

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ

Název projektu pokusů

Nové koncepty terapeutického ovlivnění lidských malignit exprimujících nádorové antigeny – zejména PSMA (prostate specific membrane antigen) pomocí cílených nanostruktur a modulací imunitní odpovědi

Doba trvání projektu pokusů 2019-2024 ukončení pokusů 1.3.2024

Klíčová slova - maximálně 5 cílená nádorová terapie, imunoterapie, prostate specific membrane antigen

Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka

základní výzkum

translační nebo aplikovaný výzkum

vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků

ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat

zachování druhů

vyšší vzdělávání nebo odborná příprava

trestní řízení a jiné soudní řízení

Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)

Maligní tumory pokročilého stadia i v dnešní době představují závažný medicínský problém, jak pro svoji vysokou mortalitu, tak i pro toxicitu užívané terapie, která je limitující pro řadu nemocných, proto je snaha o cílené ovlivnění tumorů jak pomocí směřování cytotoxických léčiv, tak i pomocí imunitního systému hostitele. Expresí nádorového markeru s označením PSMA (prostate specific membrane antigen) je popsána v prostatických tumorech, některých mozkových nádorech a také na endoteliálních buňkách většiny solidních nádorů. Cílem této studie je jak určení využití látek a nanostruktur cílících nádorové antigeny (jako např. PSMA).

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)

Pochopení možností cílení nanostruktur (nesoucích léčivo či ovlivňující imunitní systém) umožní vytvořit nové strategie léčby onkologických pacientů. Testované látky a nanostruktury by mohly představovat nová léčiva schopná zpomalit nebo zastavit růst malignit jak u lidí, tak i u zvířat a mohly by tak být alternativou ke standardní konvenční chemoterapii.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Celkem počítáme s použitím 676 myši. Je to maximální počet použitých zvířat, v každé skupině jsou zahrnuta zvířata, která budou použita jenom v případě potřeby (úmrtí, doměření apod.). Uvedené počty všech zvířat jsou stanoveny tak, aby byla zajištěna statistická hodnotitelnost výsledků.

Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?

Očekávaným nežádoucím účinkem u pokusných zvířat mohou být obecné příznaky nádorového bujení (kachexie, syndromy z lokálního útlaku). V minimálním měřítku lze očekávat i případné nežádoucí účinky v důsledku podané terapie (febrilie, autoimunní reakce). Předpokládaná míra závažnosti je střední - experimentální zvířata pocítí nejvýše středně intenzivní bolest nebo středně závažný zásah do běžného chování pokusného zvířete. Se zvířaty bude nakládáno podle zásad bezbolestného zacházení se zvířaty, experiment bude ukončen při prvních známkách zhoršení zdravotního stavu zvířete. Zvířata budou po ukončení pokusu usmrcena předávkováním anestetikem, budou odebrány a analyzovány orgány a experimentální nádory, event. i moč, stolice a krev.

Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.

Všechny testované látky budou před aplikací do zvířat otestovány na cytotoxicitu pomocí validovaných esejí na buněčných liniích pro snížení rizika nežádoucích účinků, taktéž budou *in vitro* testovány na aktivitu proti buněčným nádorovým liniím a zda jsou schopny aktivovat jednotlivé buňky imunitního systému. Tyto experimenty nám ovšem stále nemohou říci, zda tyto látky budou fungovat v systému *in vivo*, již jen z toho důvodu, že růst nádoru je velmi výrazně ovlivněn mikroprostředím (vaskularizace, tumor infiltrující makrofágy, interakce s extracelulární hmotou). Proto i v současné době je zlatým standardem k ověření tumorigenity zvířecí model. *In vivo* studie na myším zvířecím modelu v současné době představuje široce používaný přístup ve srovnatelných studiích a nejlepší model pro pochopení mechanismů tumorigeneze. Alternativní metoda bez použití zvířat se stejnou spolehlivostí v kontextu komplexní sítě interakcí nádorová buňka - nádorové mikroprostředí - imunitní systém neexistuje. Taktéž není v současné době možné bez užití zvířat úplně predikovat vedlejší účinky aplikovaných látek. Možnosti využití alternativních metod bylo čerpáno z elektronických databází - pubmed, library of science, Go3Rs, ECVAM/FAME.

Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.

Využití geneticky podmíněných imunodeficientních myši je vhodné zejména pro dobré přihojení lidských nádorových linií a tudíž i dobrou úspěšnost při vzniku tumorů, které se svými vlastnostmi blíží podmínkám v lidských nádorech. Jiné druhy imunodeficientních zvířat jsou podstatně méně běžné a úspěšnost přihojení tumorů je nižší. Proto by v případě volby jiného druhu bylo nutno očekávat větší počet experimentálních zvířat. Uvedený počet zvířat je maximální a lze předpokládat menší množství použitých zvířat. Počet zvířat bude omezen preselekcí používaných látek pomocí experimentů na buněčných kulturách. O průběhu a výsledcích všech provedených experimentů budou pečlivě vedeny

protokoly, výsledky budou průběžně hodnoceny k optimalizaci experimentální strategie a snížení počtu potřebných experimentálních zvířat. Na základě našich předchozích experimentů lze očekávat variabilitu biologického chování xenotransplantovaných tumorů a proto bude potřeba minimální počet 6 zvířat ve skupině k zajištění reprodukovatelnosti a interpretovatelnosti pozorovaných rozdílů (v počtu v každé skupině jsou zahrnuta zvířata, která budou použita jenom v případě potřeby - úmrtí, doměření apod.). Pro zajištění minimalizace počtu zvířat budou experimenty primárně provedeny nejprve v menších kohortách (á 3 jedinci), pokud již na tomto množství bude dosaženo statistické signifikance či výrazných nežádoucích účinků, pokus bude ukončen. Až pokud statistické signifikance dosaženo nebude, bude experiment doplněn do celkového počtu 6 jedinců. Společné využití zvířat při tomto pokusu není možné vzhledem k ovlivnění fyziologických pochodů zvířete jak implantovanými buněčnými liniemi, tak i studovanými látkami.

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

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

. Se zvířaty bude nakládáno podle zásad bezbolestného zacházení se zvířaty, během experimentů bude zajištěn dostatek potravy a vody, při bolestivých zákrocích budou použita anestetika. Všechny operační zákroky budou prováděny v celkové anestezii s využitím běžně užívaných anestetických látek u hlodavců ve veterinární medicíně. Pro zmenšení pooperační bolestivosti bude při odběrech krve krom celkové anestezie užito i lokálního dlouhodobého anestetika. Technické vybavení užívané v experimentu odpovídá parametrům vybavení užívaného v humánní resp. veterinární medicíně. Pro snížení stresu bude jakákoli delší manipulace (odběr krve z ocasní žíly, neinvazivní focení v iBoxu) provedena v krátkodobé celkové anestezii. Stav zvířat bude pravidelně denně kontrolován, experiment bude ukončen při prvních klinických známkách zhoršení zdravotního stavu zvířete (např. kožní léze u subkutánních tumorů, klinické známky bolesti, neurologické příznaky, změna chování, pokles hmotnosti atp.) tak, aby nedocházelo k jejich utrpení.