

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

“Transkripcia myogénnych regulačných faktorov spojených s proliferáciou a diferenciáciou satelitných buniek v prsnom svalstve po aplikácii *Enterococcus faecium* AL41 CCM 8558”

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1184-3/2020-220

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): kurča, svaly, *Enterococcus*, jejunum, imunita

Účel projektu*: Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

Regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z. z.)

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Opísať ciele projektu:

V súčasnosti je venovaná veľká pozornosť imunomodulácii po aplikácii probiotík. Záujem výskumu je orientovaný na pochopenie aktivácie produkcie cytokínov a chemokínov v patogenéze a iniciácii imunitnej odpovede.

U kurčiat včasná preventívna aplikácia *Enteroccus faecium* viedla k zníženiu počtu salmonel a kampylobakterov v céku, podporovala vývoj tenkého čreva a jeho ochrannú mucínovú vrstvu, a tiež stimulovala vrodennú a získanú imunitnú odpoveď. Predbežné zistenia naznačujú, že podávanie niektorých probiotických baktérií v kŕmnej dávke ovplyvňuje aj štruktúru svalovej hmoty prsného svalstva a kapilarizáciu.

Predkladaný projekt je zameraný predovšetkým na *in vivo* sledovanie génovej expresie svalových myogénnych regulačných a transkripčných faktorov ako sú Pax7, Myf 5, MyoD a rastových faktorov IGF, HGF, EFG spojených s proliferáciou a diferenciáciou kmeňových buniek v prsnom svalstve pri modulácii črevného mikrobiómu *Enterococcus faecium* AL41 = CCM 8558, enterocín M produkujúcim bakteriálnym kmeňom s probiotickými vlastnosťami.

Sledovanie uvedených faktorov bude skúmané v súčinnosti so štúdiom ďalších imunologických, morfológických a mikrobiologických parametrov. Determinované zmeny budú zisťované v krvi, slezine, ceku, truse a svaloch, metódami polymerázovej reakcie (RT-PCR), prietokovej cytometrie, spektrofotometrie, histológie, imunohistochemie a bakteriológie.

V predošlom postupe pri testovaní bakteriálneho kmeňa *Enterococcus faecium* AL41 *in vivo* u kurčiat, ktoré bolo vykonané po infekcii s *C. jejuni* bol preukázaný pozitívny vplyv na produkciu cytokínov imunokompetentnými bunkami izolovanými z krvi a céka kurčiat.

Prínos z vykonaného projektu

Predpokladaný prínos by mal spočívať v obohatení poznatkov súvisiacich s objasnením mechanizmov vzťahu probiotických baktérií na rozvoj svalovej hmoty.

Získané informácie o imunitných mechanizmoch na molekulovej a bunkovej úrovni umožnia vyvinúť nový prístup k poznaniu vzťahu črevnej mikrobioty a rastu svalovej hmoty u brojlerov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Do *in vivo* postupu bude zaradených celkovo 80 kusov jednodňových brojlerových kurčiat hybridu COBB 500, samčieho pohlavia, rozdelených do 4 skupín K1, K2, EF1 a EF2 (n=20).

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:

Počas sledovaného obdobia nebude bránené kurčatám v prirodzenom správaní, budú dodržané štandardy umiestnenia, chovu a starostlivosti, vyrušovanie bude obmedzené iba na aplikáciu bakteriálneho probiotického kmeňa, dôsledne bude monitorovaný zdravotný stav zvierat.

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Stupeň krutosti
Presun zvierat pri zabezpečovaní čistenia chovných nádob	Štandardný spôsob. Krátkodobý mierny stres spôsobený fixáciou zvierat. Bolesť žiadna. Dĺžka úkonu 1-2 min.	Slabý
Perorálna aplikácia <i>1x denne kultúra baktérie s probiotickým účinkom vo fyziologickom roztoku</i>	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený fixáciou zvierat. Bolesť žiadna. Dĺžka úkonu 1-2 min.	Slabý
Postaplikačné obdobie Zoznam očakávaných klinických príznakov	Neočakávame výskyt klinických príznakov, príležitostne môže byť prítomná hnačka.	Slabý
Usmrtenie dekapitáciou	Krátkodobý stres spôsobený manipuláciou s obmedzením pohybu.	Stredný

Zvieratá budú humánne usmrtené v prípade prítomnosti súčasného klinického skóre uvedeného pre narušenie zdravotného stavu pri týchto špecifických ukazovateľoch:

Konzistencie trusu: vodnatý a krvavý trus (hnačka) – skóre 3

Výrazne znížená aktivita, ospalosť, posedávanie – skóre 2,

Pokles telesnej hmotnosti +20 – skóre 3,4

U zvierat'a, ktoré pri hodnotení špecifických príznakov dosiahne hodnotiace skóre 9, pôjde o "*human end-point*", a následne na základe rozhodnutia vedúceho postupu bude humánne usmrtené dekapitáciou.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Na základe posudzovaných faktorov navrhujeme krutosť postupov označiť ako "strednú". Na konci pokusu budú všetky zvieratá humánne usmrtené (podľa prílohy č. 2 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z.). Navrhnuté spôsoby usmrčovania hydiny (dekapitácia) sú v súlade s § 5 a prílohou č. 2 NV 377/2012 Z.z.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Z dôvodu sledovania interakcií v organizme medzi imunitným, črevným a svalovým tkanivom po aplikácii *Enterococcus faecium* AL41 = CCM 8558 je použitie živých zvierat nevyhnutné. Jedným z dôvodov je detekcia kolonizujúcich baktérií a ich počtov v čreve a fečes, druhým dôležitým dôvodom je očakávaný výskyt morfológických zmien vo svaloch, predstavovaný nárastom satelitných myogénnych buniek po aplikácii enterokokov. Aplikácia enterokokového kmeňa s probiotickými vlastnosťami môže viesť aj k zmenám imunitných buniek a cytokínov v periférnej krvi, slezine a kvality mucínov v čreve, preto je potrebné zaradiť testovanie na živých zvieratách. Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v organizme, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané zo štúdií na zvieratách za tie, ktoré pochádzajú z *in vitro* postupov.

