

Netechnické zhrnutie projektu. 2944-3/2020-220

Názov projektu: Patogenéza a imunológia Rickettsií, *Coxiella burnetii*, Chlamýdií a im podobných mikroorganizmov.

Kľúčové slová: vnútrobunkové baktérie, epitopy, protilátky

Účel projektu:

1. Základný výskum a
2. Vysokoškolské, odborné vzdelávanie,

Cieľ projektu:

Cieľom projektu je štúdium patogenézy - izolácia, množenie a oživovanie Rickettsií, *Coxiella burnetii*, chlamýdií a im príbuzných mikroorganizmov na laboratórnych zvieratách. Pokúsime sa získať hlbšie poznatky o pôsobení nami sledovaných patogénov (*Rickettsia* spp., *Coxiella* spp. a Chlamýdia spp.) v živom organizme, ako aj rozšíriť naše vedomosti o imunitnej odpovedi infikovaných zvierat (myši, morčiat či králikov). Aplikácia sérologických (ELISA, IFA), molekulárne biologických (PCR) a biochemických metód, použitá na spracovanie získaných orgánov a krvi, nám umožní prehĺbiť doterajšie poznatky o vzniku a priebehu ochorení, ktoré uvedené baktérie spôsobujú.

Prínos projektu:

Vedecký prínos projekt spočíva v možnosti odhalenia dominantných, imunologicky aktívnych epitopov. Určenie antigenicity proteínových alebo iných stavebných zložiek bakteriálnych buniek nám môže dať príležitosť na zlepšenie diagnostiky a liečby rickettsiôz, koxielôz alebo chlamýdiových ochorení. Bez aplikácie živých zvierat v pokusoch nie je možné odhaliť imunologicky aktívne miesta ani prípadné mutácie, ktoré v inkriminovaných zložkách nastávajú. Príprava vhodných diagnostických preparátov je tiež základom tvorby budúcich vakcín.

Počet a druh použitých zvierat:

Myš laboratórna Balb/c, samice	420 ks	
Myš laboratórna C3H/N, samice	420 ks	
Králik domáci (samce aj samice)	60 ks	
Morča kmeň TRIK alebo Dunkin Hartley (samce aj samice)	30 ks	

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

Počas tetovania, aplikácie bakteriálnych suspenzií – subkutánnej, intraperitoneálnej a intravenózne, a aplikácie anestetika budú zvieratá prežívať len miernu nepohodu. Niektorým zvieratám sa bude odoberať krv z chvostovej žily v anestézii. Maximálne odobraté množstvo krvi bude 200 mikrolitrov. Krv bude odoberaná 1x týždenne, takže by nemalo dochádzať k výraznej ujme.

Nakoľko budú myši a králiky nakazené baktériami európskeho pôvodu, ktoré sa vyskytujú v našej prírode, nepredpokladáme, že pre ne bude priebeh infekcie zaťažujúci. Navyše dávky baktérií sú stanovené tak, aby nespôsobili závažné ochorenie zvierat. Nepredpokladá sa nutnosť aplikácie prípravkov na tlmenie bolesti.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie:

Pre plánované postupy neexistujú alternatívne metódy. Zvieratá nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov. Experimentom na zvieratách predchádzajú štúdie v *in vitro* podmienkach. Imunologickú odpoveď živého organizmu na pôsobenie baktérií nie je možné sledovať v *in vitro* systémoch. Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v rôznych orgánoch, napr. v mozgu, nie možné nahradiť poznatky získané zo živého, mozgového tkaniva animálnych modelov, poznatkami získanými z *in vitro* experimentov. Výskum spracovania a šírenia informácií v neurónoch a v neurónových sieťach mozgu je možné uskutočňovať iba v pokusných zvieratách.

Obmedzenie:

Plánovaný počet zvierat je maximálny a je v ňom zahrnutý nevyhnutný počet opakovaní. 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. Opätovné použitie zvierat použitých na izoláciu, množenie a oživovanie mikrobiálnych patogénov nie je možné avšak, využijeme jednu kontrolnú skupinu pre viacero experimentálnych pokusov.

Zjemnenie:

Myši, morčatá aj králiky budú počas celého pokusu držané v štandardných podmienkach schváleného zariadenia. Máme vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizáciu zvierat počas injekčných aplikácií. Zvieratám bude zabezpečená štandardná starostlivosť, ktorú bude vykonávať školený personál - pracovníci pokusného zariadenia. Denne sa bude vykonávať kontrola zdravotného stavu zvierat. Ani v jednom štádiu pokusu nebudú mať zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prísun potravy a vody. Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. V prípade potreby bude vykonané humánne ukončenie postupu.

Zvieratá budú mať prostredie obohatené o okusovadlá a papierové tunely (myši, morčatá); loptičky plnené senom, drevené okusovadlá, vitamínové tyčinky a minerálnu soľ (králiky).

Spätné posúdenie projektu:

Projekt nebude podliehať opätovnému posudzovaniu.

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

NÁZOV PROJEKTU:

STANOVENIE AKÚTNEJ ORÁLNEJ TOXICITY OECD TG 423

ČÍSLO KONANIA ROZHODNUTIA O SCHVÁLENÍ PROJEKTU: 3198/2020-220

Č.k. Ro 4682/19-221/3

KLÚČOVÉ SLOVÁ:

acute oral toxicity, rat

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 jednorazovom podaní látky a odhaliť potenciálne negatívne vplyvy podľa metódy OECD 423.

OČAKÁVANÝ VÝSLEDOK:

Projekt poskytne informácie, ktoré sú v tomto teste z hľadiska platnej legislatívy REACH pre látky produkované v množstve do 10 ton/rok požadované. Pokusná a pozorovacia stratégia sú dané metodickým postupom OECD 423, ktorý je na princípe postupného postup s použitím 3 zvierat jedného pohlavia v jednom kroku. V závislosti od úmrtnosti alebo moribundného stavu zvierat môžu byť potrebné priemerne 2 až 4 kroky, aby bolo možné posúdiť akútnu toxicitu testovanej látky. Tento postup je reprodukovateľný, s použitím malého počtu zvierat a je schopný hodnotiť látky podobným spôsobom ako iné metódy testovania akútnej toxicity (OECD 420 a 425). Prínosom tejto štúdie bude včasné rozpoznanie toxicity skúšaných látok a zabránenie negatívnych vplyvov na organizmus.

DRUHY POUŽITÝCH ZVIERAT A ICH POČTY

Potkany kmeňa Wistar

180 samíc, 60 samcov / na 20 testovaných látok

Chemické látky budú konkretizované v „Oznámení o začatí projektu“).

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
Jednorazová perorálna aplikácia testovanej látky	Mierny stres, bolesť slabá	slabá
Možná systémová reakcia	Mierna až silná bolesť	slabá - krutá
Celková doba pozorovania	Mierny stres, bolesť slabá	slabá
Usmrtenie predávkovaním anestetika	Mierny stres	stredná
Celkové hodnotenie krutosti skúšky: stredná - krutá		

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

V projekte budú zohľadňované zásady 3R.

Refinement – pokus je zameraný na zistenie nežiaducich účinkov testovaných látok.

Použitie látok zmierňujúcich bolesť by mohlo ovplyvniť výsledky pokusu. V prípade bolesti, alebo utrpenia (OECD Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoint for Experimental Animals Used in Safety Evaluation) budú zvieratá humánne utratené

Reduction - počty zvierat v pokuse sú primerané a redukované v maximálnej miere, ďalšie zníženie by mohlo ovplyvniť validitu pokusu

Replacement - po preskúmaní databáz pre stanovenie toxicity po jednorazovom podaní sme nenašli zodpovedajúcu alternatívnu metódu

Vyžaduje sa spätné posúdenie projektu.

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Dôsledky nedostatku alebo nadbytku aldosterónu počas ontogenézy na vývin správania a neuroendokrinných regulácií

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2876-3/2020-220

Kľúčové slová v projekte:

aldosterón, hypoaldosteronizmus, hyperaldosteronizmus, stres, ontogenéza

Účel projektu:

základný biomedicínsky výskum

Cieľ projektu:

V predchádzajúcich štúdiách bolo preukázané, že počas obdobia ontogenézy je dôležitejším stresovým hormónom mineralokortikoid aldosterón než glukokortikoid kortikosterón. Výsledky viacerých experimentov potvrdili, že aldosterón môže byť zodpovedný aj za zmeny správania a môže u zvierat vyvolať správanie podobné úzkosti alebo depresii. Z toho dôvodu predpokladáme, že zníženie alebo zvýšenie hladín aldosterónu bude mať pozitívny resp. negatívny vplyv na behaviorálne a neurovývinové ukazovatele u mláďat v období ontogenézy. V predkladanom projekte budeme u potkanov ovplyvňovať koncentrácie stresového hormónu aldosterónu, prostredníctvom modelov hypoaldosteronizmu a hyperaldosteronizmu. Hlavným cieľom projektu je zistiť, ako ovplyvňuje aldosterón správanie a iné neurovývinové ukazovatele u mláďat potkana. Nosnými postupmi v predkladanom projekte budú nasledovné metódy: (1) mláďatá potkana kmeňa Sprague-Dawley, (2) farmakologický model hypoaldosteronizmu, (3) farmakologický model hyperaldosteronizmu, (4) behaviorálne testy na hodnotenie úzkostného správania a kognitívneho výkonu a (5) akútny stresový podnet.

Prínos z vykonaného projektu:

Ide o základný výskum, ktorý môže byť následne využitý ako východisko pre klinický výskum. Výsledky predchádzajúcich štúdií poukázali na význam aldosterónu v stresovej odpovedi organizmu počas ontogenézy. Očakávame zmeny v správaní a neuroendokrinnej stresovej odpovedi u mláďat, ktoré sú vystavené zmeneným koncentráciám aldosterónu v organizme počas ontogenézy. Rozšírenie poznatkov o endokrinných zmenách v priebehu ontogenézy prispeje k novým možnostiam farmakoterapie psychických porúch, ktoré sú asociované so stresom.

Počet a druh použitých zvierat:

V projekte bude použitých 30 gravidných samíc potkanov kmeňa Sprague-Dawley (AnLab, Praha, Česká republika) v 14. dni gravidity. Následne do experimentálnych postupov bude zaradených 240 mláďat (120 samcov a 120 samíc) vo veku 3 dni po narodení. V pilotných štúdiách 1 a 2 budú zvieratá rozdelené do troch skupín po 8 jedincoch v závislosti od podávania

vybranej látky (Treatment1 samce + samice – látka podávaná jedenkrát denne; Treatment2 samce + samice – látka podávaná dvakrát denne; Placebo samce + samice – podávané jedenkrát denne). Zvieratá v Experimentálnej štúdii 1 budú rozdelené do štyroch skupín po 24 jedincoch v závislosti od podávanej látky a pohlavia (hypoadosteronizmus-samce, hypoadosteronizmus-samice, placebo-samce a placebo-samice). Zvieratá v Experimentálnej štúdii 2 budú rozdelené do štyroch skupín po 24 jedincoch v závislosti od podávanej látky a pohlavia (hyperadosteronizmus-samce, hyperadosteronizmus-samice, placebo-samce a placebo-samice).

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

Zvieratá až do začatia experimentálneho postupu nebudú vystavené žiadnym nepriaznivým vplyvom. Farmaká sa budú zvieratám podávať vo forme intraperitoneálnej injekcie **jedenkrát denne**, čo predstavuje slabú krutosť **alebo dvakrát denne**, čo spadá do kategórie krutosti **stredné**. Mláďatá budú počas podávania umiestnené na vyhrievaciu podložku. Na základe predchádzajúcich experimentov neočakávame v súvislosti s podávaným typom liečiv žiadny nepriaznivý vplyv/ujmu na zvieratách. Zvieratám v skupine placebo bude v priebehu experimentu intraperitoneálne podávaný fyziologický roztok (štúdia 1) alebo 1% roztok etanolu (štúdia 2). Zvieratá v skupinách placebo a v experimentálnych skupinách budú vážené a behaviorálne testované. Test otvoreného poľa, test vyvýšeného plusového bludiska a test rozpoznávania nového objektu môže u zvierat vyvolať krátkodobú úzkosť a stres. Z dôvodu možných zmien v citlivosti pre soľ, bude u zvierat vykonaný test preferencie soli. V prípade testu preferencie soli neočakávame žiadnu ujmu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Krutosť postupov vykonávaných v projekte klasifikujeme ako „**stredné**“, vzhľadom na skutočnosť, že **opakované podávanie farmák spadá do kategórie krutosti stredné**.

Uplatňovanie zásad “3R”:

Nahradenie zvierat:

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov. V biomedicínskom výskume, rovnako teda aj výskume psychických porúch a behaviorálnych zmien, je zatiaľ použitie laboratórneho potkana nevyhnutné a nenahradiiteľné.

Redukcia počtu zvierat:

V postupoch je zabezpečený optimálny počet experimentálnych zvierat na základe analýzy štatistickej sily. Maximálna využiteľnosť a vyťaženosť bude zabezpečená tým, že

optimalizujeme počet meraní a maximalizujeme počet odobraných vzoriek na sledovanie behaviorálnych, fyziologických, a biochemických parametrov. Znižovanie počtov by ovplyvnilo validitu dosiahnutých výsledkov.

Zjemnenie:

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Zvieratám sa počas experimentálnych postupov bude zvyšovať alebo znižovať koncentrácia aldosterónu v organizme, čím dochádza k zmene ich zdravotného stavu. Zároveň sa bude so zvieratami manipulovať v behaviorálnych testoch, čo môže mať na zvieratá mierne stresový vplyv. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. U zvierat vykazujúcich akékoľvek zhoršenie stavu v dôsledku stresu pristúpime k humánnemu ukončeniu postupu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno ☒nie

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

2994-3/2020-220

Testovanie imunitnej odpovede indukovanej peptidmi derivovanými z glykoproteínu S koronavírusu SARS-CoV 2

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): koronavírus, povrchový glykoproteín S, bunková a humorálna imunitná odpoveď

Účel projektu: Základný výskum

Ciele projektu:

V predchádzajúcom projekte zameranom na mapovanie imunogenicity glykoproteínu S koronavírusu SARS-CoV 2 sme na povrchu glykoproteínu S identifikovali niekoľko epitopov, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu pri vstupe vírusu do bunky. V snahe poskytnúť efektívnu ochranu pred novým koronavírusom je potrebné zacieliť terapiu na tieto epitopy. Inhibícia týchto úsekov protilátkami indukovanými peptidmi by mohla byť jedným z terapeutických prístupov v boji s koronavírusom. Vzhľadom na komplexnosť problematiky koronavírusu predpokladáme, že blokovanie viacerých epitopov môže viesť k účinnej terapii. Cieľom predkladaného projektu je otestovať na zvieratách kombinácie vybraných peptidov nesúcich kľúčové epitopy a analyzovať imunitnú odpoveď na jednotlivé kombinácie peptidov.

Prínos z vykonaného projektu:

Získané výsledky by mohli odhaliť efektívnu kombináciu epitopov ktorých blokovanie indukovanými protilátkami by mohlo byť jedným z terapeutických prístupov v boji s koronavírusom.

Druhy a počty použitých zvierat v pokuse:

Celkovo bude použitých 100 samíc myší C57BL/6NCrl (vo veku približne 6 týždňov).

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

Nepredpokladáme nepriaznivý vplyv imunizácie na zvieratá, keďže budeme podávať krátke syntetické peptidy konjugované na nosič. Zvieratám bude 4x subkutánne aplikovaný testovaný antigén, 10 dní po poslednej dávke im bude odobratá krv v miernej sedácii z retroorbitálneho plexu s cieľom stanoviť imunitnú odpoveď, t.j. stupeň špecifickej protilátkovej odpovede indukovanej jednotlivými kombináciami peptidov. Na konci experimentu budú zvieratá humane usmrtené v celkovej anestézii vykrvením, s následným odberom sleziny, kde budeme analyzovať bunkový typ imunitnej odpovede.

Zvieratá po injekcii antigénu a tiež pri odbere krvi sú monitorované a v prípade neadekvátnej reakcie ako napr. 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 alopecie,...)	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 humánne usmrtené.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Váženie zvierat – slabá

Značenie zvierat tetovaním – stredná

Krátkodobá fixácia, subkutánna injekcia/opakovaná 4x (0,1,2 a 12 mesiacov) – stredná

Stav zvierat počas obdobia prežívania- slabá až stredná

Odber krvi (retroorbitálny plexus) v miernej sedácii – stredná

Usmrtenie v anestézii vykrvením - slabá

Zohľadnenie 3R:

Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné ŠPP. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Počet zvierat v chovnej nádobe zohľadňuje normy dané zákonom. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám. Starostlivosť o zvieratá zabezpečujú osoby, na ktoré si zvieratá zvykli. Vo zverinci 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.

Bezprostredne po aplikácii môžeme u niektorých jedincov pozorovať miernu apatiu alebo naopak zvýšenú aktivitu, ktorá odznie v priebehu pár minút. Pri pretrvávajúcich príznakoch (triaška), zviera oddelíme a umiestnime na výhrevnú podložku až do zotavenia. Zvieratá sú pravidelne monitorované a hodnotené na základe bodového skóre, v prípade pretrvávajúcej neadekvátnej reakcie sa upovedomí veterinárny lekár a vedúci experimentu a po posúdení zdravotného stavu sa rozhodne o human end point.

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere. V jednotlivých skupinách bude maximálne 10 zvierat. Počet zvierat zohľadňuje variabilitu imunitnej odpovede.

Nahradenie:

Analýzu imunitnej odpovede po imunizácii zvierat nie je tieto možné nahradiť in vitro systémami.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

Nenašli sme žiadnu alternatívnu metódu, ktorú by sme mohli použiť vo svojom projekte, aby sme nemuseli vykonávať experimenty na zvieratách.

Utrpenie versus prínos

Začiatkom roka 2020 sa rozšíril nový koronavírus z Číny do celého sveta a spôsobil tak celosvetovú pandémiu. K dňu 4. 4. 2020 bolo zaznamenaných 1 133 969 pozitívnych prípadov spôsobených týmto vírusom a infekcii podľahlo 60 409 osôb. Snahou vedeckej komunity je lepšie

Príloha 2: Netechnické zhrnutie

porozumieť tomuto novému vírusu, získať kontrolu nad jeho šírením, zacieliť terapiu na kľúčové epitopy a poskytnúť tak efektívnu ochranu pred týmto novým koronavírusom. Vzhľadom k súčasnému stavu je prínos projektu nad utrpenie zvierat. Utrpenie/ stres zvierat sa snažíme v projekte znížiť na najnižšiu možnú mieru. Subkutánna aplikácia imunogénu trvá niekoľko sekúnd. Odber krvi trvá maximálne jednu minútu a vykonáva sa na sedovaných zvieratách. Experiment sa ukončí vykrvením zvierat v celkovej anestézii a následným odobratím sleziny.

Začiatok pokusu je plánovaný na 7.9.2020 a bude sa realizovať do konca roka, tj. do 30.11.2021.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

V projekte nebudú použité GMO zvieratá.

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

Príloha č. 2 : 2908-3/2020-220

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

Názov projektu:

Vplyv kombinácie rôznych chitosanov a hyaluronanu sodného s rôznymi antioxidantami na hojací proces ischemických rán králikov

Kľúčové slová v projekte: ischemická rana, králik, chitosan, hyaluronan, antioxidanty

a) Informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, počte a typoch zvierat.

Cieľom projektu je zistiť a porovnať vplyv liečby membránami obsahujúcimi živočíšny, resp. rastlinný chitosan (CH), hyaluronan sodný (HA) spolu s antioxidantom (edaravone, laponit, glukomanan, koloidné striebro, karbonové mikrovlákná) na proces hojenia ischemických rán u králikov.

Prínosom bude vývoj nových a bezpečných zdravotníckych prostriedkov z účinných látok farmakologicky využiteľných v liečbe ľudí na hojenie ischemických rán. Navyše sa získajú nové originálne poznatky o účinku testovaných látok v kombinovanej liečbe ťažko sa hojajúcich vulnusov u králikov.

Prínos projektu výrazne prevyšuje **ujmu** u experimentálnych králikov pri získavaní poznatkov v navrhovanom modeli ischemickej rany i z hľadiska bezpečnosti budúceho zdravotného prostriedku pre človeka.

Predpokladaná **ujma** na použitých zvieratách sa môže prejaviť čiastočným krátkodobým diskomfortom pri nadobúdaní vedomia po anestézii od ukončenia operačného zákroku a pri preväzovaní rán. Takisto v prvých dvoch dňoch po operácii, kedy sa hojí incízne poranenie kože pod sterilným obväzovým krytím. Zvieratá budú pravdepodobne viac odpočívať, menej sa aktívne pohybovať a prijímať potravu. Počas všetkých úkonov sa bude eliminovať stres a utrpenie podaním čiastočnej, resp. celkovej anestézie a dennou aplikáciou analgetika. V prípade výskytu bolestivých stavov podľa human endpoints sa zviera podrobí humánnej eutanázii.

V projekte sa použije celkom 60 zvierat (dospelé králiky vo veku 15 – 16 týždňov), s telesnou hmotnosťou v rozsahu 2500 – 3000 g. Počet 60 jedincov postačuje pre stanovenie účinnosti testovaných látok na hojenie ischemickej rany a porovnanie ich terapeutických vlastností s negatívnou kontrolou. Zvieratám bude počas celého projektu podávané každý deň krmivo a pitná voda *ad libitum*.

Experimentálny model u králikov sa indukuje vytvorením hypoxického prostredia v ušnici sekciou vybraných ciev s následnou excíziou kožného tkaniva excizionálnych rán. Po 15 dňoch sa budú sledovať zmeny v procese hojenia poškodeného tkaniva. Testované látky sa budú vymieňať každý tretí deň pracovníkom s dlhodobou praxou.

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

Váženie zvierat - slabá

Aplikácia anestézie pred operáciou, pri preväzovaní rán každé 3 dni i.m. - stredná

Denné podávanie analgetika počas 15 dní - stredná

Aplikácia antibiotika prvé 3 dni po operácii - stredná

Pooperačný stav a prežívanie zvierat po operácii počas 15 dní - stredná

Individuálne umiestnenie počas celého projektu v štandardných klietkach pre králikov – slabá
Vyberanie stehov po zákroku v anestézii po 7 dňoch od operácie – stredná
Prevážovanie rán v anestézii každé 3 dni – stredná
Applikácia anestézie pri ukončení experimentu i.m. – slabá

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

Animálny model ischemických rán sa štandardne používa pri sledovaní účinkov potenciálnych látok ovplyvňujúcich proces hojenia. V medzinárodných databázach (ECVAM, NC3R, ALTWEB) sa zisťovali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatívna metóda testovania hojacich vlastností látok na modeli ischemickej rany. Preto sa používa klasická *in vivo* metóda. Králik domáci je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre posúdenie účinkov zdravotníckeho produktu v mieste jeho podania.

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych králikov tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť i validita postupu pre fyzikálne, makroskopicko-morfologické a histologické analýzy, ako aj ich štatistické vyhodnotenie. Zvieratá budú samčieho pohlavia, rovnakého veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom. Päť zvierat v skupine je optimálny počet potrebný pre zistenie terapeutickkej efektivity testovaných látok, porovnanie ich účinkov navzájom a nemôže byť redukovaný. Z dôvodu šetrenia zvierat nebudú zaradené zvieratá v monoterapii, pretože tieto údaje nie sú nutné pre hodnotiaci proces v tomto projekte.

Zásada zjemnenia (refinement)

Zvieratá budú po presunutí z chovného zariadenia v aklimatizácii a počas experimentu po jednom v dostatočne veľkých klietkach (rozmery 60×70×45cm, plocha 4200 cm²) za stanoveného svetelného, tepelného a kŕmneho režimu. Po operačnom zásahu sa ustajnia individuálne, aby sa zamedzilo vytrhnutiu stehov, narušeniu hojaceho procesu i prijímania krmiva. Na zabránenie vzniku pooperačných zápalových reakcií sa použije antibiotikové krytie počas prvých troch dní. Operačné zákroky budú vykonávané skúseným odborným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Králiky počas postupu prežijú výraznejší stres v operačnom a pooperačnom období, ktorý sa bude minimalizovať podaním anestetík a analgetík. So zvieratami sa bude zaobchádzať šetrne a prostredie klietky sa obohatí predmetmi na hru a ohryzovanie. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokéj celkovej anestézii predávkovaním anestetikami (Zoletil+xylazín).

Projekt bude podliehať spätnému posúdeniu projektu: nie

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

Názov projektu: „Biomarkery nutričného a zdravotného statusu hospodárskych zvierat“.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: (VEGA 2/0008/21) 3098/2020-220

Kľúčové slová v projekte: model črevnej absorpcie, minerálny status, fyziológia tráviaceho traktu, suplementácia krmiva

Účel projektu:

Popísaný postup bude vykonaný na účely základného výskumu. Jeho prínosom je určenie vhodných biomarkerov/ukazovateľov nutričného a zdravotného statusu zvierat, ktoré skutočne odrážajú nutričný príjem, nutričný a minerálny status zvierat a biologické účinky kŕmnych aditív používaných v chove hospodárskych zvierat. Nutričné biomarkery sú biochemické, funkčné alebo klinické indikátory biologického stavu zvierat, ktoré odzrkadľujú krátkodobý alebo dlhodobý príjem živín, nutričný status zvierat závislý od absorpcie prijímaného aditíva a jeho metabolizmus/funkcie v organizme. Keďže zdravotný stav, produktivita a welfare zvierat sú vo veľkej miere závislé od funkčnosti ich tráviaceho traktu, zameriame sa predovšetkým na stanovenie gastrointestinálnych biomarkerov. Vhodnosť vybraných biomarkerov otestujeme v experimentoch s cieľenou suplementáciou kŕmív zvierat. Experimenty budú zamerané na zlepšenie minerálneho statusu a optimalizáciu tráviacich procesov hydiny a oviec, ktoré súčasne povedú k redukcii zaťaženia životného prostredia znižovaním metanogenézy a vylučovania ťažkých kovov.

Ciele projektu:

Cieľom projektu je porovnanie priamych a nepriamych techník/metód používaných na posúdenie nutričného statusu u rôznych druhov hospodárskych zvierat a určenie vhodných biomarkerov/ukazovateľov, ktoré budú skutočne odrážať nutričný príjem, nutričný a minerálny status zvierat a metabolizmus kŕmnych aditív v tele zvierat. Porovnávať budeme rôzne modely črevnej absorpcie a fermentácie.

Nutričný status môžeme definovať ako rovnováhu medzi živinami prijatými kŕmivom a nutričnými požiadavkami zvierat alebo populáciou zvierat. Pretože stanovenie nutričného a zdravotného statusu zvierat je vo veľkej miere závislé na funkčnosti ich tráviaceho traktu, budeme sledovať funkčné ukazovatele gastrointestinálnych procesov zvierat. Pre hodnotenie funkčných ukazovateľov GIT, ktorý predstavuje komplex rôznych biologických procesov, je potrebná diagnostika skupiny biomarkerov, ktoré by odzrkadľovali nielen funkčnosť tráviaceho traktu, ale aj celkový zdravotný stav, produktivitu a welfare zvierat. V našom projekte sa zameriame na suplementáciu kŕmív rôznymi zdrojmi minerálnych aditív, ktorá bude zameraná na zlepšenie minerálneho a antioxidačného statusu zvierat, zvyšovanie ich produktivity a optimalizáciu tráviacich procesov s cieľom minimalizovať environmentálnu záťaž. Budeme sledovať vplyv rôznych foriem minerálnych aditív používaných vo výžive hospodárskych zvierat na ich absorpciu z GIT, distribúciu v tkanivách zvierat a živočíšnych produktoch, metabolizmus a ich utilizáciu v tele. Taktiež budeme sledovať ich vplyv na aktivitu

antioxidačných enzýmov a koncentrácie vybraných metaloproteínov, ako nových biomarkerov nutričného a minerálneho statusu zvierat. Pri hodnotení nutričného statusu zvierat budú použité aj inovačné prístupy využívajúce biologické ukazovatele novej generácie vychádzajúce z omických vied a rôzne *in vitro* modely štúdia črevnej absorpcie a fermentácie. Použitím *in vitro* metód minimalizujeme počet zvierat bežne používaných v *in vivo* experimentoch.

Prínos z vykonaného projektu:

Jedná sa o projekt základného výskumu a jeho prínosom je zvýšiť rast ekologicky čistej živočíšnej produkcie na kilogram krmiva, ktorý je zlučiteľný s dobrými životnými podmienkami zvierat a zároveň prispieva k zníženiu klimatického zaťaženia prostredia s cieľom produkovať zdravé potraviny pre človeka. V chove hospodárskych zvierat je dôležitým faktorom pre udržanie/zvyšovanie produkcie a produktivity zvierat, a znižovanie environmentálnej záťaže zo živočíšnej výroby a vysoká utilizácia makro a mikronutrientov v tele zvierat. Treba si uvedomiť, že kvalita živočíšnych produktov je priamym odrazom nutričného príjmu hospodárskych zvierat. Cielenu suplementáciou krmív budeme modulovať vývoj a funkcie GIT a zameriame na zlepšenie ich nutričného, hlavne minerálneho statusu a optimalizáciu tráviacich procesov, ktoré budú súčasne redukovať zaťaženie životného prostredia znižovaním metanogenézy a vylučovania ťažkých kovov. Naše výsledky pomôžu k rozšíreniu doterajších poznatkov o vplyve minerálnych aditív na nutričný, minerálny, antioxidačný status a celkový zdravotný stav zvierat, a zároveň prispedia k dosiahnutiu želaného efektu minimalizovania environmentálneho znečistenia zo živočíšnej výroby. Prínosom budú aj získané poznatky o interakciách jednotlivých komponentov krmiva v gastrointestinálnom trakte rôznych hospodárskych zvierat.

Doposiaľ neexistuje metóda alebo technológia, ktorá by odrážala status skupiny/populácie hospodárskych zvierat v rovnakom čase, pretože požiadavky jednotlivca a jeho status sú individuálne. Vzhľadom na faktory ovplyvňujúce nutričný status zvierat je potrebná diagnostika skupiny biomarkerov, ktoré by odzrkadľovali nielen nutričný a zdravotný stav zvierat, ale aj produktivitu a welfare zvierat. Keďže nutričný a zdravotný status zvierat sú vo veľkej miere závislé na funkčnosti ich tráviaceho traktu, zameriame sa na sledovanie funkčných ukazovateľov gastrointestinálnych procesov u zvierat.

Prínosom bude určenie skupiny biomarkerov novej generácie, ktoré odhalia nielen genetický potenciál zvierat, ale dokážu odzrkadliť aj množstvo a pomer živín prijímaných krmivom, funkčnosť tráviaceho traktu a celkový zdravotný stav hospodárskych zvierat. Rovnako inovatívne je použitie rôznych *in vitro* modelov črevnej absorpcie, čím sa minimalizuje počet zvierat použitých v experimentoch. Získané parametre hodnotenia nutričného stavu budú môcť byť ďalej využívané bežne v praxi pri chove hospodárskych zvierat, na včasnú diagnostiku nutričných nedostatkov vo výžive zvierat alebo metabolických porúch.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Nosnice: Lohmann Brown resp. Isa Brown - počet spolu: 364 jedincov.

Ovca domáca/Zošľachtená Valaška- počet spolu: 6 kastrováných baranov- **opätovné použitie v postupe** zo schváleného pokusu (Ro-3355/16-221)

Ovca domáca/križenec LACAUNE x CIGÁJA x SUFFOLK - počet spolu: 1 baran- **opätovné použitie** zo schváleného pokusu (Ro-3355/16-221)

Pri zohľadnení všetkých potrieb vedeckého výskumu i predpisov stanovených v nariadení vlády 377/2012 Z.z. maximálny počet použitých zvierat za celé obdobie trvania projektu (01.01.2021-31.12.2023) nepresiahne hore uvedený počet zvierat daného druhu, keďže takéto množstvo je postačujúce na zabezpečenie zmysuplného vyhodnotenia získaných výsledkov.

Použitie nosníc a oviec v pripravovanom pokuse je opodstatnené, keďže jedným z hlavných cieľov je sledovanie nutričného a minerálneho statusu monogastrických zvierat a prežúvavcov. Pokusné zvieratá budú pochádzať zo schválených chovných zariadení. Nosnice sa použijú v modeloch *in vitro* črevnej absorpcie a transportu minerálov (144 ks) a v *in vivo* postupe zameranom na sledovanie zmien minerálneho statusu nosníc počas cieľenej suplementácie krmiva (220 ks).

Opätovné použitie oviec použijeme v *in vitro* fermentačných postupoch a v *in vivo* bilančných postupoch zameraných na určenie biomarkerov minerálneho statusu, sledovanie zmien metabolických a funkčných procesov v GIT a stráviteľnosti živín počas cieľenej suplementácie krmiva prežúvavcov (7 ks).

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

Nepriaznivý vplyv na použité zvieratá nepredpokladáme. Pokusy sú zostavené tak, aby sa minimalizovala bolesť alebo stres, a aby bol zabezpečený a dodržiavaný welfare. Chov nosníc bude v moderných obohatených kliebkach, ktoré vyhovujú požiadavkám predpisov EÚ proti týraniu zvierat. Pre každú nosnicu bude zabezpečený dostatočný podlahový priestor a klietka bude primerane vybavená podľa počtu zvierat. Klietky budú obohatené primerane na vekovú kategóriu zvierat. Bude sa dbať na predpísané zootechnické podmienky ich chovu (teplota, vlhkosť, režim striedania svetla a tmy, stmievanie, plocha/vták a pod). Voda a krmivo budú k dispozícii *ad libitum* a zootechnické podmienky chovu budú dodržiavané podľa technologického postupu pre chov daného plemena zvierat.

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera (nosnice/ovce)	Stupeň krutosti
Čistenie priestorov (klietka/koterec)	Krátkodobý mierny stres. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 min./10 min. Ovce sa premiestnia do iného koterca	Slabý
Umiestnenie zvierat (klietka/koterec)	Nosnice v obohatených kliebkach, podľa veľkosti zvierat 1-2 ks. Ovce v čase bilančných postupov v kotercoch po 1 ks. V ostatnom období- spoločné ustajnenie.	Slabý
Kŕmenie/aplikácia	Prídavky minerálnych aditív budú zamiešané do kompletného krmiva nosníc/oviec.	Slabý

Krátkodobá fixácia pri odbere krvi, trusu	Štandardná metóda. Krátkodobý stres spôsobený manipuláciou s obmedzením pohybu.	Slabý
Opakovaný odber krvi	Štandardná metóda. Krátkodobý stres. Odber krvi z v. jugularis.	Stredný
Odber tkanív a krvi nosníc v celkovej anestézii	Postup bude prevedený v celkovej anestézii, kedy zviera nepociťuje žiadnu bolesť, nereaguje na okolie a pred usmrtením nenadobudne vedomie.	Slabý
Usmrtenie	Podanie letálnej dávky anestetík.	Slabý

Obohatené kliečky pre kuru domácu majú rozmery (šírka 43 cm, hĺbka 42, výška 63,5 cm; podlahová plocha 1806 cm²) a sú určené pre chov nosníc. Priestory obohatených kliečok určených pre nosnice sú patrične obohatené o hniezdne boxy, bidlá, vhodný substrát na popolenie a zovanie. Hniezdo v každej kliečke je z umelého trávniku s plochou 480 cm² (40x12cm), pričom zabezpečuje pevnú plochu na odpočinok vtákov. Hniezda sú vystlané drevenými hoblinami a pieskom, ktoré sú vhodnými materiálmi na popolenie vtákov, hrabanie a zovanie. Bidlá umiestnené v kliečkach sú z dreva, so sploštenou hornou hranou s priemerom 3 cm o dĺžke 43 cm. Výška bidla nad podlahou je prispôbená veku vtákov. Prísun vody v kliečke je zabezpečený prostredníctvom dvoch kvapkových napájačiek. Krmný žľab má dĺžku 42 cm a poskytuje dostatok miesta pre 2 vtáky. Kliečka je pod krmným žľabom vybavená brúsny papierom na skracovanie a obrusovanie pazúrov. Všetky doplnky obohatených kliečok sa pravidelne čistia, príp. menia a udržiavajú v čistote.

Ovce budú počas experimentu ustajnené individuálne v kotercoch (výška 120 cm, podlahová plocha 2,06 m²) s vyhovujúcimi rozmermi a priestorovými podmienkami, pri dodržiavaní príslušných zootechnických podmienok a budú kŕmené 2 x denne pri voľnom prístupe k vode počas celého pokusu. V čase medzi experimentmi budú ovce spoločne ustajnené v ohrádke s podstielkou (plocha 36 m²), ktorej veľkosť sa môže prispôbiť počtu zvierat a ich telesnej hmotnosti, tak aby boli splnené minimálne priestorové podmienky. Obohatenie prostredia bude zabezpečené pobytom oviec vo vonkajšom areáli prostredníctvom prenosnej ohrádky s rovnakou plochou, zabezpečenou zastrešenou plochou a dostatočným počtom napájadiel.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Kategória krutosti u hydiny- slabá. Na konci pokusu budú všetky zvieratá humánne usmrtené (podľa prílohy č. 2 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z.). Na konce postupu budú nosnice anestetizované i. m. kombináciou sedatív Zoletil/Xylazín pre následný odber tkanív a krvi a hneď potom budú eutanazované podaním letálnej dávky uvedenej zmesi narkotík. Navrhnuté spôsoby usmrčovania hydiny (usmrtenie nadmernou dávkou anestetika) sú v súlade s § 5 a prílohou č. 2 NV 377/2012 Z.z.

Kategória krutosti u oviec- stredná. Všetky postupy vykonávané v rámci postupov na ovciach (príjem diét obohatených o minerálne aditíva, odbery krvi a trusu) spadajú podľa prílohy 4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z. do kategórie krutosti postupov „stredné“, čo

znamená, že zvieratá v ich dôsledku nebudú pociťovať žiadnu alebo iba krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach. Humánne zaobchádzanie so zvieratom pri odbere krvi, trusu a bachorovej tekutiny bude uskutočnené štandardnými metódami, šetrným spôsobom. Všetci pracovníci, ktorí prichádzajú do styku s ovcami sú príslušne poučení. Odbery budú uskutočňovať vedeckí pracovníci- veterinári lekári.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Pre dosiahnutie cieľa projektu budeme testovať a zavádzať metódy *in vitro* črevnej absorpcie, ktoré výrazne redukujú počet zvierat použitých v postupoch. V prípade nosníc použijeme v *in vitro* postupoch 36 nosníc, ktoré odpovedajú 4 rôznym stopovým prvkom so 4 rozdielnymi koncentráciami, na čo by sme za *in vivo* podmienok potrebovali 4-násobne množstvo zvierat ($36 \times 4 = 144$ zvierat). Pre overenie správnosti *in vitro* modelu, ktorý by sa dal neskôr využiť namiesto *in vivo* postupov sledujúcich absorpciu a biovyužitelnosť stopových prvkov u monogastrických zvierat, je potrebné uskutočniť identický *in vivo* postup na živých zvieratách. Na tento typ pokusu je potrebné použiť zviera – nosnice. Týmto spôsobom sa navyše získajú nové poznatky o vzájomnom pôsobení stopových prvkov v GIT hydiny, ich depozícii v tkanivách a nových biomarkerov nutričného statusu zvierat.

Na krátkodobé *in vitro* fermentácie použijeme trus baranov, prípadne bachorovú tekutinu. Rovnako v bilančných experimentoch zameraných na sledovanie tráviacich procesov, nutričného a minerálneho statusu zvierat použijeme kastrované barany (opätovne použitie), ktorých krmivo bude suplementované stopovými prvkami a ich kombináciou. Počas trvania postupu bude realizovaný odber krvi a trusu. Ide o neinvazívne postupy (Latin Square design), po ktorých nie je nutné usmrtenie zvierat a počíta sa s opätovným zaradením oviec do pokusu.

2. Redukcia počtu zvierat:

Uvádzané počty zvierat sú minimálne počty subjektov potrebné pre preukázateľné zhodnotenie sledovania stanovených parametrov. V *in vivo* postupov na nosniciach a ovciach sú nami zvolené počty zvierat v skupinách (veľkosť súboru) minimálne, nevyhnutné z hľadiska dosiahnutia štatistickej sily min. 80%. V prípade *in vitro* postupov na nosniciach sme si štatistickú silu stanovili na 90%, pretože pri takýchto štúdiách je potrebné dosiahnuť vyššiu hladinu pravdepodobnosti pre potvrdenie pracovnej hypotézy. Na výpočet štatistickej sily štúdie a min. množstva subjektov pre jej dosiahnutie sme použili online štatistický program (<http://powerandsamplesize.com>). Z vypočítaného minimálneho počtu zvierat na testovanie nami zvolenej hypotézy je možné získať dostatočné množstvo interpretovateľných a štatisticky preukazných vedeckých výsledkov. V *in vivo* postupe na nosniciach sme zredukovali kontrolnú skupinu na 10 zvierat usmrtených na začiatku experimentu, pre získanie východných parametrov/biomarkerov rovnakých pre všetky skupiny.

Pri pokusoch zameraných na sledovanie fermentačných parametrov a stráviteľnosti živín u 6 vykastrovaných baranov (opätovné použitie) použijeme schému 6x6 Latinského štvorca, čím výrazne zredukujeme počty zvierat v experimentoch. Experiment bude pozostávať zo 6 experimentálnych periód, kedy počas každej periódy bude každé zviera prijímať inú diétu.

Na krátkodobé fermentačné experimenty použijeme bachorovú tekutinu od fistulovaného barana (opätovné použitie). Tieto fermentácie slúžia na skríning zvolených kombinácií stopových prvkov, ktoré sa pridávajú priamo do inokula, čím sa redukuje použitie zvierat.

3. Zjemnenie:

V priebehu pokusu nebudú vykonávané bolestivé zákroky na zvieratách a bude s nimi šetrne zaobchádzané. Postupy sú nastavené tak, aby bol minimalizovaný stres použitých pokusných zvierat a aby bola zabezpečená primeraná starostlivosť. Všetci pracovníci, ktorí prichádzajú do styku so zvieratami sú príslušne poučení. Odber vzoriek budú uskutočňovať veterinárni lekári, u nosníc bude odber vzoriek realizovaný v celkovej anestézii zvierat. Osoby zodpovedné za starostlivosť o zvieratá sa riadia pokynmi popísanými v Prevádzkovom poriadku schváleného pokusného zariadenia a sú pravidelne školené. Neustále dbáme na humánny prístup k zvieratám. Pokusné zvieratá budú chované v takých podmienkach, ktoré u nich nebudú vyvolávať žiaden stres – zohľadní sa veľkosť kletky/koterca podľa veku zvierat, počet zvierat, svetelný a kŕmny režim a pod. Vo všeobecnosti, uvedené experimentálne postupy nespôsobia neprimeraný diskomfort pokusných zvierat, v podstate sa jedná o štandardné typy pokusov (bežne používané na špičkových vedeckých pracoviskách) v súlade s etickými požiadavkami. V dôsledku podávania minerálnych komplexov ako kŕmnych aditív nehrozí zvieratám žiadne narušenie ich zdravia, predávkovanie ani intoxikácia.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Účinky glycyrrhizínu na endokrinné, behaviorálne, zápalové a metabolické markery s predpokladaným cieľom zlepšiť liečbu COVID-19

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2949-3/2020-220

Kľúčové slová v projekte:

Glycyrrhizin, COVID-19, rats

Účel projektu:

základný biomedicínsky výskum

Cieľ projektu:

Zámerom projektu bude získať poznatky, ktoré by nás priviedli k novým cieľom farmakologického ovplyvnenia na zmiernenie priebehu covid-19. Budeme skúmať vybrané komponenty renín-angiotenzín-aldosterónového systému, ktoré by mohli súvisieť s pôsobením koronavírusu SARS-Cov-2 v bunkách. Dôležitým cieľom projektu je potvrdiť hypotézu, že glycyrrhizín vykazuje protizápalové účinky tým, že zníži tvorbu pro-zápalových faktorov.

Prínos z vykonaného projektu:

Jedná sa o základný výskum, ktorý môže byť následne využitý v klinickej praxi. Glycyrrhizín je dostupná a bezpečná látka so zanedbateľnými nežiaducimi účinkami. Preukázanie inhibície angiotenzín-konvertujúceho enzýmu 2 v pľúcach a protizápalových účinkov by predstavovalo významný podnet pre klinické štúdie smerované k lepšiemu zvládaniu ochorenia COVID-19.

Počet a druh použitých zvierat:

V projekte bude použitých 72 samcov potkanov kmeňa Sprague-Dawley (Velaz, Praha, Česká republika) vo veku 10 týždňov na začiatku experimentálnych postupov.

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

Zvieratá až do začatia experimentálneho postupu nebudú vystavené žiadnym nepriaznivým vplyvom. Na základe predchádzajúcich experimentov neočakávame v súvislosti s intraperitoneálnym podávaním liečiva žiadny nepriaznivý vplyv/ujmu na zvieratách. Kontrolné zvieratá budú v priebehu experimentu vystavené len váženiu, testu vyvýšeného bludiska a bude sa im podávať placebo vo forme fyziologického roztoku. V prípade testu preferencie soli neočakávame žiadnu ujmu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

stredná

Uplatňovanie zásad "3R":**Nahradenie zvierat:**

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov. V biomedicínskom výskume je zatiaľ použitie laboratórneho potkana nevyhnutné a nenahradiiteľné. Pre sledovanie účinkov hodnoteného liečiva je nevyhnutné pracovať s potkanom laboratórnym.

Redukcia počtu zvierat:

V postupoch je zabezpečený optimálny počet experimentálnych zvierat na základe analýzy štatistickej sily. Maximálna využiteľnosť a vyťaženosť bude zabezpečená tým, že optimalizujeme počet meraní a maximalizujeme počet odobraných vzoriek na sledovanie behaviorálnych, fyziologických, a biochemických parametrov. Znižovanie počtov by ovplyvnilo validitu dosiahnutých výsledkov.

Zjemnenie:

Zvieratá 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. U zvierat vykazujúcich akékoľvek zhoršenie stavu pristúpime k humánnemu ukončeniu postupu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno ☒nie