

Príloha č.2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Selekcia EPS (exopolysacharidy) produkujúcich prospešných baktérií a overenie ich základných vlastností v novej aplikačnej forme v *in vivo* podmienkach na modelových zvieratách

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 758/13-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): probiotiká, exopolysacharidy, konvenčné myši,

Účel projektu*: Základný výskum
Translačný alebo aplikovaný výskum
Regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z. z.)
Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat
Ochrana druhov
Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie
Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Opísať ciele projektu:

Výber probiotických kmeňov a prirodzených inokulantov pre rekolonizáciu mikroflóry produkujúcich exopolysacharidy (EPS). V *in vivo* podmienkach na modelových zvieratách (konvenčných myškách) bude overený vplyv biologického účinku vybraných kmeňov na mikrobiologické, biochemické, morfológické, imunologické a klinické parametre.

Prínos z vykonaného projektu:

Predpokladaný prínos bude spočívať v dosiahnutí nových poznatkov týkajúcich sa štúdia vlastností prospešných baktérií z hľadiska ich biologického efektu a aplikácie. Vývoj prípravkov a ich aplikačnej formy na báze kmeňa produkujúceho EPS napomôže k účinnejšiemu uplatneniu probiotík v praxi pri náhrade antibiotík a antibiotických rastových stimulátorov v živočíšnej výrobe, čo prispeje k produkcii kvalitných a bezpečných potravín.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V postupe budú použité 6 týždňové konvenčné myšky samičieho pohlavia v SPF kvalite, línie Balb/c. Bude použitých (max. 70ks myši), rozdelených do 7 pokusných skupín (7 x 10 myši).

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

Počas sledovaného obdobia zvieratám nebude zabránené v prirodzenom správaní, vrátane obmedzenia štandardov na umiestnenie, chov a starostlivosť a nebude im vo významnej miere narúšaná pohoda ani celkový stav.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Na základe posudzovaných faktorov navrhujeme klasifikáciu krutosti postupu označiť ako „strednú“.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Postup nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov (mechanizmu účinku probiotických kmeňov) na makroorganizmus. Súčasne sa jedná o štúdium vplyvu probiotík z hľadiska klinických, imunologických a patologicko-anatomických parametrov. Jedná sa o interakciu organizmu a probiotických bakteriálnych kmeňov, čo nie je možné uskutočniť v *in vitro* podmienkach.

2. Redukcia počtu zvierat:

V postupe bude použitých (max. 70ks myší), rozdelených do 7 pokusných skupín (7 x 10 myší). V rámci každej skupiny sa uskutoční odber vzoriek na 5. týždeň od začatia inokulácie s 10 myškami/odber/skupinu. Pre štatistické vyhodnotenie konvenčného experimentu je postačujúce zastúpenie zvierat v jednej skupine a odber po (7-8 ks). Vyššie počty zvierat v skupine boli zvolené z dôvodu možných úhynov pri transporte a adaptácii zvierat na nové prostredie.

3. Zjemnenie:

V postupe budú použité dospelé 6 týždňové konvenčné myšky samičieho pohlavia v SPF kvalite, línie Balb/c, ktoré sú z hľadiska štúdia požadovaných parametrov najideálnejším modelovým zvieratom, a v plnej miere spĺňajú charakter pilotných štúdií pri selekcii kmeňov na probiotické účely. Na zvieratách sa nebudú vykonávať zákroky, ktoré by boli bolestivé, alebo si vyžadujú anestéziu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno

nie

Príloha II

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

Názov projektu: *1282/13-221*

Kvasinky a ich možnosti pri ochrane integrity medzibunkových spojení vaskulárneho endotelu pred poškodením.

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

Podstatou projektu je štúdium možnosti ovplyvnenia bunkových a molekulárnych mechanizmov, podieľajúcich sa na zabezpečení funkčnej a štruktúrnej integrity endotelu ciev srdca pri zápalovom procese. Cieľovými štruktúrami sú endotelové medzibunkové spojenia a ich integrálne proteíny, regulujúce permeabilitu endotelu a aterosklerotický proces. Predstavujú tak nové terapeutické možnosti. Prínosom projektu budú originálne poznatky o využití biotechnologických prístupov pri prevencii a ochrane endotelovej integrity kardiovaskulárneho systému pred jeho poškodením. Z literatúry je známe, že účinok LPS závisí od použitej koncentrácie, miesta aplikácie a doby trvania pôsobenia a jeho opakovanej aplikácii. Pri hlodavcoch sa uvádza, že sú na LPS veľmi rezistentné. V navrhovanom projekte bude LPS aplikovaný jednorazovo intraperitoneálne a bude pôsobiť krátku dobu 10 dní. Počas projektu nebudú zvieratá vystavené výraznej ujme. Po injekčnej aplikácii LPS je však možný výskyt lokálneho zápalu, pri ktorom môžu zvieratá pociťovať krátkodobú slabú bolesť, ktorá nenaruša významne celkový stav zvierat a je klasifikovaná ako slabá (Oddiel III písmeno f). V postupe použijeme 168 dospelých laboratórnych potkanov, samcov, kmeňa Wistar.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

V medzinárodných databázach a databázach medzinárodných patentov (ECVAM, CAAT systemic review, www.google.com, Altweb: Alternatives to Animal Testing, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, www.patents.com, ALTBIB – Alternatives to Animal Testing, New Technologies as Alternatives to Animal Testing,) sme hľadali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. Heterogenita vlastností endotelu závislá od typu a veľkosti ciev v srdci neumožňuje v našom projekte nahradiť animálny model alternatívnymi metódami, ktoré by nahradili podmienky v *in vivo* modeloch.

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych zvierat tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť a validita pokusu pre fyziologické, biochemické a morfológické analýzy a ich štatistické vyhodnotenie.

Zásada zjemnenia (refinement)

Potkany v priebehu pokusu prežívajú stres, ktorý budeme minimalizovať šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia klieťky predmetmi na hru a ohryzovanie. Pri injekčnej aplikácii endotoxínu aj anestetika sa bude stres potláčať používaním jemných ihl

a šetrným a ohľaduplným zaobchádzaním so zvieratami. Usmrtenie zvierat bude prebiehať bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii.

Späťne' posedenie - nie

Príloha č. 3

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

Vplyv T-2 toxínu a glukánu u kurčiat na celkovú a slizničnú imunitu

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1232/13-221/1

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

Kurča, toxín, cytokíny, imunita, glukán

Účel projektu*: Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania
v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

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

Hlavným cieľom bude porovnať hladiny jednotlivých cytokínov u kurčiat po aplikácii a bez aplikácie T-2 toxínu a ich ovplyvnenie po podaní beta-D-glukánu, taktiež reakciu imunokompetentných buniek, zúčastňujúcich sa systémovej a lokálnej imunity, prípadne odchýlky v hlienovej vrstve a expresii mucínového génu, či zmien proliferačnej aktivity epitelových buniek ilea. Zároveň bude odobratá slezina, ktorá je jedným z predilekčne poškodzovaných orgánov mykotoxínmi a údaje o cytokínoch u kurčiat sú sporadické.

