

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Imunoterapia Alzheimerovej choroby: analýza mechanizmu účinku

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): Alzheimerova choroba, imunoterapia, gliové a neuronálne bunky

Účel projektu: Základný výskum

Podrobný účel postupu: 2013-3/2020-220

Predložený projekt je pokračovaním projektu s rovnakým názvom a má za úlohu štúdium mechanizmu účinku pasívnej vakcíny (terapeutickej protilátky). Mechanizmus účinku budeme analyzovať v podmienkach *in vitro* na primárnych bunkových kultúrach. Na experimenty budeme používať primárne neuronálne bunkové kultúry izolované z 18-dňových plodov a primárne gliové bunkové kultúry izolované z 1-dňových mláďat myši.

V ďalšej časti projektu budeme analyzovať vplyv starnutia organizmu na aktivitu mikroglií a jeho potenciálny dopad na účinnosť imunoterapie. Na experimenty budeme používať mikrogliové kultúry izolované z dospelých zvierat.

Druhy a počty použitých zvierat:

V projekte nebudú použité GMO zvieratá.

Na prípravu bunkových kultúr z experimentálnych zvierat celkovo použijeme:

- 270 gravidných myši – CD1, 70 samíc sa usmrtí v 18. dni gravidity a odoberú sa plody, 200 samíc sa nechá porodiť a odoberú sa 1- dňové mláďatá

Na bunkové kultúry z dospelých jedincov použijeme v projekte 100 ks 6-mesačných myši. Na tento typ experimentov budeme používať prednostne myši z predchádzajúcich experimentov (samce použité na pripúšťanie a samice, ktoré nezabrezli alebo ktoré porodili).

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

Odber plodov sa bude vykonávať v celkovej anestézii, po ktorej sa zvieratá už neprebudí, taktiež sa dislokujú cervikálne stavce, aby sme sa utvrdili, že zvieratá je humánne usmrtené – bez možnosti zotavenia. 1-dňové mláďatá sa ihneď po odobratí od samičky usmrtia dekapitáciou – stredná krutosť. Dospelé jedince budú humánne usmrtené cervikálnou dislokáciou. Anestézu nemožno použiť z dôvodu ovplyvnenia prežívateľnosti kultúr – stredná krutosť.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zvieratá	Krutosť
Tetovanie na chvoste	Samičky, ktoré sa budú používať na pripúšťanie budú tetované na chvoste a tým identifikované trvalo, pri tetovaní sa chvost potrie mesokaínovým gélom aby sa minimalizovala bolesť, a použitím tetovacieho zariadenia pre laboratórne zvieratá sa krátkym vpichom vytetuje na chvost označenie podľa presne definovaného číselného kódu. Trvanie 1	stredná

Príloha 2: Netechnické zhrnutie

	minúta. Bolest' slabá	
Odber plodov z maternice	Gravidná samica (18. deň gravidity) sa uvedie do hlbokkej anestézie, otvorí sa brušná dutina a z maternice sa vyberú plody	bez možnosti zotavenia
Odobratie 1-dňových mlád'at	Matka pri odbere mlád'at bude ihneď usmrtená, aby sme minimalizovali jej utrpenie	slabá
1-dňové mlád'atá	Mlád'atá ihneď po odobratí od samičky budú usmrtené dekapitáciou.	stredná
Dospelé jedince	Dospelé jedince budú usmrtené cervikálnou dislokáciou	stredná

Zohl'adnenie 3R

Nahradenie:

Primárne neuronálne a gliové bunkové kultúry izolované zo zvierat sú nenahradiateľným systémom na modelovanie reálnych procesov prebiehajúcich v mozgu. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné predpisy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. 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, v kletke s prvkami obohateného prostredia (domčeky, papierové rolky). Samičkám pred pôrodom sa dopĺňa materiál na tvorbu hniezd (nestlets, papier). Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich ich fyziologickým a sociologickým potrebám. V rámci nášho zverinca je denne kontrolovaný a monitorovaný zdravotný stav a pohoda zvierat. Pri prejavoch zmien zdravotného stavu, veterinárny lekár upovedomí vedúceho experimentu o prípadnej potrebe vyradiť zviera z experimentu a pristúpiť k humánnemu usmrteniu zvierat'a.

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov. Stanovený počet zvierat sa opiera o naše predchádzajúce experimenty. Jeden z faktorov, ktorý ovplyvňuje nami stanovený počet zvierat je relatívne nízka výťažnosť mikrogliových a neuronálnych buniek z mozgového tkaniva. Z dôvodu rôznej metodiky izolácie mikroglie a neurónov, nie je možné použiť to isté tkanivo na izolovanie aj neurónov aj mikroglie. Z hľadiska redukovania počtu použitých zvierat v projekte, používame na pripúšťanie samičky, ktoré boli použité v chove.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

Pre hľadanie alternatívnej metódy sme použili nasledovné registre medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód (Pubmed, ECVAM, NC3Rs, AltTox), kde sme nenašli žiadnu alternatívnu metódu, ktorú by sme mohli použiť vo svojom projekte, aby sme nemuseli vykonávať experimenty na zvieratách. Primárne neuronálne a gliové bunkové kultúry izolované zo zvierat sú nenahradiateľným systémom na modelovanie reálnych procesov prebiehajúcich v mozgu.

