

OBRAZAC 3

Naslov projekta	<i>in vivo</i> istraživanje "Protutumorska učinkovitost biološki aktivnih tvari iz ljekovitih gljiva u <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> uvjetima"		
Trajanje projekta	Dvije godine (1.6.2016-1.6.2018.)		
Ključne riječi (najviše do 5)	Miš, Angiogeneza, kolorektalni karcinom, imunomodulacija, ljekovite gljive, 5-fluorouracil (5-FU)		
	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika):		
	Temeljno istraživanje	da	ne
	Translacijska i primijenjena istraživanja	da	ne
	Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja	da	ne
	Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje	da	ne
	Očuvanje vrste	da	ne
	Visoko obrazovanje ili osposobljavanje	da	ne
	Forenzička ispitivanja	da	ne
	Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima	da	ne
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	Neke kronične bolesti poput bolesti srca i krvnih žila, moždanog udara, raznih oblika raka, kroničnih respiratornih bolesti te dijabetesa vodeći su uzroci smrtnosti u svijetu. Iserpci određenih vrsta ljekovitih gljiva (engl. <i>medicinal mushrooms</i>) imaju dokazane obećavajuće učinke na bolesti krvožilnog sustava, rak, dijabetes i mnoge druge bolesti te protuviralne, protubakterijske, protuparazitske, protuupalne, nefroprotektivne, neuroprotektivne i hepatoprotektivne učinke (Wasser Apl Microbiol Biotechnol., 2011). Dva su glavna mehanizma odgovorna za protutumorsko djelovanje ljekovitih gljiva; direktno citotoksično te indirektno imunomodulatorno (Borchers i sur, Exp Biol Med., 2004). Polisaharidi iz ljekovitih gljiva imaju primarno imunostimulacijsko i imunomodulacijsko djelovanje; u većini slučajeva polisaharidi nemaju direktan učinak na stanice raka, već pomažu domaćinu bolje podnošenje postojećih stresora te sprečavanje razvitka stanica raka pojačanim imunitetom (Parkinson Am J Med., 1995, Mizuno Int J Med Mushr., 1999). Beta glukani su velika grupa makromolekula koje se ne sintetiziraju u ljudskom tijelu, pa se prepoznaju kao strane molekule koje aktiviraju imunitet domaćina (Brown i sur. Nature., 2001). β-glukani brzo ulaze u proksimalno tanko crijevo te ih tamo prihvaćaju makrofagi nakon oralne primjene (Lehne i sur. Clin Exp Immunol., 2006, Chan i sur. J Hematol Oncol., 2009); cijepaju se na manje β-glukanske ulomke te se prenose u koštanu srž i endotelni retikularni sustav (Hong I sur. J Immunol., 2004). Makrofagi potom otpuštaju te male ulomke, preuzimaju ih cirkulirajući granulociti, monociti i dendritičke stanice (Revillard Eur J Dermatol., 2002) čime se potiče urođeni (nespecifični) i stečeni (specifični) imunosni odgovor. Imunomodulacija se temelji na aktivaciji citotoksičnih makrofaga, monocita, neutrofila, NK stanica, dendritičkih stanica te njihovih kemijskih glasnika (citokina, primjerice interleukine, interferone i čimbenike stimulacije kolonija). Također mogu potaći		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	gensku ekspresiju raznih imunomodulatornih citokina i citokinskih receptora kao ključnih posrednika u stvaranju stečene (adaptivne) imunosti te sudionika u jačanju specifičnog imunosnog odgovora s imunosnim pamćenjem, gdje svaki patogen ostaje 'zapamćen' po svojstvenom mu antigenu (Munz i sur. J Exp Med., 2005, Kurashige i sur. Immunopharmacol Immunotoxicol., 1997). Iako postoje izdvojeni radovi o korištenju pojedinačnih vrsta ljekovitih gljiva u kombinaciji sa standardnim kemoterapeutcima, kao na primjer klasični rad o učincima Lentinana (registrirani lijek u Japanu iz vrste <i>Lentinus edodes</i>) u kombinaciji sa 5-Fluorouracilom i Tegafurom (Taguchi Gan To Kagaku Ryoho., 1983) na pacijente s rekurentnim tumorom želuca, debelog crijeva i dojke, te npr. vrste <i>Taiwanofungus salmoneus</i> (više bazidiomicete) u kombinaciji sa cisplatinom <i>in vitro</i> (Chien i sur. Int J Med Mushr., 2015), još nema radova u kojima se istražuju učinci <i>složenih</i> prehrambenih dodataka iz ljekovitih gljiva sa standardnim kemoterapeutcima <i>in vivo</i>. Ispitivanje takvih učinaka izuzetnog je značenja jer je zaključeno da se jačanje imunog odgovora najbolje postići mješavinom polisaharida sa određenim kombinacijama iserpaka gljiva (Kurashige i sur. Immunopharmacol Immunotoxicol., 1997; Shantsyan i sur. J Biotechnol., 2004; Jakopovich Int J Med Mushr., 2011). Kombinirani učinci uključuju povećanje broja i aktivnosti citotoksičnih T limfocita i NK limfocita. Kombiniranjem više vrsta ljekovitih gljiva imuni sustav dobiva više raznih poticaja, što dovodi do jačanja prirodne obrane organizma (Ivanković i sur. Int J Med Mushr., 2004; Zaidman i sur. Appl Microbiol Biotechnol., 2005).
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Jedan od glavnih ciljeva <i>in vivo</i> istraživanja je usporediti učinke dvaju komercijalnih pripravaka iz ljekovitih gljiva (AGARIKON.I i AGARIKON PLUS) na modelu miša (BALB/c) nositelja karcinoma kolona samostalno i u kombinaciji sa 5-Fluorouracilom koji se koristi u kemoterapiji karcinoma kolona. Smatramo da će dobiveni rezultati omogućiti razvoj novih učinkovitijih protutumorskih pripravaka koji se mogu primijeniti sami i/ili združeni s citostatikom. Uporabom <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> metoda želimo istražiti protutumorsku učinkovitost pripravaka gljiva na: a) preživljenje životinja; b) rast tumora; c) angiogenezu i invazivnost; e) gensku ekspresiju odabranog panela gena; d) imunosne parametre u životinja (funkcionalnu sposobnost makrofaga).
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Balb/c miš, približno 200 životinja
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	U tijeku pokusa uslijed injiciranja 5-fluorouracila te primjene AGARIKONA.I i/ili AGARIKONA PLUS gastičnom kanilom ne očekujemo promjene u ponašanju životinja. Očekuje se da će i kod uznapredovalih promjena razina težine pokusa biti UMJERENA. Sve će životinje na kraju pokusa u trajanju od 6 tjedana biti žrtvovane, te će se izvršiti njihovo neškodljivo uklanjanje i zbrinjavanje lešina.

