

Príloha č. 2

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

NÁZOV PROJEKTU:

NOVÁ GENERÁCIA ANTIDEPRESÍV – DLHODOBÉ ÚČINKY NA POTOMSTVO

ČÍSLO KONANIA ROZHODNUTIA O SCHVÁLENÍ PROJEKTU: 3334-5/2020-220

KLÚČOVÉ SLOVÁ: materská depresia, antidepresíva, vývin mozgu, správanie, elektrofyziológia, hipokampus, serotonín, dopamín, noradrenalín, excitabilita, dlhodobá potenciácia, potkan

ÚČEL PROJEKTU: Základný výskum

CIEĽ PROJEKTU

Hlavným cieľom riešenia projektu je experimentálne štúdium účinkov materskej depresie a podávania antidepresívneho lieku mirtazapínu (MIR) na zdravotný stav matiek a vývin potomstva potkanov. V našom projekte sa sústreďíme na účinky depresie na zdravotný stav matiek počas gravidity a laktácie, ako aj na vývin potomstva potkanov, a na možnosti prevencie negatívnych účinkov depresie vhodnou liečbou matky počas gravidity. Zdravotný stav potomstva budeme charakterizovať na viacerých systémových úrovniach, od výskumu ich správania, cez sledovanie zmien neuronálnej excitability na úrovni neurónových sietí a jednotlivých neurónov, biochemické zmeny metabolizmu neurónov, až po subcelulárnu reguláciu homeostázy vápnika v neurónoch. Sústreďíme sa na skúmanie účinkov antidepresíva MIR na zdravie potomstva a na vysvetlenie bunkových mechanizmov zodpovedných za tieto účinky. Použijeme zaužívaný model materskej depresie založený na trojtýždňovom pôsobení nepredvídateľného mierneho stresu v predgestačnom období. V popôrobnom období budeme sledovať materské správanie zvierat liečených a neliečených MIR. Ťažiskom projektu bude analýza účinkov liečby MIR počas tehotenstva na potomstvo liečených a neliečených matiek. Okrem toho budeme analyzovať prípadné pohlavné rozdiely v účinkoch na samcov a samice.

Výsledky projektu prispievajú k dôkladnejšej charakterizácii MIR z hľadiska jeho požitia vo farmakoterapii materskej depresie a k pochopeniu celulárnach a subcelulárnych mechanizmov jeho účinkov.

PRÍNOS PROJEKTU

Hlavným prínosom riešenia projektu bude získanie nových poznatkov o pôsobení samotnej materskej depresie a/alebo v kombinácii s MIR na zdravotný stav a správanie matiek a postnatálny vývin ich potomstva na rôznych systémových úrovniach. Tieto poznatky sú nevyhnutné napr. k prehodnoteniu používania MIR počas tehotenstva a dojčenia v zmysle obmedzenia jeho používania alebo zníženia dávok pri liečbe. Keďže je nedostatočné množstvo experimentálnych a klinických prác hodnotiacich bezpečnosť používania antidepresív počas tehotenstva a laktácie, naše výsledky môžu poskytnúť podporné argumenty na ich použitie v liečbe materskej depresie. Pozitívne ako aj negatívne výsledky prispievajú do

debaty, či liečiť alebo neliečiť materskú depresiu, a ak áno, akým spôsobom a použitím akých liekov.

DRUH POUŽITÝCH ZVIERAT A ICH POČTY

V jednotlivých experimentálnych štúdiách použijeme laboratórne potkany druhu *Rattus norvegicus* var. *alba*, kmeňa Sprague Dawley

V rámci projektu použijeme 120 samíc a 40 samcov. Budeme ich páriť v pomere 1 samec : 3 samice. Predpokladáme, že v každej skupine sa pripári najviac 12 samíc, ktoré budú sperm pozitívne a gravidné. Spolu použijeme na celý projekt 120 dospelých samíc a 40 samcov. Celkovo rátame s 96 gravidnými matkami, ktoré budú mať spolu asi 1536 mlád'at, v ďalších postupoch použije však len 768 mlád'at. Samce, nepripárené samice a nadbytočné mlád'atá humánne utratíme podaním nadmerného množstva anestetika.

Skupiny zvierat pre každú jednotlivú etapu postupov

Nestresované + vehikulum	12 matiek (celkovo 15 samíc)
Nestresované + MIR	12 matiek (celkovo 15 samíc)
Stresované + vehikulum	12 matiek (celkovo 15 samíc)
Stresované + MIR	12 matiek (celkovo 15 samíc)

Každý matke necháme vo vrhu od 4 dňa PP 4 samce a 4 samice:

Nestresované + vehikulum	96 mlád'at (celkovo asi 192 mlád'at)
Nestresované + MIR	96 mlád'at (celkovo asi 192 mlád'at)
Stresované + vehikulum	96 mlád'at (celkovo asi 192 mlád'at)
Stresované + MIR	96 mlád'at (celkovo asi 192 mlád'at)

Za celý projekt to bude:

Nestresované + vehikulum	24 matiek (celkovo 30 samíc)
Nestresované + MIR	24 matiek (celkovo 30 samíc)
Stresované + vehikulum	24 matiek (celkovo 30 samíc)
Stresované + MIR	24 matiek (celkovo 30 samíc)
SPOLU	96 matiek (celkovo 120 samíc)

Nestresované + vehikulum	192 mlád'at (celkovo asi 384 mlád'at)
Nestresované + MIR	192 mlád'at (celkovo asi 384 mlád'at)
Stresované + vehikulum	192 mlád'at (celkovo asi 384 mlád'at)
Stresované + MIR	192 mlád'at (celkovo asi 384 mlád'at)
SPOLU	768 mlád'at (celkovo asi 1536 mlád'at)

PREDPOKLADANÝ NEPRIAZNIVÝ VPLYV/UJMA NA POUŽITÉ ZVIERATÁ V RÁMCI VYKONÁVANIA PROJEKTU

Zvieratá až do začatia experimentálneho postupu nebudú vystavené žiadnym nepriaznivým vplyvom.

Chronický nepredvídateľný mierny stres, ktorému vystavíme samice potkanov v trvaní 3 týždňov nepredstavuje pre zvieratá závažný nepriaznivý vplyv a nespôsobuje ujmu na fyzickom zdraví. Zvieratám spôsobuje diskomfort, lebo sú zvyknuté na štandardné podmienky, pravidelný príjem stravy a obohatené prostredie. Na zmiernenie diskomfortu vždy po sérii 6 dní vystavenia stresorom, budú mať zvieratá 1 deň bez stresového podnetu za účelom zotavenia. Celkovo hodnotíme úroveň krutosti ako slabú/strednú.

Testované antidepresívum MIR budeme podávať rozpustené vo vode a injikované do keksíkov. MIR je antidepresívum, ktoré vývoj, predklinický a klinický výskum nepreukázali závažné veľajšie nepriaznivé účinky. V koncentrácii, ktorú budeme aplikovať, je MR bezpečná a netoxická látka.