Utrpenie versus prínos

Po zlyhaní imunoterapie namierenej proti beta-amyloidu v Alzheimerovej chorobe sa dostáva do popredia imunoterapia namierená proti ďalšiemu kľúčovému znaku ochorenia – patologicky zmenenému tau proteínu. Tau imunoterapia v súčasnosti zaznamenáva obrovský rozkvet, avšak presný mechanizmus účinku optimálnej terapeutickkej vakcíny nie je objasnený.

Príloha 2: Netechnické zhrnutie

Cieľom projektu je prispieť k odhaleniu terapeutického mechanizmu anti-tau protilátky a popísať túto dráhu na bunkovej úrovni.

Analýza týchto mechanizmov nie je možná na immortalizovaných bunkových líniiach, vzhľadom na ich zmenený fenotyp oproti bunkám v skutočnom mozgovom tkanive, preto budeme na štúdium používať bunkové kultúry (neurónové a mikrogliové) izolované z laboratórnych zvierat.

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené neprimeranému utrpeniu.

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

Začiatok pokusu je plánovaný na 15.8.2020 a bude sa realizovať v priebehu nasledovných dvoch rokov, do 31.12.2022.

2445/2020-220a

Príloha č. 2

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

Názov projektu: Test subchronickej orálnej toxicity – opakovaná 90 dňová štúdia orálnej toxicity u hlodavcov s látkou dihydrokapsaicín, OECD TG 408 (Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents, OECD 408 adopted: 25 June, 2018)

Kľúčové slová: dihydrokapsaicín, subchronická toxicita

Účel projektu:
aplikovaný výskum

Cieľ projektu: Hlavným cieľom projektu je stanovenie miery toxicity dihydrokapsaicínu po opakovanej perorálnej aplikácii v rámci registrácie podľa legislatívy REACH. Pokusná a pozorovacia stratégia je jednoznačne daná metodikou OECD 408.

Prínos projektu: Hlavným prínosom tohoto projektu bude stanovenie miery toxicity látky dihydrokapsaicínu po opakovanej perorálnej aplikácii, a tým sa zabezpečí prevencia chorôb a zabráni sa poškodeniu zdravia alebo výskytu iných neprirodzených stavov človeka a zvierat, ktoré by mohla testovaná látka vyvolať.

Počet a druh použitých zvierat: Potkan laboratórny/ Wistar v počte 45 samcov a 45 samíc pre hlavný pokus a 15 samcov a 15 samíc pre pilotnú štúdiu.

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

Pokusná a pozorovacia stratégia je jednoznačne daná metodikou OECD 408.

Zvieratá budú po príchode do zariadenia ponechané niekoľko dní v aklimatizácii, aby si privykli na nové prostredie. Zvieratá budú označené farbou na chvoste a minimálne 1x do týždňa odvážené. Na váženie si zvieratá rýchlo privyknú a nespôsobuje im stres. Počas váženia je pri zvieratách skúsená osoba, na ktorú sú zvieratá zvyknuté. Označenie zvierat na chvoste je neinvazívny zákrok a zvieratám nespôsobuje žiadnu bolesť.

Aplikácia testovanej látky sondou počas 90 dní je postup, na ktorý si zvieratá rýchlo privyknú, veľkosť sondy a množstvá podávanej látky sú primerané veľkosti a druhu zvieraťa. V prípade potkana sa neprekročí množstvo 1ml na 100 g hmotnosti zvieraťa, látka je aplikovaná jedenkrát denne vždy v tom istom čase.

V priebehu štúdie bude urobený odber krvi (na konci štúdie) na hematologické a biochemické vyšetrenie. Pri odbere krvi do 500 mikrolitrov sa používa metóda podľa Waynfortha HB z chvostovej žily nevyžadujúca žiadnu anestéziu či znecitlivenie potkana. Jedná sa o krátkodobý stres pre zviera, ktoré je po 90-dňovej aplikácii privyknuté na manipuláciu.

Všetky postupy na zvieratách sú vykonávané skúsenými pracovníkmi, pri vykonávaných postupoch sa minimalizuje počet osôb, hluk a všetkým postupom predchádza dôkladná príprava, pretože iba v takom prípade je možné vykonať postup v klude a dostatočne rýchlo. Tým sa minimalizuje stres zvierat.