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

Predpokladaný prínos bude spočívať v získaní nových poznatkov o hladinách cytokínov v krvi a slezine po aplikácii T-2 toxínu a modulácii beta-D-glukánom. Očakávame pokles hladiny cytokínov u kurčiat po aplikácii T-2 toxínu a ich nárast po podaní beta-D-glukánu. Zároveň očakávame zlepšenie parametrov bunkovej imunity, predovšetkým CD4 a CD8 populácií v krvi a čreve, ako aj zmeny v hrúbke a denzite hlienu. Získané výsledky by mohli byť prospešné pri objasnení účinkov T-2 toxínu na imunitný systém po ovplyvnení organickým absorbentom mykotoxínov, beta-D-glukánom.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Do pokusu bude zaradených 40 kusov kurčiat hybridu COOBB 500, rozdelených do 4 skupín (n=10)

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

V predkladanom projekte pôjde o aplikáciu nízkej dávky T2 toxínu, ktorá nevedie k úhynu zvierat, ale môže spôsobovať poškodenie hemopoetického, tráviaceho alebo dýchacieho aparátu. V priebehu experimentu zvieratá budú mať voľný prístup k vode a krmivu, budú zachované štandardné podmienky chovu a starostlivosti o zvieratá.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Stredná kategória krutosti, ide o štúdiu na zistenie rozsahu dávky s akútnym účinkom.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Z dôvodu, že v pokuse ide o sledovanie interakcií v organizme, je použitie živých zvierat nevyhnutné. Ide o sledovanie potenciálne toxického účinku T-2 toxínu a preventívne aplikovaného beta-D-glukánu na primárne a sekundárne orgány imunitného systému a čreva, čo nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom v *in vitro* podmienkach.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Do pokusu bude zaradených 40 ks kurčiat, pre každý odber a skupinu najmenší počet, na ktorom je možné robiť relevantné štatistické vyhodnotenie a následné publikovanie v karentových časopisoch.

3. Zjemnenie:

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

Mykotoxikóza spôsobuje klinické príznaky u kurčiat iba pri vyšších dávkach. V našom prípade ide o nízku dávku, ktorá sa klinicky nemusí prejaviť, ale môže indukovať zmeny detegované genetickými, histologickými a imunologickými metódami.

V prípade výskytu príznakov budú choré zvieratá prednostne použité na odber biologických vzoriek. Zvieratá nebudú opätovne zaradené do pokusu, pretože všetky budú usmrtené a použité na odber vzoriek biologického materiálu.

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

V priebehu pokusu bude zvieratám venovaná štandardná veterinárna starostlivosť. Kontrola bude vykonávaná veterinárnym lekárom, zodpovedným za starostlivosť o zvieratá.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Príloha č. 1

Netechnického zhrnutia projektu:

Názov projektu: Progresívne polymérne technológie v biomedicíne: Polymérne mikrokapsule pre imunitnú ochranu transplantovaných pankreatických ostrovčiekov v liečbe cukrovky

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1624/13-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

Enkapsulácia, pankreatické ostrovčeky, diabetes mellitus

Účel projektu* : Translačný alebo aplikovaný výskum

Opísať ciele projektu:

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

Cieľom predkladaných experimentov je určenie vplyvu enkapsulačného materiálu a metódy enkapsulácie na prežívanie Langerhansových ostrovčiekov. Zdokonalenie procesu enkapsulácie a výber vhodných materiálov je nutný pred použitím tejto metódy liečby cukrovky v klinickej praxi.

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

Enkapsulácia pankreatických ostrovčiekov je jedným z dlhodobých riešení udržiavania normoglykémie u pacientov s cukrovkou. Umožňuje totiž transplantáciu bez ďalšej liečby imunosupresívami. Pred zavedením takejto metodiky do praxe, musia mikrokapsule vykazovať vhodné biologické, chemické a fyzikálne vlastnosti ako aj požiadavky na proces prípravy z pohľadu homogenity a sterility, reprodukovateľnosti a dostatočnej kapacity pripravených mikrokapsúl.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Dospelé potkany, samce kmeňa Wistar (200-400 g). Predpokladaný počet je 48 v priebehu 2 rokov.

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

Zvieratá budú celkovo anestetizované intraperitoneálnym podaním pentobarbitalu. Po excízii pankreasu bude zviera v celkovej anestéze usmrtené predávkovaním anestetikom. Bolesť, utrpenie aj strach by zvieratá mali pociťovať iba minimálne pri vpíchnutí anestézy.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Postupy v projekte sa vykonávajú v celkovej anestéze, po ktorej zviera už nenadobudne vedomie, ale bude usmrtené predávkovaním anestetika, preto sú podľa klasifikácie krutosti postupov zahrnuté do : BEZ MOŽNOSTI ZOTAVENIA.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Tento projekt je zameraný na vylepšenie enkapsulácie pankreatických ostrovčiek, ktoré by slúžili pri liečbe cukrovky. Vhodný výber polymérov a zdokonaľovanie metódy prípravy je nevyhnutný pre minimalizovanie poškodenia biologického materiálu, v tomto prípade ostrovčiek. Toto testovanie musí prebiehať na tkanivovej úrovni, aby sa na konci enkapsulácie dalo posúdiť zachovanie fyziologických funkcií, teda adekvátne sekrécia inzulínu po zvýšení koncentrácie glukózy. Existujúce bunkové línie (napr., β TC3) sú schopné produkovať inzulín a zachovávajú si vlastnosti β -buniek. Ich nevýhodou je fakt, že sú to jednotlivé bunky a nie ostrovčeky, produkujúce aj iné hormóny a po druhé ich sústavné delenie, čo by mohlo viesť k narušeniu kapsuly pri premnožení buniek alebo k zničeniu membrány, ktorá sa tvorí pri obaľovaní priamo na bunke.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Keďže z jedného zvieraťa je možné naizolovať 300 ostrovčiek, v jeden deň budú izolované z 3 zvierat, čím sa získa približne 1000 ostrovčiek. Predpokladáme približne 10 až 20% straty v priebehu enkapsulácie. Získané enkapsulované ostrovčeky budú podrobené rôznym testom ako je: priepustnosť kapsúl, ich fyzikálna a chemická stabilita, a v neposlednom rade prežívanie ostrovčiek a zachovanie ich fyziologických funkcií. Celkovo sa plánuje 48 zvierat počas 2 rokov. 16 izolácií umožní vylepšiť zloženie aj metódu vytvárania kapsúl okolo ostrovčiek.