Behaviorálne testy sú neinvazívne, vychádzajú z prirodzených spontánnych foriem správania zvierat a za žiadnych okolností nespôsobujú zvieratú bolesť ani utrpenie. Celkovo hodnotíme úroveň krutosti s výnimkou núteného plávania ako slabú.

Pred *in vivo* elektrofyziologicalkým meraním budú zvieratá podrobené celkovej anestézii. Po ukončení tohto merania budú humánne usmrtené podaním nadmerného množstva anestetika.

Klasifikácia krutosti postupu pri chronickom nepredvídateľnom miernom strese:

Stresový podnet	Klasifikácia krutosti postupu
Naklonená vanica	Slabá
Odobratie potravy	Slabá
Mokrú podstielku	Slabá
Nadpočet zvierat vo vanici	Slabá
Stroboskopický efekt	Slabá
Odobratie vody	Stredná

Predpokladaná úroveň krutosti chronického nepredvídateľného mierneho stresu: STREDNÁ.

Klasifikácia krutosti pri ďalších použitých postupoch a testoch:

Použitý postup/test	Klasifikácia krutosti postupu
Aplikácia látky MIR	Slabá
Váženie zvierat	Slabá
Test preferencie sacharózy	Slabá
Materské správanie	Slabá
Hravé správanie	Slabá
Test otvoreného poľa	Slabá
Test núteného plávania	Stredná
Elektrofyziológia <i>in vivo</i>	Stredná

Predpokladaná celková úroveň krutosti: STREDNÁ

O utratení zvierat mimo plánovaných postupov bude rozhodnuté na základe tzv. „human endpoint score“:

Parameter	PREJAV	SKÓRE
Vzhľad	Normálny	0
	Absencia čistenia srsti	1
	Piloerekcia, chúlenie sa	2
Príjem potravy a vody	Normálny	0
	Prijíma: telesná hmotnosť znížená o 10-15%	1
	Neprijíma potravu, ani vodu	2
Prirodzené správanie	Normálne	0
	Menej pohyblivé a pozorné, izolované	1
	Vokalizácia, sebamrzačenie, nepokojné, alebo nehybné	2
Provokované správanie	Normálne	0
	Zmeny v očakávanom správaní	1
	Reaguje prudko, alebo veľmi slabo a prekomatózne	2
SPOLU		0-8

Hodnotenie skóre:

0-2	norma
3-5	vyžiadanie názoru veterinárneho lekára
6 a viac	eutanázia

SÚLAD S POŽIADAVKAMI „3R“

„Replacement“ – zásada nahradenia

Postupy nie je možné nahradiť alternatívnym modelom. Ide komplexný model depresívnej poruchy (v kombinácii s antidepresívom MIR) počas tehotenstva a laktácie a jej účinkov na materský organizmus a vývin plodu a novorodenca. Jednotlivé fyziologické systémové úrovne sú navzájom poprepájané, navzájom sa ovplyvňujú, regulujú a modulujú funkcie iných systémov. Vývin mozgu s dôrazom na funkčné zmeny a neurobehaviorálne poruchy je možné študovať len na komplexnom živom organizme s vyvinutými schopnosťami komunikácie s prostredím a ostatnými jedincami v rámci druhu (adaptácie, učenie, sociálne správanie, správanie podobné depresii a úzkosti, excitabilita nervového systému). Rovnako nie je možné výskum uskutočniť na fylogeneticky nižšom druhu živočíchov.

„Reduktion“ – zásada obmedzenia počtu

Pri plánovaní počtu zvierat na skupiny sme brali do úvahy skutočnosť, že ide o projekt zameraný hlavne na výskum správania. Hodnotenie správania je veľmi náročné a jednotlivé formy správania vykazujú významnú interindividuálnu variabilitu. Počet zvierat v skupinách zodpovedá počtom, na základe ktorých môžu byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť a validita výsledkov. Reprodukovateľné výsledky je možné získať len pri spracovaní dostatočného počtu zvierat. Znižovanie počtu zvierat v postupe predstavuje riziko falošne negatívnych alebo falošne pozitívnych výsledkov, ktoré by potenciálne viedli k neopodstatneným postupom na ďalších zvieratách. Počet mláďat vo všetkých vrhoch budeme redukovať (tzv. „culling“) na 4 samce a 4 samice, aby sme získali, čo najhomogénnejšie skupiny mláďat na behaviorálne testy. Po ukončení testov budú zvieratá humánne utratené a ich mozgy použité na *post mortem* štúdie, takže nebude nutné za týmto účelom navyšovať počet zvierat.

„Refinement“ – zásada zjemnenia

So zvieratami budeme šetrne zaobchádzať po celú dobu projektu a budú pod každodenným dohľadom skúsených pracovníkov. Každé zviera bude dopredu určené na absolvovanie jedného behaviorálneho testu, každé zviera absolvuje len jeden konkrétny test, čo prispeje k ich komfortu. Zvieratá budú monitorované počas celej dĺžky experimentu na základne „humane endpoint“ skóre bude rozhodnuté a pokračovanie alebo zastavenie experimentu. S cieľom minimalizovať stres u zvierat, budú pri experimente prítomné len osoby nevyhnutné na vykonanie samotného pokusu. Zdravotný stav zvierat bude denne monitorovaný. Po ukončení behaviorálnych testov a humánnom usmrtení zvierat sa už ďalej bude pracovať len s mozgovými tkanivami. V prípade elektrofyziologickej štúdie *in vivo* bude postup vykonávaný v celkovej anestézii s použitím inzulínových striekačiek s najtenšími ihlami, čo minimalizuje utrpenie zvierat pri aplikácii roztokov intraperitoneálne. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami.

SPÄTNÉ POSÚDENIE: NIE

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu: Skúška na neškodnosť- nešpecifická neškodnosť

Abnormal toxicity, Ph. Eur. (2.6.9).

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4359/2020-220

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): myš, morča, neškodnosť, vakcína, imunosérum

Účel projektu: Regulačné metódy s rutinným používaním

Ciele projektu:

Cieľom je poznanie reakcie živého organizmu na podanie humánneho prípravku, možnou reakciou v mieste podania, ako aj systémového pôsobenia v súvislosti s ochranou zdravia ľudí z pohľadu bezpečnosti, neškodnosti a kvality liekov.

Prínos z predpokladaného projektu:

Vakcíny a imunoséra pre humánne použitie zásadne zasahujú do funkcie imunitného systému organizmu s cieľom ochrany pred daným ochorením. Je potrebné neustále zvyšovať bezpečnosť takýchto prípravkov a neupúšťať od ich testovania ale naopak posilniť overovanie ich neškodnosti *in vivo* na zvieracích modeloch. Navrhované postupy vychádzajú z regulovaného liekopisného modelu. Výsledky projektu výrazne prispievajú k bezpečnosti a ochrane zdravia ľudí.