2. Redukcia počtu zvierat:

Do postupu bude zaradených 80 ks kurčiat, bude vykonané 4. odbery, pre každý odber a skupinu najmenší počet, na ktorom je možné robiť relevantné štatistické vyhodnotenie pre publikovanie v karentových časopisoch. Pri odberoch je použitie viacerých zvierat nevyhnutné, nakoľko budú vykonávané viaceré vyšetrovacie metódy na orgánoch u kurčiat vo veku do 12 dní, počas ktorých postup bude trvať. Pre zmysluplné vyhodnotenie výsledkov je uvedený počet zvierat nevyhnutný.

3. Zjemnenie:

Do postupu budú zaradené jednodňové kurčatá a bude im aplikovaný bakteriálny probiotický kmeň *Enterococcus faecium* AL41 = CCM 8558, u ktorého bola potvrdená produkcia bakteriocínov a priaznivý účinok tak na produkciu prozápalových cytokínov, ako aj nárast imunitnej odpovede. *Enterococcus faecium* AL41 = CCM 8558 je prospešným enterocín M produkujúcim bakteriálnym kmeňom, ktorý nepredstavuje riziko pre iné zvieratá a ľudí. V prípade výskytu chorobných príznakov budú choré zvieratá prednostne použité na odber biologických vzoriek.

Zvieratá použité v tomto postupe nebudú opätovne zaradené do iného postupu, pretože všetky budú usmrtené a použité na odber vzoriek biologického materiálu.

Na zvieratách sa nebudú vykonávať zákroky, ktoré by boli bolestivé, alebo si vyžadovali anestéziu.

V priebehu postupu bude zvieratám venovaná štandardná veterinárna starostlivosť. Kontrola bude vykonávaná veterinárnym lekárom, zodpovedným za starostlivosť o zvieratá. Zvieratám nehrozí ani predávkovanie ani intoxikácia, v podstate ide o štandardné postupy pre daný typ overovania účinnosti probiotika pri zachovaní všetkých podmienok podľa prílohy č. 5 k nariadeniu vlády č.377/2012 Z.z.

Zvieratám pri nástupe klinických príznakov zabezpečíme dôkladné klinické monitorovanie s použitím všeobecného hárku na zaznamenávanie klinického skóre so zvýšenou frekvenciou monitorovania. Keď zvieratá dosiahnu vopred stanovené klinické skóre pre humánne ukončenie postupu, humánne sa usmrtia.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Príloha č. 2 :

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

Názov projektu: 1202-3/2020-220

Vekom podmienený rozvoj neskorých diabetických komplikácií a predklinické hodnotenie vybraných indolových derivátov.

Kľúčové slová v projekte: zvierací model diabetu typu 2, inhibitor aldózareduktázy, starnutie

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

Projekt sa zaoberá štúdiom vzniku neskorých diabetických komplikácií na ZDF potkanoch. Prvá časť projektu, ktorá je na úrovni *in vitro* je zameraná na štúdium rozvoja diabetu a postupný vývoj neskorých diabetických komplikácií v jednotlivých fázach vývoja. Druhá časť projektu je zameraná na štúdium možnosti farmakologického využitia inhibítorov aldózareduktázy na báze substituovaných 1-indolových kyselín pri prevencii a liečbe diabetických komplikácií. Sú to látky, u ktorých sa na úrovni *in vitro* prejaví schopnosť inhibovať enzým aldózareduktáza a nebude sa prejavovať toxicita na bunkových kultúrach. 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 ako aj štúdium mechanizmov rozvoja neskorých diabetických komplikácií a ich vplyv na jednotlivé orgány.

V časti projektu *in vitro* sa použije celkom 180 zvierat (dospelých samcov laboratórnych potkanov kmeňa ZDF). Kontrolné a experimentálne skupiny potkanov v tejto časti štúdie nebudú vytvárané. Vyššie uvedené počty zvierat sa s ohľadom na požadované štatistické spracovanie stanovili nasledovne: 9 postupov po 10 diabetických zvierat a 10 Lean zvierat. Vek zvierat je 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 21 a 24 mesiacov. Alternatívne metódy získania požadovaných informácií o priebehu a rozvoja neskorých diabetických komplikácií u diabetikov s použitím tkanivových kultúr neexistujú.

V časti projektu *in vivo* sa použije celkom 150 zvierat (dospelých laboratórnych potkanov, samcov, kmeňa ZDF) v troch postupoch. Experimentálny diabetes u ZDF potkanov vzniká spontánne. V jednom postupe sa použije 50 zvierat (14 kontrolných a 36 diabetických). Kontrolným a diabetickým zvieratám v liečených skupinách budú po dobu 60 dní podávať každý deň testované zlúčeniny sondou do žalúdka, prípadne ak to charakter testovanej látky dovoľí – na piškótu. Na zvieratách v dlhodobom *in vivo* teste budú vykonávané behaviorálne testy na štúdium periférnej neuropatie – „Tail flick“, „hot plate“ a „von Fray Filaments“.