Keďže hlavným cieľom projektu je zistenie toxicity podávanej látky, budeme pozorovať či nedochádza k zhoršeniu zdravotného stavu zvierat. Z dôvodu možného dostavenia sa systémovej

reakcie organizmu u zvierat v skupine s vysokou dávkou testovanej látky je pre tento postup zvolená najvyššia úroveň krutosti. Zhoršenie zdravotného stavu sa môže prejavíť stratou hmotnosti, sťaženým dýchaním, nechutenstvom, zmenou postoja, správania a pod. Zdravotný stav zvierat sa bude denne kontrolovať. Kontrolovať sa bude aj spotreba krmiva. Moribundné zvieratá budú humánne utratené podľa human end points a bude vykonaná pitva.

Zvieratá sa usmrtia nadmernou dávkou kombinácie anestetík s účinnou látkou xylazín a ketamín. Jedná sa o jednorazovú intraperitoneálnu injekčnú aplikáciu.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná až krutá

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie:

Testovanie dihydrokapsaicínu podlieha regulačným požiadavkám:

1. Použitie ako doplnková látka do krmiva (príchut') pre všetky živočíšne druhy v EÚ a
2. Použitie ako nová potravina v EÚ.

V týchto prípadoch legislatíva vyžaduje preskúmanie subchronického toxického potenciálu účinnej látky a musí predložiť aspoň jedna štúdia na hlodavcoch s trvaním minimálne 90 dní.

Testovanie na hlodavcoch nie je možné nahradiť iným relevantným postupom.

Obmedzenie:

Počet zvierat v skupinách je daný metodikou OECD 408 a bude použitý minimálny počet, ktorý je odporúčaný.

Postupy a zloženie pokusných skupín sú naplánované tak, aby bolo možné využiť jednu kontrolnú skupinu zvierat pre 2 testované látky, čím sa celkový počet použitých zvierat redukoval.

Zjemnenie:

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Máme vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizovanie zvierat. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. V prípade potreby bude vykonané humánne ukončenie postupu. Prostredie, v ktorom sú zvieratá ustajnené je obohatené papierovými rolkami, papierovou vatou, prípadne paličkami na ohryzovanie. So zvieratami sa zaobchádza opatrne a citlivo.

Spätné posúdenie projektu:

Áno

2445/2020-220

Príloha č. 2

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

Názov projektu: Test subchronickej orálnej toxicity – opakovaná 90 dňová štúdia orálnej toxicity u hlodavcov s látkou kapsaicín, OECD TG 408 (Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents, OECD 408 adopted: 25 June, 2018)

Kľúčové slová: kapsaicín, subchronická toxicita

Účel projektu:
aplikovaný výskum

Cieľ projektu: Hlavným cieľom projektu je stanovenie miery toxicity kapsaicínu po opakovanej perorálnej aplikácii v rámci registrácie podľa legislatívy REACH. Pokusná a pozorovacia stratégia je jednoznačne daná metodikou OECD 408.

Prínos projektu: Hlavným prínosom tohoto projektu bude stanovenie miery toxicity látky kapsaicín po opakovanej perorálnej aplikácii, a tým sa zabezpečí prevencia chorôb a zabráni sa poškodeniu zdravia alebo výskytu iných neprirodzených stavov človeka a zvierat, ktoré by mohla testovaná látka vyvolať.

Počet a druh použitých zvierat: Potkan laboratórny/ Wistar v počte 60 samcov a 60 samíc pre hlavný pokus a 15 samcov a 15 samíc pre pilotnú štúdiu.

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

Pokusná a pozorovacia stratégia je jednoznačne daná metodikou OECD 408.

Zvieratá budú po príchode do zariadenia ponechané niekoľko dní v aklimatizácii, aby si privykli na nové prostredie. Zvieratá budú označené farbou na chvoste a minimálne 1x do týždňa odvážené. Na váženie si zvieratá rýchlo privyknú a nespôsobuje im stres. Počas váženia je pri zvieratách skúsená osoba, na ktorú sú zvieratá zvyknuté. Označenie zvierat na chvoste je neinvazívny zákrok a zvieratám nespôsobuje žiadnu bolesť.

Aplikácia testovanej látky sondou počas 90 dní je postup, na ktorý si zvieratá rýchlo privyknú, veľkosť sondy a množstvo podávanej látky sú primerané veľkosti a druhu zvierat. V prípade potkana sa neprekročí množstvo 1ml na 100 g hmotnosti zvierat, látka je aplikovaná jedenkrát denne vždy v tom istom čase.

V priebehu štúdie bude urobený odber krvi (na konci štúdie) na hematologické a biochemické vyšetrenie. Pri odbere krvi do 500 mikrolitrov sa používa metóda podľa Waynfortha HB z chvostovej žily nevyžadujúca žiadnu anestéziu či znecitlivenie potkana. Jedná sa o krátkodobý stres pre zviera, ktoré je po 90-dňovej aplikácii privyknuté na manipuláciu.