3. Zjemnenie:

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

Pre izolovanie ostrovčiek sa dajú použiť aj myši, ale počet ostrovčiek z jedného experimentálneho zvieraťa je podstatne vyššia u potkanov. Zvieratá budú po dovoze na ÚEE SAV umiestnené do karantény po dobu najmenej jedného týždňa a následne chované v klimatizovanej ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) miestnosti s 12 hodinovým svetelným režimom. Voda a peletovaná strava bude zvieratám podávaná *ad libitum*. Zvieratá budú až do dňa pokusu intaktné a kontrolované veterinárnym lekárom. Experiment prebieha v celkovej anestéze (Pentobarbital). Po excízii pankreasu bude zviera v celkovej anestéze usmrtené predávkovaním anestetikom. Bolesť, utrpenie aj strach by zvieratá mali pociťovať iba minimálne pri vpíchnutí anestézy.

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

Príloha č. 2

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu:

Výskum úlohy nervového systému pri vzniku a progresii experimentálneho melanómu indukovaného u laboratórnych myši kmeňa C57Black subkutánnym podaním B16-F10 nádorových buniek

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1632/13-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

- melanóm, laboratórne myši, nervový systém, neurobiológia nádorov

Účel projektu:

a) základný výskum

b) translačný alebo aplikovaný výskum

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

d) ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

e) ochrana druhov

f) vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

g) zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch.

Opísať ciele projektu:

A/ Imunohistochemicky charakterizovať inerváciu nádorového tkaniva (experimentálny melanóm) a jej fenotyp.

B/ Chemickou sympatikotómiou využitím neurotoxínu 6-hydroxydopamínu inhibovať činnosť periférnych sympatikových nervových zakončení a následne sledovať vplyv tohto zásahu na vznik a progresiu experimentálneho melanómu.

C/ Subdiafragmatickou chirurgickou vagotómiou inhibovať činnosť parasympatikového nervus vagus a následne sledovať vplyv tohto zásahu na vznik a progresiu experimentálneho melanómu.

D/ Použitím implantovaných osmotických minipúmp chronicky podávať (intraperitoneálne) vybrané látky (noradrenalín, nikotín, beta blokátory) a sledovať ich vplyv na progresiu experimentálneho melanómu.

E/ Využitím stereotaktického aparátu a špeciálne upraveného Halászovho nožika prerušiť nervové dráhy tých mozgových oblastí, ktoré na centrálnej úrovni regulujú neuro-endokrinné-imunitné interakcie organizmu a následne sledovať vplyv tohto zásahu na vznik a progresiu experimentálneho melanómu.

F/ Využitím stereotaktického aparátu a infúznej súpravy napojenej na osmotickú minipumpu chronicky intracerebroventrikulárne podávať protizápalovo pôsobiaci inhibítor NF κ B a následne sledovať vplyv tohto zásahu na vznik a progresiu experimentálneho melanómu.

Prínos z vykonaného projektu:

Hoci mnohé experimentálne a klinické práce preukázali zapojenie nervového systému v patogenéze nádorových chorôb, mechanizmus akým môže nervový systém ovplyvniť vznik a progresiu nádorov, nie je doposiaľ úplne objasnený. Výskum úlohy nervového systému v procesoch vzniku a progresie melanómu plánovaný v našom laboratóriu bude orientovaný na objasnenie úlohy:

- neuroimunitných interakcií v etiopatogenéze nádorových chorôb,
- obojsmerných interakcií nádorových buniek s mikroprostredím sprostredkovaných signálnymi molekulami,
- širokej škály neurotransmitterov pôsobiacich na funkcie nádorových buniek esenciálne pre ich invazívne a metastatické aktivity. Pôsobenie neurotransmitterov prostredníctvom receptorov na nádorových bunkách, ovplyvňuje proliferáciu, migráciu a invazívnosť týchto buniek. Preto je cieľom predkladaného projektu zistiť, či stimulácia resp. inhibícia sympatikového/parasympatikového nervového systému na periférnej úrovni ovplyvní vznik a rast experimentálneho melanómu.
- neoneurogenézy - priamej inervácie nádorového tkaniva nervovým systémom. Nedávne zistenia totiž indikujú, že nádorové bunky sa spolupodieľajú na procese neoneurogenézy syntézou a uvoľňovaním neurotrofných faktorov, prostredníctvom ktorých iniciujú svoju vlastnú inerváciu. Poznatky o inervácii nádorového tkaniva, rovnako ako aj poznanie fenotypu tejto inervácie, môže umožniť, zásahmi do činnosti nervového systému, modulovať nádorový rast a jeho progresiu.

Ďalším cieľom predkladaného projektu je objasniť úlohu mozgových štruktúr zapojených do regulácie imunitných, ako aj neuroendokrinných odpovedí počas progresie experimentálneho melanómu u laboratórnych myší. Predpokladáme, že monitorovaním aktivity nervových štruktúr bude možné posúdiť priebeh nádorového rastu a ovplyvnením činnosti určitých nervových štruktúr bude dokonca možné nádorový rast inhibovať.

Veríme, že podrobnejšie štúdium interakcií medzi nervovým systémom a vyvíjajúcim sa melanómom vytvorí v budúcnosti podklad pre zavedenie nových postupov pri diagnostike a liečbe tohto rozšíreného typu nádoru.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

- laboratórne myši kmeňa C57Black, dospelé samce aj samice, počet: 364 ks

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

Vzhľadom nato, že laboratórnym myšiam sa budú subkutánne inokulovať melanómové B16-F10 nádorové bunky, budú zvieratá vystavené nepriaznivému účinku vyvíjajúceho sa melanómu. Okrem toho, zvieratá podstúpia niektoré vybrané chirurgické, príp. farmakologické zásahy, ktoré tiež môžu ovplyvniť ich zdravotný stav. Hoci budú všetky chirurgické zákroky u zvierat vykonané pod anestéziou (implantácia osmotických minipúmp, chirurgická subdiafragmatická vagotómia, stereotaktické operácie mozgu), predpokladáme ich krátkodobý nepriaznivý vplyv na zdravotný stav zvierat (predovšetkým pooperačná bolesť, ktorú zmiernime jednorazovým i.p. pooperačným podaním analgetika Rometaru). Všetkým predvídateľným zdravotným komplikáciám sa budeme snažiť zabrániť, prípadne ich zmierniť.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Naplánované zásahy na laboratórnych myšiach môžeme zaradiť do nasledovných kategórií podľa úrovne krutosti:

Kategória slabé (zvieratá budú pociťovať krátkodobú slabú bolesť a vo významnej miere nebude narušená ich pohoda ani celkový stav):

- i.p. podávanie anestézie pred vykonaním chirurgických zákrokov,
- i.m. podávanie pendeponu po operačných zákrokoch,
- s.c. inokulácia nádorových buniek,
- i.p. injekčné podávanie vybraných látok experimentálnym zvieratám,
- podávanie tekutej potravy Fresubinu po vykonaní chirurgickej subdiafragmatickej vagotómie pre zabránenie gastrostázy,
- vyholenie zvierat pred inokuláciou nádorových buniek, ako aj pred chirurgickými zákrokmi použitím elektrického holiaceho strojčeka.

Kategória stredné (zvieratá budú pociťovať krátkodobú strednú bolesť a je pravdepodobné, že stredne narušia pohodu alebo celkový stav zvierat):

- chirurgická subdiafragmatická vagotómia,
- implantáciu osmotických minipúmp,
- stereotaktické operácie mozgu,
- znehybnenie zvierat v plastovej trubici s otvormi na dýchanie,
- rast melanómových nádorov.

Uplatňovanie zásad 3R:

1. Nahradenie zvierat (zdôvodnenie použitia zvierat v projekte, zdôvodnenie prečo sa nemôže použiť alternatívna metóda bez použitia zvierat)

Úlohu nervového systému v procesoch súvisiacich so vznikom a progresiou nádorov je možné študovať len na animálnom modeli s dostatočne vyvinutým nervovým systémom. Preto nie je možné navrhovaný experiment realizovať na systematicky nižšom druhu živočíchov a ani za využitia počítačovej simulácie. Je nevyhnutné využiť laboratórne myši kmeňa C57Black, keďže predstavujú ideálny model pre indukciu melanómov subkutánnou aplikáciou B16-F10 melanómových nádorových buniek. V prípade, že bude možné experimenty uskutočniť priebežne (personálne a priestorové zabezpečenie), budeme minimalizovať počet zvierat redukciou kontrolných skupín. Taktiež, ak bude možné využiť vzorky získané z jedného experimentu aj v druhom experimente, počet experimentálnych zvierat adekvátne znížime.

2. Redukcia počtu zvierat (zdôvodnenie použitia určeného počtu zvierat, akým spôsobom sa použije redukcia, objasnenie toho, že sa použil minimálny možný počet zvierat)

Počet zvierat je minimalizovaný na najmenšiu možnú hranicu tak, aby získané údaje mohli byť štatisticky spracované a mali serióznú výpovednú hodnotu. Avšak, z dôvodu reprodukovateľnosti a validity pokusov a z dôvodu nie 100% incidencie nádorov u laboratórnych zvierat po inokulácii nádorovými bunkami, je potrebné zaradiť do jednej experimentálnej skupiny priemerne 10 zvierat. V kontrolných skupinách postačujú 4 zvieratá.

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

Utrpenie zvierat bude minimalizované dodržiavaním každej z piatich zásad uvádzaných pri definícii welfare zvierat. Testy budú uskutočňované tak, aby zvieratá čo najmenej strádali. Zvieratá budú chované v klietkach maximálne po 6 za prísunu peletovanej stravy a vody *ad libitum*, čo im umožní plne realizovať prirodzené formy správania, vrátane sociálneho. Počas chirurgických zásahov (subdiafragmatická vagotómia, implantácie kanýl a osmotických minipúmp, mechanická deaferentácia) budú zvieratá v celkovej anestézii (ketamín/xylazín, i.p.), čím sa zminimalizuje ich utrpenie na najmenšiu možnú mieru. Zdravotný stav zvierat bude denne monitorovaný. Zvieratám budú taktiež pred operačnými zákrokmi podané anestetiká (kombinácia ketamín/xylazín v pomere 1:3 a v množstve 0,15 ml na zviera intraperitoneálne), aby sme znížili pôsobenie chirurgického zásahu. Po operačných zásahoch budú zvieratá ponechané na vyhrievacích podložkách do doznenia účinkov anestézie. Následne budú preložené do chovných klietok, kde budú pravidelne monitorované.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno nie

PRÍLOHA 2

Netechnické zhrnutie projektu

1667/13-221/3

Rakovina prsníka je najčastejším nádorovým ochorením žien vo svete. Liečba pacientov s mamárnym karcinómom je finančne a časovo náročná a často býva sprevádzaná vedľajšími účinkami liečebných postupov.

Resveratrol je polyfenol vyskytujúci sa v mnohých rastlinách, napríklad hrozne, moruši či tmavo zafarbenom ovoci či zelenine. Je známy svojimi antikarcinogénnymi účinkami v rôznych typoch nádorov, napr. žalúdka, čreva, ovárií či prsníka. Účinkovanie resveratrolu sa vyznačuje dávkovou závislosťou, ktorú sme sledovali v predošlých experimentoch na našej katedre. Okrem toho však pôsobí i časovo závisle. Doposiaľ však nebola publikovaná nijaká štúdia, zaoberajúca sa cirkadiánnym účinkovaním resveratrolu v procese karcinogenézy.

Cieľom tohto projektu je analyzovať účinok resveratrolu, podávaného v tmavej časti dňa, na vybrané nádorové parametre 40 samíc potkanov kmeňa Sprague-Dawley. Základné parametre karcinogenézy nám poskytnú obraz o celkovom efekte resveratrolu na nádorové ochorenie prsníka.

Po vstupe do bunky sa resveratrol viaže predovšetkým na estrogénové receptory. Preto je ďalším dôležitým cieľom sledovanie a kvantifikácia expresie estrogénových receptorov na bunkovej membráne nádorových buniek s následným štatistickým vyhodnotením.

Resveratrol je známy antioxidant. Jedným zo základných vlastností antioxidantov je schopnosť vychytávať reaktívne formy kyslíka, dusíka, ale aj iných. Cieľom tejto časti experimentu je stanoviť hladiny reaktívnych foriem kyslíka pomocou prietokového cytometra v krvi zvierat, s následným štatistickým vyhodnotením.

V súčasnosti stále pretrváva nedostatok klinických štúdií, zaoberajúcich sa účinkami resveratrolu na ľudský organizmus a preto je tento fakt v centre záujmu vedeckej komunity. Dávková a časová závislosť účinkovania resveratrolu znemožňuje jeho priamu aplikáciu v klinickej praxi.

