

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Biološka aktivnost odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata		
Trajanje projekta	1.06.2017. – 31.12.2018.		
Ključne riječi (najviše do 5)	boronična kiselina, tumori, terapija		
	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika)		
	Temeljno istraživanje	da	ne
	Translacijska i primijenjena istraživanja	da	ne
	Korištenje određeno propisima i nutriska 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)	Cilj predloženoga projekta jest istraživanje citotoksičnog i antitumorskog djelovanja odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata (fenilboronična kiselina i trifluorofenilboronična kiselina).		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprjeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta)	Rezultati ovog projekta bit će originalan doprinos istraživanjima citotoksične i antitumorske aktivnosti odabranih a do sada nedovoljno istraženih derivata boronične kiseline, fenilboronične i trifluorofenilboronične kiseline. Predloženo istraživanje obuhvatit će sustavno ispitivanje citotoksične i antitumorske aktivnosti ovih spojeva <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> te će dati vrijedne rezultate o eventualnoj primjeni tih spojeva u liječenju malignih bolesti.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U pokusima će se koristiti miš, <i>Mus musculus</i> . Očekuje se da će se koristiti 56 miševa soja C3H/DBu za istraživanje antitumorskog djelovanja derivata boronične kiseline na mišjem karcinomu SCCVII, 56 miševa soja BALB/c za istraživanje antitumorskog djelovanja derivata boronične kiseline na mišjem adenokarcinomu dojke 4T1, te 56 miševa soja C57BL/6 za istraživanje antitumorskog djelovanja derivata boronične kiseline na mišjem melanomu B16F10. Sve životinje će biti starosti približno tri mjeseca.		
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Kod uspostavljanja transplantacijskog tumorskog modela u životinja se ne očekuje značajnija pojava boli, jer sam zahvat ne prelazi razinu boli uboda igle. Također tijekom terapije niti jedan postupak ne bi trebao uzrokovati značajniju pojavu boli kod životinje, a isto tako ne očekuje se da bi istraživani spojevi u primijenjenoj dozi mogli uzrokovati značajnije toksikološke učinke. Zbog prirode tumorske bolesti s vremenom može kod životinja doći do razvoja simptoma koji bi uzrokovali bol i patnju kod životinja te su stoga određene krajnje točke pri čijem dostizanju će se životinje žrtvovati kako bi se spriječila bol i patnja životinje. Redovitim praćenjem životinja od strane voditelja pokusa i osposobljenog osoblja Pogona za laboratorijske životinje takve promjene će biti na vrijeme uočene i životinje će biti humano eutanazirane u komori s ugljičnim dioksidom. Očekivana je umjerena razina težine postupka.		
Primjena načela 3R			
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje	Tijekom ovog projekta koristit ćemo se metodama koje djelomično izbjegavaju korištenje miševa. Ove zamjenske metode predstavljaju stanične tumorske modele <i>in vitro</i> . Prije početka pokusa na miševima obaviti će se <i>in vitro</i> istraživanja na više normalnih i više tumorskih staničnih linija najljeg podrijetla čime će se dobiti podaci o onkolitičkom potencijalu ispitivanih tretmana i eventualnom postojanju selektivne citotoksičnosti. Nakon toga, neophodno je provesti procjenu antitumorske učinkovitosti <i>in vivo</i> na singeničnim		

2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja	sojevima miševa s transplantiranim tumorskim stanicama budući da do danas nisu razvijene alternativne metode koje bi u potpunosti mogle u ovom dijelu pokusa dokinuti uporabu životinja Biološka varijabilnost utječe na rast tumora i dovodi do povećane raspršenosti rezultata te na taj način smanjuje mogućnost dobivanja statistički značajnih rezultata. U ovom projektu koristit ćemo prirodene vrste miševa (engl. inbred) umjesto genetički heterogenih vrsta (engl. outbred) te ćemo tako osigurati smanjenje ukupnog broja korištenih životinja budući da će manji broj genetički homogenih miševa osigurati statistički značajne rezultate. Osim toga, sve životinje će biti istog spola, starosti i približno iste težine što će dodatno smanjiti varijabilnost rezultata a time i broj životinja potrebnih za pokus. Na osnovu dosada provedenih istraživanja antitumorske učinkovitosti različitih supstanci na tumorskim modelima koji će se koristiti u ovom projektu, pokazano je da se sa 7 životinja po grupi može dokazati uspješnost pojedinog tretmana na razini statističke značajnosti od $p < 0.05$, uz snagu (engl. power) testa od 0,8. Za utvrđivanje broja korištenih životinja korišten je Russ Lenth's Power and Sample Size test (http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/).
3. Poboľšanje 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	Miš je općeprihvaćeni model izbora u pokusima utvrđivanja antitumorske učinkovitosti novih potencijalnih antitumorskih terapijskih modaliteta kako na singeničnim (genetski identični davaoc) tako i na ksenogeničnim (različite vrste) primacima s poznatim i dobro razrađenim translacijskim pokazateljima. Dostupnost mnogih različitih, visokosrodnih sojeva koji umanjuju pojedinačne varijabilnosti omogućuje dobivanje pouzdanih rezultata korištenjem manjeg broja jedinki u eksperimentalnoj skupini. Također, dostupnost različitih tumorskih staničnih linija (npr. karcinomi, fibrosarkomi, melanomi itd.) izvedenih od tumora porijeklom od istog soja miša nam omogućuju uspoređivanje protutumorskih učinaka na tumorima iste genetske osnove, a različite histogeneze. Dobrobit životinja bit će osigurana u svakom pogledu. Miševi će se držati u kavezima, u socijalnim uvjetima primjerenim miševima. Pod kaveza će biti prekriven stieljom koja im omogućuje pravljenje gnijezda, a pristup hrani i vodi će biti <i>ad libitum</i>. Pomoću automatiziranog sustava održavat će se konstantni mikroklimatski uvjeti u prostoriji - temperatura 22°C i vlaga 55%, a također će se poštovati standardi boravišta u uvjetima od 12 h boravišta na svjetlu i 12 h boravišta u tamu. Kontrolu uvjeta boravišta i brigu o životinjama obavljat će osposobljeno i pravilno educirano osoblje Pogona za laboratorijske životinje na IRB. Životinjama će bol i patnja biti svedene na minimum jer u tijeku ovog projekta nisu planirani pokusi koji zahtijevaju kirurške zahvate, operacije niti bilo koji drugi testovi koji se izvršavaju na živim životinjama, a eventualna bolnost kao posljedica razvoja tumora bit će kontrolirana korištenjem kratkih točaka u pokusu.