Všetky postupy na zvieratách sú vykonávané skúsenými pracovníkmi, pri vykonávaných postupoch sa minimalizuje počet osôb, hluk a všetkým postupom predchádza dôkladná príprava, pretože iba v takom prípade je možné vykonať postup v klude a dostatočne rýchlo. Tým sa minimalizuje stres zvierat.

Keďže hlavným cieľom projektu je zistenie toxicity podávanej látky, budeme pozorovať či nedochádza k zhoršeniu zdravotného stavu zvierat. Z dôvodu možného dostavenia sa systémovej

reakcie organizmu u zvierat v skupine s vysokou dávkou testovanej látky je pre tento postup zvolená najvyššia úroveň krutosti. Zhoršenie zdravotného stavu sa môže prejavíť stratou hmotnosti, sťaženým dýchaním, nechutenstvom, zmenou postoja, správania a pod. Zdravotný stav zvierat sa bude denne kontrolovať. Kontrolovať sa bude aj spotreba krmiva. Moribundné zvieratá budú humánne utratené podľa human end points a bude vykonaná pitva.

Zvieratá sa usmrtia nadmernou dávkou kombinácie anestetík s účinnou látkou xylazín a ketamín. Jedná sa o jednorazovú intraperitoneálnu injekčnú aplikáciu.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná až krutá

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie:

Testovanie kapsaicínu podlieha regulačným požiadavkám:

1. Použitie ako doplnková látka do krmiva (príchut') pre všetky živočíšne druhy v EÚ a
2. Použitie ako nová potravina v EÚ.

V týchto prípadoch legislatíva vyžaduje preskúmanie subchronického toxického potenciálu účinnej látky a musí predložiť aspoň jedna štúdia na hlodavcoch s trvaním minimálne 90 dní.

Testovanie na hlodavcoch nie je možné nahradiť iným relevantným postupom.

Obmedzenie:

Počet zvierat v skupinách je daný metodikou OECD 408 a bude použitý minimálny počet, ktorý je odporúčaný.

Postupy a zloženie pokusných skupín sú naplánované tak, aby bolo možné využiť jednu kontrolnú skupinu zvierat pre 2 testované látky, čím sa celkový počet použitých zvierat redukoval.

Zjemnenie:

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Máme vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizovanie zvierat. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. V prípade potreby bude vykonané humánne ukončenie postupu. Prostredie, v ktorom sú zvieratá ustajnené je obohatené papierovými rolkami, papierovou vatou, prípadne paličkami na ohryzovanie. So zvieratami sa zaobchádza opatrne a citlivo.

Spätné posúdenie projektu:

Áno

Príloha č. 3

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

Názov projektu: Postavenie Rho kinázovej dráhy v patomechanizme alergického zápalu dýchacích ciest a možnosti jej farmakologického ovplyvnenia. 2124-3/2020-220

Kľúčové slová: Rho-kináza, bronchiálna astma, iónové kanály, remodelácia, hyperreaktivita, kašeľ, STAT-6

Opodstatnenosť, cieľ a predpokladaný prínos projektu: Celosvetové štatistiky uvádzajú, že bronchiálnou astmou trpí viac ako 30 miliónov ľudí, ich počet narastá rovnako ako aj počet pacientov, ktorí nereagujú na liečbu dostupnú v súčasnosti. Ide o chronické zápalové ochorenie, v ktorom hrajú dôležitú úlohu bunky imunitného systému a dýchacích ciest. Ich činnosť riadia špecifické vnútrobunkové enzýmy zvané Rho-kinázy, ktorých aktivitu spúšťajú rôzne typy iónových kanálov alebo je aktivita iónových kanálov výsledkom činnosti Rho-kináz a je reálny predpoklad, že látky schopné ovplyvniť ich aktivitu môžu predstavovať alternatívu súčasnej liečby.

Cieľom projektu je identifikovať kompetitívne inhibítory Rho-kináz alebo modulátor/modulátory aktivity s nimi úzko spätých iónových kanálov, ktoré by boli schopné selektívne ovplyvniť priebeh alergického zápalu a tým aj reaktivitu obranných mechanizmov DC a následnú remodeláciu. Takéto liečivá by mohlo znamenať výrazný posun v terapii astmy, pretože by svojim potenciálom predstihlo súčasné dostupné antiastmatiká.

Použitie zvierat v postupoch:

Navrhované postupy projektu počítajú s použitím outbredných morčiat kmeň DH/TRIK s hmotnosťou 200-350 g v celkovom počte 336 jedincov.

Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami ako aj medzinárodne zavedenými osvedčenými metódami v starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne a zodpovedné zaobchádzanie so zvieratami. Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované množstvom prác a prezentované na mnohých odborných fórach nielen doma ale aj v zahraničí. Z hľadiska dodržiavania zásad práce so zvieratami neboli voči nim vznesené žiadne námietky či už na odborných fórach v rámci diskusií alebo v oponentských posudkoch publikovaných článkov. Postupy sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov prispievajúcich k účelnej farmakoterapii. Riešitelia preto považujú navrhované metódy za vhodné aj pre realizáciu predkladaného projektu.