Predpokladaná ujma na použitých zvieratách bude len v diskomforte spôsobenom fixáciou potkanov pri perorálnej aplikácii substancií a behaviorálnymi testami. Samotné úkony však budú krátkodobé nespôsobujúce dlhodobú bolesť, utrpenie alebo stres a bez potreby podania celkovej anestézie i 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

Aplikácia testovanej látky *p.o.* 60 dní - stredná
Retroorbitálny odber krvi v čiastočnej anestézii – stredná
Prežívanie zvierat po indukcii hyperglykémie – stredná
Jednorázové behaviorálne testy –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 krv a orgány na za účelom štúdia rozvoja neskorých diabetických komplikácií. V postupoch *in vivo* sa budú testovať iba 3 deriváty. Tieto deriváty budú pred vykonaním *in vivo* štúdie najskôr otestované na úrovni *in vitro*. Na enzýme aldóza reduktáza izolovanom z očných šošoviek potkanov (č.Ro. 4314/19-221/3), otestované na úrovni *ex vivo* a na bunkových kultúrach. V prípade potvrdenia dobrej biodostupnosti a nízkej toxicity na úrovni *in vitro* a priaznivých výsledkov na krátkodobom experimente *in vivo* (10 dňový - č.Ro. 4314/19-221/3) sa pristúpi k testovaniu aj na ZDF potkanoch. Nepredpokladá sa utrpenie potkanov počas jeho realizácie. Podávať sa bude látka v nízkych koncentráciách. 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 počtu zvierat sa v časti *in vivo* použije iba 6 kontrolných „lean“ ZDF potkanov. Potrebné doplňujúce údaje do štatistiky sa získajú z *in vitro* postupu. V jednom postupe *in vivo* sa testujú naraz 2 koncentrácie. Čím ušetríme kontrolné skupiny, keby sme museli postup opakovať s vyššou/nížšou koncentráciou.

Zásada zjemnenia (refinement)

Zvieratá budú po privezení z chovného zariadenia v karanténe po dobu 7 dní 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 stres len pri aplikácii látok a manipulácii s nimi ako aj počas behaviorálnych testov. Bude sa minimalizovať šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia klietky predmetmi na hru i ohryzovanie. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu jedincov charakterizovaných v tabuľke human end points budú humánne usmrtené. Ošetrovatelia budú kontrolovať zvieratá 1-krát denne. O humánnom usmrtení bude rozhodovať veterinárny lekár na základe informácií od zodpovedných osôb za projekt. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokéj celkovej anestézii predávkovaním anestetík.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

PRÍLOHA 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Transplantácia črevnej mikrobioty modulovanej laktobacilmi v terapii ulceróznej kolitídy

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1222-3/2020-220

Kľúčové slová v projekte (max. 5 slov): ulcerózna kolitída, dextran sulfát sodný, fekálna transplantácia, laktobacily

Účel projektu: základný výskum

Ciele projektu:

Nešpecifické črevné zápal (inflammatory bowel disease, IBD) je skupina chronických zápalov tráviaceho traktu, ktoré majú neinfekčný pôvod a príčiny ich vzniku nie sú zatiaľ dostatočne objasnené. Jednou z foriem IBD je ulcerózna kolitída, pri ktorej je zápal lokalizovaný v oblasti hrubého čreva a konečníka, má kontinuálny charakter a zasahuje len mukóznú vrstvu črevnej steny. Terapia je v súčasnosti skôr symptomatická, v pokročilejších štádiách ochorenia je nutný chirurgický zásah. Často sa vyvíjajú závažné komplikácie, vedúce až k invalidizácii pacienta. Z toho dôvodu sa hľadajú nové možnosti prevencie a liečby IBD. Jednou z nich je transplantácia črevnej mikrobioty, pri ktorej sa do tráviaceho traktu aplikuje kompletná komunita črevných mikroorganizmov získaných od zdravých darcov. Liečebný efekt fekálneho transplantátu môže byť zosilnený jeho obohatením o špecifikované druhy baktérií resp. naturálnych látok. Cieľom predkladaného projektu je otestovať terapeutický efekt fekálneho transplantátu získaného od zdravého človeka a jeho modulovanej formy – obohatenej o dva druhy laktobacilov (*L. plantarum* LS/07 a *L. reuteri*), u ktorých bola dokázaná probiotická a protizápalová aktivita. Ako model bude využitý konvenčný kmeň potkanov s chemicky (dextran sulfátom sodným) indukovanou kolitídou. V projekte budú stanovované morfológické (stena tráviaceho traktu), mikrobiologické, biochemické, hematologické a imunologické (lokálna a systémová imunitná odpoveď) parametre.

Prínos z vykonaného projektu:

Pacienti s ulceróznou kolitídou často trpia závažnými včasnými i neskorými komplikáciami, ktoré významne znižujú kvalitu ich života. Z toho dôvodu sa hľadajú nové možnosti liečby IBD. Fekálna transplantácia by mohla byť výhodným, málo invazívnym terapeutickým prístupom. Prínosom predkladaného projektu bude otestovanie liečebného

účinku transplantátu črevnej mikrobioty zdravého človeka a jeho upravenej formy, cielene obohatenej o prospešné druhy laktobacilov, v modeli akútnej ulceróznej kolitídy. Z dlhodobého hľadiska budú výsledky slúžiť ako základ pre klinické štúdie.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

laboratórne potkany, kmeň Sprague-Dawley, spolu 84 zvierat

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu a predpokladaný stupeň krutosti:

Postup	Vplyv na zviera	Stupeň krutosti
Váženie zvierat, handling	Krátkodobý slabý stres, bez bolesti.	slabý
Opakované inhalačné podanie anestetika	Krátkodobý slabý stres, bez bolesti.	slabý
Chemická indukcia ulceróznej kolitídy – podávanie DSS	Bez bolesti, roztok DSS podávaný v pitnej vode.	slabý
Vývin ulceróznej kolitídy	Na 4.-5. deň podávania DSS sa u zvierat začínajú rozvíjať zápalové zmeny v oblasti hrubého čreva, sprevádzané výskytom hnačiek, úbytkom telesnej hmotnosti, krvácaním z tráviaceho traktu.	stredný
Kolonoskopické vyšetrenie	Bez stresu a bolesti. Postup bude vykonaný v celkovej inhalačnej anestéze.	slabý
Opakovaný odber krvi z chvostovej žily	Krátkodobý opakovaný stres, bez bolesti. Postup bude vykonaný v celkovej inhalačnej anestéze.	stredný
Fekálna transplantácia	Krátkodobý stres spôsobený fixáciou zvieraťa (v trvaní 1-2 min), bez bolesti. Transplantát bude opakovane aplikovaný pipetou do ústnej dutiny.	slabý
Dekapitácia	Bez stresu a bolesti. Postup vykonávaný v celkovej anestéze.	slabý

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat

Nahradenie experimentálnych zvierat nie je možné vzhľadom na charakter experimentu. Vzájomnú interakciu črevného epitelu, transplantovanej črevnej mikrobioty a imunitného systému ako odpoveď organizmu na vznik kolitídy je možné skúmať len v podmienkach *in vivo*, za účasti ďalších kľúčových regulačných systémov – nervového a hormonálneho. Výhodou nami zvoleného modelu IBD oproti *in vitro* modelom alebo gnotobiotickým zvieratám je bežné mikrobiálne osídlenie čreva pokusných zvierat a prítomnosť štandardne vyvinutého imunitného systému, ktorého jednotlivé zložky sa vyvíjajú v priebehu ontogenézy v kontakte s antigénmi z prostredia. Štandardný imunitný systém u zvierat je nevyhnutný na sledovanie jeho zmien vyvolaných aplikáciou fekálneho transplantátu.

2. Redukcia počtu zvierat

Počet zvierat v postupe bol zvolený tak, aby sme dosiahli validne a reprodukovateľné výsledky, ktoré je možné vyhodnotiť vhodnými štatistickými metódami. V DSS modeli ulceróznej kolitídy je nutné počítať s určitou mierou variability zápalových zmien v stene čreva, najmä v dôsledku *ad libitum* príjmu DSS v pitnej vode, preto je potrebné použiť uvedené počty zvierat. Ďalšie znižovanie počtu zvierat by ohrozilo dosiahnutie hodnoverných výsledkov projektu.

3. Zjemnenie

V priebehu pokusu bude utrpenie zvierat minimalizované na najnižšiu možnú mieru. Rozvoj kolitídy môže so sebou prinášať bolestivé stavy, ktoré zjemníme uľahčením prístupu k potrave a vode (umiestnením na podlahe kletky) a denným sledovaním jednotlivých ukazovateľov welfare zvierat v rámci hodnotenia human end point. Zdravotný stav a prejavy bolesti budú denne monitorované a zaznamenávané zaškolenými a skúsenými pracovníkmi. Po dosiahnutí human end point (vopred stanoveného klinického skóre) budú zvieratá vyradené z experimentu a humánne usmrtené. Podávanie liečiv na zníženie bolesti zvieratám s aplikovaným DSS nie je možné z dôvodu ovplyvnenia sledovaných parametrov, čím by mohlo dôjsť k zmareniu naplnenia cieľov projektu.

Sledovaný znak	Klinické hodnotenie	Skóre
Celkový vzhľad	normálny stav srsti, bežné postavenie tela, otvorené očné štrbiny	0
	čiastočne zježená sršť, mierne zhrbené postavenie, čiastočné zúženie očných štrbín	1
	zježená sršť, zhrbené postavenie tela, očné štrbiny napoly zatvorené	2
Príjem potravy	normálny (15-25 g /deň)	0

	mierne znížený (10-15 g/deň)	1
	stredne znížený (5-10 g/deň)	2
	výrazne znížený (< 5 g/deň)	3
Príjem vody (roztoku DSS)	normálny (30-40 ml/deň) *	0
	mierne znížený (< 30 ml/deň)	1
	stredne znížený (< 20 ml/deň)	2
	výrazne znížený (< 10 ml/deň)	3
Strata telesnej hmotnosti	žiadna / prírastok	0
	1-5 %	1
	5-10 %	2
	10-20 %	3
	< 20 %	4
Konzistencia stolice	normálna	0
	formovaná mäkká	1
	neformovaná pastovitá	2
	riedka vodnatá	3
Krvácanie z rekta	bez stôp krvi	0
	stopy krvi v stolici +	1
	krv v stolici ++	2
	masívne krvácanie	3
Lokomócia, správanie	normálna, bežné exploračné správanie, čistenie srsti	0
	mierne znížená, mierne oslabené exploračné správanie, obmedzené čistenie	1
	výrazne znížená, výrazne oslabené exploračné správanie, apatia, chýbanie čistenia, ťažkosti s dosiahnutím na potravu a vodu	2

* Pozn: priemerný denný príjem roztoku DSS je vyšší ako príjem vody

Výsledné skóre:

1-7 bodov – mierne znížené welfare

8-12 bodov – stredne znížené welfare

13-20 bodov – výrazné zníženie welfare

Human endpoint:

- pri dosiahnutí 10 bodov, najmä pri dosiahnutí maximálneho skóre hodnotenia klinických príznakov, bude zviera humánne usmrtené dekapitáciou v celkovej anestéze (izoflurán)

