

NETECHNICKÉ SHRNTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569**Název projektu pokusů**

Nové mechanismy lymfomogeneze: role PHIP proteinu a poruchy jeho signalizace s využitím modelů myši laboratorní (Mus musculus) (20-01969Y)

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

30

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾

PHIP, lymfomogeneze, signalizace

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

Folikulární lymfom je druhým nejčastějším non-Hodgkinským lymfomem (tvoří přibližně 20%) a je zároveň nejčastějším ze skupiny indolentních lymfomů. Jeho genetickou charakteristikou je balancovaná translokace t(14;18)(q32;q21), která vede k zvýšené expresi proti apoptotického proteinu BCL2. Tato genetická alterace avšak není samostatně dostačující ke vzniku folikulárního lymfomu, jelikož byla popsána i u normálních lymfocytů u zdravých lidí. Předpoklad, že je potřeba série dalších genetických změn k rozvoji folikulárního lymfomu se potvrdil v nedávných studiích a jako zcela zásadní se ukázaly mutace a delecce v genech regulujících genovou expresi neboli epigenetických regulátorech. Integrativní genomickou analýzou jsme identifikovali nový kandidátní gen PHIP (Pleckstrin homology domain-interacting protein) k jehož somatické delecce dochází u 30% folikulárních lymfomů a jehož funkce byla nedávno spojena právě s epigenetickou regulací. Cílem studie je popis obecné i pro lymfomové buňky specifické funkce PHIP proteinu, jeho role při vzniku folikulárního lymfomu a jeho interakci s dalšími epigenetickými regulátory. Toto posune naše vědomosti ohledně mechanismů lymfomogeneze, ale může naznačit i nové směry v jeho léčbě.

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)

Některé mechanismy vzniku a vývoje nádorů a ověření specifické léčby není možné bez použití myších modelů. Přínos projektu tak leží zejména v posunutí našeho chápání rozvoje a růstu nádorových buněk v co nejbližším prostředí, kde normálně rostou a ověření významu nádorově specifických změn v DNA. Stejně tak jsou myší modely nutné i pro ověření efektivity protinádorové terapie jako předstupeň případnému klinickému použití. Tyto přínosy jsou krátkodobé. Pokud budou úspěšné, tak by navrhovaný projekt mohl v dlouhodobém měřítku sloužit jako základ k dalšímu výzkumu navrhované protinádorové léčby jak v preklinickém, tak i v klinickém výzkumu s potenciálem zlepšit léčbu v současnosti nevyčísitelných typů lymfomů (nádorů z bílých krvinek).

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.

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, jelikož se jedná o indolentní skupinu lymfomů. 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 bude pokus ukončen nejdéle 40 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)	330			X	
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 skutečné 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 - vysvětlíte, 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. Nezbytný minimální počet myši v pokusné skupině byl odhadnut pomocí dvou metodik popsanych v publikaci Charan a Kantharia "How to calculate sample size in animal studies?" (PMID: 23961961); tzv. "resource equation" metody a kalkulace síly studie s použitím volně dostupného programu "G power" (PMID: 17695343).

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 1. LF UK v souladu se zákonem a s ohledem na maximální pohodu zvířat. Během experimentu bude sledována velikost nádorů a zdravotní stav zvířat - v případě neuspokojivého zdravotního stavu zvířete bude pokus ukončen a zvíře usmrceno.

Použité druhy zvířat - vysvětlíte výběr druhů a souvisejících životních stadií

A20 nádorová buněčná linie byla odvozena z BALB/c myšního 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