

# NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 74/2020

upravené podle PR 2020/569

## Název projektu pokusů

Role Methanobactinu při eliminaci senescentních buněk

Doba trvání projektu pokusů - v měsících 46 měsíců (datum ukončení 30.6.2024)

Klíčová slova - maximálně pět <sup>1)</sup> mitochondrie, rakovina, MitoTam, imunoterapie

## Účel projektu pokusů - zaškrtněte políčko; možno i více možností

- ☒ základní výzkum
- ☒ translační a aplikovaný výzkum
- ☐ kontrola kvality (včetně zkoušení bezpečnosti a účinnosti šarže)
- ☐ legislativní účely jiné zkoušení účinnosti a tolerance
- ☐ a běžná výroba zkoušení toxicity a jiné zkoušky bezpečnosti včetně farmakologie
- ☐ běžná výroba
- ☐ ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
- ☐ zachování druhů
- ☐ vyšší vzdělávání
- ☐ odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí
- ☐ trestní řízení a jiné soudní řízení
- ☐ udržování populací ustálených geneticky upravených zvířat, která nebyla použita v jiných pokusech

## Cíle projektu pokusů - např. řešení některých vědeckých neznámých nebo vědeckých či klinických potřeb

Cílem tohoto projektu je analyzovat nové postupy při léčbě nádorových onemocnění cílené na mitochondrie a potenciálně využitelné v klinické praxi se zaměřením na 1) efekt mitochondriálně cílených látek na progresi nádorů, zejména pak nádorů ledvin a 2) detekci mechanismu, jakým mitochondriálně cílené látky eliminují nádorové buňky.

## Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů - jak by mohlo být dosaženo vědeckého pokroku nebo jaký přínos by z něj člověk, zvířata či životní prostředí mohli mít; v příslušných případech rozlišujte mezi krátkodobými (v době trvání projektu) a dlouhodobými přínosy (mohou se projevit až po skončení projektu)

Tento projekt přinese nové poznatky o úloze mitochondrií v nádorech a poskytne nové nástroje při eliminaci nádorových buněk z organismu, což může vést k vývoji nové a šetrnější léčby nádorových onemocnění.

## Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání

Myším budou látky aplikovány intraperitoneálně (i.p.) či intravenózně (i.v) ve fyziologickém roztoku či 4% EtOH v kukuřičném oleji u i.p. podání (max. objem bude 100ul). Látky či příslušná kontrola (fyziologický roztok či 4% EtOH v kukuřičném oleji) budou aplikovány dvakrát týdně po dobu 2-4 týdnů. U ortotopických nádorů ledvin budou Renca buňky chirurgicky voperovány do ledviny Balb-c myši. Za tímto účelem budou myši uspány (směs Ketamin/Xylazin) a do ledviny jim bude aplikována směs buněk ( $2.5 \times 10^4$  buněk/myš) a Matrigel extracellular matrix (20ul, Corning) pro lepší uchycení nádorových buněk. Následně se kůže zašije. Myším bude aplikován Rimadyl pro zmírnění bolesti. Myši se nechají na vyhřívané podložce až do jejich probuzení. Tato metoda je v naší laboratoři již zavedena a byla několikrát úspěšně provedena. Jako alternativu chirurgického vpravení nádorových buněk do ledviny budeme používat mikroinjekci nádorových buněk do ledviny pomocí ultrazvuku v celkové anestézii (inhalace směsi izofuranu (2%) s kyslíkem (2 l/min), viz bod 12) bez nutnosti operace. Tato metoda se u nás momentálně testuje a v případě úspěšného zavedení plně nahradí chirurgické zákroky. V momentě, kdy nádor dosáhne velikosti 20-50mm<sup>3</sup> budou myším aplikovány látky MitoTam, PD-1 (či PD-L1) nebo jejich kombinace. Látky (MitoTam 4mg/kg; PD1 či PDL1 8-16ug/g myši) budou podávány i.p. či i.v. každé 3-4 dny, celkově 4-8 aplikací. Změny v růstu nádoru budou monitorovány pomocí ultrazvuku (USI; Vevo 3100).

## Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) a doba trvání těchto účinků

Nepředpokládáme žádné negativní dopady na zvířata (aplikace látek v plánovaných koncentracích již byla testována, viz. publikace Hubackova et al, 2019, CDD či Rohlenova et al., 2017, ARS, Hirayama et al., 2016, Cancer Sci., Ragnum et al., 2014, BJC). Operační zákroky budou probíhat na vyhřívané podložce s využitím sterilních nástrojů. Po zavedení nádorových buněk do ledviny budou pokusným zvířatům podávána analgetika (Rimadyl).

## Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

| Druh zvířat <sup>2)</sup><br>- vyberte ze seznamu | Odhadovaný počet | Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti |       |         |         |
|---------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------|-------|---------|---------|
|                                                   |                  | Nenabude vědomí                          | Mírná | Střední | Závažná |
| Myš laboratorní (Mus musculus)                    | 800              |                                          |       | x       |         |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |  |  |  |   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|--|---|
| Zvolte položku.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |  |  |  |   |
| Zvolte položku.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |  |  |  |   |
| Zvolte položku.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |  |  |  |   |
| Zvolte položku.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |  |  |  |   |
| <b>Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |  |  |  |   |
| Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |  |  |  | 0 |
| Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |  |  |  | 0 |
| Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |  |  |  | 0 |
| Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - <i>uved'te</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |  |  |  |   |
| Všechna zvířata budou na konci pokusu usmrcena                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |  |  |  |   |
| <b>Uplatňování 3R</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |  |  |  |   |
| <b>Nahrazení</b> používání zvířat - <i>uved'te, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |  |  |  |   |
| Pro určení vlivu MitoTamu a jeho případné kombinace s imunoterapií na eliminaci nádorových buněk je naprosto nezbytné použít zvířecí model, který plně vystihuje komplexní situaci vyskytující se v organismu, zejména pak přítomnost funkčního imunitního systému. Selektivní účinnost na nádorové buňky byla předem ověřena v <i>in vitro</i> experimentech kde zároveň nebyla prokázána <i>in vitro</i> toxicita u buněk primárních.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |  |  |  |   |
| <b>Omezení</b> používání zvířat - <i>vysvětlete, jaký počet zvířat byl pro tento projekt stanoven. Popište kroky, které byly podniknuty ke snížení počtu používaných zvířat, a zásady použité k vytvoření studie; případně popište postupy, které budou používány po celou dobu trvání projektu za účelem minimalizace počtu používaných zvířat a které odpovídají vědeckým cílům (mezi tyto postupy mohou patřit např. pilotní studie, počítačové modelování, sdílení tkání a opakované použití).</i>                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |  |  |  |   |
| Bude použit minimální počet zvířat, který ještě umožňuje validní statistické vyhodnocení. Po usmrcení zvířat budou orgány využity pro další nezávislé experimenty, tím dojde k omezení počtu použitých pokusných myší.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |  |  |  |   |
| <b>Šetrné zacházení</b> se zvířaty - <i>uved'te příklady konkrétních opatření (např. zvýšené pozorování, pooperační péče, tlumení bolesti, výcvik zvířat) přijatých v souvislosti s postupy k minimalizaci dopadů na dobré životní podmínky zvířat; popište mechanismy k přijímání vznikajících zmírňujících postupů v době trvání projektu</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |  |  |  |   |
| Látky budou aplikovány i.p. či i.v., což je standardní způsob aplikace u laboratorních myší. Zákroky, které vyvolávají bolest u zvířat, budou prováděny v celkové anestezii. Po zákroku budou pokusným myším podávána analgetika. Kvalita života pokusných zvířat bude pravidelně kontrolována. Bude dodržován zákon č. 246/1992 Sb. (vhodná ošetrovatelská péče, vhodné prostředí v chovu, výživa, napájení). Jako alternativu chirurgického vpravení nádorových buněk do ledviny budeme používat mikroinjekci nádorových buněk do ledviny pomocí ultrazvuku v celkové anestézii (inhalace směsi izofuranu (2%) s kyslíkem (2 l/min), viz bod 12) bez nutnosti operace. Tato metoda se u nás momentálně testuje a v případě úspěšného zavedení plně nahradí chirurgické zákroky. |  |  |  |  |   |
| <b>Použité druhy zvířat</b> - <i>vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |  |  |  |   |
| Pro experiment bude použit druh <i>mus musculus</i> v rámci testování protinádorového efektu látek na komplexní organismus.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |  |  |   |

<sup>1)</sup> Včetně vědeckých pojmů, které se mohou skládat z více než pěti jednotlivých slov, a s výjimkou druhů zvířat a účelů uvedených jinde v dokumentu

<sup>2)</sup> Druhy zvířat v souladu s kategoriemi statistického vykazování v příloze III prováděcího rozhodnutí Komise 2020/569 s doplňkovou možností „**nespecifikovaného savce**“ pro zachování anonymity ve výjimečných případech