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Proučavanje utjecaja antitumorskih tvari na patohistološke promjene izazvane tumorom, međudjelovanje imunomodulacijskih čimbenika, oksidacijskog stresa, angiogeneze i rasta tumora ne može se proučavati na ljudima, a <i>in vitro</i> istraživanja tih procesa nedostatna su za njihovo razumijevanje.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	U pokusu će se koristiti najmanji mogući broj životinja s obzirom na svrhu istraživanja. Kako bi rezultati dosegli statističku značajnost u analizi kvantitativnih varijabli jednosmjernom analizom varijance s $p < 0.05$, za navedeni se tip istraživanja preporučuje uzeti najmanje 10 životinja po skupini, pa će tako biti učinjeno i u ovom istraživanju.
3. Pобољшanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	Životinje u pokusu držati će se u uobičajenim uvjetima za održavanje laboratorijskih životinja (hranjenje, njega), te s obogaćenim okolišem i materijalima za grizenje, trganje i manipuliranje. Mišji imunosni sustav poklapa se 98-99% sa humanim, što odražava nužnost proučavanja mehanizama humane imunomodulacije na modelima sisavaca. Sa životinjama će se tijekom pokusa postupati u skladu s propisima o dobrobiti životinja. Prije procedure injiciranja tumorskih stanica CT26.WT, 5-fluorouracila, te administracije AGARIKONA.I i/ili AGARIKONA PLUS gastričnom kanilom, kao i prije žrtvovanja, sve životinje biti će adekvatno anestezirane i analgezirane intraperitonealnom primjenom kombinacije ketamina i ksilazina.