Druhy použitých zvierat a ich počty: Morča domáce 2 ks na 1 šaržu testovaného prípravku, Myš laboratórna 5 ks na 1 šaržu testovaného prípravku. Spolu je plánované otestovať 50 ks šarží.

Myš laboratórna

50x5=250

Morča domáce

50x2=100

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

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Zaradenie podľa krutosti
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres	slabé
Krátka fixácia pri aplikácii	Krátkodobý mierny stres	slabé
Jednorázová i.p..aplikácia	Krátkodobé obmedzenie, bolesť slabá	slabé
Testovanie očkovacej látky	Zvýšená telesná teplota prípadne, možný nástup závažného ochorenia vedúceho úhynu	kruté
Celkové hodnotenie krutosti postupu		Kruté

Úroveň krutosti: kruté

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia: Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie:

Druh zvierat sa v súčasnosti nedá nahradiť, nakoľko je určený používanou metódou - Skúška na neškodnosť-nešpecifická neškodnosť / Abnormal toxicity, Ph. Eur. (2.6.9). Je to generický postup – regulovaná liekopisná metóda, EUROPEAN PHARMACOPOEIA, Ph. Eur. (2.6.9). Požiadavky európskeho liekopisu pre lieky /kvalitatívne a kvantitatívne/ uvedené vo všeobecných a špecifických monografiách sú právne záväzné pre výrobu a kontrolu liekov – generický postup. Použitie zvierat je pri tomto humánnom prípravku stále potrebné kvôli jeho širšej aplikácii v humánnej medicíne pri zachovaní zdravia obyvateľstva.

2. Redukcia počtu zvierat:

Ďalšie zníženie počtu zvierat by sa negatívne prejavilo na reprodukovateľnosti výsledkov a to aj v dôsledku možnej variabilite imunologických parametrov u morčiat a myší. Počet zvierat vybraných do postupu je považovaný za minimálny a nevyhnutný, vyhovujúci potrebám liekopisu.

3. Zjemnenie:

Zásada zjemnenia bude dodržiavaná v plnej miere odo dňa dodávky zvierat do zvieratníka. Počas karantény prejdú zvieratá procesom handlingu. Pri štandardnej dennej jemnej manipulácii si zvyknú na prítomnosť človeka a na bežné denné procedúry (čistenie, kŕmenie, napájanie, kontrola zdravotného stavu). Aplikácie látok budú vykonávané šetrne osobami, ktoré majú bohaté skúsenosti v tejto oblasti a boli patrične vyškolené. Zdravotný stav zvierat bude min. 2x denne monitorovaný, každá zmena indikujúca zhoršenie zdravotného stavu bude po konzultácii so zmluvným veterinárnym lekárom ihneď riešená na základe vypracovaného humane endpoint.

		Skóre	Deň 1	Deň 2	Deň 3	Deň 4	Deň 5	Deň 6	Deň 7
Hmotnosť	Normálna	0							
	< 5%	1							
	5%-10%	2							
	< 15%	3							
Vzhľad	Normálny	0							
	Mierne zanedbané	1							
	Hladká srst', výtok z nozdier alebo očí	2							
	Zježená srst', abnormálny postoj	3							
Správanie	Normálne	0							
	Mierne zmeny	1							
	Znížená pohyblivosť a izolovanie sa	2							
	Vokalizácia, samopoškodzovanie, nepokoj, nehybnosť	3							
	Celkové skóre								

Ak sa dosiahne skóre 3 v ktorejkoľvek kategórii alebo celkovo 6, zviera bude neodkladne usmrtené. Všetky zvieratá budú usmrtené podľa Zz, NV č. 377/2012

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu:

35 85 - 3 / 2020 - 220

Funkčná validácia inovatívnej antisense platformy pre chronickú myeloidnú leukémiu *in vivo*

Kľúčové slová:

chronická myeloidná leukémia, antisense terapia, myši

Účel projektu:

Základný biomedicínsky výskum

Cieľ projektu:

Predkladaný projekt je zasadený do kontextu základného výskumu chronickej myeloidnej leukémie (CML) s ambíciou klinického využitia nielen pre CML, ale aj pre ďalšie ochorenia so známou molekulárnou podstatou. Predkladaný projekt sa opiera o enormný potenciál inovatívnej platformy antisense molekuly, ktorej účinnosť a schopnosť pôsobiť výlučne v nádorových bunkách bola už potvrdená *in vitro*.

Cieľom experimentálnej práce v rámci navrhovaného projektu je overiť účinnosť predmetnej antisense platformy *in vivo* v zmysle zlepšenia klinických parametrov u myši s vyvolanou CML. Úspešné výsledky by mali viesť k zlepšeniu klinického obrazu a zefektívneniu liečby CML.

Prínos projektu:

Hlavným cieľom, a zároveň prínosom projektu je potvrdenie selektívneho terapeutického účinku inovatívnej antisense platformy v liečbe CML *in vivo*. Jedným z výstupov projektu bude takisto posúdenie aplikačného potenciálu tohto typu liečiv pre protileukeickú terapiu pre klinickú prax. Téma využitia a implementácie antisense terapeutík do širokej palety diagnóz je v dnešnej dobe intenzívne diskutovaná a možno ju nepochybne označiť za jednu z najrýchlejšie a najdynamickejšie sa rozvíjajúcu oblasť modernej medicíny, čo sa týka *de novo* liečiv a terapeutických postupov. Predmetným projektom získané jedinečné a originálne dáta prinesú vedeckej komunite kvalitatívne kľúčové poznatky o charaktere a možnostiach využitia antisense systémov, na ktoré sa už dnes nahliada ako na novú účinnú zbraň v liečbe nádorových aj nenádorových ochorení, navyše s potenciálom priameho personalizovania.

Očakávané vedecké dáta tak prinesú novú líniu previazaných poznatkov s priamym dopadom pre výskum nových liečebných modalít v oblasti CML a generalizovateľný pohľad na efektívnosť a funkčnosť vyvinutej antisense platformy pre širokú paletu geneticky podmienených ochorení.