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

921-3/2020-220

Názov projektu:**Vplyv dávky vakcíny na hladiny indukovaných protilátok u imunizovaných myší****Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** imunizácia, dávka imunogénu, Alzheimerova choroba, účinnosť vakcíny**Účel projektu:** Základný výskum**Podrobný účel postupu:**

Projekt je zameraný na vývoj testu, ktorý bude monitorovať integritu (konzistentnosť, stabilitu, kvalitu) a účinnosť (imunogenicitu) peptidovej vakcíny určenej na klinické testovanie. Peptidová vakcína pozostáva z krátkeho syntetického peptidu a nosiča. Podľa nariadení regulačných orgánov EU (EU: Directive 75/318/EEC as amended, jul 1996; ICH: QUALITY OF BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS: STABILITY TESTING OF BIOTECHNOLOGICAL/BIOLOGICAL PRODUCTS (Q5C)), potency assay monitorujúca kompaktnosť vakcíny musí byť schopná odrážať aj minimálne poškodenie vakcíny, tj. zníženú účinnosť (imunogenicitu). Z tohto dôvodu budeme na jednej strane testovať tri riedenia vakcíny (4x, 10x, 40x), ktoré budú simulovať rôzny stupeň možnej degradácie vakcíny. Na druhej strane budeme analyzovať vplyv cieľného „arteficiálneho“ poškodenia vakcíny (napr. tepelne opracovaná vakcína, mechanicky narušená vakcína) na vývoj hladín protilátok. Takto opracované experimentálne vakcíny budeme porovnávať s kontrolnou intaktnou vakcínou (interný štandard). Ako interný štandard nám bude slúžiť vakcína stabilizovaná 50% glycerolom pri teplote -80°C.

Test bude v prvom kroku spočívať v *in vivo* experimente, tj. na imunizácii myší jednak vakcínami rôznej sily (rôznymi riedeniami vakcíny) a jednak cielene poškodenými vakcínami. Druhá časť, *in vitro* experiment, bude založená na analýze kinetiky tvorby protilátok. Po podaní jednej dávky vakcíny budeme experimentálnym zvieratám v dvojtyždňových intervaloch (tj. 2, 4 a 6 týždňov po podaní vakcíny) odoberať krv a sledovať hladiny indukovaných protilátok.

Projekt prebehne v čiastkových experimentoch: 25 experimentov, 10 zvierat v experimente. Celkom bude použitých 250 myší C57BL/6NCrl (samice) vo veku približne 6 týždňov. Po vstupnej karanténe a veterinárnom vyšetrení budú zvieratá priradené do príslušného experimentu.

- V deň 1 sa každej myške v experimente aplikuje testovaný imunogén subkutánnou injekciou v dávke 300 µl.
- V deň 14, 28, 42 sa odoberie krv z retroorbitálneho plexu v objeme asi 100-150 µl. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieratá neprekračuje stanovené normy.
- Po poslednom odbere budú zvieratá z experimentu vyradené a humánne usmrtené v súlade so zákonom: anestézia a dislokácia krčných stavcov.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Preštudovali sme všetky dostupné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili v danom experimente nahradiť zvieratá za iný biologický testovací systém. Keďže kvalitu vakcíny (jej biologickú aktivitu) najkomplexnejšie odráža jej schopnosť indukovať imunitnú odpoveď, na monitorovanie konzistentnosti a efektívnosti vakcíny je nevyhnutné použiť imunitný systém zvierat. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Druhy a počty použitých zvierat v pokuse:

Celkovo bude použitých 250 myší C57BL/6NCrl (samice) vo veku približne 6 týždňov.

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:

Zvieratám bude jednorazovo subkutánne aplikovaný imunogén, a následne 3x v 2-týždňových intervaloch odoberá krv v miernej sedácii z retroorbitálneho plexu. Po poslednom odbere budú zvieratá humanne usmrtené v celkovej anestézii dislokáciou krčných stavcov.

Zvieratá po subkutánnej injekcii, a tiež pri odbere krvi sú monitorované a v prípade neadekvátnej reakcie ako nar. výrazná triaška, apatia a pod. sa upovedomí veterinárny lekár a vedúci experimentu a po posúdení zdravotného stavu sa rozhodne o human end point:

Human end point:

	Prejav	Skóre			
1	Akýkoľvek stav vedúci k dlhotrvajúcej alebo nezvratnej neschopnosti prijímať potravu alebo vodu (dlhodobá nehybnosť, letargia...)	0	1	2	3
2	Stavy, ktoré poukazujú na silnú bolesť, strach alebo utrpenie (autoindukovaná trauma, hrbenie, vokalizácia, abnormálne pohyby, otvorené rany,...)	0	1	2	3
3	Rýchla alebo pretrvávajúca strata hmotnosti (>15% očakávanej hmotnosti)	0	1	2	3
4	Zovšeobecnené zníženie starostlivosti a abnormálny vzhľad počas dlhého časového obdobia (naježená srst', rozsiahla alopecia,...)	0	1	2	3
5	Ťažké alebo pretrvávajúce ťažkosti s dýchaním	0	1	2	3

Hodnotenie:

0 - bez príznakov

1 - mierny príznak

2- stredne silný príznak / konzultácia s veterinárnym lekárom

3- silný príznak -eutanázia

Každý znak sa zhodnotí na základe bodovania 0-3, pričom 0-bez príznakov, 3- silný príznak.

Výsledné skóre je súčtom jednotlivých pozorovaných príznakov.

Každé zviera, ktoré bude prejavovať stredne silný príznak bude presunuté do kletky s neobmedzeným prístupom ku krmivu a tekutinám, bude neustále monitorované a jeho stav bude konzultovaný veterinárnym lekárom. Každé zviera prejavujúce silný príznak v ktoromkoľvek prejave, prípadne pri súčte bodov viac ako 8, bude vyradené z experimentu a humanne usmrtené.

Manipulácia so zvieratami:

Tetovanie chvosta – stredná

Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia (jedna dávka)-slabá

Stav zvierat po aplikácii – slabá

Odbor krvi (3x v dvojtýždňových intervaloch/retroorbitálny plexus)-stredná

Stav zvierat počas obdobia prežívania – slabá až stredná

Usmrtenie v anestézii dislokáciou krčných stavcov - slabá

Zohľadnenie 3R**Zjemnenie:**

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné predpisy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humanne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Niekoľko nezávislých štúdií preukázalo, že stres významne modifikuje imunitnú odpoveď, čo je v prípade nášho experimentu nežiaduce. Starostlivosť zabezpečuje jedna osoba, na ktorú si zvieratá zvykli. Zvieratá sú chované v počte 5 zvierat na chovnú nádobu, aby sme zabezpečili sociálne interakcie medzi zvieratami. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám. Odbor krvi sa vykonáva v čiastkovej anestézii, aby sme utlmili bolesť spôsobenú odberom krvi.

Pri spozorovaní nežiadúcich účinkov (triaška, apatia, ...), zviera oddelíme a kletku umiestnime na výhrevnú podložku až do zotavenia. V prípade vytvorenia rán v mieste vpichu ranu ošetríme prípravkom Betadine a v nasledujúcich dňoch pozorujeme. V prípade výskytu neočakávaných

mokvajúcich rán, miesto vpichu ošetríme dermálnou masťou Kalcium Panthotenicum a izolujeme, aby sme zabránili ďalšiemu poraneniu zvieraťa ostatnými zvieratami. Pravidelne je kontrolovaný zdravotný stav zvierat a hodnotené bodové skóre podľa tabuľky human end point.

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov.

Nahradenie:

Súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje sledovať integritu (konzistentnosť, stabilitu, kvalitu) a účinnosť (imunogenicitu) vakcíny v in vitro podmienkach. Po imunizácii sa sleduje celková hladina vakcínou indukovaných protilátok. Z legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať na humánnych pacientoch.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

Pre hľadanie alternatívnej metódy sme použili nasledovné registre medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód (ECVAM, NICEATM-ICCVAM, NC3Rs, AltTox), kde sme nenašli žiadnu alternatívnu metódu, ktorú by sme mohli použiť vo svojom projekte, aby sme nemuseli vykonávať experimenty na zvieratách.

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené nadmernému utrpeniu. Zo skúsenosti z našich predchádzajúcich projektov neočakávame nepriaznivé účinky na zvieratá. U niektorých zvierat však môže v krátkom čase po vpichu objaviť mierna apatia v dôsledku stresu z aplikácie subkutánnej injekcie, ktorá odznie v nasledujúcich hodinách. Subkutánna aplikácia trvá niekoľko sekúnd. Odber krvi trvá len pár sekúnd a vykonáva sa na sedovaných zvieratách. Zvieratá dostanú jednu nízku dávku netoxickej vakcíny, ktorá indukuje len miernu imunitnú odpoveď a nevedie k poškodeniu organizmu. Keďže príčina Alzheimerovej choroby zostáva neznáma a stále neexistuje účinná terapia, prínos projektu spočíva vo vývoji testu (potency assay) na monitorovanie komplexnosti, stability a účinnosti (biologickej aktivity) vakcíny pre pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou.

Začiatok pokusu je plánovaný na 20.4.2020 a bude sa realizovať do 31.12.2022.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

Projekt nevyžaduje spätné posúdenie (podľa Nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.).

Netechnické zhrnutie projektu podľa §35 ods. 2 písm. b) a § 40 nariadenia vlády SR č. 377/2012

Názov projektu:

Vplyv zastavenia prietoku krvi mozgom na bielkoviny mitochondriálnej dynamiky. Štúdium farmakologických a nefarmakologických neuroprotektívnych postupov.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1360-3/2020-220

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): Centrálny nervový systém, mitochondriálna dynamika, zvierací model

Účel projektu*: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

(napr. nie sú ešte výsledky z takéhoto výskumu, nutnosť jeho vykonania z hľadiska vedy , z klinického hľadiska)

Hlavným cieľom projektu je zistiť vplyv prerušenia prietoku krvi mozgom na zmeny produkcie bielkovín mitochondriálnej dynamiky v určitých oblastiach mozgu, ich účasti v procese odumierania nervových buniek, ako aj nájdenie vhodných protektívnych mechanizmov voči patologickým zmenám, ktoré sú spôsobené prerušením prietoku krvi mozgom.

Prínos z vykonaného projektu (napr. aký je prínos pre vedu, ľudstvo, zvieratá)

Predpokladáme, že naše experimenty s farmakologickým a nefarmakologickým neuroprotektívnym postupom dajú jednoznačnú odpoveď na to, či bielkoviny mitochondriálnej dynamiky zohrávajú významnú úlohu v mechanizmoch odumierania nervových buniek po prerušení prietoku krvi mozgom.