Predkladaný projekt je v súlade so zásadami 3R:

Zásada nahraditeľnosti:

Nádorové ochorenia sú druhou najčastejšou príčinou úmrtí na celom svete. Je preto dôležité, aby sa neustále objavovali a skúmali nové preventívne látky. Vzhľadom na charakter pokusu je nevyhnutné, aby bol vplyv preventívnej látky analyzovaný v podmienkach *in vivo*, ktoré tvoria systém dejov a odpovedí na stimuly z vonkajšieho a vnútorného prostredia. Potkany majú podobnú histologickú stavbu a vývin mliečnej žľazy ako človek a tvoria najvhodnejší model na skúmanie vplyvu látok v procese mamárnej karcinogenézy. Okrem toho, vznikajúce nádory majú rovnaký pôvod ako u človeka a odpovedajú v rovnakej miere na pohlavné hormóny.

Zásada zníženia:

Plánovaný experiment je zostavený tak, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov použitých čo najmenej zvierat a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého použitého pokusného zvierat'a. Plánovaný experiment je zároveň zostavený tak, aby bola minimalizovaná bolesť alebo stres použitých pokusných zvierat a aby bol zabezpečený primeraný welfare od ich privezenia až po smrť.

Zásada zdokonalenia (zjemnenia):

Počas experimentu bude zabezpečená komplexná starostlivosť o zvieratá. Bežnú starostlivosť o zvieratá budú zabezpečovať laborantky, ktoré sú príslušne školené a poučené. Všeobecne sa dá konštatovať, že uvedené experimentálne postupy nespôsobia neprimeraný diskomfort pokusných zvierat a že ide o štandardné typy pokusov (bežne používané v špičkových vedeckých pracoviskách) v súlade s etickými požiadavkami.

Spätné posúdenie - nie

Príloha č. 1

Názov projektu: Vplyv kondičného stavu samíc na preimplantačný vývin embrya a úspešnosť biotechnologických postupov v reprodukčnej praxi (VEGA 2/0001/14)

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2296/13-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): preimplantačné embryo, obezita, podvýživa, biotechnológia

Účel projektu*: Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu: Predmetom výskumu bude štúdium vplyvu odchýlok kondičného stavu samíc od fyziologických hodnôt na embryá v preimplantačnom štádiu vývinu. V minulosti bol dokázaný nepriaznivý vplyv materskej obezity a podvýživy na špecifické parametre oocytov a raných embryí, no mechanizmy týchto vplyvov ani potenciálny dopad na reprodukčnú prax doposiaľ nie sú známe. Hlavným cieľom projektu bude identifikovať vplyv kondičného stavu samíc na úspešnosť bežne využívaných biotechnologických postupov – na hormonálne riadenie pohlavného cyklu zvierat a na in vitro kultiváciu embryí.

Prínos z vykonaného projektu: Výsledky experimentov prinesú nové poznatky o vplyve metabolických a endokrinných zmien v materskom prostredí na fyziologické pochody v preimplantačnom embryu (funkčná morfogénéza, metabolizmus a transkripcia) a pomôžu sformovať príslušné odporúčania pre biotechnologickú prax.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: Modelovým zvieratom pre všetky experimenty bude myš laboratórna (kmeň ICR). Pri zohľadnení všetkých potrieb vedeckého výskumu i predpisov stanovených v nariadení vlády 377/2012 Z.z. by maximálny počet použitých myší za celé obdobie trvania projektu (01/2014-12/2017) nemal prekročiť 3200 myší.

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu: Ujma spôsobená zvieratám z hľadiska utrpenia, bolesti a strachu bude minimálna. Okrem dietetických zmien u ½ zvierat, neinvazívneho merania objemu tuku (EchoMRI) a hormonálnej indukcie pohlavného cyklu u časti F1 samíc nebude pokusným ani kontrolným zvieratám spôsobovaný žiaden ďalší diskomfort. Všetky invazívne zásahy (izolácia embryí a odber krvi) budú vykonané až po ich usmrtení.

Predpokladaná úroveň krutosti: Všetky postupy vykonávané v rámci pokusov spadajú do kategórie krutosti „slabé“, tzn. zvieratá v ich dôsledku nebudú pociťovať žiadnu alebo iba krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Plánované experimenty nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom bez použitia živých zvierat. Doterajšie poznatky o problematike neumožňujú vytvorenie adekvátneho *in vitro* alebo počítačového modelu, ktorý by dokázal simulovať zložitý vzťah medzi kondičným stavom matky a reprodukciou.

2. Redukcia počtu zvierat:

Plánované experimenty sú zostavené tak, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov použitých čo najmenej zvierat a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého použitého pokusného zvierata. Počet použitých zvierat (3200) bol stanovený tak, aby bola zachovaná reprodukovateľnosť a validita pokusov pri minimálnom objeme vstupného materiálu. Odchov samíc s rôznym objemom telesného tuku bude prebiehať cyklicky. Opakovania postupu budú ukončené vždy v momente, keď sa nazbiera dostatok biologického materiálu (oocytov / preimplantačných embryí), ktorý poskytne interpretovateľné a štatisticky preukazné výsledky. Usmrcovanie zvierat s následným zberom biologického materiálu je v postupe nastavené tak, aby mohlo byť vo vzorkách vyšetrených paralelne toľko parametrov, koľko bude technicky možné. Navrhovaný počet zvierat ale zohľadňuje aj potreby riešenia nepredvídaných vedeckých problémov, preto očakávame, že reálne počty použitých zvierat budú nižšie.

3. Zjemnenie:

Hlavným dôvodom výberu myši laboratórnej je vysoká reprodukčná schopnosť druhu (početnosť vo vrhu, rýchla generačná výmena, celoročný pohlavný cyklus myši), ktorá umožní získanie potrebného objemu interpretovateľných vedeckých výsledkov v relatívne krátkom čase. Plánované experimenty sú zostavené tak, aby bola minimalizovaná bolesť alebo stres použitých pokusných zvierat a aby bol zabezpečený primeraný welfare od ich narodenia až po smrť. Všetci pracovníci, ktorí prichádzajú do styku so zvieratami sú príslušne poučení a budú dbať na humánny prístup k zvieratám a starať sa o to, aby neboli v žiadnej fáze pokusov vystavované zbytočnému stresu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Kedže v projekte nie sú použité primáty ani postupy klasifikované ako „kruté“ a ani tak nestanovuje vyjadrenie etickej komisie, spätné posúdenie projektu nie je podľa § 37 NV 377/2012 Z.z. nutné.