Počet a druh použitých zvierat:

Myš laboratórna 8-10 týždňov, samce

- Kmeň C57BL/6 (navrhovaný počet 30 jedincov na pilotnú štúdiu projektu)
- Kmeň SCID hairless (navrhovaný počet 30 jedincov na pilotnú štúdiu projektu)
- Kmeň zvolený na základe výsledkov pilotnej štúdie C57BL/6 alebo SCID hairless (navrhovaný počet 180 jedincov na 48 mesiacov riešenia projektu)

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

Počas väzenia zvierat sa neočakáva nepriaznivý vplyv na zdravotný stav zvierat a iba krátkotrvajúca mierna nepohoda. Aplikácia do retroorbitálneho sínusu je pre zvieratá stresujúca, preto bude prebiehať v krátkodobej anestézii (izoflurán). Vzhľadom na intenzívny výskum v tejto oblasti je vyvolaný stav CML u myší pomerne dobre preskúmaný a vážne zhoršenie zdravotného stavu a prípadná úmrtnosť sa očakáva 6-8 týždňov po aplikácii leukemických buniek (Skorski *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91:4504-4508; Chen *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 2013, 105:405-423; Zhang *et al.*, *Cancer Cell* 2010, 17(5):427-442). Aby sme však nevylúčili možnosť, že sa tak z nejakého, v tomto momente neznámeho dôvodu, môže stať, predpokladáme, že prípadná úmrtnosť nepresiahne 5%. Keďže náš projekt ukončuje vyvolaný stav najneskôr na 32 deň po aplikácii týchto buniek, neočakávame vážne zhoršenie zdravotného stavu zvierat. K pozorovaným príznakom patrí nečistená sršť, paralýza zadných končatín a letargia, ktoré sú znakom vážneho ochorenia (Kamps a Baltimore, *Molecular and Cellular Biology* 1993, 13(1):351-357), ktoré my ale neplánujeme sledovať, čiže po prvých prejavoch ktoréhokoľvek z týchto príznakov by sme myšky humánne utratili. Zdravotný stav zvierat bude monitorovaný na dennej báze a u zvierat vykazujúcich znaky bolesti, prípadne iného stresu ako zhrbený postoj, naježená sršť, privreté oči, strata hmotnosti, atď. bude *ad hoc* zvážené ukončenie experimentálneho postupu. Za „humane end-point“ sa bude považovať skóre 4 vypočítané na základe publikácie Langford DJ. a kol., 2010: *Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse*, *NATURE METHODS*, VOL. 7 NO. 6 JUNE 2010; doi:10.1038/nmeth.1455 (Tabuľka v Prílohe 3.5), kedy bude postup okamžite ukončený humánnym spôsobom, tj. aplikovaním letálnej dávky tiopentalu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Stredná.

K utrpeniu zvierat pri injekčných aplikáciách nedochádza, keďže *i.v.* aplikáciu (s použitím inzulínových striekačiek s najtenšími ihlami) zvieratá podstúpia v krátkej narkóze. Intraperitoneálna aplikácia letálnej dávky tiopentalu bude podávaná identickými ihlami a striekačkami bez narkózy. Vzhľadom na opakovanú *i.v.* aplikáciu liečiva a na to, že sa nedá vylúčiť negatívny vplyv indukovanej CML na pohodlie zvierat, predpokladaná úroveň krutosti je stanovená ako stredná.

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie:

Napriek tomu, že je snaha minimalizovať experimenty na laboratónych zvieratách (3 R zásady), v prípade látok, ktorých pôsobenie by mohlo pomôcť v liečbe ochorení a mohli by sa dostať do klinickej praxe sú nevyhnutné štúdie na úrovni experimentálnych zvierat. Alternatívne metódy nedokážu zachytiť zložitú skúmanú problematiku, a preto sa nimi nedajú nahradiť navrhované postupy. Testovaním *in vitro* nie je možné sledovať komplexné interakcie prebiehajúce v organizme, napríklad reakciu imunitného systému a tkanivovú distribúciu látok, ani nie je možné vyhodnotiť celkovú terapeutickú účinnosť preparátov. Antisense platforma, ktorá sa plánuje v rámci predkladaného projektu testovať bola dlhodobo a spoľahlivo testovaná a validovaná *in vitro* a vykazovala zanedbateľnú toxicitu a vysokú anti-leukemickú aktivitu, pričom neboli pozorované žiadne negatívne účinky na zdravé bunky. Preto sa v rámci projektu plánuje pristúpiť k racionálnym testom na hlodavcoch, ktoré sa v tomto štádiu výskumu nedajú nahradiť iným postupom.

Obmedzenie:

Na základe dostupných údajov z literatúry a našich vlastných skúseností je počet zvierat navrhnutý tak, aby bolo možné získať ucelené vedecké dáta so štatistickou významnosťou. Celkové množstvo experimentálnych zvierat neprekročí počet 240 jedincov (pilotná aj experimentálna štúdia spolu). Naplánovaná pilotná štúdia výrazným spôsobom prispeje k redukcii počtu experimentálnych zvierat, keďže v rámci nej na malom počte zvierat stanovíme presné parametre, ktoré sa použijú v experimentálnej štúdii (kmeň myší, množstvo inokulovaných buniek, dávku antisense platformy). Pre plánované *in vivo* experimenty bude použitá len antisense platforma, ktorá

už bola v minulosti validovaná *in vitro* a ktorá preukázateľne vykazuje silný a hlavne selektívny anti-leukemický účinok s nepozorovaným negatívnym dopadom na zdravé bunky. Realizácia projektu je plánovaná na 48 mesiacov. Nakoľko sa jedná o štúdiu úplne novej antisense platformy, je zvolený počet experimentálnych zvierat pre úspešnú realizáciu projektu adekvátny. V prípade získania štatisticky spracovateľných výsledkov už v rámci pilotnej štúdie, budú aj tieto zvieratá zarátané do experimentálnej štúdie. V prípade štatisticky podloženej úspešnosti navrhovaných experimentálnych postupov bude operatívne redukovaný celkový počet plánovaných zvierat.

Zjemnenie:

Experimentálne zvieratá budú chované v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody v podmienkach pravidelného 12 h/12 h svetelného režimu. Prostredie chovných kliebok bude obohatené o materiál umožňujúci úkryt a stavbu hniezd. So zvieratami sa bude zaobchádzať opatrne a citlivo. Použitie inzulinových striekačiek s najtenšími ihlami minimalizuje utrpenie zvierat pri aplikácii roztokov subkutánne, intraperitoneálne aj intravenózne. Navyše, i.v. aplikácie budú vykonávané v anestetizovaných zvieratách, čo výrazne znižuje diskomfort asociovaný s injekčným podaním. Máme vypracovaný humane end point na usmrtenie zvierat, ktoré dosiahli skóre 4 (Tabuľka v Prílohe 3.5). Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Spätné posúdenie projektu:

Projekt nepodlieha spätnému posúdeniu.

Netechnické zhrnutie projektu 3623-3/2020-220

Názov projektu: Úloha cholinesteráz v metabolickom syndróme

Kľúčové slová: metabolický syndróm, cholinesterázy, kardiovaskulárny systém, cievy, tukové tkanivo, potkan

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu

Metabolický syndróm postihuje zhruba 20% slovenskej populácie. Charakterizuje ho predovšetkým spoločný výskyt porúch metabolizmu cukrov a lipidov. Napriek indíciám o vzťahu medzi cholinesterázami (ChE) a komponentmi metabolického syndrómu, nebola doteraz úloha týchto enzýmov v patogenéze metabolického syndrómu komplexne popísaná. Cieľom projektu je objasniť vzťah medzi ChE a patológiami vymedzujúcimi metabolickým syndrómom, predovšetkým so zameraním na rozvoj obezity, poruchy v lipidovom a glukózovom metabolizme, anatomické a fyziologické zmeny srdca a ciev, zápalové procesy (plazmatické zápalové markery), anatomicko-funkčné vlastnosti kostí.