Pri realizácii postupov budeme dodržiavať všeobecné zásady 3R: nahradenie, zníženie a zjemnenie (Replace, Reduce a Refine).

Replacement- pre postupy v projekte boli vybrané morčatá, ktorých výber vychádzal z našich dlhoročných skúseností. Vzhľadom na receptorové zastúpenie v DC patria morčatá k najvhodnejším zvieratám, používaným v experimentálnom modeli alergickej astmy. Charakter postupov nedáva možnosť dosiahnuť požadovaný, reprodukovateľný a validný výsledok inou dostupnou metódou bez použitia zvierat.

Reduction- Navrhovaný počet zvierat použitý v postupe (celkovo 336) bude potrebný na získanie signifikantných výsledkov po štatistickom hodnotení a akceptovaní vedeckou komunitou (1 skupina = vždy maximálne 8 zvierat). Tento počet bol výrazne zredukovaný o potrebné kontrolné skupiny, z dôvodu doplnenia výsledkov realizovaných na morčatách z iných postupov. V jednotlivých experimentálnych skupinách použijeme maximálne 8 zvierat. Tento počet je ešte akceptovateľný pre štatistickú validáciu a reprodukovateľnosť výsledkov. Počas riešenia projektu použijeme na sledovanie zmien reaktivity dýchacích ciest, na sledovanie kinetiky cilií respiračného epitelu, zápalovej reakcie a antiremodelačného účinku metódu *in vitro*, ktoré nám umožnia ďalšiu výraznú redukciu počtu použitých zvierat.

Refinement - Postupy sa budú vykonávať *lege artis* na neanestézovaných morčatách. Cieľom senzitivizácie je vyvolanie podobných klinických príznakov, ktorými sa prejavuje astma u ľudí – t.j. ide o stavy krátkodobej dušnosti. Možné závažné zhoršenie dýchania bude riešené použitím záchranných bronchodilatancií, ktoré majú okamžitý účinok a podobným spôsobom sa používajú v klinickej praxi. Pri prejavoch bolestivosti vyjadrených human endpoint score 10 a viac (maximálne však 14) podáme analgetiká. U morčiat ako spoločenských zvierat bude zabezpečené skupinové usporiadanie v klietkach, zachované pôvodné rozdelenie do skupín a povolené budú úkrytové hračky ako obohacujúci parameter.

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

Vyvolanie chronického alergického zápalu dýchacích ciest a remodelačných zmien vyžaduje opakované podávanie alergénu intraperitoneálnou a subkutánnou injekciou a opakovaným vdychovaním tejto látky. Je preto možné, že zvieratá budú počas podávania injekcií pociťovať krátkodobú bolesť, prípadne prechodný diskomfort a nepohodlie. Pociťovanie diskomfortu a krátkodobého nepohodlia je možné aj pri inhalačnom podaní alergénu. Tento alergén vyvoláva u zvierat príznaky podobné ľudskej bronchiálnej astme s epizódami krátkodobej dýchavičnosti. S výnimkou kontrolných senzitivizovaných zvierat bez špecifickej medikácie bude všetkým ostatným senzitivizovaným skupinám podávané liečivo, ktoré sa v klinickej praxi bežne používa na prevenciu týchto záchvatov (pozitívne kontrolné skupiny zvierat) alebo liečivo, ktorého mechanizmus účinku sa spája s ovplyvnením aktivity Rho kináz a prípušných iónových kanálov. Početné literárne zdroje však naznačujú, že uvedené „experimentálne“ liečivá by mali viesť k podobnému účinku ako bežne používané antiastmatiká, t.j. potlačeniu vzniku prechodnej dýchavičnosti. Na základe uvedeného tieto postupy a stav zvierat z hľadiska krutosti označujeme ako **strednú krutosť**. Krátkodobé vystavenie zvierat účinku látok vyvolávajúcich bronchokonstrikciu a kašeľ tiež pre zvieratá predstavuje istý diskomfort a nepohodlie a preto postupy z hľadiska krutosti hodnotíme **stredne** kruté. Keďže projekt je naplánovaný tak, že takmer u všetkých skupín zvierat budú vykonané viaceré manipulácie charakterizované strednou krutosťou, celkovo hodnotíme stupeň krutosti postupov vykonávaných na zvieratách ako **stredne** krutý.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Charakteristika postupu	Úroveň krutosti
Váženie zvierat	slabá
Opakovaná s.c., i.p. a inhalačná aplikácia látok	stredná
Vyvolanie stavu podobného ľudskej astme opakovaným podaním ovalbumínu	stredná

s.c. podanie LPS	slabá
Usmrtenie dislokáciou krčných stavcov v anestézii	bez možnosti zotavenia
Umiestnenie zvierat'a do bodypletyzmografu	slabá
Inhalácia tusigénnych, resp. bronchokonstrikčných látok v bodypletyzmografe	slabá
Vyvolanie krátkodobej bronchokonstrikcie histamínom a metacholínom	stredná
Vyvolanie krátkodobej epizódy kašľa miernej až strednej intenzity	stredná

Predpokladaná celková úroveň krutosti: stredná

Human endpoint: nastane v prípade zhoršeného zdravotného stavu zvierat'a, ktorý sa bude hodnotiť špecifickým dotazníkom vtedy, ak počet bodov v ňom narátaných bude 15 a viac. Postup bude ukončený a pod dohľadom veterinárneho lekára zvieratá usmrtené.

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

2345-3/2020-220

Netechnické zhrnutie projektu**Názov projektu:** Mechanizmy postnatálneho vývinu a diferenciácie neuronálnych buniek**Kľúčové slová:** oxytocín, vývin, mozog**Účel projektu:** Základný výskum**Cieľ projektu:**

Hlavným cieľom projektu je vykonať in vivo a in vitro štúdie, počas ktorých bude podaný oxytocín a budeme sledovať tvorbu neuronálnych buniek a ich typy. Dôraz bude kladený na identifikáciu a analýzu expresie markerov glutamátergických, GABAergických dopamínergických a acetylcholínových neurónov. Zároveň vykonáme in vitro štúdie, v ktorých izolujeme primárne neuronálne kultúry hipokampu a hypotalamu a v odpovedi na podanie viacerých koncentrácií oxytocínu budeme sledovať zmeny tvaru neurónov v závislosti od toho o aký typ neurónu ide.

Prínos projektu:

Štúdium vzťahu oxytocínu a diferenciácie neuronálnych buniek má viacero potenciálnych výstupov. Učíme typy, tvar a množstvo neuronálnych buniek vo viacerých štádiách vývinu. Znalosť zmien novovytvorených neurónov a ich typov vytvára predpoklady na pochopenie vývinových porúch, ku ktorým dochádza u ľudí. Vizualizovať markery glutamátergických, GABAergických dopamínergických a acetylcholínových neurónov po podaní oxytocínu vo viacerých oblastiach mozgu, čo nám poskytne pohľad o citlivosti a funkčnom význame jednotlivých populácií buniek. Experimentálne prístupy s použitím fluorescenčných prób a ich prekrytie s cytoskeletovými parametrami sú modernými a originálnymi prístupmi vo výskume funkcie nervového tkaniva. Za podstatné v tejto súvislosti možno považovať aj imunocytochemické hodnotenie morfológie primárnych neuronálnych buniek in vitro, ktorým vieme detegovať zmeny tvaru a rastu neurónov.

Počet a druh použitých zvierat: 60 gravidných samíc a cca 600 novonarodených mláďat, potkan, Wistar**Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:**

Nepredpokladáme nepriaznivý vplyv podávaných látok na použité zvieratá vzhľadom na krátkodobosť a použitú dávku oxytocínu a BrdU.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Stredná

Súlad s požiadavkami „3R“**Nahradenie**

Na výskum skorých vývinových štádií mozgu cicavcov nie je možné využiť nižších živočíchov, alebo odlišné experimentálne modely. Nami plánované experimenty nie je možné vykonávať na imortalizovaných líniách neurónov.

Obmedzenie:

Projekt je optimalizovaný z hľadiska počtu použitých zvierat na dosiahnutie maximálneho výťažku a štatisticky relevantných výsledkov. Maximálny počet odobratých tkanív a izolácií počas 3 rokov je 600. Plánovaný počet jedincov na celé obdobie trvania projektu (3 roky) je 60 gravidných samíc (20 samíc ročne) a odhadom 600 mláďat (približne 200 mláďat ročne). Výsledky z experimentov budeme priebežne vyhodnocovať, a ak to budem možné, ukončíme projekt pred vyčerpaním plánovaného maximálneho počtu zvierat. Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Ak získame štatisticky významné dáta z menšieho počtu zvierat, nebude potrebné použiť celkový plánovaný počet.

Zjemnenie:

Všetky experimentálne procedúry budú uskutočňované tak, aby zvieratá čo najmenej strádali. Gravidné samice budú chované v klietkach individuálne za prísunu peletovanej stravy a vody ad libitum, čo im umožní plne realizovať prirodzené formy správania. Máme vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizáciu zvierat počas injekčných aplikácií. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. V prípade potreby bude vykonané humánne ukončenie postupu.

Spätné posúdenie projektu:

Nie

Netechnické zhrnutie projektu: 2519/2020-220

Názov projektu: VZŤAHY CENTRÁLNEJ REGULÁCIE KAŠĽA A DÝCHANIA

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

kašeľ, centrálna regulácia, reflexy dýchacích ciest, dýchanie

Účel projektu*: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

- 1) zistiť efekty neurónovej excitácie a inhibície vo vymedzených oblastiach ventrálnej respiračnej skupiny (VRG) na dýchanie a kašeľ, prípadne iné reflexné odpovede z respiračného traktu,
- 2) preskúmať možné excitačné a inhibičné neurónové mechanizmy vo vybraných oblastiach VRG zapojených do regulácie dýchania a obranných reflexných odpovedí z respiračného traktu,
- 3) zhrnúť poznatky o spoločných a diferenciálnych efektoch centrálnej regulácie dýchania a kašľa vo VRG vrátane možných vplyvov anestézy, decerebrácie a rozličnej modality stimulácie kašľa (indukovaný mechanicky vs. chemicky)

Prínos z vykonaného projektu:

V originálnych postupoch získame dôležité poznatky o regulácii kašľa a obranných mechanizmov respiračného traktu na úrovni mozgového kmeňa, najmä vo vzťahu k dýchaniu. Základom účinného ovplyvnenia kašľa je selektivita, t.j. jeho modulácia bez výrazných zmien v regulácii a funkcii dýchania a na to je nutné dostatočne poznať centrálnu riadenie týchto motorických dejov. Preskúmajú sa taktiež efekty aplikácie látok ovplyvňujúcich neuróny (excitácia a inhibícia) a porovnávajú sa efekty na kašeľ pri rozličnej modalite stimulov. Výsledky budú základom pre klinické štúdie na zlepšenie „manažmentu“ respiračnej obrany u pacientov.

Predpokladané prínosy :

Nové poznatky o regulácii pokojného dýchania, kašľa, prehltania atď. najmä v cieľových oblastiach mozgového kmeňa so zameraním na VRG a diferenciálne efekty na kašeľ vs. dýchanie.

Objasnenie účinku a mechanizmov niektorých neuromodulátorov.

Zistenie rozdielov v mechanizmoch obrany respiračného traktu iniciovaných rozličnými typmi stimulov.

Predikcia vplyvu lézií a nesprávnej funkcie v centrálnych oblastiach zodpovedných za tvorbu dychového vzoru a reflexných odpovedí z dýchacích ciest.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Králik domáci – maximálne 25 jedincov

Mačka domáca – maximálne 50 jedincov

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

Postupy s anestézovanými zvieratami sú terminálne v náležitej úrovni anestézie s uplatnením správneho monitorovania jedinca (vitálne funkcie, v prípade potreby respiračná podpora, normotermia, lokálne anestetiká atď.) a prevenciu akéhokoľvek vnímania bolesti a diskomfortu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Anestézované jedince – bez možnosti zotavenia

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Komplexné neurónové funkcie a odpovede organizmu sa dajú študovať len na živom jedincovi alebo obmedzene s použitím modelových a simulačných techník. Počítačové modelovanie však stále závisí od experimentálnych údajov. Keďže pre komplexné reflexné odpovede z respiračného traktu je zapojený prakticky celý organizmus, nie sú metódy práce s izolovaným orgánom, tkanivom, či jednotlivou bunkou bez zahrnutia celého jedinca aplikovateľné.

Mačka domáca a králik domáci sú vhodné laboratórne zvieratá, ktoré sa dlhodobo využívajú v experimentálnych štúdiách obranných reflexov dýchacích ciest. Centrálné a neuro-mediátorové mechanizmy reflexných dejov, ktoré budú študované sú najlepšie preskúmané u týchto druhov. Tieto taktiež predstavujú najlepšiu variantu pre transláciu výsledkov na človeka. Neexistujú alternatívne druhy (s výnimkou morčat'a avšak vo veľmi obmedzenej miere), pretože „nižšie“ druhy laboratórnych zvierat (myš, potkan) nemajú vyvinutý kašľový reflex a manipulácia s nimi ako aj uskutočniteľný protokol je limitovaná ich stabilitou, odolnosťou a veľkosťou.

2. Redukcia počtu zvierat:

Na splnenie našich početných cieľov predpokladáme vykonať počas 40 mesiacov asi 20 protokolov v 4 sériách. Postupy budú vykonané na najnižšom počte jedincov tak, aby bol výsledok postupu štatisticky hodnotiteľný a dáta získané z postupu relevantné. Mnohoročný experimentálny výskum potvrdzuje nutnosť zahrnúť do jednej série 6 až 8 (výnimočne 10) jedincov v závislosti od druhu zvierat'a, typu experimentu a variability získaných dát. Efektívnosť využitia jedinca je znížená nutnosťou vykonať kontrolné testy a tým, že je postup u anestézovaného a decerebrovaného jedinca terminálny. Zvýšenie efektívnosti bude dosiahnuté: 1) vykonaním viacerých nekolidujúcich protokolov na jednom jedincovi (ak je to možné najmä u mačky), 2) priebežným hodnotením výsledkov so sledovaním úrovne štatistickej významnosti sledovaných parametrov, 3) využitím skúseností, postupov a dát (najmä kontrolných) z predchádzajúcich postupov, a tým súvisiace optimálne plánovanie postupov.

3. Zjemnenie:

Mačka je druh mnoho desaťročí využívaný v neurologickom výskume, odolný, dobre monitorovateľný. Značné množstvo dát o neurónových funkciách pri dýchaní, adaptačných odpovediach, pri kašli, kýchaní, prehltaní atď. uľahčujú plánovanie, hodnotenie aj interpretáciu. Všetky predpokladané skúmané deje sú u mačky dobre vyvolateľné.

Králik je druh menej odolný v experimente a ťažšie monitorovateľný. Poznatky o dýchaní a reflexných dejoch u tohto druhu však taktiež vyhovujú predmetu nášho výskumu. Všetky skúmané deje sú u králikov vyvolateľné, najmä reflex kýchania. Existujú zaujímavé a dôležité rozdiely v centrálnej regulácii voči mačke, takže niektoré postupy je potrebné potvrdiť aj s využitím tohto experimentálneho modelu.

Stres jedincov sa minimalizuje ich sedáciou a anestézovaním priamo vo zverinci (bez podnetov súvisiacich s manipuláciou a prepravou). Pred podaním anestetika sa zvieratá premedikujú podaním diazepamu, rovnako ako pacienti pred operáciou, čo zabezpečí hladší priebeh úvodu do anestézie a minimalizuje sa stres, ktorý by mohol vzniknúť pri podaní anestetika. Uplatňujú sa všetky postupy na optimálny monitoring funkcií a parametrov jedinca. Po ukončení postupu sú zvieratá humánne usmrtené predávkovaním anestetika.

Humane endpoints:

Počas postupu je zviera v celkovej anestézii a má plne monitorované vitálne funkcie. V tejto fáze sa postup predčasne ukončí ak nie sme schopní úspešnej resuscitácie a korekcie: straty dráždivosti dýchacích ciest, straty odpovedí na kontrolné podnety (test úrovne anestézie), neschopnosti vyvolať reflexné odpovede, masívneho krvácania, kardiálneho zlyhania (a dlhotrvajúceho nebezpečného poklesu tlaku krvi), respiračného zlyhania, nebezpečných zmien biochemických parametrov krvi (napr. extrémna acidóza). Počas pobytu vo zverinci nastane v prípade najmenej 5 prejavov zlého zdravotného stavu: malátnosť, dehydratácia, neschopnosť prijať vodu a potravu, strata hmotnosti $\geq 20\%$, agonálne dýchanie (gasping), kardiovaskulárne problémy (značný poklesom krvného tlaku, tmavá farba slizníc znamenajúca hypoxiu tkanív atď.).

Hodnotiace skóre zdravotného stavu zvierat

Bodové skóre	Charakter zdravotného stavu	Opatrenie
1	Dobrý fyziologický stav	
2	Mierne zhoršený stav	Zváženie doplnkovej starostlivosti, častejšia kontrola zvierat'a
3	Zhoršený zdravotný stav	Prítomnosť 3 prejavov zhoršeného zdravotného stavu. Častejšia kontrola zvierat'a, doplnková starostlivosť (analgetiká, pridanie tekutín, zvýšenie tepla)
4	Zlý zdravotný stav	Prítomnosť 4 prejavov zhoršeného zdravotného stavu. Porada s veterinárom a aplikácia jeho návrhov.
5	Nepriaznivý zdravotný stav	Prítomnosť 5 a viac prejavov zhoršeného zdravotného stavu (humane endpoint). Vyradenie zvierat'a z postupu a humánne usmrtenie.

Sledované parametre v hodnotiacom procese:

- celkový vzhľad zvieraťa:
 - telesný stav (prírastok / úbytok hmotnosti)
 - stav srsti / kože (čistenie, pilorekcia, kožné lézie, hydratácia kože)
 - prítomnosť výtoku (oči, uši, nos, urogenitálny systém)
 - vzhľad očí (zatvorené, polozatvorené, zakalenie) a slizníc
 - spôsob pohybu a stav pohybového aparátu (pokrivkavanie, nakláňanie, krúženie, stereotypné držanie tela)
- telesné funkcie zvieraťa:
 - príjem potravy a vody
 - respiračný systém (zrýchlené, ťažké, lapavé dýchanie a iné zvuky)
 - vyprázdňovanie a močenie
- sociálne interakcie zvieraťa:
 - hypo/heperaktivita, bojazlivé / agresívne interakcie, zreteľné únikové reakcie, skrývanie sa
- chovné prostredie
 - znečistenie podstielky, stolica a jej hustota, prítomnosť vývratkov, krvi
- voľné pozorovania:
 - iné neobvyklé pozorovania, znaky bolesti a utrpenia – výraz tváre (nos, uši, fúzy)

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Vzhľadom na to, že ide o projekt, ktorý je v kategórii „bez možnosti zotavenia“, podľa § 37 ods. 3 nariadenia vlády č. 377/2012 Z. z. projekt nebude podliehať spätnému posúdeniu.