

Badania onkologiczne w modelach mysich

Modele zwierzęce stosowane są w badaniach mechanizmów molekularnych rozwoju nowotworów i poszukiwaniach nowych leków jako uzupełnienie analiz *in silico*, analiz fizyko-chemicznych projektowanych związków oraz badań prowadzonych na hodowlach komórkowych *in vitro*. Badania nowych leków powinny być ograniczone jedynie do związków, które w analizach *in vitro* potwierdziły zakładaną aktywność. Badania efektywności biologicznej powinny być poprzedzone testami przeprowadzonymi na niewielkiej liczbie zwierząt pozwalającymi na ustalenie maksymalnej tolerowanej dawki związku (MTD, *maximum tolerated dose*).

1. Wzrost guzów po wszczepieniu komórek nowotworowych.

Wstęp

Poziom inwazyjności badań zależy od wybranego modelu. i) Wzrost guzów tworzonych przez nieprzerzutujące linie nowotworowe wszczepiane podskórnie zwykle nie wpływa znacząco na dobrostan, pod warunkiem odpowiedniego monitorowania kondycji zwierząt oraz stosowania odpowiednich kryteriów humanitarnego punktu końcowego doświadczenia. Należy przy tym zwrócić uwagę na możliwy wpływ podawanych związków przeciwnowotworowych, które mogą mieć aktywność cytotoksyczną. ii) Badania nowotworów przerzutujących mogą być związane z istotnym wpływem na dobrostan zwierząt, będący efektem zarówno cytotoksycznej aktywności badanych substancji jak i tworzenia się licznych przerzutów w wielu narządach.

Przykładowe doświadczenie i oszacowanie inwazyjności procedury:

1.1. Podskórne wszczepienie komórek nieprzerzutującej ludzkiej linii komórkowej do myszy o upośledzonym układzie odpornościowym (myszy immunodefektywnych).

Doświadczenie może mieć na celu np. utrzymywanie linii nowotworowych lub badania heterogenności fenotypowej i funkcjonalnej komórek nowotworowych, bez podawania związków wpływających na guzy.

1.1.A. Utrzymanie myszy immunodefektywnych.

Możliwy wpływ na dyskomfort zwierząt: Myszy immunodefektywne są wrażliwe na infekcje.

Zalecane sposoby minimalizacji dyskomfortu: Myszy immunodefektywne powinny być utrzymywane w warunkach minimalizujących ryzyko infekcji – np. w klatkach indywidualnie wentylowanych lub izolatorach. Zalecane jest wzbogacenie środowiska bytowania zwierząt – np. dostarczenie gryzaków, materiału na gniazda (sterylizowanych przed podaniem) pozwalające na ograniczenie stresu i zmniejszenie ryzyka agresji w grupie. Podawana linia nowotworowa powinna być przetestowana pod kątem obecności *Mycoplasma* sp., by uniknąć wszczepienia zainfekowanych komórek.

Humanitarne punkty końcowe: zwierzęta wykazujące jakiegokolwiek objawy chorobowe sugerujące możliwość infekcji powinny być poddane eutanazji.

1.1.B. Iniekcja podskórna komórek nowotworowych.

Możliwy wpływ na dyskomfort zwierząt: Ukłucie igłą i krótkotrwały dyskomfort związany z podaniem podskórnie wymaganej objętości zawiesiny komórek.

Zalecane sposoby minimalizacji dyskomfortu: Iniekcja powinna być wykonana tylko raz, objętość zawiesiny komórek nie powinna przekraczać 200 μ L. Zwierzęta powinny być obserwowane bezpośrednio po iniekcji, by móc zauważyć ewentualne zachowania nietypowe, świadczące o utrzymującym się dyskomforcie.

Humanitarne punkty końcowe: Zwierzęta powinny być poddane eutanazji, jeśli objawy co najmniej umiarkowanego dyskomfortu utrzymują się po iniekcji.

1.1.C. Wzrost guza nowotworowego.

Możliwy wpływ na dyskomfort zwierząt: Rosnący guz może wpływać na zachowanie zwierząt, przede wszystkim na możliwość swobodnej lokomocji. W guzie może dojść do zakażeń lub tworzenia owrzodzeń, co może wywoływać ból. Powstawanie przerzutów jest natomiast mało prawdopodobne.

