

OBRAZAC 3

Naslov projekta	"Učinak nanokristala resveratrola na angiogenezu i rast Ehrlichovog ascitesnog i solidnog tumora u miša"		
Trajanje projekta	Dvije godine (1. listopada 2018. - 1. srpnja 2020.)		
Ključne riječi (najviše do 5)	Mišji model angiogeneze, ascitesni i solidni tumor, imunomodulacija, nanokristali resveratrola		
	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).	Usprkos značajnim postignućima u borbi protiv tumorskih bolesti u posljednjem desetljeću, tumor i dalje ostaje drugi uzročnik smrtnosti u svijetu, odmah iza kardiovaskularnih bolesti. Uz kirurške zahvate, kemoterapija i radioterapija su izbor trenutno dostupne terapije. Ovakva tradicionalna terapija je skupa, neselektivna te uključuje brojne nuspojave. Problemi povezani s tradicionalnom terapijom ukazuju na potrebu istraživanja alternativnih terapija s optimalnim učinkom na bolesnika, smanjenom toksičnošću i boljom kvalitetom života (Alobaedi i sur., 2017). Prirodni polifenol i fitoaleksin – resveratrol (3,5,4-trihidroksi-trans-stilben) je u posljednje vrijeme predmet mnogih ispitivanja zahvaljujući dokazanim antioksidativnim, kardioprotektivnim, protuupalnim i protutumorskim značajkama (Summerlin i sur., 2015; Alobaedi i sur., 2017). Jang i sur. (1997) pokazali su da resveratrol djeluje na tri razine u procesu karcinogeneze; inhibira proces inicijacije, promocije i progresije (Summerlin i sur., 2015). Prema dostupnoj literaturi, resveratrol svoj protutumorski učinak ispoljava kroz višestruke mehanizme koji uključuju proapoptotičko, antiproliferativno, protuupalno i anti-angiogenetsko djelovanje. Ciljna molekula djelovanja resveratrola je TANK-vezna kinaza 1 (TBK1, engl. Serine/threonine-protein kinase), pokazatelj mnogih kroničnih upalnih procesa koji mogu dovesti do razvoja tumora (Singh i sur., 2015). Protutumorska aktivnost resveratrola temelji se na regulaciji razine reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), modulaciji signalnih puteva, aktivaciji apoptoze i inhibiciji staničnog ciklusa (Summerlin i sur., 2015). Međutim, terapijska primjena resveratrola ograničena je njegovim fizičko-kemijskim (slaba topljivost, nestabilnost) i farmakokinetičkim (brzi metabolizam, kratko vrijeme polueliminacije, niska bioraspoloživost, brza eliminacija) značajkama (Amri i sur., 2011; Singh i sur., 2015).		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	Jedan od važnijih pristupa povećanja bioraspoloživosti slabo topljivih tvari je smanjenje veličina čestica takve tvari do nanometarskog područja dimenzija, odnosno izrada nanokristala slabo topljive tvari. Teško topljiva tvar u obliku nanokristala dispergirana je najčešće u vodeno disperzijsko sredstvo (> 97 %). Mali udjel stabilizatora (1-2 %) osigurava stabilnost takve nanosuspencije, a stabilizatori su pomoćne tvari koje se uobičajeno koriste u izradi odobrenih farmaceutskih oblika lijekova (Sigfridsson i sur., 2017). U ovom istraživanju cilj jest ispitati protutumorski učinak nanokristala resveratrola praćenjem rasta tumora, angiogeneze i polarizacije makrofaga na modelu miša nositelja ascitesnog Ehrlichovog tumora (peritonealna angiogeneza) i solidnog tumora (angiogeneza tumora).
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (<i>kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta</i>).	Jedan od glavnih ciljeva <i>in vivo</i> ispitivanja je istražiti protutumorsku učinkovitost nanokristala resveratrola na modelu miša (Swiss albino) nositelja Erlichovog ascitesnog tumora i/ili solidnog tumora. Iako postoje brojni radovi kojima je dokazana protutumorska učinkovitost resveratrola, korištenje nanokristala resveratrola kao mogućeg načina poboljšanja fizičko-kemijskih i biofarmaceutskih značajki resveratrola, uz minimalno korištenje pomoćnih tvari bez značajnog utjecaja na sigurnosni profil resveratrola, do sada nije provedeno. Smatramo da će dobiveni rezultati omogućiti bolje razumijevanje mogućnosti korištenja nanokristala za razvoj farmaceutskih oblika za primjenu protutumorskih djelatnih tvari. Uporabom <i>in vivo</i> metoda želimo istražiti protutumorsku učinkovitost nanokristala resveratrola na: a) preživljenje životinja; b) rast tumora; c) angiogenezu i invazivnost; d) imunosne parametre u životinja (funkcionalnu sposobnost makrofaga).
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Swiss albino, 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?	Očekuje se da će i kod uznapredovalih promjena razina težine pokusa biti UMJERENA. Prvi dio životinja predviđenih za analizu broja tumorskih stanica, volumena ascitesa, funkcionalnu analizu makrofaga, analizu parametara angiogeneze (broj krvnih žila, VEGF, MMP2, MMP9), citokine, biljege oksidacijskog stresa te hematološke i biokemijske parametre, iz svih skupina (I-10) biti će žrtvovan 15. dana od unosa EAT stanica te će biti prikupljeni uzorci krvi (serum) i organi od ciljnog interesa, nakon čega će se izvršiti njihovo neškodljivo uklanjanje i zbrinjavanje lešina.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Za <i>in vivo</i> istraživanje odabrani su Swiss albino miševi nositelji ascitesnog i/ili solidnog oblika Erlichovog tumora kao pogodan model za praćenje lokalnog učinka nanokristala resveratrola na rast tumora, angiogenezu (peritonealnog i solidnog tumora) i polarizaciju makrofaga. Proučavanje utjecaja protutumorskih tvari na patohistološke promjene izazvane tumorom, kao i proučavanje oksidacijskog stresa.

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	angiogeneze i rasta tumora ne može se proučavati na ljudima, a <i>in vitro</i> istraživanja tih procesa nedostatna su za njihovo razumijevanje s obzirom na višestruke međureakcije između tumorskih, stromalnih i imunosnih stanica te njihovih lučećih čimbenika. Mišji imunosni sustav poklapa se 98-99% sa humanim, što odražava nužnost proučavanja mehanizama humane imunomodulacije na modelima sisavaca.
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. Poboljšanje 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. Istraživanja na životinjama će se provesti u skladu sa smjernicama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o dobrobiti životinja, NN 37/13, NN 55/13) te u skladu sa vodičem za držanje i korištenje laboratorijskih životinja [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23].

