

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ

Název projektu pokusů	
Rezistence nádorových buněk vůči terapii v kontextu buněčné heterogenity	
Doba trvání projektu pokusů	1.12.2018-30.11.2023
Klíčová slova - maximálně 5	nádorová heterogenita, xenografty, nádorová terapie
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)	
Cílem projektu pokusů je využít imunodeficientní myši kmen NOD.Cg-Rag1 ^{tm1Mom} Il2rg ^{tm1Wjl} /SzJ (zkráceně NRG) pro expanzi lidského nádorového materiálu (nádory prsu, prostaty, ovárií), který bude následně fenotypově charakterizován. Dále bude tento kmen využit ke studiu vlivu vybraných léčiv a jejich kombinací na růst nádorů. Dalším cílem je využít imunodeficientní myši kmen pro potvrzení diferenciačního potenciálu a vyšetření genetické stability nově vytvořených linií lidských embryonálních kmenových buněk pomocí tvorby teratomů v podmínkách <i>in vivo</i> .	
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)	
Heterogenita nádorů, tedy přítomnost různých buněčných subtypů v nádoru, může přispívat k rezistenci nádorů k aplikované terapii. Xenotransplantace lidského nádorového materiálu do imunodeficientních myši umožní dostatečnou expanzi tohoto materiálu pro další biologické a molekulární analýzy bez rizika odvrhnutí graftu. Plánované experimenty přispějí k objasnění heterogenity nádorů prostaty, prsu a vaječníků, tedy k identifikaci a charakterizaci jednotlivých buněčných subpopulací. Experimenty, kdy bude aplikováno vybrané léčivo nebo kombinace léčiv, přispějí k nalezení takových léčiv a jejich kombinací, které budou schopny cílit tyto různé buněčné populace, případně budou schopny překonat získanou rezistenci těchto subpopulací. Lidské indukované pluripotentní kmenové buňky vzniklé z adultních lidských buněk představují slibný model pro studium celé řady onemocnění s potenciálním medicínským využitím. Je však nutné jednoznačně potvrdit jejich genetickou stabilitu a diferenciační potenciál, k čemuž se užívá i tvorbu teratomů v podmínkách <i>in vivo</i> .	
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá	
Imunodeficientní kmen myši druhu <i>Mus musculus</i> , přibližně 900 myši za celý pětiletý průběh projektu pokusů.	
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?	
Cílem experimentů je imunodeficientním jedincům injikovat nádorové buňky nebo nádorovou tkáň lidského původu, monitorovat růst nádoru a jeho odpověď na případnou léčbu a izolovat z těchto nádorů různé buněčné subpopulace. Nádory budou růst maximálně do velikosti 3 cm ³ , 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 nádory, případně další orgány, tkáně a tekutiny pro následnou analýzu. Orgány, tkáně a tekutiny budou také odebírány ze zdravých jedinců pro získání kontrolních vzorků. Cílem dalších experimentů je injikace nově připravených linií lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk do varlat, ledvinné kapsuly nebo intramuskulárně za účelem tvorby teratomů. Tyto budou následně vyšetřeny pomocí histologických a molekulárně biologických metod pro potvrzení genetické stability a diferenciačního potenciálu testovaných linií. Všechny pokusy budou prováděny tak, aby utrpení zvířat bylo co nejmenší a zvířata byla co nejméně stresována. Navrhovaná míra závažnosti je mírná až střední. Po ukončení experimentu budou zvířata usmrcena přerušením míchy a budou z nich odebrány teratomy pro další analýzy. Kadavery budou umístěny do kafilerního mrazicího boxu pro VŽP 1. kategorie a jejich následná likvidace bude zajištěna firmou Agris, s.r.o., záv. Medlov, Němčíčky 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 <i>in vitro</i> , neboť zejména rozvoj nádorového onemocnění a následná odpověď na aplikované terapeutika je nutné studovat v kontextu nádorového mikroprostředí. V podmínkách <i>in vitro</i> dochází také ke změně fenotypu buněčných kultur, což může zkreslit výsledky pokusů. Expanze materiálu lidského původu je v podmínkách <i>in vitro</i> obtížná a dále je zatížena rizikem změny fenotypu. V případě pokusů s experimentálními teratomy není možné posoudit je toto standardně používaná a akceptovaná metoda pro potvrzení diferenciačního potenciálu lidských embryonálních kmenových buněk a indukovaných pluripotentních kmenových buněk.	
Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.	

Během celé studie bude použito minimálního množství zvířat, které je nezbytné jednak pro udržení kolonie a dále pro zopakování pokusů a správné statistické zhodnocení získaných výsledků. V pokusech, kde budou zvířata s nádory ovlivněna terapií, se odhaduje použití 5-10 jedinců na skupinu a opakování. Počet použitých zvířat bude dále záviset také od počtu nově vytvořených linií indukovaných pluripotentních kmenových buněk. Předpokládá se použití nejméně tří myší na každou nově odvozenou linii indukovaných pluripotentních kmenových buněk.

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.

Pro experimenty bude využíváno myší kmene NRG (NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ), který je silně imunodeficientní a tedy vhodný pro xenotransplantace buněk a tkání lidského původu. Navíc, ve srovnání s jinými imunodeficientními kmeny, je tento kmen více radiorezistentní. Během všech experimentů bude se zvířaty zacházeno šetrným způsobem tak, aby jim nebyla působena nadměrná bolest, stres, strach a utrpení. Se zvířaty bude zacházeno klidně, budou umístěna v definovaných podmínkách bariérového chovu v individuálně ventilovaných klecích v samostatné místnosti k tomu určené. Pro vybrané náročnější zákroky budou zvířata udržována v celkové anestezii, v případě potřeby jim po ukončení zákroku budou podávána analgetika pro zmírnění bolesti. V případě, že některý pokusný zásah způsobí zvířeti obtíže, které významně změní kvalitu jeho života, bude takové zvíře neprodleně vyřazeno z pokusu a utraceno.