

Vyplňujte jen bílé kolonky!
Formulář vyplňujte na počítači; kolonky se zvětší automaticky podle množství textu.

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ upravené podle PR 2020/569	
Název projektu pokusů	
Studium ledvinné exkrece radioaktivně značených peptidů pro molekulární zobrazování s využitím izolované ledviny potkana	
Doba trvání projektu pokusů - v měsících	24
Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾	receptorově specifické peptidy; radiodiagnostika; radioaktivní značení; perfundovaná ledvina; močová exkrece
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 toxieity 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 projektu je posoudit parametry ledvinné exkrece nově koncipovaných radioaktivně značených receptorově specifických peptidů. Tyto peptidy jsou cíleny na jeden z významných receptorů determinujících proliferaci cévního systému v solidních nádorech (VEGF receptor). Jeho distribuce v nádorové tkáni je vysoká a vazbou vhodného labelu (např. radioaktivního) by bylo možné nádory s jejich vyšší hustotou zobrazit pomocí SPECT či PET.					
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)					
Vývojové radiopeptidy cílené na receptory exprimované nádorovou tkání musí splňovat některé farmakokinetické předpoklady, jako je např. poměrně rychlá exkrece a odstranění z krve a necílových orgánů. Tato exkrece by měla probíhat převážně ledvinami, protože kumulace v játrech ruší zobrazení cílových struktur v abdominální oblasti. Stanovení míry vylučování ledvinami je proto důležité pro další vývoj v dané skupině a výběr nejvhodnějších látek. Translace výsledků směrem na člověka je v tomto případě velmi vysoká, protože základní ledvinné vylučovací fyziologické funkce potkana a člověka jsou obecně relativně podobné.					
Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání					
Pro dosažení cíle studie je plánováno použití standardního, vědecky uznávaného experimentálního modelu, který využívá izolovanou perfundovanou ledvinu jako orgánový model, který má zachovalou integrální vylučovací funkci. Zvíře je uvedeno do celkové anestézie a poté je provedeno vypreparování pravé ledviny, která je dále perfundována za definovaných podmínek (tlak, průtok) speciálním roztokem. Po přidání zkoumané látky jsou odebírány vzorky perfúzního média a produkované moče pro stanovení hladiny zkoumané látky. Perfúzní médium obsahuje vedle dalších látek potkaní erytrocyty jako důležitý prostředek pro zajištění dostatečného zásobení tkáně preparátu kyslíkem. Po skončení perfúze je zvíře bez nabytí vědomí usmrceno předávkováním celkového anestetika (pentobarbital 150mg/kg i.v.). Odběr krve pro izolaci erytrocytů je prováděn v celkové anestezii pentobarbitalem (50 mg/kg i.p.) a zvíře je usmrceno vykrvením.					
Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) a doba trvání těchto účinků					
Zvíře v experimentu slouží pouze jako dárce orgánu (ledviny) a erytrocytů. Všechny zákroky jsou prováděny v hluboké celkové anestezii. Po experimentu je zvíře usmrceno bez nabytí vědomí. Žádné nepříznivé účinky nejsou z tohoto důvodu očekávány.					
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu					
Druh zvířat ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhadovaný počet	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
		Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Potkan laboratorní (Rattus norvegicus)	72	72			
Zvolte položku.					
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 - <i>uveďte</i>	
Pro plánované experimenty není relevantní.	
Uplatňování 3R	
Nahrazení používání zvířat - <i>uveďte, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu</i>	
Pro daný cíl studie je nezbytné zkoumat vylučovací parametry s využitím modelu se zachovalou vylučovací funkcí. Pro posouzení ledvinných clearancových parametrů, míry glomerulární filtrace a případně tubulární sekrece/reabsorpce neexistují srovnatelné experimentální modely. Metody na buněčné úrovni nemohou taková data přinést, protože vylučování látek v ledvinách je dáno souhrou funkcí několika buněčných typů a závisí na zachovalém průtoku krve a moči intaktním ledvinným tubulárním systémem. Alternativní metoda k perfundované ledvině se zachovalou integritou ledvinné funkce by mohlo být studium eliminačních parametrů <i>in vivo</i>, avšak i zde je třeba využití zvířat. Navíc se zde významně uplatňují extrarenální vlivy (eliminace játry aj.) a výsledky by tedy nebyly ekvivalentní použité orgánové metodě. Jiná metoda, která by umožnila stanovit ledvinné exkreční parametry a mechanismus ledvinné exkrece bez extrarenálních vlivů, tj. která by umožňovala získat experimentální data se stejnou či podobnou vypovídací hodnotou není zatím k dispozici, proto zvíře z experimentů zcela vyloučit nelze.	
Omezení používání zvířat - <i>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).</i>	
Bude použit jen takový počet laboratorních zvířat, který je nutný pro zajištění relevantního množství experimentálních dat. Jejich počet by měl být takový, aby umožňoval statistické vyhodnocení experimentů – stanovení průměrných hodnot vylučovacích parametrů. Počet opakování experimentů pro získání statisticky hodnotitelné skupiny bude omezen na 4. Pokud budou úspěšně provedeny čtyři experimenty za stejných podmínek, tak další pokusy již nebudou v dané sérii prováděny a budou využita data z těchto experimentů. Pro minimalizaci počtu zvířat bude použita jen jedna koncentrace radiopeptidů v perfúzním médiu. Bude se jednat o velmi nízkou koncentraci (na úrovni pM), u které nebude riziko nasycení exkrečních systémů a tím zkreslení studovaných exkrečních parametrů. Vyšší počet koncentrací by sice mohl širěji popsat vylučovací kinetiku radiopeptidů, avšak pro dosažení cílů studie je plánovaný počet experimentů dostačující. Pro každý perfúzní experiment je třeba jednoho zvířete jako dárce orgánu a dvou dalších jedinců pro získání erytrocytární masy přidávané do perfuzátu. Pro vysokou experimentální náročnost metody je úspěšnost provedení perfúze kolem 70%-80%. I při standardním postupu se mohou vyskytnout nečekané komplikace (např. jiné anatomické uspořádání cév v oblasti ledvin). Z tohoto důvodu je plánováno využití až šesti zvířat na experiment s jednou látkou a až 12 zvířat jako dárců krve pro izolaci erytrocytů. Pro stanovení ledvinných parametrů jednoho radiopeptidu bude třeba max. 18 zvířat. Celkový počet peptidů bude 4, z čehož vyplývá, že celkový počet zvířat na plánované období (2021-2022) bude maximálně 72 (36 ročně). Při naprosté úspěšnosti experimentů by byl použitý (minimální) počet zvířat 48 (24 za rok).	
Šetrné zacházení se zvířaty - <i>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</i>	
Zvíře bude při plánovaných experimentech uvedeno do celkové anestezie, dále jsou provedeny příslušné chirurgické zásahy (preparace ledviny, odběr krve z aorty), a po jejich skončení je zvíře usmrceno buď předávkováním celkového anestetika nebo vykrvením v celkové anestezii v případě odběru krve. Je tedy vyloučena bolest či další nepříznivé vlivy na zvíře. Při manipulaci s laboratorním zvířetem je postupováno šetrně a zvířeti není způsobována žádná bolest ani újma. Během experimentu je zvíře v celkové anestézii, utrácení probíhá také v celkové anestézii, bez uvědomování si negativních stimulů.	
Použité druhy zvířat - <i>vysvětlete výběr druhů a souvisejících životních stadií</i>	
Technika perfundované ledviny je téměř výlučně používána s využitím potkaní ledviny. Příčinou je rozměrově výhodné anatomické uspořádání, vhodné pro preparaci ledviny, a velmi dobrá znalost standardních parametrů ledvinné funkce, což umožňuje mezilaboratorní porovnávání. Daná metoda je používána v mezinárodním měřítku několika pracovišti na světě. Alternativně by bylo teoreticky možné	

použít perfúzi králičí ledviny, ale tato metoda není standardizována a není běžně pro cíle plánované v předkládané studii aplikována. Jde ovšem zase o metodu založenou na využití laboratorního zvířecího druhu.

- 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