Prínos z vykonaného projektu:

Predpokladáme prínos nových informácií o úlohe ChE a ich zapojení pri vzniku a vývoji metabolického syndrómu, ktorý je významným rizikovým faktorom vzniku kardiovaskulárnych ochorení aj diabetu 2. typu. Objasnenie úlohy ChE môže viesť k otvoreniu nových diagnostických a farmakoterapeutických prístupov v manažmente metabolického syndrómu.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty :

Potkany, samce rodu Wistar 216 ks a samce rodu SHR 144 ks.

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

Zvieratám bude podávaná strava obohatená o tuky a/ alebo fruktózu, ktorá je pre ne chuťovo atraktívna. Okrem priberania na hmotnosti a prípadne navodenej hypertenzie nebudú zvieratá vystavené žiadnemu fyzickému ani psychickému utrpeniu.

Zvieratám bude meraný krvný tlak umiestnením manžety na chvoste. Toto zahŕňa krátkodobé obmedzenie pohybu a nahriatie na 37 °C počas približne 10-15 minút a je pre zvieratá bezbolestné.

Na overenie účinnosti podanej liečby bude zvieratám maximálne dvakrát odobraté malé množstvo krvi (< 100 µl) z chvostovej žily.

Utratenie zvierat bude prebiehať bezbolestne v CO₂ atmosfére, kde dochádza k rýchlej strate vedomia.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Navrhovaný postup klasifikujeme ako stredne krutý. Klasifikáciu miery krutosti jednotlivých postupov zhŕňa nasledovná tabuľka.

Tabuľka: Klasifikácia krutosti navrhovaných postupov

Navrhovaný postup	Opakovanie	Klasifikácia krutosti
Váženie zvierat	áno	slabá
Podávanie liečiva perorálne v pitnej vode	áno	slabá
Odber < 100 µl krvi z chvostovej žily	max 2 odbery na zviera, druhý odber len v prípade nepostačujúcej inhibície ChE	stredná
Podávanie modifikovanej stravy a jej dopad na zdravotný stav zvierat	áno	stredná
Meranie krvého tlaku a tepovej frekvencie pomocou tail-cuff metódy	áno	slabá

Uplatňovanie zásad 3R

Pri práci so zvieratami budú dodržané všetky predpísané predpisy a smernice pre chov a zaobchádzanie s laboratórnymi zvieratami podľa zásad **3 R**.

Nahradenie (Replacement)

Predkladaný projekt má za cieľ objasniť dynamiku patofyziologických mechanizmov zapojenia ChE do vzniku MS na úrovni metabolizmu, kardiovaskulárnych zmien a vlastností kostí. Súčasťou projektu sú merania fyziologických parametrov ako množstvo prijatej potravy/ vody, nárast hmotnosti, meranie tlaku krvi, kontraktility ciev a fyziologických parametrov srdcovej činnosti. Taktiež budú stanovené biochemické markery v plazme, vykonané imunochemické a aktivné farbenia na úrovni intaktného tukového tkaniva a ciev. Vzhľadom na uvedené nie je možné experimentálne získané informácie nahradiť experimentami *in vitro* na bunkových kultúrach. V intaktnom organizme zvieraťa totiž dochádza ku komplexným ovplyvneniam orgánových systémov medzi sebou a z toho vyplývajúcim kompenzačným mechanizmom, ktoré nie je možné simulovať v bunkových kultúrach. Vlastnosti a fenotyp bunkových kultúr sa tiež môže výrazne líšiť od vlastností tkanív z intaktného orgánu. Rovnako nie je možné vyhodnotiť zapojenie ChE na úrovni jednotlivých tkanív *ex vivo*, nakoľko takýto prístup postráda informácie o dynamike patofyziologických procesov MS. Taktiež nie je možné simulovať uvedené podmienky *in silico*, nakoľko chýbajú vstupné informácie o účasti ChE v skúmaných patofyziologických procesoch.

Nahradenie (replacement) však plánujeme pri titracii dávky selektívnych inhibítorov, kde využijeme experimenty *in vitro*, a teda nebudeme testovať toxicitu a inhibičnú schopnosť priamo v animálnych modeloch. Správanie inhibítorov overíme v inhibičných biochemických experimentoch s purifikovaným natívnym (Schopfer et al., 2019) alebo rekombinantným enzýmom (Lockridge et al., 2018), poprípade priamo s ľudským, myšacím a potkaním sérom, ktoré sú zbierané priebežne v rámci schválených experimentov na katedre a uchovávané pri -80°C (v rámci programu zdieľania tkanív, ktorý

dlhoročne úspešne realizujeme na našom pracovisku). Okrem toho budeme pracovať s údajmi z dostupných toxikologických databáz a publikovaných toxikologických prác, na základe ktorých vyberieme dávku s inhibičnou účinnosťou na aktivitu ChE, ktorá však nespôsobuje žiadne príznaky toxicity *in vivo*.

Obmedzenie (Reduction)

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat nutný pre štatistické vyhodnotenie a zároveň na vygenerovanie relevantných výsledkov. Výsledný počet zvierat zohľadňuje interindividuálnu variabilitu medzi jedincami v rámci jednej farmakologickej skupiny. Zvieratá, ktoré budú použité vo fáze 1 na určenie dávkovania inhibítora AChE donepezilu a inhibítora BChE isoOMPA, budú zároveň slúžiť ako kontrolná skupina pre fázu 2, čím sa dosiahne obmedzenie (reduction) počtu zvierat o 12 potkanov. Spoločné využitie zvierat vo fázach 2 a 3 nie je možné z dôvodu rôznych metodických postupov pri disekcii pre biochemické a molekulárne experimenty a fyziologické experimenty.

Z dôvodu maximálnej redukcie počtu experimentálnych zvierat je dôležité podčiarknuť, že tretia fáza bude realizovaná výlučne v prípade, ak bude v druhej fáze preukázaný vplyv ChE na vývoj metabolického syndrómu. Taktiež bude realizovaná výlučne v tom modeli metabolického syndrómu, kde sa preukážu najvýznamnejšie cholinergické zmeny.

Každé experimentálne zviera bude maximálne využité z hľadiska množstva odobratých a skúmaných orgánov. Orgány a tkanivá, ktoré neplánujeme použiť v navrhovanom postupe, budú využité inými skupinami na pracovisku v rámci programu zdieľania tkanív, ktorý dlhoročne úspešne realizujeme na našom pracovisku.