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

Vplyv ranej výživy na kontrolu príjmu potravy, rast a enzymatickú aktivitu tenkého čreva mladých a dospelých zvierat (VEGA 2/0011/14)

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2299/13-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

raná výživa, funkčný stav čreva

Účel projektu*: Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

1. V navrhovanom projekte budeme skúmať dlhodobý vplyv ranej dietárnej intervencie navodenej a) kŕmením potkaních matiek štandardnou laboratórnou diétou alebo vysokotukovou diétou ENSURE plus počas laktácie; b) neonatálnou úpravou veľkosti hniezda (počet mláďat 4, 10 alebo 16/hniezdo) na funkčný stav tenkého čreva a sledovať ako tieto skoré nutričné zásahy ovplyvnia stavbu tela a využiteľnosť krmiva u mladých a dospelých samcov a samíc. Taktiež budeme sledovať, či dôjde k zvýrazneniu alebo zoslabeniu nadobudnutých somatických a funkčných zmien u zvierat so zvýšenou, zníženou a normálnou hmotnosťou po prechode na štandardné, vysokotukové alebo obmedzené kŕmenie.
2. Sledovanie dlhodobého vplyvu rozdielného raného nutričného prostredia na reguláciu telesnej hmotnosti, príjem potravy, enzymatickú aktivitu tenkého čreva a na zdravie (hodnoty telesného tuku a krvného tlaku) u potkanov pochádzajúcich z hniezd nerovnakej veľkosti za použitia metódy cross-fosteringu. Na 10. deň života mláďatá pochádzajúce z malého hniezda budú premiestnené k matkám starajúcim sa o optimálny počet mláďat (10) a naopak mláďatá zo stredného hniezda presunieme k matkám z malého hniezda.
3. V ďalších experimentoch budeme hodnotiť vplyv aktivácie β 3-adrenergných receptorov hnedého tukového tkaniva krátko po narodení u potkanov zo stredného a malého hniezda za použitia

farmakologickej intervencie na ukladanie bieleho tukového tkaniva a zistiť úlohu hnedého tukového tkaniva pre optimalizáciu energetickej rovnováhy v neskoršom období.

Prínos z vykonaného projektu

Výskum bude nadväzovať na naše doterajšie výsledky dosiahnuté pri riešení VEGA a EU projektov, v ktorých sme okrem zmien týkajúcich sa somatických a kŕmnych parametrov, pozorovali aj výrazne mikrobiálne a funkčné alterácie tenkého čreva. Informácie o presnej úlohe tenkého čreva pri vzniku metabolických a kŕmnych porúch zvierat prekŕmených/podvýživených v ranom období sú v súčasnej dobe nejasné, preto experimentálny model použitý v tomto projekte, by mohol byť nápomocný pri zavádzaní nutričných stratégií zabráňujúcich zmenám v kontrole príjmu potravy a regulácie telesnej hmotnosti ako aj pri zabezpečovaní optimálneho využitia krmiva a rastu zvierat. Dá sa predpokladať, že s výživou súvisiace somatické a funkčné zmeny nadobudnuté v období vývoja, môžu zohrávať významnú úlohu pri nastavení budúcich fyziologických procesov regulujúcich metabolizmus a stavbu tela zvierat.

Vzhľadom k tomu, že o úlohe hnedého tukového tkaniva v mechanizmoch kontroly hmotnosti a telového tuku je k dispozícii pomerne málo informácií, môžu byť naše pokusy na zvieratách využívajúce špecifickú stimuláciu hnedého tukového tkaniva (podporuje lipolýzu a energetický výdaj) dôležité. Je známe, že u cicavcov hnedé tukové tkanivo zohráva významnú úlohu v termogenéze zodpovednej za kontrolu telesnej teploty a regulácie energetickej rovnováhy (Ghorbani a kol. 1997). Z tohto pohľadu môže byť daný jav potenciálne zaujímavý pre rozšírenie doterajších poznatkov o patogenéze metabolických porúch, čo môže pomôcť pri nastavení farmakologickej a nutričnej stratégie pri prevencii a liečbe chorobnosti hospodárskych zvierat.

Literatúra:

Ghorbani a kol. *Biochemical Pharmacology* 1997;1:121–131.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan laboratórny Sprague-Dawley 480 ks/3 roky

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

V rámci pokusov nepredpokladáme žiadne nepriaznivé vplyvy na použité zvieratá, zvieratá nebudú vystavené žiadnym bolestivým zákrokom a ani zbytočnému stresu. Počas všetkých experimentov budeme neustále dbať na humánny prístup k zvieratám.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Na základe miery bolesti, utrpenia atď. postupy vykonávané na zvieratách v našich experimentoch možno podľa príloha č. 4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z. z. Klasifikácia krutosti postupov, klasifikovať ako slabé.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

V registroch medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód sme nenašli žiadne uznané alternatívne metódy nevyžadujúce použitie zvierat pre vykonanie našich experimentov (ECVAM <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/> Database service on alternative methods to animal

experimentation; ICCVAM <http://iccvam.niehs.nih.gov/> The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. Keďže sa jedná o sledovanie raných nutričných zásahov na kŕmne a somatické parametre ako aj funkčné zmeny v tenkom čreve zvierat, pokus nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom.

2. Redukcia počtu zvierat:

Uvedené počty zvierat v skupinách sú minimálne, stanovené počty sú potrebné na získanie dostatočného množstva interpretovateľných a správne štatisticky vyhodnotiteľných výsledkov jednotlivých experimentov a na optimálne posúdenie účinkov ranej nutričnej intervencie.

3. Zjemnenie:

Zvieratá v priebehu pokusov nebudú vystavené žiadnym bolestivým zákrokom, utrpeniu ani vplyvom životného prostredia. Počas všetkých experimentov budeme neustále dbať na humánný prístup k zvieratám. Na zvieratách nebudú vykonávané žiadne invazívne zákroky. Nebudeme ich vystavovať zbytočnému stresu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Ovplyvnenie apoptózy a zápalu inhibítormi fosfodiesteráz v podmienkach experimentálne indukovaného alergického zápalu dýchacích ciest

Cieľom projektu je zistiť účinnosť selektívnych inhibítorov fosfodiesteráz (PDE) pri ovplyvnení apoptotických zmien zápalových buniek v podmienkach alergického zápalu a objasniť, či tieto zmeny korelujú so zmenami zápalových markerov, resp. s in vivo a in vitro reaktivitou dýchacích ciest (DC).

