

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ

Název projektu pokusů	
Experimentální terapie maligních lymfomů pomocí inhibitoru BCL2 venetoclaxu v kombinaci s cytarabinem a tacrolimem na myších modelech	
Doba trvání projektu pokusů	do: 12/2021
Klíčová slova - maximálně 5	Maligní lymfomy, cílená terapie, patient-derived xenograft (PDX)
Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka	
	<input type="checkbox"/> základní výzkum
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" 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>Maligní lymfomy (ML) 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. Cytarabin (araC) je klasické cytostatikum představující páteřní lék v terapii akutních leukémií a agresivních lymfomů. V předkládaném projektu bychom používali jeho polymerní formu (poly-araC) v dávce 4 mg / kg intraperitoneálně (jednorázová aplikace). Venetoclax (VTX) je inhibitor BCL2 anti-apoptotického proteinu- se používá v léčbě chronické lymfatické leukémie, akutních leukémií a některých typů lymfomů. Podává se v dávce 50mg/kg perorálně sondou denně po dobu 10 dnů. Tacrolimus je inhibitor kalcineurinového receptoru. V klinické praxi se používá jako imunosupresivní látka, ale testuje se také jako protinádorová látka, zejména díky schopnosti inhibovat p-glykoprotein. Podává se intraperitoneálně v dávce 5 mg /kg 1 x denně.</p> <p>Hlavním cílem předkládaného projektu je ověřit (potvrdit) synergismus mezi látkami venetoclax a poly-araC (část A) a mezi látkami venetoclax a tacrolimus (část B). Pokusy budou provedeny na vybraných myších modelech agresivních lymfomů odvozených od pacientů (tzv. patient-derived xenografts, PDXs).</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)	
Preklinické zdůvodnění pro design klinické studie fáze 2 testující účinek venetoclaxu a cytarabinu, resp. tacrolimu u pacientů s B-NHL.	
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. Imunodeficientní NSG (NOD-SCID-gamma) a NOD-RAG myši jsou deficientní v T, i v B buněčné imunitě a navíc vykazují poruchy nespecifické imunity, což umožňuje přihojení (xenotransplantaci) nádorových buněk v myším organismu. Pro tento projekt předpokládáme spotřebu max. 400 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 2 cm, není růst takto malého tumoru v podkoží spojen s bolestí, dyskomfortem či hubnutím experimentálních zvířat. Aplikace všech léčiv v plánovaných dávkách je zcela 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 přihojení, 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 <i>in vivo</i> 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.	
Experimentální terapeutické postupy budou validovány na reprezentativním počtu PDX modelů hematologických malignit. Navrhované kombinace nebyly dosud testovány na myších PDX modelech agresivních lymfomů. Ověření proběhlo v databázích vědeckých prací SCOPUS, MedLINE, Web of Science a PubMed, naposledy v lednu 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. Použití panelu 30 PDX modelů lidských agresivních lymfomů zajistí dostatečnou relevanci ve vztahu k molekulárně-	

cytogenetické heterogenitě maligních lymfomů, což je nezbytné pro zajištění relevance výsledků plánovaných pokusů. Tumory a vybrané orgány z pokusných myši budou zamraženy za účelem využití pro případné translační výzkum, aby nemusely být pokusy z těchto důvodů opakovány.

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.

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. Experimentální léčba na myších modelech založených na xenotransplantaci primárních lymfomových buněk (tzv. patient-derived xenografts) představuje uznávanou preklinickou alternativu k léčbě pacientů s daným typem nádorového onemocnění. 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.