Zjemnenie (Refinement)

Cholinergický systém je extrémne citlivý na prítomnosť stresu, preto je v navrhovanom postupe nutné predchádzať akémukoľvek stresu experimentálnych zvierat. Tomuto cieľu sme detailne prispôbili všetky časti protokolu nasledovne:

- **Handling:** Zvieratá budú pravidelne každý týždeň podrobované manipulácii (handling) na zníženie stresu pri vážení a meraní krvného tlaku. Taktiež budú pri výmene vody a krmiva vystavované hlasovému prejavu obsluhujúceho personálu, čo tiež zníži úroveň stresu pri vážení a meraní tlaku.
- **Separáčne mriežky:** Nakoľko individuálne klietky sú pre sociálne zvieratá ako potkany mimoriadne stresujúcim faktorom a zároveň je pre relevantnosť postupu nutné merať individuálny príjem vody a potravy, zvolili sme chov zvierat vo vaniciach po dvoch s prítomnosťou predeľovacej mriežky. V literatúre je preukázané, že tento spôsob chovu minimalizuje stres zvierat, nakoľko je zachovaný ich vzájomný vizuálny, čuchový aj taktilný kontakt. Stresové markery takto chovaných zvierat sa nelíšia od zvierat chovaných v skupinách (Boggiano *et al.*, 2008).
- **Obohatené prostredie:** Zvieratá budú mať v klietkach k dispozícii papierové hračky rôznych tvarov a farieb, ktoré budú slúžiť ako skrýše/ stavebný materiál, čím pre ne vytvoríme obohatené prostredie.
- **Spôsob podávania farmakologických látok:** Farmakologicky aktívne látky budú zvieratám podávané v pitnej vode, opäť s účelom zníženia ich stresu. Máme za to, že tak opakované intraperitoneálne injekčné podanie ako aj podávanie gastrickou sondou by neprimerane zvyšovalo stres zvierat. Z tohto dôvodu sme sa rozhodli podávať farmakologické látky rozpustené v pitnej vode a zároveň prísne monitorovať jej príjem na zabezpečenie adekvátneho dávkovania.
- **Voľba modifikovanej stravy:** Strava zvierat bude obohatená o fruktózu a/ alebo lipidy vo forme bravčového tuku. Zvolené modely boli v literatúre popísané ako vhodné modely pre navodenie metabolického syndrómu a zároveň boli odsúhlasené príslušnými etickými komisiami (Buettner *et al.*, 2006; Mahmoud and Elshazly, 2014; Panchal *et al.*, 2011; Senaphan *et al.*, 2015; Sutherland *et*

al., 2008). Obe plánované zložky krmiva, tak fruktóza ako aj bravčový tuk, sú pre experimentálne zvieratá chuťovo vysoko atraktívne.

- **Utratenie zvierat:** Zvieratá budú humánne utratené oxidom uhličitým. Nakoľko použitie celkového anestetika ovplyvňuje cholinergický systém, nie je možné ho aplikovať.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: ~~áno~~ nie

Netechnické zhrnutie projektu – 3591-3/2020-220

Názov projektu:

Využitie exozómov vylučovaných ľudskými mezenchýmovými stromálnymi bunkami na cielenú génovú terapiu glioblastómov II

Kľúčové slová:

Glioblastóm, génová terapia, exozómy, kmeňové bunky

Účel projektu:

Základný výskum

Cieľ projektu: Cieľom projektu je overenie možnosti využitia terapeutických exozómov z ľudských mezenchýmových stromálnych buniek na cielenú génovú terapiu glioblastómu na princípe použitia samovražedného enzýmu cytozín deaminázy a predliečiva 5-fluorocytosínu alebo tymidínkinázy vírusu Herpes simplex a predliečiva Gancikloviru.

Prínos projektu: Možnosti liečby gliómov, najčastejšie sa vyskytujúcich primárnych mozgových nádorov sú veľmi limitované predovšetkým kvôli invazívnej a agresívnej povahe týchto nádorov a tiež ich schopnosti odolať chemoterapii či rádioterapii. Glioblastóm je spomedzi gliómov najagresívnejší a nesie najvyšší stupeň malignity (stupeň IV podľa WHO). Štandardný postup liečby začína maximálnym možným chirurgickým odstránením nádoru, po ktorom nasleduje rádioterapia spolu s konkomitantnou a adjuvantnou chemoterapiou. Napriek nemalým pokrokom vo všetkých troch oblastiach liečby, prognóza pre pacientov ostáva naďalej nepriaznivá a skoro vždy dochádza k relapsu ochorenia. Medián prežívania sa pohybuje okolo 14 mesiacov. Na Slovensku sa ročne diagnostikuje okolo 200 nových prípadov glioblastómu.

Projekt je orientovaný na výskum rakoviny a liečbu nádorového ochorenia. Riešenie projektu priblíži tento inovatívny terapeutický prístup k pacientom. Overí aj možnosti neinvazívneho podania terapie.

Počet a druh použitých zvierat: V projekte plánujeme použiť maximálne 480 jedincov potkana laboratórneho kmeňa Sprague Dawley alebo Fischer oboch pohlaví.

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu: Počas všetkých chirurgických zákrokov budú zvieratá v celkovej anestézii, po zákroku môžu pociťovať krátkodobú strednú bolesť (tlmenie analgetikami). Postupujúce nádorové ochorenie (glioblastóm) sa prejaví celkovým chradnutím zvierat, zmenou správania, smerom k útlmu, spavosti, zníženej pohyblivosti, predpokladáme stratu hmotnosti, menej často ochrnutie zadných končatín. Ochrnutie predných končatín sa nevyskytuje, rovnako sa ochorenie neprejavuje kŕčmi, zvukovými prejavmi poukazujúcimi na bolesť. Na základe skúseností z predchádzajúcich projektov predpokladáme, že priebeh ochorenia bude rýchly, zvieratá s náhlým zhoršením stavu budú utratené, aby sme zabránili utrpeniu, potkany s rozvinutým ochorením nebudú ponechané na dožitie. Pri opakovanom podaní terapie budú zvieratá pociťovať krátkodobý stres.

Predpokladaná úroveň krutosti: krutá

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov, použitiu zvierat predchádzali/budú predchádzať štúdie *in vitro*. Až po overení účinnosti *in vitro* prechádzame na *in vivo* postupy a počet použitých zvierat sa snažíme minimalizovať pri zachovaní štatisticky významných výsledkov.

Hlodavce v tomto štádiu experimentov už nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov. Overenie účinnosti liečby vyžaduje komplexitu celého organizmu.

Obmedzenie

Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Projekt nadväzuje na predchádzajúce schválené projekty, preto sme schopní predvídať terapeutickú účinnosť ako aj priebeh ochorenia u kontrolných skupín, čo nám umožňuje počet zvierat v určitých experimentálnych skupinách redukovať. V prípade nízkeho rozptylu hodnotených kritérií (klinických príznakov, prežívania) v jednotlivých skupinách bude na štatisticky významné vyhodnotenie výsledkov postačujúci nižší počet zvierat. Rátame s použitím jednej kontrolnej skupiny pre viacero liečených skupín. Najprv do skupiny zaradíme 6 zvierat a pokiaľ budú výsledky významné, ďalšie 4 plánované zvieratá nepoužijeme.

