

NETECHNICKÉ SHRNUÍ PROJEKTU POKUSŮ	
<b>Název projektu pokusů</b>	
Experimentální terapiemaligních lymfomů pomocí cílené inhibice vybraných energo-metabolických drah na myších modelech	
Doba trvání projektu pokusů	(do 31.12.2021)
Klíčová slova - maximálně 5	Maligní lymfomy, ox-phos, metabolismus, patient-derivedxenograft (PDX)
<b>Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka</b>	
	základní výzkum
<input checked="" type="checkbox"/>	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
<b>Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)</b>	
<p>Myší modely založené na xenotransplantaci primárních lymfomových buněk do imunodeficientních myší (tzv. patient-derivedxenografts, 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. 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. Některé vědecké práce naznačují, že na návratu (relapsu) lymfomu se může podílet změna metabolismu lymfomových buněk (tzv. metabolicrewirement). V předkládaném projektu hodláme testovat experimentální léčebné strategie zaměřené na cílenou inhibici vybraných metabolických drah s primárním cílem zjistit terapeutický potenciál těchto inovativních léčiv. Pokusy budou provedeny na vybraných myších PDX modelech agresivních lymfomů. MitoTAM je inhibitor respiračního komplexu II. MitoTAM se podává 1 x denně intraperitoneálně jako suspenze účinné látky v kukuřičném oleji v dávkě 3mg/kg/myš. MitoTAM se v současné době klinicky testuje u pacientů se solidními nádory. Devimistat (CPI-613) je inhibitor komplexu <math>\alpha</math>-ketoglutarát-dehydrogenázy, což je klíčový komplex anaerobní glykolýzy. Devimistat je první látka svého druhu schválená k léčbě onkologických pacientů, jmenovitě k léčbě karcinomu pankreatu. Na myších modelech se dává 25mg/kg i.p. 1 x denně.</p>	
<b>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)</b>	
Preklinické zdůvodnění pro design klinické studie fáze 2 testující účinek specifických inhibitorů energo-metabolických drah u pacientů s agresivními lymfomy	
<b>Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá</b>	
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 ( <i>NOD-SCID-gamma</i> ) 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. 900 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, dyskomfortem 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).	
<b>Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)</b>	
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 (30 různých PDX modelů odvozených reprezentujících hlavní typy agresivních lymfomů). 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  $\chi^2$  (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 zamrazeny 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.