Na dosiahnutie tohto cieľa budeme realizovať nasledovné čiastkové úlohy:

- na modeloch hyperreaktivity DC budeme porovnávať účinky viacerých selektívnych inhibítorov PDE, a to najmä inhibítorov izoenzýmov PDE3, 4, 5 a 7, u ktorých predpokladáme najvýraznejšie bronchodilatačné a protizápalové pôsobenie ako aj ovplyvnenie kašľa a hyperreaktivity dýchacích ciest a menej vedľajších účinkov spomedzi selektívnych inhibítorov PDE; zároveň porovnáme ich účinnosť s klinicky overenými bronchodilatačnými (beta2-sympatomimetiká, parasympatolytiká, metylxantíny) a protizápalovými (glukokortikoidy) pôsobiacimi látkami,
- zameriame sa na sledovanie ovplyvnenia eozinofilného zápalu a jeho markerov ako aj markerov oxidačného stresu v podmienkach experimentálne navodenej hyperreaktivity pôsobením selektívnych inhibítorov PDE (jednotlivo i v kombinácii),
- po úvodnej všeobecnej analýze vyberieme vhodné markery apoptózy (viabilita buniek, aktivita kaspáz a pod.) zápalových buniek a následne ich namerané hodnoty budeme korelovať s markermi zápalu ako aj s celkovými zmenami reaktivity dýchacích ciest,
- uvedené účinky budeme hodnotiť u vybraných látok pri rôznych dávkach, rôznych dávkovacích schémach (akútne a chronické podávanie) a spôsoboch aplikácie (intraperitoneálne, perorálne a inhalačne).

Počas riešenia projektu budeme priebežne konzultovať získané výsledky v spolupráci s klinickými pracovníkmi; na základe toho sa pokúsime vybrať najvhodnejší selektívny inhibítor PDE a následne pripraviť podmienky pre jeho klinické testovanie.

Predpokladaný prínos projektu:

Z literárneho prehľadu vyplýva, že selektívne inhibítory PDE otvárajú nové potenciálne možnosti ovplyvnenia zápalových ochorení DC spojených s hyperreaktivitou (bronchiálna astma, CHOCHP). Na potvrdenie tohto predpokladu sú však potrebné početné experimentálne ako aj klinické skúšky.

Preto našou snahou bude priniesť originálne poznatky o tom, do akej miery sú schopné selektívne inhibítory PDE3, 4, 5, 7, resp. ich vzájomné kombinácie a kombinácie s inými antiastmatikami tlmiť prejavy zápalu a podporiť pro-apoptotické zmeny zápalových buniek. Zameriame sa aj na rôzne cesty a dĺžku podávania selektívnych

inhibítorov PDE, čím zdokumentujeme aj ich farmakokinetické vlastnosti, resp. participáciu na ich bronchodilatačnom a protizápalovom pôsobení.

Preto budeme sledovať markery zápalovej reakcie, oxidačného stresu i jednotlivých procesov participujúcich na apoptotických zmenách, čím prinesieme originálne výsledky v tejto oblasti pôsobenia selektívnych aj neselektívnych inhibítorov PDE.

Predpokladáme, že našimi výsledkami potvrdíme opodstatnenosť použitia inhibítorov PDE v liečbe ochorení spojených s hyperreaktivitou DC a po zvolení najvhodnejšieho selektívneho inhibítora PDE na základe experimentálnych výsledkov pripravíme podmienky pre jeho testovanie a následne možné uplatnenie v klinickej praxi.

Na pokusy použijeme outbredné morčatá kmeň TRIK o hmotnosti 150 až 350 g v celkovom počte 360.

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

Pri realizácii pokusov sa budeme snažiť dodržiavať všeobecné zásady 3R (Replace, Reduce a Refine):

- nahradenie,
- zníženie,
- zjemnenie.

Nahradenie – postupy projektu nie je možné vykonať bez použitia zvierat. Morča sa vďaka svojmu imunologickému a receptorovému profile blíži vlastnostiam človeka, preto je v z tohto pohľadu najvhodnejším živočíšnym druhom pre zvolený typ experimentov. Zmeny reaktivity in vivo sa nedajú predikovať len na základe in vitro pokusov. Táto metóda nám však umožní pripraviť viac preparátov tak z trachey ako aj z pľúc, čím bude možné použiť menej zvierat.

Zníženie - na získanie platných výsledkov použijeme namiesto 10 len 8 zvierat v každej skupine, čo považujeme za optimálny počet tak z hľadiska reprodukovateľnosti ako aj získania nevyhnutných údajov a objektívne hodnotiteľných výsledkov. Menší počet zvierat by mohol spôsobiť výraznejšie pôsobenie interindividuálnych rozdielov s možnosťou spochybnenia objektívnosti výsledkov. Navrhované postupy sú zároveň usporiadané tak, aby sa z každého zvieraťa získalo maximálne množstvo vzoriek a údajov pre analýzy. Zvyšok vzoriek bude odložený v hlbokomraziacich boxoch, aby sa mohli využiť aj pri prípadných dodatočných analýzach bez potreby použitia ďalších zvierat.

Zjemnenie (Refinement) – 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.

Aplikácia látok a senzibilizácia, ako aj hodnotenie in vivo reaktivity a kašľa bude realizované tak, aby bol pobyt zvieraťa v pletyzmografe zredukovaný na nevyhnutne potrebný čas. Usmrtenie zvieraťa bude formou šetrnej exsanguinácie po navodení celkovej anestézy (ketamín 20 mg/kg hmot. + xylazín 5 mg/kg hmot. i.m.).

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

Príloha 4: 25 22/13-221

Netechnické zhrnutie projektu podľa § 40 nariadenia vlády

Druh, plemeno, chovná línia, pohlavie pokusných zvierat	Plánovaný počet použitých zvierat	za obdobie	trvania pokusu
CD1 ♀, ♂	44 ♀, 204 ♂	September 2013 – Máj 2014	270 dní
NOD ♂	45	September – December 2013	105 dní
A/J ♂	60	Február – Marec 2014	10 dní
CD1 ♂	60	Apríl - Jún 2014	45 dní
CD1 ♂	60	September – Október 2014	45 dní
CD1 ♂	30	Október - December 2014	45 dní
A/J ♂	78	Január – Marec 2015	55 dní
SCID ♂	85	Apríl - Jún 2015	49 dní
SCID ♂	65	September – Október 2015	49 dní
SCID-NOD ♂	35	November - December 2015	49 dní
CD1 ♂	60	Január – Marec 2016	45 dní
CD1 ♂	63	Apríl - Jún 2016	63 dní

Charles River Lab., Germany
Masarykova univerzita, Brno
Harlan Laboratories SRL

DE 2429373
C262760157
REG.NR.2-prof.2914

30048/2007-1001
del15/06/1964

Podrobný cieľ projektu, očakávané výsledky a ich využitie v praxi:

Cieľom pokusu je získať exaktné poznatky o patogenéze coxsackievírusovej infekcie pri dvoch spôsoboch infikovania (parenterálny a perorálny). Vzhľadom k tomu, že v súčasnosti sú k dispozícii prevažne údaje o priebehu infekcie po parenterálnej aplikácii vírusu, ale prirodzená cesta infekcie enterovírusmi u ľudí je alimentárna, je experiment zameraný na podrobné štúdium účasti črevného imunitného systému (GALT) na rozvoji infekcie a vzniku ochorenia. Na štúdie sa používali štandardné laboratórne kmene vírusov. V našom experimente sa použije kmeň vírusu izolovaný od pacienta s juvenilným diabetom, kde bol vírusu vyvolávacím faktorom patologického procesu. Na porovnanie priebehu infekcie budeme sledovať aj patogenézu po infekcii mutantným vírusom a environmentálnymi a klinickými vzorkami. Toto usporiadanie pokusu umožní získať relevantné poznatky o podstate a príčinách rozvoja infekcie u ľudí a tým aj o možnosti opatrení, ktoré znížia riziko patologického procesu.

