivních optických metod, detekcí fluorescenčního signálu. Předpokládané ukončení pokusů bude 6 měsíců po implantaci buněk. Po ukončení pokusu budou zvířata šetrně usmrcena (cervikální dislokace, oxid

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

Utrpení zvířat v průběhu pokusů bude minimalizováno. Subkutánní injekce budou prováděny bez místního či celkového znecitlivění. Cílem experimentů je 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 cm³, aby zvířatům nezpůsobovaly závažnější obtíže. Zvířata budou pravidelně monitorována, a pokud dojde k prokazatelnému zhoršení kvality jejich života, budou ihned z experimentu vyřazena a utracena. Po skončení pokusu budou zvířata utracena (přerušení míchy nebo pomocí 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. Po skončení pokusu budou experimentální zvířata usmrcena odpovídající metodou (cervikální dislokace). 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	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
myš laboratorní (Mus musculus) [A1]	0	0	800	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 provedení pokusů budou zvířata usmrcena z důvodu snížení jejich utrpení, která by byla indukována po provedených zákrocích.				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Navrhované experimenty in vivo využívající myši model tvoří důležitou součást plánovaného projektu, účelně doplňují experimenty in vitro 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, což není možné obsáhnout v podmínkách in vitro buněčné kultivace.				
Omezení používání zvířat				
Budou použity minimální nezbytné počty zvířat. Jejich počet v jednotlivých experimentálních skupinách je plánován s ohledem na požadavky na statistickou průkaznost získaných výsledků, což předpokládá 5-10 jedinců ve skupině. Maximálně se bude jednat o celkem 800 myši				
Šetrné zacházení se zvířaty				
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 tlášení 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 utraceno.				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Experimenty budou prováděny na jedincích myšího kmene NOD.Cg-Rag1tm1Mom Il2rgtm1Wjl/SzJ (NRG). Tento kmen je vhodným modelem pro studium nádorových onemocnění, neboť nesou mutace v genech ovlivňujících zdárný vývoj T a B lymfocytů a jsou tak vysoce imunodeficientní. Využití imunodeficientního myšího kmene pro tento experiment umožňuje expanzi populací buněk lidského původu bez rizika jejich odvrhnutí. Při navrhovaném plánu pokusů předpokládáme spotřebu 800 jedinců. Tento přístup představuje unikátní model pro komplexní studium chování nádoru v organismu a jeho reakce na navrhovanou léčbu. Nové poznatky získané s využitím uvedeného relativně jednoduchého modelu lze aplikovat na složitější organismy včetně člověka. Maximálně se bude jednat o celkem 800 myší. Dále budou drženy minimální počty rodičovských kmenů nutné pro udržení kontinuální kolonie kmene NRG.