

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ	
Název projektu pokusů	
Odvození imunokompetentního myšního modelu B-lymfomu pomocí transplantace myší lymfomové linie 38C13 do syngenního kmene C3H/HeN (H-2k) s cílem testovat roli imunity při eradikaci zbytkové choroby po léčbě	
Doba trvání projektu pokusů	do 12/2021
Klíčová slova - maximálně 5	Maligní lymfomy, imunoterapie, cytarabin, minimální reziduální choroba
Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka	
	<input type="checkbox"/> základní výzkum
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> translační nebo aplikovaný výzkum
	<input type="checkbox"/> vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
	<input type="checkbox"/> ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
	<input type="checkbox"/> zachování druhů
	<input type="checkbox"/> vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
	<input type="checkbox"/> trestní řízení a jiné soudní řízení
Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)	
<p>Myší modely založené na xenotransplantaci primárních lymfomových buněk do imunodeficientních myší (tzv. <i>patient-derived xenografts</i>, PDX) se v posledních několika letech staly standardem testování či ověřování preklinických experimentálních léčebných postupů v hematologii. PDX modely mají řadu nesporných výhod oproti buněčným liniím, neboť umožňují testování účinnosti experimentální látky na růst a šíření lymfomu a <i>in vivo</i> testování zahrnuje řadu klíčových parametrů (vztahy s mikroprostředím, hypoxie, metabolické změny, farmakokinetika), které v <i>in vitro</i> systémech testovat vůbec nelze. Hlavní nevýhodou PDX modelů však zůstává imunodeficiencí použitých myší (NOD-RAG, NOD-SCID), díky které PDX modely umožňují pouze omezeně testovat experimentální imunoterapeutické léčebné postupy, zejména ty založené na T-lymfocytech (např. bispecifické protilátky typu BiTEs, check-point inhibitory atd.). Maligní lymfomy představují nejčastější typ hematologických malignit v České republice. U části pacientů se nedaří lymfom vyléčit za použití standardních léčebných postupů, což vyžaduje testování nových protilymfomových látek. Imunoterapie představuje zásadní milník v protinádorové léčbě. Testování a následné schválení celé řady látek ze skupiny imunoterapeutik včetně terapeutických monoklonálních protilátek (např. rituximab), imunomodulačních látek (např. lenalidomid), check-point inhibitorů (např. nivolumab), nebo bispecifických protilátek (BiTE, blinatumomab) vedly k zásadnímu zlepšení přežití pacientů s různými typy hematologických malignit. V předkládaném projektu hodláme zavést a standardizovat myší model myšního B-lymfomu založený na transplantaci linie 38C13 do syngenního kmene C3H/HeN (H-2k). Předpokládáme, že podkožní transplantace 10exp6 buněk/myš povede k vytvoření podkožního růstu lymfomu v podobě „tumoru“. Tento model pak hodláme použít pro ověření role imunitního systému pro eradikaci zbytkového lymfomu po léčbě pomocí volným a polymerně-vázaným cytarabinem. Předpokládáme, že po léčbě polymerně-vázaným cytarabinem nedojde k recidivě / relapsu lymfomu, na rozdíl od léčby založené na volném cytarabinu. Vycházíme z výsledků analogické léčby na imunodeficientních myších modelech, kde terapie pomocí polymerně-vázaného cytarabinu vedla k dlouhodobému „vymizení“ lymfomu a pozdní recidivě choroby. Předpokládáme, že imunomodulace imunitního systému myši po proběhlé léčbě může vést k eradikaci zbytkové minimální choroby, čímž dojde k zabránění relapsu lymfomu.</p>	
Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů (jak by mohlo být dosaženo pokroku ve vašem vědním oboru nebo jaký přínos by z něj člověk či zvířata mohli mít)	
Ověření schopnosti imunitního systému eradikovat zbytkovou nemoc a zabránit návratu (relapsu) lymfomu. Experimentální průkaz mechanismu dlouhodobého protilymfomového účinku polymerně-vázaných léčiv.	
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá	
Tento typ studie není možné realizovat jinak než s použitím laboratorních zvířat – v současné době není k dispozici žádný alternativní systém či model, kterým by bylo možné laboratorní zvíře nahradit. Imunokompetentní myši C3H/HeN (H-2k) jsou schopny přijít syngenní myší linii 83C13. Pro tento projekt předpokládáme spotřebu max. 100 myší (dospělých samic) .	
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?	
Podkožní aplikace lymfomových buněk je spojena s růstem lymfomu v podobě podkožního tumoru. Vzhledem k tomu, že experiment bude ukončen v okamžiku, kdy maximální rozměr tumoru dosáhne 2cm, není růst takto malého tumoru v podkoží spojen s bolestí, diskomfortem či hubnutím experimentálních zvířat. Aplikace všech léčiv v plánovaných dávkách je pro pokusná zvířata netoxická. Proto není plánováno použití anestezie či analgezie. Navrhovaná míra závažnosti je tudíž 2 (střední).	
Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)	
Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.	
Pro plánované experimenty byl vybrán model imunodeficientní laboratorní myši, která umožňuje příhojení, růst a následnou léčbu lidských lymfomových buněk. V současné době neexistuje jiná metoda, která by umožnila preklinické <i>in vivo</i> testování (ověření) účinnosti a/nebo biodistribuce nových protinádorových léčiv před tím, než budou testována v rámci klinických studií na pacientech. Většinu protinádorových látek lze pouze omezeně testovat <i>in vitro</i> , jejich plnou	

protinádorovou účinnost lze preklinicky testovat pouze in vivo na zvířecích modelech, nejčastěji na myších modelech. 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, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.

Navrhovaný experiment nebyl dosud testován na myších imunokompetentním myším modelu lymfomu. Ověření proběhlo v databázích vědeckých prací SCOPUS, MedLINE, Web of Science a PubMed, naposledy v září 2019. Statistická kalkulace pomocí χ^2 (chi-kvadrát) testu predikuje, že při použití 10 zvířat na skupinu bude dosaženo signifikance $p < 0.01$ při dosažení rozdílu o $> 60\%$ ve vypočítaných objemech tumorů mezi léčenou a neléčenou skupinou. Plasma, tumory a vybrané orgány z pokusných myši budou zamrazeny za účelem využití pro případné translační výzkum, aby nemusely být pokusy z těchto důvodů opakovány.

Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlete volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů.

Vysvětlete obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.

Zdravotní stav zvířat a jejich reakce na podané léčivo bude sledována v průběhu experimentu od okamžiku aplikace až do ukončení experimentu. V případě pozorování negativních změn u laboratorního zvířete bude pokus ukončen a zvíře usmrceno. Podkožní modely lymfomů jsou (ve srovnání se systémovými modely diseminovaných lymfomů založenými na intravenózní xenotransplantaci lymfomových buněk) pro myši šetrnější, neboť nevedou k hubnutí, alternaci celkového stavu či pre-terminální paralýze.