Zjemnenie

Pokiaľ to zdravotný stav zvierat možní, budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. V rámci pooperačnej starostlivosti podáme lieky proti bolesti. Zvieratá s vážne zhoršeným zdravotným stavom nebudú ponechané na dožitie, budeme dbať na uplatňovanie humánneho ukončenia postupu (HUP, v projekte bude vyhodnotené ako úhyn v súvislosti s rozvojom ochorenia). Vykonanie HUP je v tomto projekte najdôležitejším prvkom zjemnenia. Neúspešne liečené ako aj neliečené zvieratá budú mať rovnaké prejavy, na základe ktorých bol vypracovaný postup na uplatnenie HUP. Postupujúce ochorenie nie je možné zvrátiť (zvieratá vyliečiť), preto by bolo nehumánne držať ich pri živote. Pri zníženej pohyblivosti zvierat bude potrava a voda umiestnená priamo do kletky. V záujme väčšieho komfortu nebudeme naplňovať maximálnu kapacitu kletiek. Prostredie obohatíme plastovými úkrytmi určenými pre hlodavce. Ak bude na magnetickú rezonanciu zviera prevážané v inej ako domovskej kletke, prenesieme do kletky aj časť hoblín z kletky, v ktorej bolo zviera umiestnené.

Spätné posúdenie projektu:

Postupy klasifikujeme ako „kruté“, spätné posúdenie projektu vykonáme do troch mesiacov po jeho ukončení, t.j. do 1.2.2025.

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU
podľa § 40 nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.

NÁZOV PROJEKTU:

**KOMBINOVANÁ ŠTÚDIA TOXICITY PO OPAKOVANOM PODANÍ SO SKRÍNINGOVÝM TESTOM
REPRODUKČNEJ/VÝVINOVEJ TOXICITY (OECD 422)**

ČÍSLO KONANIA ROZHODNUTIA O SCHVÁLENÍ PROJEKTU:

3335-3/2020-220

KLÚČOVÉ SLOVÁ:

embryo-foetal toxicity, reproduction, rat, repeated oral toxicity

ÚČEL PROJEKTU PODĽA § 3 A JEHO ZDÔVODNENIE:

Aplikovaný výskum

PODROBNÝ POPIS CIEĽA PROJEKTU:

Cieľom projektu (štúdie) bude poskytnúť podklady pre posúdenie bezpečnosti chemických látok z hľadiska schopnosti vyvolať toxickú reakciu organizmu po opakovanom podávaní látky a odhaliť potenciálne negatívne vplyvy na reprodukčné parametre podľa metódy OECD 422.

OČAKÁVANÝ VÝSLEDOK:

Projekt poskytne informácie, ktoré sú v tomto teste z hľadiska platnej legislatívy REACH pre látky produkované v množstve do 100 ton/rok požadované. Pokusná a pozorovacia stratégia sú dané metodickým postupom OECD 422, ktorá je alternatívou pre testy Reprodukčnej skriningovej toxicity (OECD 421) a 28-dňovej toxicity (OECD 407) kde sa sledujú nielen reprodukčné parametre testovaných zvierat, ale robí sa aj hematologické a biochemické vyšetrenie krvi, vyšetrenie moču, patológia a histopatológia. Na základe výsledkov štúdie budú stanovené hodnoty NOAEL pre reprodukčnú a systémovú toxicitu. Prínosom tejto štúdie bude včasné rozpoznanie toxicity skúšaných látok a zabránenie negatívnych vplyvov na organizmus.

DRUHY POUŽITÝCH ZVIERAT A ICH POČTY

Potkany kmeňa Wistar

328 samíc, 280 samcov, cca 2240 mláďat / na 4 testované látky

Na 1 testovanú látku:

Pre pilotnú časť: 15 samcov a 15 samíc

Hlavný test: 50 samcov a 62 samíc + 560 mláďat

Náhradné zvieratá: 5 samcov a 5 samíc

Hmotnosť: samice 180-200g; samce 200-220g

PREDPOKLADANÝ NEPRIAZNIVÝ VPLYV/UJMA NA POUŽITÉ ZVIERATÁ V RÁMCI VYKONÁVANÉHO POSTUPU

Počas postupu sa bude so zvieratami zaobchádzať šetrne v súlade so zásadami 3R s možnou ujmou počas vystavenia aplikácie testovaných látok. Celkový zdravotný stav potkanov bude sledovaný podľa kritérií humane endpoints, aby sa zabránilo bolesti a utrpeniu zvierat. Ak by zviera prejavilo výrazné zhoršenie zdravotného stavu a pohody v období karantény resp. štúdie, bude humánne usmrtené (podľa návodu pre daný druh zvierat, príloha 2. k nariadeniu vlády č.377/2012 Z.z.). Zvieratá prejavujúce bolesť budú neodkladne humánne utratené, nie je však vylúčené, že príde k úhynu vplyvom látky, preto je pokus hodnotený ako stredne krutý až krutý

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná – krutá

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Zaradenie podľa krutosti
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres	slabá
Opakované perorálne podávanie testovanej látky	Mierny stres, bolesť slabá	slabá
Možná systémová reakcia	Mierna až silná bolesť	slabá - krutá
Výšetrenia – vaginálne výtery,	Mierny stres, bolesť slabá	slabá
Odber krvi	Mierny stres	stredná
Aplikácia gravidných samíc	Mierny stres, bolesť slabá	stredná
Usmrtenie nadmernou dávkou anestetika	Krátkodobý mierny stres	slabá
Celkové hodnotenie krutosti skúšky: stredná - krutá		

SÚLAD S POŽIADAVKOU NAHRADENIA, OBMEDZENIA A ZJEMNENIA (3R)

V projekte budú zohľadňované zásady 3R.

Refinement – v postupe pri odberoch na biochemické vyšetrenie odoberieme krv z retrobulbárneho venoplexu, v narkóze. Ako anestetikum použijeme Isofluran. Slabá - silná bolesť môže byť spôsobená systémovou reakciou na podanú látku. Po podaní testovanej látky bude zvieratám venovaná pozornosť. Ak by bolo utrpenie zvierat neprijateľné pristúpime k „human end point“.

Reduction – počty zvierat v pokuse sú primerané, redukované v maximálnej miere tak, aby sa nemohla ovplyvniť validita pokusu a vychádzajú s pravidiel OECD 422.

Replacement – Možnosť náhrady testami *in vitro*

Test kombinovanej štúdie toxicity po opakovanom podaní so skríningovým testom reprodukčnej/vývinovej toxicity na zvieratách sa nedá nahradiť alternatívnymi metódami *in vitro* z dôvodu potreby reakcie živého organizmu na podanie látky a jeho systémové pôsobenie.

Vyžaduje sa spätné posúdenie projektu.