Zalecane sposoby minimalizacji dyskomfortu: Kondycja zwierząt i wygląd guzów muszą być monitorowany codziennie. Najczęściej zaleca się mierzenie objętości guzów co drugi dzień. Należy zwrócić uwagę czy zwierzęta nie wykazują zmian w zachowaniu (postawa ciała, sposób chodzenia, przyjmowanie pokarmu) mogących świadczyć o osłabieniu lub bólu. W tym przypadku należy wprowadzić do protokołu doświadczenia podawanie leków przeciwbólowych i dodatkowej form opieki (np. nawadniania).

Humanitarne punkty końcowe: Zaleca się poddanie zwierząt eutanazji w przypadku wystąpienia owrzodzeń guza lub upośledzenia przez rosnący guz możliwości swobodnego poruszania się zwierzęcia. Najczęściej zakłada się zakończenie doświadczenia jeśli dłuższa oś guza osiągnie 12 mm.

Przy zachowaniu zalecanych sposobów postępowania i kryteriów humanitarnych punktów końcowych procedura jest klasyfikowana jako **ŁAGODNA**.

Czynniki mogące wpłynąć na zmianę klasyfikacji:

- Zmiana sposobu podania komórek może wpływać na odmienny typ wzrostu guza. Na przykład: podanie komórek w formie sferoidu zamiast w formie zawiesiny może spowodować, że komórki uznawane za nieprzerzutujące będą mogły tworzyć przerzuty, mimo wszczepienia podskórnego. Jeśli planowana jest modyfikacja w sposobie podawania komórek celowe może być wprowadzenie do linii komórkowej genu reporterowego (np. lucyferazy) pozwalającego na przyżyciowe monitorowanie pojawiania się przerzutów oraz wykonanie wstępnego doświadczenia na niewielkiej liczbie zwierząt, w którym post mortem sprawdzona zostanie obecność mikroprzerzutów w narządach.

- W przypadku zastosowania linii przerzutujących, nowotworów zasiedlających kości, nowotworów powodujących kacheksję, utrzymywania guzów z owrzodzeniem – procedura klasyfikowana jest jako **OSTRA**.

Przykładowe doświadczenie i oszacowanie inwazyjności procedury:

1.2. Wpływ nowego związku farmaceutycznego na wzrost guza utworzonego po podskórnym wszczepieniu komórek nieprzerzutującej ludzkiej linii komórkowej do myszy o upośledzonym układzie odpornościowym (myszy immunodefektywnych).

Badania mają najczęściej na celu oszacowanie wpływu testowanego związku na wzrost guza nowotworowego. Randomizację zwierząt i podawanie związków rozpoczyna się zwykle gdy

średnica guza wynosi 5 mm. W czasie trwania doświadczenia guzy rosną, przy czym zalecane jest zakończenie doświadczenia gdy dłuższa oś guza osiągnie 12 mm. Testowane związki przeciwnowotworowe mogą mieć działanie cytotoksyczne i mogą wpływać negatywnie na dobrostan zwierząt. Również ich podawanie (zwłaszcza codzienne lub dwukrotne w ciągu dnia) może być obciążające.

1.2.A. Utrzymanie myszy immunodefektywnych.

Możliwy wpływ na dyskomfort zwierząt: Myszy immunodefektywne są wrażliwe na infekcje.

Zalecane sposoby minimalizacji dyskomfortu: Myszy immunodefektywne powinny być utrzymywane w warunkach minimalizujących ryzyko infekcji – np. w klatkach indywidualnie wentylowanych lub izolatorach. Zalecane jest wzbogacenie środowiska bytowania zwierząt – np. dostarczenie gryzaków, materiału na gniazda (sterylizowanych przed podaniem) pozwalające na ograniczenie stresu i zmniejszenie ryzyka agresji w grupie. Podawana linia nowotworowa powinna być przetestowana pod kątem obecności *Mycoplasma* sp., by uniknąć wszczepienia zainfekowanych komórek.

Humanitarne punkty końcowe: zwierzęta wykazujące jakiegokolwiek objawy chorobowe sugerujące możliwość infekcji powinny być poddane eutanazji.

1.2.B. Iniekcja podskórna komórek nowotworowych.