Naše výsledky by tiež mohli prispieť k vývoju humánnych neuroprotektívnych látok na báze mitochondriálnej dynamiky s prípadným klinickým využitím ochrany poškodenia mozgu spojeného so zlyhaním krvného obehu a následnom úspešnom obnovení prietoku okysličenej krvi mozgom.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan laboratórny, kmeň - Wistar, 150ks/4roky

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:

Prvá časť experimentov zahŕňa aplikáciu hydrazónu M1 do žily, ktorý bude zvieratám podávaný jednorázovo počas krátkodobej anestézie, a to 3h alebo 24 h po navodení prerušenia prietoku krvi do mozgu. Dĺžka jeho pôsobenia v zvierati bude max do cca 72h. Po aplikácii hydrazónu M1 sa môžu u niektorých zvierat objaviť na koži malé chrastičky, ktoré sa po niekoľkých dňoch vysušia a odpadnú. Nakoľko sa však nejedná o nebezpečnú látku a neobsahuje nebezpečné zložky, ani látky s expozičnými limitmi na pracovisku Európskeho spoločenstva, ani látky vzbudzujúce veľké obavy nad ich príslušnými uvádzanými limitmi, nepredpokladáme, žeby hydrazón M1 spôsobil zvieratám po aplikácii väčšiu ujmu. Rana bude štandardne ošetrená a zvieratá budú udržiavané vo zverinci s najväčšou starostlivosťou po celú dobu trvania experimentu. Prípadný úhyn experimentálnych zvierat v súvislosti s použitými dávkami hydrazónu M1 je preto nepravdepodobný, avšak nemožno ho vylúčiť u jedincov so zvýšenou citlivosťou zapríčineného napr. individuálne zhoršeným zdravotným stavom. Zvieratám zaradeným do skupín vystavených hydrazónu M1 bude venovaná zvýšená miera starostlivosti a v prípade neočakávaného správania súvisiaceho so zvýšením human end point skóre bude ihneď zvažovaný charakter ďalšieho priebehu experimentu.

Druhá časť experimentov zahŕňa **Experimentálny model prerušenia prietoku krvi mozgom cez krčné a chrbticové cievy** (15 min prerušenie prietoku krvi do mozgu). Zvieratá sú pri jeho vykonávaní v anestézii. Rany po chirurgických zákrokoch budú štandardne ošetrené a zvieratá budú udržiavané vo zverinci s najväčšou starostlivosťou po jednotlivé doby obnovenia prietoku krvi do mozgu. Po operačnom zákroku je nevyhnutné monitorovať zvieratá a priebežne vyhodnocovať odchýlky od normálu, sledovať ich vzhľad, príjem potravy a vody, zhodnotiť prirodzené správanie a posúdiť klinické príznaky. Na uľahčenie príjmu vody sa použijú fľaše s predĺženou napájacou násoskou. Zvieratá môžu prejavovať známky neurologického poškodenia – malátnosť, napoly privreté viečko, spomalený pohyb, znížený príjem potravy, ktoré sa väčšinou po 2-3 dňoch upravujú. Predpokladáme aj kognitívne zmeny (poškodenie krátkodobej a dlhodobej pamäte). Vyvolaním tolerance voči prerušeniu krvi do mozgu (4 min prerušenie prietoku krvi do mozgu, dva dni pred škodlivým prerušením v trvaní 15 min) by sme chceli navodiť vnútorné vybudované neuroregeneratívne procesy na zmiernenie dopadu 15 min prerušenia prietoku krvi do mozgu na organizmus. V rámci postupov vyžadujúcich použitie anestézy existuje určité riziko úhynu experimentálnych zvierat. Riziko však bude minimalizované na najnižšiu možnú úroveň skúsenosťami a odbornou spôsobilosťou personálu vykonávajúceho tieto postupy na zvieratách. Ak sa spozoruje ktorýkoľvek z uvedených ukazovateľov, zvieratá sa humánne usmrťia: ak sa napr. zvieratá nepohybujú, majú zatvorené oči, pískajú pri dýchaní, majú silné trasenie s početnými záškľbmi, vôbec neprijímajú vodu a potravu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Podľa prílohy č.4 k nariadeniu vlády Slovenskej republiky č.377/2012 Z.z. klasifikujeme krutosť jednotlivých postupov nasledovne:

Postup	Vplyv na zviera	krutosť
Váženie	Krátkodobý mierny stres	slabá
Značenie zvierat	Krátkodobý mierny stres	slabá
Jednorázové podávanie hydrazónu M1 (do žily)	Podávanie v anestézii, mierny stres	stredná
Vystavenie účinkom pôsobenia hydrazónu M1 po jeho jednorázovom podaní	Mierny stres	stredná
15 min prerušenie prietoku krvi do mozgu	Vykonávané v anestézii, mierny stres	stredná
4 min prerušenie prietoku krvi do mozgu	Vykonávané v anestézii, mierny stres	stredná
Obnovenie prietoku krvi do mozgu v dĺžke trvania 1,3, 24 a 72 h	Mierny stres	slabá
Samostatné umiestnenie zvierat v kliebkach	Mierny stres	stredná
celková klasifikácia		stredná

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

(Zdôvodnenie použitia zvierat v projekte, zdôvodnenie prečo sa nemôže použiť alternatívna metóda bez použitia zvierat)

Objasnenie, prečo niektoré typy buniek hynú v relatívne krátkom časovom intervale po prerušení prietoku krvi do mozgu, resp. zistenie mechanizmov obranných procesov bunky voči tomuto deju sa nemôže vykonávať v experimentálnych podmienkach bez využitia celostného prístupu, t.j. na experimentálnych zvieratách. Dôvodom je vysoká komplexnosť procesov, kooperácia rôznych typov buniek, ako aj celková odpoveď organizmu na poškodzujúci podnet. Postupy sú použiteľné pri modelovaní výkonných orgánov cieľových bunkových signálov, ktoré sa javia byť rovnaké ako u zvierat, tak aj v humánnej medicíne.

