

Príloha č. 2 : 4344/19-221/3

Netechnické zhrnutie projektu podľa § 40 Nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.

Názov projektu:

Predklinické testovanie vybraných indolových derivátov v prevencii rozvoja neskorých diabetických komplikácií

Kľúčové slová v projekte: zvierací model diabetu typu 1, streptozotocín, inhibitor aldózareduktázy, potkan

a) Ciele projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, počte a typoch zvierat.

Podstatou projektu je štúdium možnosti farmakologického využitia inhibítorov aldózareduktázy na báze substituovaných 1-indolových kyselín pri prevencii a liečbe diabetických komplikácií. Budú navrhnuté, syntetizované a testované nové zlúčeniny s očakávanou schopnosťou inhibovať enzým aldózareduktázu. Návrh nových štruktúr na báze substituovaných 1-indolových kyselín, bude spočívať v počítačovej selekcii vhodných farmakofórových fragmentov potrebných pre interakciu s inhibičným väzobným miestom enzýmu. Očakávaným prínosom projektu bude vývoj vysoko účinných látok farmakologicky využiteľných v prevencii a liečbe chronických diabetických komplikácií a zápalu, s cieľom znížiť morbiditu a mortalitu diabetikov a zlepšiť kvalitu ich života.

V časti projektu *in vitro* sa použije celkom 300 zvierat (dospelých laboratórnych potkanov, pohlavie nie je kľúčové, kmeňa Wistar). Kontrolné a experimentálne skupiny potkanov v tejto časti štúdie nebudú vytvárané. Vyššie uvedené počty zvierat sa s ohľadom na požadované štatistické spracovanie stanovili nasledovne: 192 zvierat sa použije ako zdroj očných šošoviek na izoláciu enzýmu aldózareduktáza a aldehydreduktáza pre *in vitro* postupy; zvyšných 108 zvierat sa použije ako zdroj erytrocytov a očných šošoviek pre orgánové inkubácie *in vitro*. Alternatívne metódy získania požadovaných enzýmových preparátov aldózareduktázy resp. aldehydreduktázy s použitím tkanivových kultúr neexistujú.

V časti projektu *in vivo* sa použije celkom 300 zvierat (dospelých laboratórnych potkanov, samcov, kmeňa Wistar). Experimentálny diabetes sa navodí i.p. podaním streptozotocínu [STZ, 30 mg/kg] v troch po sebe nasledujúcich dňoch. Kontrolným a diabetickým zvieratám v liečených skupinách budú po dobu 5, príp. 60 dní (t.j. 6. až 10. deň), resp. 6.-65. deň od začiatku postupu podávané každý deň testované zlúčeniny sondou do žalúdka. Na zvieratách v dlhodobej *in vivo* štúdii budú vykonávané behaviorálne testy na štúdium periférnej neuropatie – Tail flick, Hot plate a von Fray Filaments.

Potkany sa podrobia intraperitoneálnemu podaniu streptozotocínu a manipulácii pri aplikácii látok počas štúdie. Doba podávania STZ je 3 dni a substancií 5 dní v krátkodobom postupe, resp. 60-dní pri dlhodobom experimente.

Predpokladaná ujma na použitých zvieratách bude v prvých troch dňoch pri použití streptozotocínu, v skupinách zvierat trpiacich diabetom a v diskomforte spôsobenom fixáciou potkanov pri perorálnej aplikácii substancií, behaviorálnymi testami. Samotné úkony však nespôsobujú dlhodobú bolesť, utrpenie alebo stres a sú bez potreby podania analgetík. Pre zistenie bezpečnosti a účinnosti testovanej látky s plánovaným využitím pre človeka prínos projektu výrazne prevyšuje ujmu u experimentálnych potkanov.

Celkovo v postupe budú vykonávané práce na zvieratách pri strednej úrovni krutosti podľa klasifikácie krutosti postupov:

Váženie zvierat – slabá

Jednorázová aplikácia anestetika – slabá

Podanie streptozotocínu i.p. opakovane tri dni po sebe - stredná.
Aplikácia testovanej látky p.o. 5 dní, resp. 60 dní - stredná
Odber krvi z očnej žily v čiastočnej anestézii – stredná
Prežívanie zvierat po indukcii hyperglykémie – stredná
Jednorazové behaviorálne testy – slabá/stredná
Systémová reakcia na podávanie liečiv – slabá/stredná

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

Rozhodujúca časť projektu bude realizovaná v podmienkach *in vitro*. Zvieratá budú poskytovať v tejto etape len orgány na kultivačné metódy. V postupoch *in vivo* sa bude testovať iba obmedzený počet najúčinnějších derivátov zistených z postupov *in vitro*. Aby sa zmiernilo utrpenie zvierat, použije sa krátkodobý postup *in vivo* v celkovej dĺžke 10 dní. V prípade výsledkov, kedy nedôjde k poškodeniu zdravia zvierat, uskutoční sa aj dlhodobý experiment v dĺžke 65 dní, kde sa testuje efekt chronického liečenia. Nepredpokladá sa utrpenie potkanov počas jeho realizácie. Nutnosť realizácie postupov hodnotiacich účinkov novosyntetizovaných látok na zvieratách podporuje aj skutočnosť, že sa jedná o komparatívnu štúdiu biologickej aktivity viacerých zlúčenín. V medzinárodných databázach DB –ALM ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) a NC3Rs (National Centre for the Replacement, refinement and Reduction of Animals in Research) sa nenachádzajú alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. Pre komplexnosť procesov absorpcie, distribúcie a metabolizácie liečiv v živých organizmoch nie je možné v projekte nahradiť navrhnutý animálny model alternatívnymi metódami.

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych zvierat tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť a validita postupu pre fyziologické, biochemické a morfológické analýzy aj ich štatistické vyhodnotenie. Zvieratá budú rovnakého pohlavia, veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom. Z dôvodu šetrenia zvierat nebudú realizované dlhodobé štúdie (60 dní), ak sa zistí v prvotnom krátkodobom experimente (10 dní) nepriaznivý vplyv podaných testovaných látok na zvieratá.

Zásada zjemnenia (refinement)

Zvieratá budú po privezení z chovného zariadenia v karanténe po dobu 7 dní a budú umiestnené po dvoch v dostatočne veľkých vaniciach (rozmery 53x32x19 cm, plocha 1670 cm²) za stanoveného svetelného, tepelného a kŕmneho režimu. Budú v kontakte len so školenými pracovníkmi zverinca. Potkany v priebehu postupu prežívajú len stres pri aplikácii látok a manipulácii s nimi. Bude sa minimalizovať šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia klietky predmetmi na hru i ohryzovanie. Pri injekčnej aplikácii STZ sa stres zmierni používaním tenkých jednorazových ihliel, šetrným a ohľaduplným zaobchádzaním so zvieratami. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu jedincov charakterizovaných v tabuľke humane endpoints budú humánne usmrtené. Ošetrovatelia budú kontrolovať v prvých dvoch dňoch po aplikácii STZ zvieratá 3-krát denne a v nasledujúcich dňoch 2-krát denne. O humánnom usmrtení bude rozhodovať veterinárny lekár na základe informácií od zodpovedných osôb za projekt. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii predávkovaním anestetík.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie