

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

Názov projektu: Štúdium vplyvu indukovanej hyperhomocysteinémie na rozvoj metabolických a neurohistopatologických zmien s črtami Alzheimerovej choroby v experimentálnom modeli mozgovej ischémie.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3033-3/2020-220

Kľúčové slová: experimental ischemia, alternative methodology, animal model, four vessel occlusion

Účel projektu: základný výskum

Informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, o počte a typoch zvierat, ktoré sa použijú

Ciele projektu:

Hlavným cieľom projektu je zistiť vplyv metabolických porúch, vyvolaných napr. vysokým obsahom metionínu v stave (hyperhomocysteinémia) na následné prerušenia prietoku krvi mozgu v určitých oblastiach mozgu. Sledovaním oboch procesov záčastňujúcich sa v postupe odumierania nervových buniek, ako aj nájdenie vhodných preventívnych/prediktívnych mechanizmov voči patologickým zmenám, ktoré sú spôsobené hyperhomocysteinémiou samotnou alebo v spojitosti s prerušením prietoku krvi v mozgu.

Predpokladaný prínos projektu:

Výskum zameraný na štúdium neurodegeneratívnych ochorení na prežívajúcich pacientoch je možné len do určitého stupňa, rovnako ako aj sledovať degeneratívne zmeny nervových buniek *in vitro*, preto je obzvlášť potrebné detailne popísať deje, ktoré vedú k rozvoju neurodegenerácie práve s využitím zvieracích modelov.

Predpokladáme, že naše experimenty s farmakologickým a nefarmakologickým neurodegeneratívnym postupom dajú jednoznačnú odpoveď na to, či metabolická porucha vyvolaná zvýšením homocysteínu v plazme zohráva významnú úlohu v mechanizmoch odumierania nervových buniek po prerušení prietoku krvi mozgom.

Naše výsledky by tiež mohli prispieť k pochopeniu úlohy modifikovateľných rizikových faktorov (strava) aj v klinických štúdiách v širšom kontexte. Výskum procesov, ktoré spúšťajú poškodenia mozgu spojeného so zlyhaním krvného obehu a následnom úspešnom obnovení prietoku okysličenej krvi mozgom môže poskytnúť kľúčové informácie v prevencii a možnej terapii neurodegeneratívnych ochorení.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan laboratórny, kmeň - Wistar, 150 ks/5 rokov

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

Prvá časť experimentov zahŕňa indukciu metabolickej poruchy (hyperhomocysteinémie - hHcy):

1. Subkutánna aplikácia **homocysteínu** (Hcy) do kožného záhybu nad zadnou labkou 1x denne počas 14-28 dní. Po aplikácii Hcy sa môžu u niektorých zvierat objaviť na koži malé chrastíčky, ktoré sa po niekoľkých dňoch vysušia a odpadnú. Nakoľko sa však nejedná o nebezpečnú látku a neobsahuje nebezpečné zložky, ani látky s expozičnými limitmi na pracovisku Európskeho spoločenstva, ani látky vzbudzujúce veľké obavy nad ich príslušnými uvádzanými limitmi, nepredpokladáme, žeby Hcy spôsobil zvieratám po aplikácii väčšiu ujmu. Rana bude štandardne ošetrená a zvieratá budú udržiavané vo zverinci s najväčšou starostlivosťou po celú dobu trvania experimentu. Prípadný úhyn experimentálnych zvierat v súvislosti s použitými dávkami Hcy je

preto nepravdepodobný, avšak nemožno ho vylúčiť u jedincov so zvýšenou citlivosťou zapríčineného napr. individuálne zhoršeným zdravotným stavom. Z hľadiska humánneho postupu budú zvieratá ovplyvňované subkutánnou aplikáciou Hcy, sledované vo zvýšenej miere z hľadiska včasného odhalenia prípadného neúmerného výskytu prejavov poškodenia chemikáliou. Sústreďíme sa na významné ovplyvnenie motorických funkcií, neúmernú retardáciu rastu a absenciu príjmu potravy, čo budeme hodnotiť pomocou popísaného human end point skóre a ihneď zvažovaný charakter ďalšieho priebehu experimentu.

2. **Metionín (Met)** podávaný v pitnej vode po dobu 14-28 dní. Pri orálnom podávaní metionínu v pitnej vode sa u niektorých zvierat môže vyskytnúť nechutenstvo, ktoré však zväčša do dvoch dní vytratí. Metionín je esenciálna aminokyselina, ktorá sa vyskytuje bežne v strave. Nakoľko sa nejedná o nebezpečnú látku a neobsahuje nebezpečné zložky, ani látky s expozičnými limitmi na pracovisku Európskeho spoločenstva, ani látky vzbudzujúce veľké obavy nad ich príslušnými uvádzanými limitmi, nepredpokladáme, žeby Met spôsobil zvieratám po aplikácii väčšiu ujmu. Prípadný úhyn experimentálnych zvierat v súvislosti s použitými dávkami Met je preto nepravdepodobný, avšak nemožno ho vylúčiť u jedincov so zvýšenou citlivosťou zapríčineného napr. individuálne zhoršeným zdravotným stavom. Z hľadiska humánneho postupu budú zvieratá ovplyvňované Met diétou, sledované vo zvýšenej miere z hľadiska včasného odhalenia prípadného neúmerného výskytu prejavov poškodenia chemikáliou. Sústreďíme sa na významné ovplyvnenie motorických funkcií, neúmernú retardáciu rastu a absenciu príjmu potravy, čo budeme hodnotiť pomocou popísaného human end point skóre a ihneď zvažovaný charakter ďalšieho priebehu experimentu.

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

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Postup	Vplyv na zviera	krutosť
Váženie	Krátkodobý mierny stres	slabá
Značenie zvierat	Krátkodobý mierny stres	slabá
Metionín podávaný v pitnej vode (14-28 dní)	Mierny stres	slabá
Subkutánne podávanie homocysteínu (14-28 dní)	Mierny stres	stredná
Vystavenie účinkom pôsobenia homocysteínu/metionínu po 14-28 dňovom podávaní	Mierny stres	stredná
In vivo MR vyšetrenie	Vykonávané v anestézii, mierny stres	stredná



15 min prerušenie prietoku krvi do mozgu	Vykonávané v anestézii , mierny stres	stredná
Obnovenie prietoku krvi do mozgu v dĺžke trvania 24 hod, 3, 7, 14, 21 a 28 dní	Mierny stres	slabá
Samostatné umiestnenie zvierat v klietkach	Mierny stres	stredná
celková klasifikácia		stredná

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Nahradenie (Replacement):

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

Zníženie (Reduction):

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

Zjemnenie (Refinement):

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

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

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

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

V Martine, dňa 18.9. 2020

Príloha č. 2

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU:

Názov projektu: Pasážovanie referenčných kmeňov *Trichinella* spp.

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

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): trichinely, laboratórna myš, pasážovanie

Účel projektu: základný a aplikovaný výskum za účelom prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka, zvierat alebo ich účinkov na ľudí, zvieratá a stanovovania, odhaľovania, usmerňovania alebo úpravy posúdenia, zistenia, regulácie alebo zmeny fyziologického stavu alebo fyziologických procesov ľudí, zvierat; vysokoškolského vzdelávania alebo odborného vzdelávania na účely získania, udržiavania alebo zlepšenia zručností potrebných na výkon povolania.

Ciele projektu: Cieľom projektu je udržiavanie referenčných kmeňov trichinel, ktoré boli získané z komunitného referenčného pracoviska pre diagnostiku trichinelózy European Trichinella Reference Centre v Ríme a udržiavajú sa ako referenčný materiál pasážovaním na laboratórnych myšiach pre vedecké a diagnostické účely (pre potreby diagnostiky, prípravy antigénov, porovnávacích štúdií, prípravu medzilaboratórnych testov a potreby diagnostických pracovísk) a poskytovanie pre výčbu a tréning pre vysokoškolské vzdelávanie a celoživotné vzdelávanie veterinárnych lekárov.

Prínos z vykonaného projektu: Prínosom projektu je zabezpečenie čerstvého parazitárneho materiálu slúžiaceho pre výskum, vzdelávanie a diagnostiku.

- **Druhy použitých zvierat a ich počty:** myši, kmeň CD1, samce/samice, max. 50 jedincov za rok, max. 250 jedincov za dobu trvania projektu.

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujsa na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu: Vzhľadom na to, že infekčné dávky sú volené tak, aby nespôsobili zvieratám prepuknutie klinických príznakov ochorenia, nepriaznivý vplyv a ujma na zvieratách sa nepredpokladá. Vo veľmi ojedinelých prípadoch sa môže v prvých dňoch po infekcii objaviť hnačka v dôsledku črevnej fázy, tá však po niekoľkých dňoch spontánne odznieva. V ďalšom priebehu infekcie sa ujma u zvierat nepredpokladá, nakoľko zvieratá vo všeobecnosti znášajú infekciu trichinelami bezpríznakovo a klinické ochorenie sa u nich nevyvíja.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Fixácia za kožnú riasu na krku a chvost: slabá

Zavedenie žalúdočnej sondy per os: slabá

Priebeh infekcie trichinelami: slabá

Kumulatívny účinok – infekcia trichinelami: slabá

Spolu pre zviera v postupe: slabá

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Pre experiment sme zvolili laboratórne myši, ako najdostupnejší možný model laboratórnych zvierat. Pokus nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože v in vitro podmienkach

nie je možné dlhodobo udržiavať životaschopné a infekčné larvy trichinel, ktorých vývoj a prežívanie sú viazané na kostrovú svalovinu. Existencia alternatívnych metód bola overovaná v databázach Európskeho centra pre validáciu alternatívnych metód (ECVAM), NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), GO3R Web a na internete prostredníctvom vyhľadávačov GOOGLE a PubMed. V žiadnej z týchto databáz sa nevyskytuje zmienka o možnosti pasážovania trichinel in vitro, na bunkových kultúrach, alebo inými alternatívnymi metódami. Je nevyhnutné použiť cicavčí model, vybrali sme najnižší možný – myš.

2. Redukcia počtu zvierat:

Počet zvierat žiadaných pre projekt je určený počtom referenčných kmeňov, ktoré je potrebné udržiavať. Na každý referenčný druh trichinel sa plánuje skupina 5 jedincov, aby sa zabezpečil dostatok parazitárneho materiálu a predišlo sa riziku straty referenčného kmeňa v prípade úhynu zvierat alebo zvýšenej potreby lariev. Zásadu znižovania počtu zvierat sme oproti minulosti splnili aj tým, že sme znížili interval pasážovania lariev z trikrát ročne na dvakrát ročne a obmedzili sme počet udržiavaných referenčných kmeňov na 5.

Krokom k redukcii počtu zvierat je využitie skutočnosti, že sa pasážovanie referenčných kmeňov trichinel nie je v pravom slova zmysle experiment, z ktorého sa získavajú údaje a nie je potrebná uniformita zvierat pre menšiu variabilitu výsledkov. Preto využívame jedince oboch pohlaví, ktorá sa narodí v zariadení a nevstupujú do iného schváleného experimentu, čím sa zníži nutnosť selektívneho utrácania novorodených jednotlivcov nežiaduceho pohlavia.

3. Zjemnenie:

Vzhľadom na to, že fixácia a nakazovanie zvierat sú jednorazové, krátke a nebolestivé, nevyžaduje sa počas tohto zákroku podávať myšiam prípravky na zmiernenie bolesti. Infekcia sa uskutočňuje takým počtom lariev, ktoré nevyvolávajú klinické ochorenie a umožňujú dlhodobé prežívanie zvierat bez toho, aby bol narušený ich zdravotný stav, pohoda alebo welfare. Denne sa bude sledovať zdravotný stav myšiek a v prípade objavenia sa a pretrvávania známk utrpenia budú humánne usmrtené cervikálnou dislokáciou.

Súčasťou zjemnenia je vytváranie skupín z jedincov pochádzajúcich z jedného hniezda, aby sa minimalizoval stres z odstavu a zmiešavania skupín.

Zjemnenie dosiahneme aj poskytovaním predmetov na obohatenie prostredia a aktivizáciu - preliezok, domčekov a kartónových tunelov.

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

Aktualizované netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Hodnotenie protinádorových účinkov rastlinných funkčných potravín použitím ortotopického syngénneho modelu karcinómu prsníka

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: Č.k. Ro.2212/19-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): karcinóm prsníka, myši Balb/c, ortotopický model, fytoterapia

Účel projektu: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

V posledných rokoch sa zvýšil záujem o látky prírodného pôvodu pre ich očakávaný protinádorový efekt v organizme. Cieľom projektu je analyzovať antitumorovú aktivitu prirodzených substancií (*Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis*, *Cinnamomum cassia*) použitím syngeneických modelových štúdií mamárnej karcinogenézy u samíc myší. V experimentoch bol hodnotený rast objemu inokulovaných 4T1 buniek adenokarcinómu mliečnej žľazy myší a mechanizmus účinku podávaných substancií (histopatologické markery).

Pri pitve sme odobrali krv, nádory vypitvali a vyhodnotili prípadné makroskopické zmeny na sledovaných orgánoch. V jednotlivých skupinách sme štatisticky vyhodnotili základný parameter mamárnej karcinogenézy - objem nádorov. Vykonali sme histologickú typizáciu nádorov a ich grading. Súčasťou postupu bude mimoriadne dôležitá analýza prežívania zvierat.

Z overovania cez najprestížnejšiu vedeckú databázu Web of Science je zrejmé, že ešte neexistujú výsledky z uvedeného výskumu. Z hľadiska vedy preto existovala nutnosť jeho vykonania, aj z dôrazom na závažnosť problematiky karcinómu prsníka u žien, kde fytoterapia môže zohrávať vysoko prínosnú úlohu aj preto, že rastlinné funkčné potraviny sú ľahko a aj cenovo dostupné pre širokú populáciu.

Prínos z vykonaného projektu

Na základe protinádorových vlastností môžu fytochemikálie v prirodzených substanciách priniesť pre klinickú onkológiu nové prístupy v či už v chemoprevencii alebo v liečbe nádorového ochorenia. Na našom pracovisku sa problematikou experimentálnej mamárnej karcinogenézy zaoberáme 23 rokov, pričom analýze protinádorového účinku fytofarmák/fytosubstancií sa venujeme takmer 10 rokov. Výhody diéty bohatej na rastlinné zložky spočívajú v komplexnom pôsobení veľmi širokého spektra fytochemikálií. Práve aditívne a synergické pôsobenie fytochemikálií zodpovedá za ich antioxidačné a protinádorové účinky. Táto skutočnosť vysvetľuje fakt, prečo samostatne aplikovaný antioxidant nemôže nahradiť kombinované pôsobenie desiatok rôznych fytochemikálií prítomných v rastlinných produktoch a nemôže dosiahnuť s nimi porovnateľné účinky na zdravie človeka.

V experimentálnej rakovine prsníka *in vivo* a *in vitro* doteraz neboli hodnotené antineoplastické účinky ani jednej z prirodzených substancií, ktoré sme testovali. **Tymián** je zaujímavý obsahom fenolických látok, saponínov a steroidných látok (Bozkurt et al., 2012). **Šalvia** sa vyznačuje vysokým zastúpením hlavne flavonoidov, zvlášť alfa-tujon, kamfor, borneol, gamma-murolen (Russo et al., 2013). **Škorica** je bohatá na anthokyaníny, cinamaldehyd, eugenol, cineol, cinamyl acetát.

Chceme zdôrazniť, že riešením tohto projektu sme získali prvotné experimentálne výsledky, ktoré môžu byť veľmi prínosné zvlášť pre klinickú prax. Použitie ortotopického syngénneho modelu umožnilo analyzovať nielen liečebné možnosti ale aj prežívanie laboratórnych myší, čím sme získali veľmi hodnotné výsledky v rámci vedného odboru onkológia, konkrétne pre liečbu karcinómu prsníka. V projekte sme analyzovali základné parametre tumorového rastu a určili histologickú typizáciu nádorov. V rámci terapeutického hodnotenia sme vyhodnotili prežívanie zvierat, čo významne prispelo k validite výsledkov a teda aj vedeckej hodnote celej štúdie.



Druhy a počty použitých zvierat:

V projekte sme reálne použili panenské samice laboratórnych myší kmeňa Balb/c v celkovom počte 234 kusov (z 234 schválených).

Doba riešenia projektu – **2 roky (1. 8. 2017 - 31. 12. 2019)**, počas ktorých boli realizované **3 experimenty**, pričom v každom sa použilo 78 zvierat.

Celková dĺžka experimentov, tymián - 40 dní, škorica - 48 dní, šalvia - 38 dní.

Nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:

V štúdií analýzy liečebného efektu išlo o modely s vyvolanými nádormi u myší, pri ktorých sa očakávalo, že spôsobia maximálne strednú bolesť alebo strach, alebo že budú stredne prekážať normálnemu správaniu.

V štúdií analýzy prežívania išlo o modely s vyvolanými nádormi, pri ktorých sa očakávalo, že spôsobia progresívnu letálnu chorobu spojenú s dlhotrvajúcou strednou bolesťou, strachom alebo utrpením.

Zvieratá boli denne monitorované za účelom hodnotenia prežívania. Krivka prežívania zvierat je najlepším obrazom toho ako terapia účinkuje, je veľmi žiadaná vo výsledkoch všetkých onkologických štúdií. Každá klinická onkologická štúdia porovnáva prežívanie ľudí bez terapie a s terapiou, analogicky je potrebné postupovať aj u animálnych štúdií pre získanie vedecky hodnotných výsledkov.

Úrovně realizovanej krutosti: v závislosti od jednotlivých postupov - slabá, stredná až krutá (vysoká)

Vysoká krutosť sa týkala polovice z použitých zvierat, tj. 117 zvierat.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

K metóde použitej v ukončenom projekte nie je možné využiť alternatívne metódy, pretože fyto-substancia sa musí testovať aj na celistvom organizme, nestačí iba testovanie *in vitro* na bunkových líniiach, vzhľadom na to, že pri týchto experimentoch nie je možné sledovať komplexný vplyv všetkých parametrov a súčinnosti v celistvom organizme. Tymián, škorica ani šalvia neboli doteraz testované v uvedenom ortotopickom 4T1 modeli mamárnej karcinogenézy u myší (dokumentované pri podávaní žiadosti v r. 2017, viď priložené výpisy z Web of Science; kľúčové slová: orthotopic mouse model, breast cancer, thyme resp. sage resp. cinnamon).

2. Redukcia počtu zvierat:

V každom postupe sme použili **minimálny počet zvierat** (n=78; 3 experimentálne skupiny po 26 zvierat, tie boli ešte rozdelené na 2 podskupiny štúdie terapie resp. prežívania po 13 zvierat). n=13 je počet zvierat potrebný na získanie signifikantných výsledkov po štatistickom hodnotení a ktorý je ešte akceptovateľný vedeckou komunitou (zachovanie validity a reprodukovateľnosti experimentu).

3. Zjemnenie:

Najpoužívanejšími **laboratórnymi modelovými zvieratami** sú hlodavce, pretože majú mnohé jedinečné vlastnosti, ktoré ich predurčujú k získavaniu a hodnoteniu všeobecných princípov experimentálnej onkológie. Myš a potkan je najnižším druhom živočíchov, ktorý vyhovuje danému typu experimentov, t.j. nie je nahraditeľný iným druhom. Hlavnou výhodou použitia myší je to, že ich nádory mliečnej žľazy sa veľmi podobajú ľudským, tak v etiológii ako aj v patológii (Medina et al., 1982). Veľmi dôležitým kritériom v experimentálnej onkológii na definovanie terapeutických možností alebo karcinogénnej aktivity farmaka je spontánny výskyt tumorov. Vďaka spontánnemu vzniku nádorov pri dlhodobých štúdiách sú vybrané kmene myší a potkanov vhodným modelom pre imitáciu situácie u ľudí (Anderson, 1992). Myš je nevhodná pre štúdium chemoprevenencie avšak je vhodná pre realizáciu ortotopického (syngénneho resp. xenograftového) modelu s použitím subkutánne inokulovaných buniek karcinómu (Ito et al., 1996).

Spôsob manipulácie so zvieratami a starostlivosť o zvieratá počas postupu bude v súlade s požiadavkami uvedenými v Nariadení vlády SR č. 377/2012 Z.z. a Vyhláške Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR č. 436/2012 Z.z. Čo sa týka zásady **zjemňovania postupu**, charakter postupu minimalizuje stres u zvierat, keďže počas celej dĺžky experimentu sa okrem subkutánnej inokulácie buniek karcinómu (slabý stupeň krutosti) nerealizovali na zvieratách žiadne bolestivé výkony, iba palpácie a váženie predstavujúce tiež iba slabý stupeň krutosti. Počas celého priebehu postupu neboli zvieratá vystavené bolestivým zákrokom. V štúdiu terapeutického hodnotenia a prežívacej štúdie sa použilo analgetikum Carprofen, 5 mg/kg/deň aplikovaný vode (odporúčenie zmluvného vet.lekára), kedy sme očakávali u zvierat strednú až krutú bolesť. Carprofen patrí do skupiny nesteroidných protizápalových látok (NSAID), bolo podávané perorálne denne do pitnej vody (vypočítala sa priemerná spotreba vody v jednej klietke na deň, stanovila sa priemerná hmotnosť zvierat na klietku a následne sa stanovilo množstvo liečiva rozpusteného v jednej fľaši). Zvieratám bolo analgetikum aplikované kontinuálne, čím sa zabezpečila jeho maximálna efektivita. Carprofen v uvedenej dávke je osvedčeným analgetikom u hlodavcov, aplikáciou tohto analgetika dokázateľne zmiernime utrpenie zvierat, navyše klietky boli vybavené hračkami - enrichmentom (tunely, iglu domčeky). Stupeň bolesti bol posudzovaný na základe posúdenia vitality zvierat, prípadne výskytu nekrotizujúceho nádoru. V prvej časti experimentu sme pozorovali u zvierat celkovo dobrý zdravotný stav, bez poklesu vitality, z dôvodu nerozvinutej formy rakoviny - ešte bez metastáz. Nebol žiaden úhyn. Zvieratám bolo podávané vyššie spomínané analgetikum v oboch častiach experimentu – terapeutickej a prežívacej (začala cca po dvoch týždňoch). Mimoriadne dôležitá prežívacia časť štúdie priniesla zvieratám väčšiu ujmu. Kritériom pre humánny endpoint bol zreteľný pokles vitality zvierat, druhým kritériom pre humánny endpoint bola viditeľná nekróza nádoru, ktorá bola prítomná u nádorov s väčším objemom. Ďalším dôvodom na predčasné usmrtenie bola zmena vzhľadu (hlavne farba srsti a piloerekcia), zmena správania (izolovanosť, imobilita a depresia) a úbytok hmotnosti. Ako náhle čo i len jeden z uvedených parametrov dosiahol bodové hodnotenie 3 (stupnica welfare), zvieratá sa usmrtilo. Spolu išlo o 51 prípadov humánneho endpoint. Štúdia prežívania je najhodnotnejším ukazovateľom účinku testovanej liečby, predstavuje najvalidnejší parameter terapie. Čo sa týka pomeru ujmy a prínosu, Etická komisia [REDACTED] došla k záveru, že celospoločenská hodnota výsledkov riešenia tohto projektu prevyšuje ujmu zvierat spôsobenú utrpením, bolesťou a strachom a s ohľadom na etické aspekty, môžu byť výsledky projektu v konečnom dôsledku prospešné ľuďom.

100

100

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Hodnotenie antineoplastických účinkov rastlinných funkčných potravín v mamárnej karcinogéze

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2384-3/2020-220

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): 4T1 model, vanilka, sumak, cirok

Účel projektu: Základný výskum

Opísať ciele projektu: Cieľom projektu je hľadanie tzv. **superpotravín** s pleiotrofnými blahodárskymi účinkami na ľudský organizmus využiteľné v liečbe rakoviny (ale aj iných civilizačných ochorení) a ktoré môžu zohrávať podstatnú úlohu v zlepšovaní celkového zdravotného stavu svetovej populácie. Plánované sú animálne štúdie, v ktorých budeme analyzovať antineoplastický účinok prirodzených substancií v modeli rakoviny prsníka u samíc myší. Postupy budú tvoriť štúdie s indukovanou mamárnou karcinogézou u samíc myší. Postupne vyhodnotíme terapeutickú efektivitu Vanilky pravej (*Vanilla planifolia*), sumaku (*Rhus coriaria*), či otrúb ciroku (*Sorghum bicolor*). Budeme hľadať mechanizmus účinku očakávaného liečebného pôsobenia použitých fytosubstancií. Vyhodnotíme prípadné vedľajšie účinky látok na organizmus zvierat (telesná hmotnosť, spotreba potravy, vody, pri pitve zhodnotíme makroskopické zmeny na vybraných orgánoch (pečeň, slezina, GIT, ovária). Pôjde o originálne výsledky, ktoré môžu priniesť veľmi dôležité poznatky do klinického výskumu s možnou transláciou do klinickej praxe.

Prínos z vykonaného projektu: Na základe protinádorových vlastností môžu fytochemikálie v prirodzených substanciách priniesť pre klinickú onkológiu nové terapeutické prístupy v či už v chemoprevencii alebo v liečbe nádorového ochorenia. Na našom pracovisku sa problematikou experimentálnej mamárnej karcinogézy zaoberáme vyše 20 rokov, pričom analýze protinádorového účinku fytofarmák/fytosubstancií sa venujeme takmer 10 rokov.

Výhody diéty bohatej na rastlinné zložky spočívajú v komplexnom pôsobení veľmi širokého spektra fytochemikálií. Práve aditívne a synergické pôsobenie fytochemikálií zodpovedá za ich antioxidantné a protinádorové účinky. Táto skutočnosť vysvetľuje fakt, prečo samostatne aplikovaný antioxidant nemôže nahradiť kombinované pôsobenie desiatok rôznych fytochemikálií prítomných v rastlinných produktoch a nemôže dosiahnuť s nimi porovnateľné účinky na zdravie človeka. Cieľovou skupinou pre dlhodobú konzumáciu tzv. superpotravín budú nielen vysokorizikóvi jedinci a pacienti na rakovinu prsníka ale aj široké populácia vzhľadom na výrazný vzostup incidencie civilizačných ochorení vrátane rakoviny. Treba pripomenúť aj ďalší prínos pre samotné zvieratá, ktorým možno pripravovať potravinové doplnky aditívne práve superpotravínami, čím možno prispieť k zlepšeniu ich zdraviu a úžitkovej hodnoty vrátane doplnkovej liečby rakoviny.

V experimentálnej rakovine prsníka doteraz neboli hodnotené antineoplastické účinky ani jednej z prirodzených substancií, ktoré plánujeme testovať. Sekundárne metabolity

fenolického charakteru (vanilín, kyselina vanilová, vanilyl alkohol, kumarová a ferulová kyselina) prítomné u **vanilky pravej** (*Vanilla planifolia*) môžu mať potenciálne významný antioxidačný a protinádorový účinok. Na hodnotné fytochemikálie (viac ako 180 fytochemikálií, napr. taníny, izoflavonoidy, terpenoidy) s protinádorovým účinkom je bohatý aj **sumak** (*Rhus coriaria*). Ďalším perspektívnym zdrojom protinádorových látok predstavujú otruby **ciroku** (*Sorghum bicolor*). Protinádorové účinné látky v otrubách ciroku tvoria fenolické látky, zvlášť 3-deoxyantokyaniíny a taníny.

Chceme zdôrazniť, že riešením tohto projektu získame prvotné experimentálne výsledky, ktoré môžu byť veľmi prínosné pre klinickú prax. Plánované použitie ortotopického syngénneho modelu umožní analyzovať nielen liečebné možnosti ale aj prežívanie laboratórnych myší, čím získame veľmi hodnotné výsledky v rámci vedného odboru onkológia. V projekte budeme analyzovať základné parametre tumorového rastu a určíme histologickú typizáciu nádorov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: V projekte použijeme panenské samice laboratórnych myší kmeňa Balb/c v celkovom počte 234 kusov (uskutočníme 3 experimenty, pričom v každom použijeme max. 78 zvierat).

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu: Predpokladaná ujma u zvierat je vyvolanie mamárnej karcinogenézy, s tým súvisiace zhoršovanie zdravotného stavu a bolestí. Za účelom sledovania zdravotného stavu, vedecký pracovník spolu s technickým pracovníkom uskutočňujú každodenné kontroly zdravotného stavu zvierat (viď nižšie uvedené parametre v časti 3R zjemňovanie). Kontrola zdravotného stavu sa uskutočňuje každé ráno. Pri výskyte závažne zhoršeného zdravotného stavu budú choré zvieratá po dohode s veterinárnym lekárom vyradené z postupu a humánne usmrtené.

Čo sa týka porovnania ujmy zvierat oproti prínosu pre spoločnosť je potrebné zdôrazniť, že riešením tohto projektu získame prvotné experimentálne výsledky, ktoré budú veľmi prínosné pre klinickú prax. Hľadanie tzv. superpotravin, ktoré sú lacné a ľahko dostupné širokej populácii a vykazujú výraznú chemopreventívnu aktivitu voči rakovine je pre spoločnosť veľmi dôležité. Je potrebné uviesť, že dokazovanie liečebných účinkov funkčných potravín je v klinickom výskume realizovanom u ľudí je omnoho náročnejšie (nielen finančne). Žiaden takýto klinický výskum nedokáže nájsť ideálne experimentálne skupiny pacientov alebo vysokorizikových jedincov. Jedinci sa v rámci jednej skupiny sa líšia vekom, genetikou, životným štýlom, prežívaným stresom, chorobami, ktoré prekonali, atď. čo značne sťažuje validitu získaných výsledkov. Efekt určitej látky sa najlepšie prejaví vtedy, ak sú jedinci v skupine dobre definovaní a uniformní, čo spĺňajú experimenty s laboratórnymi zvieratami (identické: vek, indukcia rakoviny, doba aplikácie, životné podmienky, strava, dĺžka deň/noc atď.). Z tohto pohľadu sú experimenty na laboratórnych zvieratách nespochybniteľne mimoriadne prínosné pre spoločnosť a nenahraditeľné. Vďaka laboratórnym zvieratám môžeme hodnotiť nové spôsoby liečby, pričom použitím vhodného animálneho modelu

možno s vysokou pravdepodobnosťou pozitívne účinky očakávať aj u ľudí. Následne sú takéto experimenty inšpiráciou pre klinické štúdie.

Predpokladaná úroveň krutosti: slabá až krutá

jednotlivé postupy:

aplikácia nádorových buniek subkutánne – slabá krutosť

váženie – slabá krutosť

palpácia – slabá krutosť

meranie nádoru posuvným meradlom – slabá krutosť

prežívanie zvierat s malým nádorom – stredná krutosť

usmrtenie rýchlou dekapitáciou – stredná krutosť

umiestnenie zvierat individuálne na viac ako 24 hod – stredná krutosť

analýza prežívania zvierat (začína od 3.-4. týždňa postupu) - kategória krutosti – krutá

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

K metóde použitej v predkladanom projekte nie je možné využiť alternatívne metódy, pretože fyto-substancia sa musí testovať aj na celistvom organizme, nestačí iba testovanie *in vitro* na bunkových líniách, vzhľadom na to, že pri týchto experimentoch nie je možné sledovať komplexný vplyv všetkých parametrov a súčinnosti v celistvom organizme. Sumak, vanilka ani cirok neboli doteraz testované v uvedenom ortotopickom 4T1 modeli mamárnej karcinogenézy u myší.

Pilierom európskej politiky v oblasti ochrany zvierat je uplatňovanie **zásady 3R** (Replacement, Reduction, Refinement – nahradenie, zníženie, zjemnenie), prostredníctvom ktorého by sa malo znížiť používanie zvierat na účely výskumu, vedy a schválenia výrobku.

Najpoužívanejšími **laboratórnymi modelovými zvieratami** sú hlodavce, pretože majú mnohé jedinečné vlastnosti, ktoré ich predurčujú k získavaniu a hodnoteniu všeobecných princípov experimentálnej onkológie. Myš a potkan je najnižším druhom živočíchov, ktorý vyhovuje danému typu experimentov, t.j. nie je nahraditeľný iným druhom. Hlavnou výhodou použitia myší je to, že ich nádory mliečnej žľazy sa veľmi podobajú ľudským, tak v etiológii ako aj v patológii. Veľmi dôležitým kritériom v experimentálnej onkológii na definovanie terapeutických možností alebo karcinogénnej aktivity farmaka je spontánny výskyt tumorov. Vďaka spontánnemu vzniku nádorov pri dlhodobých štúdiách sú vybrané kmene myší a potkanov vhodným modelom pre imitáciu situácie u ľudí. Myš je nevhodná pre štúdium chemoprevenencie avšak je vhodná pre realizáciu ortotopického modelu s použitím subkutánne inokulovaných buniek karcinómu).

2. Redukcia počtu zvierat

V každom postupe používame **minimálny počet zvierat** (n=78; 3 experimentálne skupiny po 26 zvierat sú ešte rozdelené na 2 podskupiny štúdie terapie resp. prežívania po 13 zvierat). n=13 je počet zvierat potrebný na získanie signifikantných výsledkov po štatistickom hodnotení a ktorý je ešte akceptovateľný vedeckou komunitou (zachovanie validity a reprodukovateľnosti experimentu).

3. Zjemnenie

Čo sa týka zásady **zjemňovania postupu**, charakter postupu minimalizuje stres u zvierat, keďže počas celej dĺžky experimentu sa okrem subkutánnej inokulácie buniek karcinómu (slabý stupeň krutosti) nebudú realizovať na zvieratách žiadne bolestivé výkony, iba palpácie a váženie predstavujúce tiež iba slabý stupeň krutosti. Počas celého priebehu postupu nebudú zvieratá vystavené bolestivým zákrokom. V štúdií sa použije analgetikum Carprofen, 5 mg/kg/deň aplikovaný vode (odporúčenie zmluvného vet.lekára), keď u zvierat očakávame strednú až krutú bolesť. Zvieratám bude analgetikum aplikované kontinuálne, čím sa zabezpečí jeho maximálna efektivita. Klietky budú vybavené hračkami - enrichmentom (tunely, iglu domčeky). Stupeň bolesti bude posudzovaný na základe posúdenia vitality a zmeny správania zvierat, vzhľad a výskytom nekrotizujúceho nádoru. V prvej časti experimentu budeme sledovať zdravotný stav zvierat, či pokles vitality, očakávame iba nerozvinutú formu rakoviny - ešte bez metastáz. Nepredpokladáme úhyn. Mimoriadne dôležitá prežívacia časť štúdie prinesie zvieratám väčšiu ujmu. Štúdia prežívania je najhodnotnejším ukazovateľom účinku testovanej liečby, predstavuje najvalidnejší parameter hodnotenia terapeutickú účinnosti liečiva. Kritériom pre humánny endpoint bude zreteľný pokles vitality zvierat, druhým kritériom pre humánny endpoint bude nekrotická zmena nádoru. Ďalšími parametrami ktoré budú definovať utrpenie zvierat bude zmena vzhľadu (hlavne neprirodzená farba srsti a piloerekcia), zmena správania (izolovanosť, imobilita a depresia) a úbytok hmotnosti pod 20%. Ako náhle čo i len jeden z uvedených parametrov dosiahne bodové hodnotenie 3 (stupnica welfare), zviera sa usmrtí, čím sa vyhneme jeho neúnosnému utrpeniu.

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

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

Názov projektu:

Vplyv experimentálne navodenej depresie a vybraných antidepresív na percepciu horkej chuti, metabolizmus a funkciu srdca laboratórnych potkanov

Č.k.RO: 2159-3/2020-220

Kľúčové slová (max 5 slov): chronický mierny stres (CMS – „chronic mild stress“), horká chuť, antidepresíva, srdce, energetický metabolizmus

Účel projektu*: základný výskum

Ciele a očakávaný prínos projektu:

Depresia je závažné psychiatrické ochorenie, prevalencia ktorého v spoločnosti významne stúpa a ohrozuje behaviorálnu a fyzickú pohodu človeka. Depresiu často sprevádzajú ochorenia kardiovaskulárneho systému (KVS) vedúce k závažným zdravotným komplikáciám. Hlavným cieľom projektu je preto navodenie experimentálnej depresie u potkanov použitím modelu mierneho chronického stresu (CMS), ktorú a overíme pomocou štandardných behaviorálnych testov (Porsoltov test, „open field test“).

Zmena percepcie chuťových podnetov poukazuje aj na zmenenú psychickú a emocionálnu homeostázu, napr. anhedóniu, či už u človeka alebo animálneho jedinca. V súčasnosti používaný sacharózový test, predstavuje potenciálne zdravotné riziko u jedincov s porušenou glukózovou toleranciou, inzulínovou rezistenciou alebo metabolickým syndrómom. Vzhľadom na vyšší výskyt receptorov horkej chuti v mozgu, v porovnaní s receptormi sladkej chuti, by mohol byť test horkej chuti citlivejší, než sacharózový test. Oslabené vnímanie horkej chuti taktiež môže viesť k zvýšenému príjmu tukov a vysokému riziku kardiovaskulárnych komplikácií. Cieľom čiastkového prístupu je teda perspektívne a originálne použitie testu percepcie horkej chuti ako indikátora príznakov predepresívneho alebo depresívneho stavu jedinca. Súčasne s testovaním prahu chuti pre horkú látku (PROP - 6-n-propyltiouracyl) posúdime aj bezpečnosť látky PROP lebo zhodnotíme aj jej prípadné neželané vplyvy na organizmus potkanov, ktoré doteraz neboli popísané.

Opakované stresové podnety, ktoré vedú k vyvolaniu depresii podobného stavu u potkanov, spôsobujú zmeny v cievnej cirkulácii a zmenu bunkového oxidatívneho metabolizmu na glykolytický, čo sa prejaví zmenami vo funkcii myokardu. Preto rozšírenie poznatkov o tomto prešmyku bude ďalším cieľom predkladaného projektu pri detekcii porúch funkcie KVS, a hlavne srdca v podmienkach *ex vivo*, kde sa zameriame na charakterizáciu elektrických a čerpacích vlastností myokardu. Získané údaje doplníme molekulárnou analýzou srdcového tkaniva, ktorá bude zameraná na signálne kaskády spojené s poruchami excitability a srdcového rytmu, so zmenami kontraktility myokardu.

Kľúčovým zámerom bude identifikácia signálnej metabolickej kaskády, ktorá hrá úlohu v zmenách energetického metabolizmu srdca. Aplikáciou látok modulujúcich metabolizmus myokardu (L-karnitín, meldónium), sa pokúsime zistiť, či je pre správnu činnosť srdca, ovplyvneného depresiou výhodnejšia podpora metabolizmu mastných kyselín pomocou L-karnitínu (fyziologická metabolická cesta) alebo metabolizmu sacharidov pomocou meldónia (metabolická cesta aktivovaná najmä v ischemických a iných

patologických stavoch). Použitie týchto látok by perspektívne predstavovalo podpornú kardioprotektívnu liečbu pacientov s depresiou.

Poznatky o antidepresívnej terapii rozšírime o testovanie látky SNC80, ktorá pôsobí ako selektívny agonista δ -opioidných receptorov (DOR) a porovnáme ju s klinicky používaným venlafaxínom. Látka SNC80 vedie k zvýšeniu hladiny sérotonínu a zlepšeniu neuroplasticity v mozgu, takže látka SNC80 ((+)-4-[(α R)- α -((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperaziny)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamid) sa môže stať vhodným kandidátom pre klinickú kardioprotekciu u pacientov s psychiatrickou diagnózou, keďže sa zistilo, že opioidný receptorový systém môže byť kľúčový v adaptačno-protektívnych odpovediach na fyziologické a patologické stimuly a aktivácia niektorých receptorov tohto systému má antidysrhythmický potenciál. Efekt novej látky porovnáme s klinicky používaným venlafaxínom

Vzhľadom k tomu, že v literatúre sa popisuje častejší výskyt depresie u žien a častejší výskyt kardiovaskulárnych ochorení u mužov, plánujeme aj porovnanie prejavov kombinácie týchto patologických stavov u oboch pohlaví.

Predkladaný projekt poskytne komplexný pohľad na problematiku experimentálnej depresie a kardiovaskulárnych komorbidít z hľadiska energetického metabolizmu pomocou in vivo, in vitro metód elektrofyziológie, patofyziológie, biochémie, a molekulárnej biológie a poukáže na nové prístupy vo farmakoterapii depresie a jej komplikácií.

Druh, počet použitých zvierat:

Experimenty vykonáme na potkanoch (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar v 2 etapách v závislosti od priestorových možností experimentálnych zariadení:

1 etapa: samice – počet použitých zvierat: 60

2 etapa: samce – počet použitých zvierat: 200

Celkový počet použitých zvierat: 260

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

Vyvolanie depresie a jej symptómov v animálnom modeli je možné dosiahnuť použitím opakovaných nepríjemných stresových podnetov (stresorov). Polovica z uvedeného počtu potkanov bude vystavená pôsobeniu CMS po dobu 3 týždňov (skupiny „stres“), ktorý bude pozostávať z 5 rôznych stresových podnetov, aplikovaných v náhodnom poradí. Každý deň zvieratá vystavíme iba jednému stresovému podnetu, trvajúcemu 8 – 12 h, v závislosti od druhu použitého stresora. Žiaden z aplikovaných stresorov nevyvolá u zvierat fyzickú bolesť a nepresiahne úroveň strednej krutosti (prehľad uvedený v Tab. 4, 5) podľa prílohy č. 4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z. Diskomfort a welfare zvierat môže byť zhoršené z dôvodu opakovania stresových podnetov, čo je však súčasťou a účelom navrhovaného „stresového modelu“ s cieľom navodiť depresiu.

Behaviorálne testy, testy na percepciu chuti a ďalšie merania vykonávané „in vivo“ (meranie krvného tlaku, EKG záznam), budú taktiež neinvazívne, s minimalizáciou stupňa krutosti. Zvieratá budú utratené v celkovej anestézii (zoletil/xylazín), aby pred usmrtením a izoláciou srdca necítilo strach a bolesť.

Keďže hodnotenie testu percepcie chuti súvisí so zisťovaním množstva skonzumovaných tekutín (vody, roztok 6-n-propyltiouracylu – PROP), je nevyhnutné na určitý čas individuálne umiestnenie jednotlivých zvierat bez obmedzenia pohybu, pričom zvieratá majú zabezpečený voľný prístup k fľaši s čistou alebo s ochutenou vodou a k

štandardnej peletovanej potrave *ad libitum*. Zvieratá budú po celý čas umiestnené v spoločnej miestnosti, aj keď v individuálnych priesvitných klietkach s možnosťou vzdialenej vzájomnej zrakovej, zvukovej príp. čuchovej komunikácie.

Pre minimalizáciu poškodenia zvierat budeme aplikovať testované látky p. o. na keksíkoch. Tento spôsob aplikácie látok bol v minulosti overený a nepredstavuje riziko nepriaznivého ovplyvnenia základného príjmu živín jedinca. Postup si vyžaduje krátkodobé (menej ako 10 minút) umiestnenie zvierat v individuálnych klietkach potrebné na zjedenie keksíka a okamžite po zjedení keksíku bude potkan vrátený naspäť do domovskej vanice.

Tabuľka 4: Prehľad použitých experimentálnych postupov v projekte s klasifikáciou krutosti.

Použitý postup/ experiment	Oddiel III – Klasifikácia krutosti postupov
Test horkej chuti (PROP; 0,032; 0,32; 3,2 mmol/l)	Slabá
Test preferencie sacharózy (1 %)	Slabá
Perorálne podávanie liečiv	Slabá
Individuálne ustajnenie zvierat počas testovania chute (2x5 dní, 5 h/deň)	Slabá
Exploračné správanie v otvorenom poli	Slabá
Test vynúteného plávania (Porsoltov test)	Stredná
Meranie krvného tlaku	Stredná
Záznam EKG „in vivo“	Stredná
Humánne utratenie a odber vzoriek	Bez možnosti zotavenia

Tabuľka 5: Prehľad stresorov CMS s klasifikáciou krutosti.

Použitý postup v rámci modelu chronického nepredvídateľného stresu	Oddiel III – Klasifikácia krutosti postupov
Predátorský stres	Slabá/Stredná
Naklonenie klietky	Slabá/Stredná
Nadpočet zvierat vo vanici	Slabá/Stredná
Mokrý podstielka	Slabá/Stredná
Odobratie potravy	Slabá/Stredná

Keďže v rámci projektu uvažujeme o metódach, ktoré spadajú pod strednú mieru krutosti, zvieratá budú po podstúpení procedúr monitorované. O “human end point” bude rozhodnuté na základe nasledujúceho skóre:

Human end point skóre

VZHLAD	PREJAV	SKÓRE
vzhľad príjem potravy a vody	Normálny	0
	Absencia čistenia srsti	1
	Piloerekcia, chýlenie sa	2
príjem potravy a vody prirodzené správanie	Normálny	0
	Prijíma: telesná hmotnosť znížená o 10-15%	1
	Neprijíma potravu, ani vodu	2
prirodzené správanie provokované 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*

Predpokladaná úroveň krutosti celého experimentálneho postupu je hodnotená podľa prílohy č. 4 Nariadenia vlády č. 377/2012 Z.z. ako **stredná** krutosť

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat (Replacement):

Predkladaný projekt je venovaný metabolizmu a funkcii srdca, ako aj hodnoteniu vnímania chuťových podnetov u zvierat ovplyvnených s experimentálne navodeným stavom podobným depresii, s následnou aplikáciou antidepresív a látok modifikujúcich metabolizmus myokardu. Aby sme identifikovali zmeny v správaní a funkcii kardiovaskulárneho systému, je nevyhnutné vykonať pokusy v podmienkach „*in vivo*“ a taktiež na izolovanom spontánne tepajúcom srdci perfundovanom podľa Langendorffa v podmienkach „*ex vivo*“. Použitie bunkových kultúr, či počítačových simulácií nie je vhodným spôsobom pre získanie požadovaných výsledkov a poznatkov.

2. Redukcia počtu zvierat (Reduction):

Použitie primeraného počtu zvierat zvyšuje šancu na získanie kvalitných a reprodukovateľných výsledkov, bez nutnosti opakovania experimentov. Pre porovnanie výsledkov získaných zo zvierat ovplyvnených depresiou je nevyhnutné zaradiť do experimentov aj kontrolnú skupinu zvierat, ktoré stresovým protokolom ovplyvnené nebudú, no všetky ďalšie merania a hodnotenia na nich budú vykonávané identicky ako u stresovaných zvierat. Použijeme samce aj samice potkanov kmeňa Wistar. Projekt bude realizovaný v dvoch fázach. V prvej etape použijeme samice, ktoré budú rozdelené do 3 skupín po 20 zvierat, vrátane absolútnej kontrolnej skupiny, ktorá nebude stresovaná a nebude dostávať horký roztok, len čistú vodu. Celkový počet zvierat v etape 1 bude 60. V druhej etape použijeme samce, ktoré budú rozdelené do 10 skupín po 20 jedincov na základe toho, či boli vystavené stresovému protokolu a aká látka im bola podávaná (vehikulum, L-karnitín, meldónium, venlafaxín, látka SNC80). Celkový počet zvierat v etape 2 bude 200. V jednej skupine je potrebných 20 zvierat pre vykonanie viacerých experimentálnych prístupov (vrátane molekulárnej biológie a elektrónovej mikroskopie) a získanie komplexných výsledkov charakterizujúcich zmeny percepcie chuti, zmeny správania, krvného tlaku, činnosti izolovaného srdca, zmeny na molekulárnej úrovni alebo morfológické zmeny myokardu. S ohľadom na riadne a korektné štatistické spracovanie v rámci jednotlivých experimentálnych postupov ide o najnižší možný počet použitých zvierat pre riešenie predkladaného projektu.

3. Zjemnenie (Refinement):

V projekte plánujeme použiť samice aj samce kmeňa Wistar, ktoré sú najčastejšie používané cicavce na podobný výskum, a tiež vzhľadom na naše predchádzajúce získané publikované výsledky a práce iných autorov. O zvieratá bude správne postarané, podľa definície welfare zvierat, dodržiavaním každej z piatich slobôd zvierat, podľa zákonom stanovených požiadaviek. So zvieratami bude zaobchádzať minimálny počet zamestnancov, potrebných pre vykonanie experimentálnych postupov a meraní. Meraniu krvného tlaku a EKG bude predchádzať 3 – 5-dňový „handling“ zvierat, aby sa minimalizoval stres z neznámeho prostredia, nástrojov a postupov. Testy, ktoré budú na zvieratách vykonávané, budú neinvazívne, bezbolestné a miera diskomfortu zvierat bude minimalizovaná. Za účelom zjemnenia budú mať zvieratá v klietkach prostredie obohatené o plastové krabíčky, perforované loptičky a tunely, určené na preliezanie a hru. Zvieratá budú monitorované počas celej dĺžky experimentu na základne human end point skóre bude rozhodnuté a pokračovanie alebo zastavenie experimentu. Na zmiernenie bolesti sa aplikuje analgetikum Tramal v dávke 5 mg/kg, i. p..

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

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

NÁZOV PROJEKTU:

**PRENATÁLNA VÝVINOVÁ ŠTÚDIA TOXICITY - OECD 414
(MALEIC ACID (CAS NO. 110-16-7))**

ČÍSLO KONANIA ROZHODNUTIA O SCHVÁLENÍ PROJEKTU:

Č.k. Ro 2344/19-221/3 - 3461/2020 - 220

KLÚČOVÉ SLOVÁ:

embryo-foetal toxicity, teratology, rat

ÚČEL PROJEKTU PODĽA § 3 A JEHO ZDÔVODNENIE:

Aplikovaný výskum

PODROBNÝ POPIS CIEĽA PROJEKTU:

Cieľom projektu bude hodnotenie relatívnej bezpečnosti testovanej látky maleic acid (CAS NO. 110-16-7) využitím testu OECD č. 414 - "Štúdia prenatálnej vývinovej toxicity" z hľadiska jeho účinku na matku a plod a poskytnúť podklady zadávateľovi pre posúdenie bezpečnosti testovanej látky z hľadiska schopnosti vyvolať materskú toxicitu a vývinové poškodenia u potomstva. Testovaná látka sa používa na výrobu ďalších chemikálií, syntetických lepidiel a farbív. Používa sa pri spracovaní vlny, hodvábu a bavlny a ako konzervačný prostriedok v tukoch a olejoch.

Výsledky štúdie umožnia označovanie látky z hľadiska toxicity podľa GHS (Globally Harmonised System) v súlade s európskou legislatívou - European Regulation No 1272/2008 on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures (CLP Regulation) za účelom ochrany zdravia a bezpečnosti a sú potrebné na registračné účely v súlade s predpismi REACH Annex IX Regulácie (EC) No. 1907/2006.

OČAKÁVANÝ VÝSLEDOK:

Projekt poskytne informácie o testovanej látke maleic acid (CAS no. 110-16-7), ktorá je v tomto teste z hľadiska platnej legislatívy REACH pre látky produkované v množstve do 100 ton/rok požadovaná. Pokusná a pozorovacia stratégia sú dané metodickým postupom OECD 414. Na základe výsledkov štúdie budú stanovené hodnoty NOAEL pre vývinovú toxicitu pre maleic acid. Prínosom tejto štúdie bude včasné rozpoznanie toxicity maleic acid a zabránenie negatívnych vplyvov na organizmus.

DRUHY POUŽITÝCH ZVIERAT A ICH POČTY

Potkany kmeňa Wistar

Pre pilotnú časť: 15 samíc

Hlavný test: 30 samcov a 100 samíc + 960 plodov

Hmotnosť: samice 180-200g; samce 220-240g

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 human end points, 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
Priparovanie	Mierny stres	slabá
Možná systémová reakcia	Mierna až silná bolesť	slabá - krutá
Výšetrenia – vaginálne výtery,	Mierny stres, bolesť slabá	slabá
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 – So zvieratami sa bude zaobchádzať šetrne po celú dobu projektu a budú pod každodenným dohľadom skúsených pracovníkov. 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 414.

Replacement – Postup nie je možné vykonať nahradením animálneho experimentálneho modelu alternatívnym modelom. Jedná sa o regulovaný projekt a zatiaľ nebol navrhnutý alternatívny *in vitro* resp. *in silico* model analýzy prenatálnej vývinovej toxicity.

Vyžaduje sa spätné posúdenie projektu.

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

NÁZOV PROJEKTU:

**PRENATÁLNA VÝVINOVÁ ŠTÚDIA TOXICITY - OECD 414
(FLUOROBENZENE (CAS NO. 462-06-6))**

ČÍSLO KONANIA ROZHODNUTIA O SCHVÁLENÍ PROJEKTU:

Č.k. Ro 2344/19-221/3 *.. 3460/2020-220*

KLÚČOVÉ SLOVÁ:

embryo-foetal toxicity, teratology, rat

ÚČEL PROJEKTU PODĽA § 3 A JEHO ZDÔVODNENIE:

Aplikovaný výskum

PODROBNÝ POPIS CIEĽA PROJEKTU:

Cieľom projektu bude hodnotenie relatívnej bezpečnosti testovanej látky fluorobenzénu (CAS NO. 462-06-6) využitím testu OECD č. 414 - "Štúdia prenatálnej vývinovej toxicity" z hľadiska jeho účinku na matku a plod a poskytnúť podklady zadávateľovi pre posúdenie bezpečnosti testovanej látky z hľadiska schopnosti vyvolať materskú toxicitu a vývinové poškodenia u potomstva. Testovaná látka sa používa ako insekticíd, larvicíd a ako činidlo na výrobu plastových alebo živcových polymérov.

Výsledky štúdie umožnia označovanie látky z hľadiska toxicity podľa GHS (Globally Harmonised System) v súlade s európskou legislatívou - European Regulation No 1272/2008 on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures (CLP Regulation) za účelom ochrany zdravia a bezpečnosti a sú potrebné na registračné účely v súlade s predpismi REACH Annex IX Regulácie (EC) No. 1907/2006.

OČAKÁVANÝ VÝSLEDOK:

Projekt poskytne informácie o testovanej látke fluorobenzene (CAS NO. 462-06-6), ktorá je v tomto teste z hľadiska platnej legislatívy REACH pre látky produkované v množstve do 100 ton/rok požadovaná. Pokusná a pozorovacia stratégia sú dané metodickým postupom OECD 414. Na základe výsledkov štúdie budú stanovené hodnoty NOAEL pre vývinovú toxicitu pre fluorobenzene. Prínosom tejto štúdie bude včasné rozpoznanie toxicity fluorobenzénu a zabránenie negatívnych vplyvov na organizmus.

DRUHY POUŽITÝCH ZVIERAT A ICH POČTY

Potkany kmeňa Wistar

Pre pilotnú časť: 15 samíc

Hlavný test: 30 samcov a 100 samíc + 960 plodov

Hmotnosť: samice 180-200g; samce 220-240g

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 human end points, 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
Priparovanie	Mierny stres	slabá
Možná systémová reakcia	Mierna až silná bolesť	slabá - krutá
Výšetrenia – vaginálne výtery,	Mierny stres, bolesť slabá	slabá
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 – So zvieratami sa bude zaobchádzať šetrne po celú dobu projektu a budú pod každodenným dohľadom skúsených pracovníkov. 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 414.

Replacement – Postup nie je možné vykonať nahradením animálneho experimentálneho modelu alternatívnym modelom. Jedná sa o regulovaný projekt a zatiaľ nebol navrhnutý alternatívny *in vitro* resp. *in silico* model analýzy prenatálnej vývinovej toxicity.

Vyžaduje sa spätné posúdenie projektu.