2. Redukcia počtu zvierat:

(Zdôvodnenie použitia určeného počtu zvierat, akým spôsobom sa použije redukcia, objasnenie toho, že sa použil minimálny možný počet zvierat)

Projekt je naplánovaný tak, aby bol použitý čo najmenší počet zvierat (experimentálne skupiny zvierat), aby sme zabezpečili validity a reprodukovateľnosť výsledkov. Menší počet zvierat by mohol ovplyvniť objektívne zhodnotenie výsledkov celého projektu. Predpokladá sa cca 90 % úspešnosť kvôli experimentálnej náročnosti používaných metodických prístupov. Počet zvierat ktoré uhynú počas operačného či po operačnom zákroku je ťažko odhadnuteľný. Predpokladá sa cca 10 % úhyn zvierat počas operačných zákrokov a počas obnovenia prietoku krvi do mozgu. V snahe o dosiahnutie čo najnižšej miery úmrtnosti počas experimentov, resp. prežívania jedincov sa na pracovisku kladie dôraz na vysokú úroveň zručnosti pri vykonávaní experimentálnych metód s následnou maximálnou mierou poskytnutia pooperačnej starostlivosti a zjemňovania.

3. Zjemnenie:

(Vysvetliť výber použitých druhov zvierat, zdôvodnenie použitia zvieraťa, objasnenie spôsobu ako sa minimalizuje stres, utrpenie a bolesť zvierat v priebehu vykonávania postupu tak, aby sa dosiahli vedecké ciele projektu)

Starostlivosti o zvieratá ako aj manipulácii s nimi sa bude venovať veľká pozornosť. Bude sa brať ohľad na nároky na ustajnenie zvierat, na zvykanie si zvieraťa na človeka a na šetrné zachádzanie. Pokusné zvieratá budú chované v podmienkach, ktoré u neho nevyvolávajú stres - zohľadňuje sa veľkosť klieťky, počet zvierat, svetelný a krmný režim. Pri operačnom zákroku sa minimalizuje invazivnosť, zaistuje sa vyhovujúca operačná analgézia a dostatočná pooperačná starostlivosť. Operačné zákroky (**model prerušenia prietoku krvi mozgom v dĺžke trvania 15 min, vyvolanie tolerancie voči prerušeniu krvi do mozgu 4 min prerušením prietoku krvi do mozgu a aplikácia hydrazónu M1**) na zvieratách budú vykonávané v celkovej anestézii a po skončení anestézie pri prežívaní, obdobie obnovenie prietoku krvi do mozgu, bude zvieratám venovaná zvýšená starostlivosť. Prežívanie v tejto fáze uľahčuje umiestnenie zvieraťa na vyhrievanú podložku, ako aj podanie fyziologického roztoku. V každom prípade sú ihneď po ukončení prerušenia prietoku krvi mozgom podávané analgetiká (Carprofen alebo Meloxicam) na zmiernenie bolesti, na zabránenie nežiaducich patologických prejavov a na celkové zjemnenie postupu. V pooperačnom období budú jedince denne sledované a analgetikum (Carprofen alebo Meloxicam) im bude podané opätovne pri akýchkoľvek ďalších nezvyklých patologických pooperačných prejavoch, ako je napr. bolestivosť prejavujúca sa stabilnou polohou zvieraťa so zježenou srstou, vydávanie neprirodzených zvukov a pod. Pri dosiahnutí bodového skóre 3 v ktoromkoľvek zo sledovaných parametrov hlavných kritérií (vid'. Tabuľka 1), bude zviera humánne usmrtené v celkovej hlbkej anestézii tak aby bolo minimalizované jeho „utrpenie“, pri skóre nad 1 až 2 podanie analgetika prípadne roztoku glukózy.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Tabuľka 1: Hlavné kritéria pre HUMAN ENDPOINT (HUMÁNNE UKONČENIE POSTUPU)

HLAVNÉ KRITÉRIA PRE HUMAN ENDPOINT			
Fyziologický stav	váha		Záznam
	normálna	úbytok pod 20%	úbytok nad 20%
	0	1 až 2	3
		fyz.+glu	ukončenie postupu
	trasenie		
	nemá	slabé s občasnými záškľbmi	silné s početnými záškľbmi
	0	2	3
		analgetikum	ukončenie postupu
	sekréty		
	nemá	prítomný mierny priehľadný	prítomný silný priehľadný alebo krvavý
	0	1 až 2	3
		analgetikum	ukončenie postupu
	svalový tonus		
	normálny	znížený	slabý
	0	1 až 2	3
		analgetikum	ukončenie postupu
POMOCNÉ KRITÉRIA PRE HUMAN ENDPOINT			
Celkový vzhľad jedinca a prostredia	postoj		
	normálny	schúlený	abnormálne prejavy
	0	2	3
		analgetikum	analgetikum+kontrola hlavných kritérií
	stav srsti		
	normálny	neučesaná	špinavá/sekréty
	0	1 až 2	3
			kontrola hlavných kritérií
	vzhľad očí		
	normálny	polozatvorené	zatvorené
	0	1 až 2	3
		analgetikum	analgetikum+kontrola hlavných kritérií
	pohybová aktivita		
	normálna	znížená	žiadna
	0	1 až 2	3
		analgetikum	analgetikum+kontrola hlavných kritérií
	zvukové prejavy		
	nemá	chraptot	pískanie
	0	1	3
		analgetikum	analgetikum+kontrola hlavných kritérií
	čistota podstielky		
	normálna	miernie znečistená	výkaly a sekréty
	0	1	2 až 3
			kontrola hlavných kritérií

V Martine, 14.05.2020