Możliwy wpływ na dyskomfort zwierząt: Ukłucie igłą i krótkotrwały dyskomfort związany z podaniem podskórnie wymaganej objętości zawiesiny komórek.

Zalecane sposoby minimalizacji dyskomfortu: Iniekcja powinna być wykonana tylko raz, objętość zawiesiny komórek nie powinna przekraczać 200 μ L. Zwierzęta powinny być obserwowane bezpośrednio po iniekcji, by móc zauważyć ewentualne zachowania nietypowe, świadczące o utrzymującym się dyskomforcie.

Humanitarne punkty końcowe: Zwierzęta powinny być poddane eutanazji, jeśli objawy co najmniej umiarkowanego dyskomfortu utrzymują się po iniekcji.

1.2.C. Wzrost guza nowotworowego.

Możliwy wpływ na dyskomfort zwierząt: Rosnący guz może wpływać na zachowanie zwierząt, przede wszystkim na możliwość swobodnej lokomocji. W guzie może dojść do zakażeń lub tworzenia owrzodzeń, co może wywoływać ból. Powstawanie przerzutów jest natomiast mało prawdopodobne.

Zalecane sposoby minimalizacji dyskomfortu: Kondycja zwierząt i wygląd guzów muszą być monitorowane codziennie. Najczęściej zaleca się mierzenie objętości guzów co drugi dzień. Należy zwrócić uwagę czy zwierzęta nie wykazują zmian w zachowaniu (postawa ciała, sposób chodzenia, przyjmowanie pokarmu) mogących świadczyć o osłabieniu lub bólu. W tym przypadku należy wprowadzić do protokołu doświadczenia podawanie leków przeciwbólowych.

Humanitarne punkty końcowe: Zaleca się poddanie zwierząt eutanazji w przypadku wystąpienia owrzodzeń guza lub upośledzenia przez rosnący guz możliwości swobodnego poruszania się zwierzęcia. Najczęściej zakłada się zakończenie doświadczenia jeśli dłuższa oś guza osiągnie 12 mm.

1.2.D. Podawanie związku farmaceutycznego (iniekcje dootrzewnowe)

Możliwy wpływ na dyskomfort zwierząt: Ukłucie igłą i krótkotrwały dyskomfort związany z podaniem dootrzewnowym wymaganej objętości badanej substancji. W niektórych

przypadkach podawane substancje cytotoksyczne (przeciwnowotworowe) mogą powodować biegunkę, utratę wagi czy anoreksję.

Zalecane sposoby minimalizacji dyskomfortu: Zwierzęta muszą być obserwowane bezpośrednio po podaniu badanej substancji, a ich kondycja musi być sprawdzana codziennie, z uwzględnieniem klinicznych parametrów dobrostanu. W przypadku odwodnienia należy rozważyć podawanie płynu fizjologicznego. Wskazane jest codzienne ważenie zwierząt. Zalecana maksymalna objętość podawanej dootrzewnowo substancji to 10 $\mu\text{L/g}$ masy ciała.

Humanitarne punkty końcowe: Zaleca się podanie zwierząt eutanazji jeśli utrata wagi przekroczy 20% wartości wyjściowej. Eutanazja zalecana jest również jeśli zwierzęta nie przyjmują pokarmu lub jeśli mają biegunkę przez ponad 48 h.

Przy zachowaniu zalecanych sposobów postępowania i kryteriów humanitarnych punktów końcowych procedura jest klasyfikowana jako **UMIARKOWANA**. Zalecana jest ocena rzeczywistej inwazyjności procedury dla każdego zwierzęcia w trakcie trwania doświadczenia, pozwalająca na retrospektywną ocenę wpływu zastosowanej dawki badanej substancji na dobrostan zwierząt.