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU:

Názov projektu: Udržanie modelovej infekcie vyvolanej larválnym štádiom pásomnice (cestóda) *Mesocetoides vogae* v laboratórnych myšiach prostredníctvom ich pasážovania za účelom ich využitia v experimentálnych štúdiách in vivo a in vitro.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3143-3-2020/220

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): *Mesocetoides vogae*, pásomnice, larválne cestodózy

Účel projektu*:

- translačný, základný výskum alebo aplikovaný výskum za účelom

- zabránenia, prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka, zvierat alebo rastlín alebo ich účinkov na ľudí, zvieratá alebo rastliny,
- v záujme dosiahnutia ktoréhokoľvek z cieľov uvedených v písmene b) pri vývoji, výrobe alebo testovaní kvality, účinnosti a bezpečnosti liekov, potravín, krmív a iných látok alebo výrobkov,

Ciele projektu:

Vo farmakologickom výskume sú nevyhnutné predklinické štúdie, v ktorých sa na overenie a vysvetlenie účinkov liekov a nových aktívnych molekúl využívajú laboratórne zvieratá. V prípade chorôb vyvolaných parazitickými helmintami, vrátane pásomníc, je potrebné udržiavať modelové druhy v ich prirodzených hostiteľoch (hlodavce). Izolované larvy *Mesocetoides vogae* budú využité na pasážovanie, infikovanie myší vo farmakologických experimentoch a zvyšné na in vitro testovanie účinkov látok.

Prínos z vykonaného projektu:

Larválne štádia helmintov, vrátane pásomníc, si v priebehu evolúcie vyvinuli mechanizmy umožňujúce dlhodobé prežitie v hostiteľskom organizme s dlhou fázou asymptomatického štádia v dôsledku imunosupresie. Ochorenia ľudí a zvierat spôsobené larválnymi štádiami helmintov parazitujú v parenchymatóznych orgánoch svojich hostiteľov, vrátane ľudí, a sú sprevádzané patologickými prejavmi, ktoré výrazne znižujú účinnosť liečby a dostupnosť liečiv pre larvy.

Medzi hlavné patologické prejavy infekcie patrí potlačenie imunity, poškodenie pečene a zápal v telových dutinách a orgánoch ako je slezina. Farmakologický výskum sa preto orientuje na hľadanie nových postupov a pri liečbe antiparazitickými liekmi, vývoj nových účinnejších a bezpečnejších liekov a využívanie kombinovanej liečby spolu s látkami prírodného pôvodu s imunostimulačným účinkom.

Udržiavanie infekcie modelovou pásomnicou v myšiach je nevyhnutné pre následné experimentálne štúdie. Izolované larvy *Mesocetoides vogae* budú využité na pasážovanie,

infikovanie myší vo farmakologických experimentoch a zvyšné na in vitro testovanie účinkov nových bioaktívnych látok a získanie sekrečných produktov na proteonomické analýzy.

Druhy použitých zvierat a ich počty: myši - outbredný kmeň CD1 samce/samice, spolu 120 zvierat na 5 rokov

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

Fixácia zvierat'a a aplikácia lariev per os vo fyziologickom roztoku im spôsobí len krátkodobý stres trvajúci maximálne po dobu 1 minútu. Infekčné dávky sú volené tak, aby nespôsobili zvieratám prepuknutie klinických príznakov ochorenia, t.j 250-300 lariev parazita. Preto sa nepredpokladá nepriaznivý vplyv a ujma na zvieratách. Veľmi ojedinele a na základe individuálneho stavu zvierat'a sa môže v neskoršej fáze infekcie objaviť nepohoda v dôsledku prudšieho delenia sa lariev v brušnej dutine spojená so znížením pohyblivosti a zníženým príjmom potravy.

Predpokladaná úroveň krutosti:

- Slabá:

-podávanie látok cez sondu

Zvieratá budú sondou infikované orálne 250-300 larvami, čo nevyvolá masívnu infekciu počas prvých troch mesiacov a teda riziko akútnej bolesti sa nepredpokladá a ani obmedzenie príjmu potravy a pohyblivosti. V priebehu infekcie (3 mesiace) zvieratá nebudú vystavované žiadnym iným úkonom, ktoré by im spôsobovali bolesť. Počas experimentu nedôjde k žiadnym obmedzeniam štandardov na umiestnenie, chov a starostlivosť.

Infekcia larvami má počas prvých troch mesiacov pomalší priebeh a larvy sa začínajú intenzívnejšie nepohlavne deliť až od 4. mesiaca po orálnej infekcii. V tomto období ich počet nespôsobuje zvieratám zdravotné problémy, ktoré by im znížili ich pohodu a ovplyvnili fyziologické potreby ako príjem potravy a vody, pohyb, správanie, a kvalitu srsti. Z tohto dôvodu sa môže označiť stav krutosti počas rastu larvocýst ako stredný v dôsledku variability reakcie jednotlivých zvierat.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat: Laboratórne myši kmeňa CD1 sú vnímavým kmeňom voči infekcii larválnym štádiom pásomnice *Mesocestoides vogae*, u ktorých larvy infikujú pečeň a peritoneálnu dutinu. Živočíšne modely, vnímavé voči infekciám helmintami, umožňujú študovať komplexne hostiteľsko-parazitické interakcie a ich ovplyvnenie liečivami a inými látkami, čo nie je možné nahradiť metódami in vitro. Myš zároveň predstavuje najnižší cicavčí model, na ktorom je možné udržiavať infekciu. Len larvy izolované z myší ako svojho hostiteľa dokážu vyvolať infekciu vhodnú na testovanie liekov pre humánne použitie.

2. Redukcia počtu zvierat: Naplánovaný počet na jednotlivé odberové dni je výsledkom čo najväčšej minimalizácie, tak aby nedošlo k strate modelovej infekcie. Vychádza z charakteru infekcie a kinetiky rozmnožovania lariev a je výsledkom čo najväčšej minimalizácie. Na základe toho boli zvolené aj intervaly medzi pasážami (3 mesiace). Krokom k redukcii počtu

zvierat je zníženie počtu jedincov v skupine z 10 na 6, čo je minimálny počet na zabezpečenie dostatku pasážovaného parazitárneho materiálu.

3. Zjemnenie: Zásada zjemnenia bude dodržiavaná v plnej miere. Infekcia zvierat larvami sa uskutoční sondou per os, čo je jemnejší a prirodzený spôsob ako je intraperitoneálna aplikácia ďalšie zákroky na zvieratách sa neplánujú. Miera krutosti sa považuje za slabú. Zvieratá budú z vlastného chovu, a preto sú zvyknuté na prítomnosť človeka spojenú s bežnými dennými procedúrami a manipuláciou (čistenie, kŕmenie, napájanie, kontrola zdravotného stavu). Zvieratá budú chované v štandardných podmienkach nevyvolávajúcich stres. V prípade známkov zhoršeného zdravotného stavu, napr. výrazné zníženie lokomočnej aktivity, zježená srst', bude kontaktovaný veterinárny lekár, zvieratá budú vyradené z pokusu, uvedené do celkovej anestézy v atmosfére CO₂ v komore a následne usmrtené cervikálnou dislokáciou.

Projekt nebude spätne posúdený po skončení v súlade s § 37 bodom 2) NV 377/2012.