

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569	
Název projektu pokusů	
Souvislost diabetu a rakovinného bujení a analýza nových léčebných látek cílených na mitochondrie	
Doba trvání projektu pokusů - v měsících	4. 1. 2021 – 31. 1. 2025
Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾	Diabetes mellitus, obezita, rakovinné bujení
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 látky cílené na mitochondrie a potencionálně využitelné v klinické praxi se zaměřením na charakterizaci fyziologických změn u myši s dietně vyvolaným diabetem 2. typu v souvislosti se vznikem rakovinných nádorů.	
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 vztahu obezity, diabetu 2. typu a rakovinného bujení. Vztah zhoubných nádorů a diabetu je v poslední době intenzivně zkoumán. Řada klinických studií a metaanalýz dokazuje vyšší riziko nádorů právě u diabetiků, ovšem přesné souvislosti nebyly zcela popsány. Předpokládá se významná role inzulinu, ale také leptinu a dalších hormonálně aktivních látek. Léčba diabetu může ovlivňovat pozitivně i negativně riziko zhoubného nádoru. Z výsledků našich předchozích experimentů vyplývá, že mitochondriálně cílené látky účinně snižují koncentrace inzulinu i leptinu u myši s dietou vyvolaným diabetem 2. typu a zároveň účinně působí na redukci rakovinných nádorů.	
Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání	
Myši budou v průběhu 6 měsíčního období krmení vysokotukovou a standardní dietou váženy (1x měsíčně), v průběhu experimentu budou váženy (1x týdně) a před ukončením experimentu bude proveden orální glukózový toleranční test (glukóza bude v objemu 50μl/10g tělesné hmotnosti, tzn. 0,15-0,3 ml celkového objemu). Glykémie bude měřena z kapky krve z ocasní žíly. Myším budou subkutánně (10 ⁶ buněk/100 μl PBS) nebo do ocasní žíly (100 000 buněk/100 μl PBS) vpraveny LLC1 buňky. K léčbě budou využity mitochondriálně cílené látky MitoTam a 3 různé typy derivátu Mitotamu. O těchto látkách je známo že v aplikovaných dávkách (2 mg/kg pro MitoTam a 0.5 mg/kg pro jeho deriváty – látky budou podány v objemu 100 μl) jsou netoxické a zvířatům nezpůsobují žádné utrpení. Látky budou aplikovány intraperitoneálně 2x týdně, celkově 8 aplikací. Subkutánní, intraperitoneální a intravenózní aplikace je rutinní záležitostí.. Zvířata budou denně kontrolována a v případě zhoršení zdravotního stavu bude pokus ukončen. Myši budou usmrceny v časném stádiu růstu nádoru, nádory pro ně tedy nebudou představovat žádnou zátěž. Ukončení pokusu bude provedeno intraperitoneálním podáním anestetika (Zoletil 5 mg/100 g b.w. + Rometar 2 mg/100 g b.w. – anestetikum bude v objemu max. 0,7 ml), a zvířata budou dekapitována.	
Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) a doba trvání těchto účinků	
Ztráta hmotnosti obézních myši na standardní hmotnost.	
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu	
	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti

Druh zvířat ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhadovaný počet	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Myš laboratorní (Mus musculus)	480		480		
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena					
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 - uveďte					
Uplatňování 3R					
Nahrazení používání zvířat - uveďte, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu					
Prohlašujeme, že pokus na zvířecích modelech nelze nahradit alternativními metodami. Zvířecí model jako jediný umožňuje testování, které dosud nelze jinými metodami nahradit, protože poruchy provázející diabetes mellitus 2. typu, obezitu a rakovinu jsou komplexní a projevují se současně v řadě orgánů, farmakologickou léčbu je rovněž nezbytné sledovat na celém organismu.					
Omezení používání zvířat - 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).					
Uvedený počet zvířat odpovídá takto prováděným metabolickým experimentům a jde o minimální možný počet zajišťující validní statistické posouzení.					
Setrné zacházení se zvířaty - uveďte 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					
Se zvířaty bude nakládáno podle zásad bezbolestného zacházení se zvířaty. Mitochondriálně cílené látky budou podávány intraperitoneálně, nádorové buňky subkutánně a intravenózně, což jsou minimálně bolestivé způsoby aplikace. Pokusná zvířata nebudou opětovně používána. Stav zvířat bude pravidelně kontrolován vedoucím pokusů, nebo jím pověřenou kvalifikovanou osobou, experiment bude ukončen při zhoršení zdravotního stavu zvířete. Dodržování předpisů ochrany zvířat kontroluje pravidelně vedoucí pokusů, nebo jím pověřená kvalifikovaná osoba.					
Použité druhy zvířat - vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií					
Pro experimenty budou využiti samci myšího kmene C57BL/6, který je celosvětově nejpoužívanějším experimentálním modelem obezity spojené s diabetes mellitus 2. typu. U zvířat krmených vysokotukovou dietou se po určité době vyvine obezita spojená s inzulinovou rezistencí a počátečním stádiem diabetes mellitus 2. typu, charakterizovaným zvýšenou glykemií na lačno.					
Zvířata budou dodána ve věku cca 5-7 týdnů. Následovat bude 6 měsíční podávání standardní a vysokotukové diety. Pro vlastní provedení pokusu bude vytvořeno 6 pokusných skupin pro každý typ léčiva (4 mitochondriálně cílené látky - Mitotam (MT) a jeho deriváty) a každý typ aplikace rakovinných buněk (subkutánní a intravenózní). Každá skupina bude mít konečný počet zvířat 10. Uvedený počet zvířat na skupinu odpovídá takto prováděným experimentům a jde o minimální možný počet zajišťující validní statistické posouzení. Předpokládáme využití celkem 480 jedinců kmene C57BL/6, tj. 120 jedinců na rok.					

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

²⁾ 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