Czynniki mogące wpłynąć na zmianę klasyfikacji:

- Ortotopowe podanie komórek jest bardziej dotkliwe dla zwierząt niż podanie podskórne. Objętości podawanej zawiesiny komórek muszą być mniejsze niż dopuszczalne przy podaniach podskórnych. Należy unikać podawania komórek domięśniowo, o ile nie uzasadnia tego wyraźny powód merytoryczny, gdyż rosnący w obrębie mięśnia guz może zmniejszać swobodę ruchów. Podobnie należy unikać podawania komórek do opuszki łapy bez wyraźnego uzasadnienia merytorycznego, przy czym nawet w takim przypadku podanie może obejmować tylko pojedynczą opuszkę. Należy również unikać podawania komórek do śledziony, do węzłów chłonnych lub do klatki piersiowej bez szczegółowego uzasadnienia merytorycznego. Wybór takiej drogi podania wiąże się z podwyższeniem dotkliwości procedury.

- Maksymalne dopuszczalne objętości substancji, które mogą być podane jednorazowo u myszy (zalecany jest wybór mniejszych objętości):

- * podanie do mózgu: 5 μL
- * podanie do prostaty: 30 μL
- * podanie do śledziony: 50 μL
- * podanie podskórne: 20 $\mu\text{L/g}$ masy ciała, igła 25-26 G x 13-25 mm
- * podanie śródskórne: 50 μL , igła 27-30 G x 13 mm
- * podanie domięśniowe: 50 μL , igła 26-30 G x 13-25 mm
- * podanie dożylnie: 10 $\mu\text{L/g}$ masy ciała jednorazowo, igła 25-30 G x 13 mm
- * podanie dootrzewnowe: 20 $\mu\text{L/g}$ masy ciała jednorazowo, igła 25-27 G x 13-25 mm
- * podanie doustne (sondą): 20 $\mu\text{L/g}$ masy ciała
- * powolna iniekcja dożylna lub dotętnicza: 800 μL w ciągu 2 minut
- * stała infuzja dożylna: 40 $\mu\text{L}/\text{minutę}$
- * stała infuzja dootrzewnowa: 40 $\mu\text{L}/\text{minutę}$
- * iniekcja do guza: 100 μL jednorazowo

- Związki farmaceutyczne w nośnikach oleistych nie powinny być podawane domięśniowo i dożylnie. Jeśli to możliwe, związki powinny być podawane w izotonicznym roztworze wodnym soli fizjologicznej, o pH jak najbardziej zbliżonym do fizjologicznego (wartości

graniczne to 5.5 – 8.0). Jeśli stosowane są nośniki organiczne (np. DMSO) to nie powinny przekroczyć 10% objętości lub 5 μ L/g masy ciała.

- Podawanie badanych związków z wykorzystaniem mini-pomp osmotycznych wymaga zastosowania anestezji i analgezji przy implantacji pompy. Obecność pompy może zmniejszać dobrostan zwierzęcia, choć może być preferowanym rozwiązaniem przy planowaniu długotrwałego podawania związków, wymagającego częstych i wielokrotnych iniekcji.

- Zmiana sposobu podania komórek może wpływać na odmienny typ wzrostu guza. Na przykład: podanie komórek w formie sferoidu zamiast w formie zawiesiny może spowodować, że komórki uznawane za nieprzerzutujące będą mogły tworzyć przerzuty, mimo wszczepienia podskórnego. Jeśli planowana jest modyfikacja w sposobie podawania komórek celowe może być wprowadzenie do linii komórkowej genu reporterowego (np. lucyferazy) pozwalającego na przyżyciowe monitorowanie pojawiania się przerzutów oraz wykonanie wstępnego doświadczenia na niewielkiej liczbie zwierząt, w którym post mortem sprawdzona zostanie obecność mikroprzerzutów w narządach.

- W przypadku zastosowania linii przerzutujących, nowotworów zasiedlających kości, nowotworów powodujących kacheksję, utrzymywania guzów z owrzodzeniem – procedura klasyfikowana jest jako **OSTRA**.

Literatura:

European Commission. Caring for animals aiming for better science. Severity assessment framework.

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/guidance/inspections/en.pdf

Workman et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102: 1555-1577.

Australian Government. National Health and Medical Research Council. Guidelines to promote the wellbeing of animals used for scientific purposes. The assessment and alleviation of pain and distress in research animals. 2008.



Australian Government

National Health and Medical Research Council

**GUIDELINES TO PROMOTE THE WELLBEING
OF ANIMALS USED FOR SCIENTIFIC PURPOSES**
THE ASSESSMENT AND ALLEVIATION
OF PAIN AND DISTRESS IN RESEARCH ANIMALS