

## NETECHNICKÉ SHRNU TÍ PROJEKTU POKUSŮ 103/2019

### Název projektu pokusů

Cirkulující nádorové buňky jako nástroj pro preklinickou analýzu nádorové heterogenity a odpovědi na léčbu

Doba trvání projektu pokusů 3 roky, ukončení 31.12.2023

Klíčová slova - *maximálně 5* Cirkulující nádorové buňky, nádorová heterogenita, metastáze, resistance

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

<input checked="" type="checkbox"/>	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
<input checked="" type="checkbox"/>	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
	trestní řízení a jiné soudní řízení

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

Cílem projektu pokusů je studovat heterogenitu nádorových buněk v podmínkách *in vivo*, zejména s ohledem na cirkulující nádorové buňky, které jsou klíčové pro vznik metastáz a progresi onemocnění. Detailnější porozumění biologii cirkulujících nádorových buněk může přispět ke zlepšení studia mechanismů vzniku resistance k terapii a pomoci při vývoji nových potenciálních terapeutik zejména pro léčbu diseminovaného nádorového onemocnění.

Pro studium cirkulujících nádorových buněk v podmínkách *in vivo* budou zavedeny zvířecí modely vytvořené myšimi a lidskými buněčnými liniemi nádoru mléčné žlázy a prostaty a také modely připravené pomocí lidských primárních nádorů v imunodeficientních myších kmenech. Pokusy, které jsou předmětem Žádosti o schválení projektů pokusu, mají za cíl připravit dané zvířecí modely pro rekapitulaci metastatické kaskády se zaměřením na izolaci a charakterizaci cirkulujících nádorových buněk. Tyto studie přispějí k výzkumu v oblasti nádorové diseminace a vzniku metastáz na úrovni cirkulujících nádorových kmenových buněk a dále pak k objasnění vzniku chemoresistance a nádorové heterogenity.

### 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)

Cirkulující nádorové buňky představují populaci buněk odvozených z primárního nádoru, která významně přispívá k progresi onemocnění a rezistenci k aplikované léčbě. Plánované experimenty přispějí k detailnějšímu objasnění biologických vlastností této populace, jejímu fenotypu a k případnému nalezení léčiv, která mohou tuto populaci specificky cílit a tím snižovat riziko vzniku metastatického vývoje v dalších orgánech. Cirkulující nádorové buňky jsou slibným buněčným typem pro využití zejména v regenerativní medicíně. Plánované pokusy přispějí k objasnění nádorové heterogenity, plasticity a dopadu těchto procesů na vznik resistance vůči aplikované léčbě a pomohou zejména při vývoji léčby pro diseminovaná nádorová onemocnění. Imunodeficientní modely s lidskými nádorovými buňkami či patientskými nádory umožní aplikovat tyto výsledky přímo na klinické vzorky. Tento přístup je slibný pro expandování patientského materiálu pro následné molekulárně biologické analýzy.

### Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá

Pro pokusy budou využíváni imunokompetentní jedinci kmenů C57Bl/6 a BALB/c, a to v závislosti na genetickém pozadí materiálu určeného k injikaci. V případě injikace materiálu lidského původu budou použiti jedinci imunodeficientního kmene SHO nebo NRG. Počet použitých pokusných zvířat se bude odvíjet od počtu vzorků buněčných linií a tkání vhodných pro injikaci. Celkový odhadovaný počet myší závisí od množství patientského materiálu, které bude možno injikovat. Odhadovaný počet zvířat v období tří let řešení projektu je 600. Dále budou drženy minimální počty rodičovských kmenů nutné pro udržení kontinuální kolonie kmene SHO.

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

Cílem experimentů je imunokompetentním nebo imunodeficientním jedincům injikovat nádorové buňky, monitorovat růst nádoru a izolovat subpopulace cirkulujících nádorových buněk z krve. Dalším cílem je sledovat vliv léčby a případnou odpověď či rezistenci nádorových buněk. Nádory budou růst maximálně do velikosti 2 cm<sup>3</sup>, 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 plíce, krev a případně další orgány pro následnou analýzu. Plíce, krev a případně další orgány budou také odebírány ze zdravých jedinců pro získání kontrolních vzorků. Všechny experimenty budou prováděny tak, aby utrpení zvířat bylo co nejmenší. Injikace buněk a tkání za účelem vytvoření experimentálního modelu bude prováděna u zvířat v celkové anestezii ve sterilních podmínkách. Následně budou zvířatům podávána analgetika pro zmírnění pooperační bolesti a dále budou zvířata po operaci pravidelně monitorována. Pokusy budou prováděny tak, aby byla zvířata co nejméně stresována. Navrhovaná míra závažnosti je mírná až střední. Po ukončení experimentu bude zvířatům odebrána krev kardiální punkcí pod celkovou anestezii a následně budou zvířata usmrcena přerušením míchy. Kadavery budou umístěny do kafilerního mrazicího boxu pro VŽP 1. kategorie a jejich následná likvidace bude zajištěna firmou Agris, s.r.o., záv. Medlov, Němčičky u Židlochovic.

### Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)

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

Plánované studie na zvířatech nelze nahradit studiemi na buněčných liniích kultivovaných v podmínkách *in vitro*, neboť zejména rozvoj a diseminace nádorového onemocnění a následná odpověď na aplikovanou terapeutiku je nutné studovat

v kontextu celého mikroprostředí nádoru a organismu, což plánované syngenní a xenogenní modely umožňují.

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

Během celé studie však bude použito minimálního množství zvířat, které je nezbytné pro správné statistické zhodnocení získaných výsledků. Počet použitých zvířat bude záviset také od počtu a množství patientských vzorků pro expandování. Předpokládá se použití nejméně tří myši na každý nově implantovaný patientský vzorek solidního nádoru. V pokusech, kde budou zvířata s nádory ovlivněna terapeutiky, se odhaduje použití 5-10 jedinců na skupinu a opakování.

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.

V pokusech pro zavedení syngenních modelů rakoviny prsu a prostaty budou používáni jedinci kmene C57Bl/6 a BALB/C. Během pokusů s materiálem lidského původu je plánováno využít myši kmene SHO nebo NRG, který je imunodeficientní a tedy vhodný pro xenotransplantace lidského materiálu. Navíc jedinci kmene SHO jsou bezsrstí, což usnadňuje monitorování růstu nádorů. Po celou dobu trvání pokusů bude se zvířaty zacházeno šetrným způsobem tak, aby jim nebyla působena bolest, stres, strach a utrpení. Se zvířaty bude zacházeno klidně, budou přivýkána na úchop rukou ošetřovatele nebo výzkumníka a budou umístěna v neměnných definovaných podmínkách bariérového chovu ve sterilních klecích, v případě imunodeficientního kmene v individuálně ventilovaných klecích. Během operačních zásahů budou zvířata pod celkovou anestézií 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.