Projekt sa nemusí spätne posúdiť a netechnické zhrnutie projektu sa aktualizuje

Projekt nepredpokladá ekonomické prínosy. Patogenéza a šírenie sa coxsackievírusu v organizme sa nedá skúmať na ľudskej populácii, preto vďaka podobnosti mCAR receptoru u myši a CAR receptoru u ľudí, je vedecky uznávaným modelovým organizmom štúdia patogenézy coxsackievírusov myši model. Z tohto hľadiska výsledky pokusu majú výslovne význačnú vedecko-výskumnú hodnotu. Výsledky budú zverejnené formou publikácií, prezentácií na národných a medzinárodných vedeckých podujatiach, formou diplomových a dizertačných doktorandských prác.

Po zhodnotení literárnych zdrojov v súčasnej dostupnej vedeckej literatúre zameranej na hľadanie alternatívnych laboratórnych techník navrhovaný projekt

pokusu plne rešpektuje zásadu 3 R, projekt je v súlade s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Replacement: Nie je známa náhrada použitia zvierat v uvedenom projekte. Navrhnutý zvierací druh – myši. U ľudí nie je reálne možné sledovať patogenézu vírusových infekcií a kinetiku deštrukcie buniek. Myšací model, vzhľadom na podobnosť priebehu infekcie s ľuďmi vďaka prítomnosti mCAR receptoru, je vhodným prostriedkom na štúdium ochorení spôsobených coxsackievírusmi. Na súčasnom stupni vedeckého poznania neexistuje dostatočne validovaný *in vitro* alternatívny spôsob sledovania patogenézy vírusových infekcií. Všetky pokusy budú vykonané podľa doporučenej a schválenej metodiky OCED.

Refinement (zjemnenie manipulácie so zvieratami) – Pri manipulácii so zvieratami budeme dodržiavať ŠPP/ EZ/V001-013 a ŠPP/IMU/V017

Reduction (obmedzenie počtu zvierat) – Predpokladaný počet zvierat potrebných na pokus je minimalizovaný na najmenšiu možnú mieru, aby sa však zaručila štatistická validita údajov. Akékoľvek zníženie počtu zvierat môže viesť k zníženiu validity a štatistických kalkulácii preukaznosti pokusu a nevyhnutnosti jeho opakovania.

Bezbolestné usmrtenie zvierat, najhumánnejší spôsob je predávkovanie anestetikom. Eutanáziu zvierat vykonáva poverený ošetrovateľ v miestnosti na to určenej. Eutanázia (v konkrétnych prípadoch podľa plánu pokusu) sa prevedie intraperitoneálne podaním thiopentabarbiturátu. Bez možnosti zotavenia: postupy, ktoré sa celé vykonávajú v celkovej anestézii, po ktorej zviera nenadobudne vedomie, sa klasifikujú ako „bez možnosti zotavenia“.

Späť po sídle - m

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu: 2229/13-221

Hodnotenie hemostatického účinku rekombinantného trombínu na potkanoch.

ÚVOD

Výrazné krvácanie je vážnou komplikáciou každého chirurgického zákroku. V súčasnosti sa na zastavenie krvácania používa podváz veľkých ciev, kauterizácia okolia rany alebo lokálne použitie hemostatických liečiv. Vzhľadom na komplikácie, ktoré sa môžu vyskytnúť pri prvých dvoch technikách (dočasné zastavenie prísunu krvi pri podväze ciev, tvorba exudátu pri kauterizácii) sa javí ako veľmi perspektívne použitie lokálnych hemostatík. Medzi najčastejšie používané hemostatiká patrí trombín. V klinickej praxi sa používa humánny (Evithrom) a bovinný trombín (Thrombostat, Thrombogen) - oba prípravky však majú tak isto obmedzujúce nežiadúce účinky. Pri požití humánneho trombínu je to možné šírenie krvou prenosných chorôb a pri bovinnom trombíne je to tvorba protilátok na bovinne proteíny. V súčasnosti sa veľká pozornosť venuje vývoju rekombinantného trombínu, ktorý by nemal spôsobovať hore uvedené komplikácie.

Rekombinantný trombín, ktorý bude predmetom testovania je produkt firmy , ktorý nebol z hľadiska účinnosti a bezpečnosti zatiaľ testovaný.

CIEĽ

Cieľom štúdie je hodnotenie hemostatického účinku troch liekových foriem rekombinantného trombínu na potkanoch. Experimenty budú vykonané v rámci európskeho projektu "Priemyselný výskum nových liečiv na báze rekombinantných proteínov" č. 26240220034.

TESTOVACÍ SYSTÉM

Experimenty budú vykonané na potkanoch Wistar, samcoch (Velaz Praha) hmotnosti 250 – 300 g. Zvieratá budú ustajnené v chovnom miestnostiach exp.zverinca v označených umelohmotných vaniciach na hoblovancoch , štandardná peletovaná strava MP – OŠ - 06 (BIOFER) a pitná voda ad libitum. Počas experimentu budú mať zvieratá riadený svetelný režim - svetlo/tma -12/12 (ŠPP 002/53204/07).

Klimatické podmienky v chovných priestoroch – teplota $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ a rel. vlhkosť vzduchu 45-65% sú riadené klimatizačnou jednotkou (ŠPP 013/53204/07).

Karanténa zvierat – 7dní (ŠPP 001/53204/07).

Počas experimentu budú zvieratá označené na chvostoch nezmazateľnou farbou.

PREUKÁZANIE SÚLADU S POŽIADAVKAMI NAHRADENIA, OBMEDZENIA A ZJEMNENIA

Posúdenie pokusu z hľadiska 3R

- Refinement – vzhľadom na to, že v pokuse nebudú vykonané žiadne bolestivé zákroky, nie je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť
- Reduction – počty zvierat v pokuse sú primerané, redukované v maximálnej miere; ich ďalšie zníženie by mohlo ovplyvniť reprodukovateľnosť a validitu pokusu

• Replacement – po preskúmaní databáz TOXNE(<http://toxnet.nlm.nih.gov>), ICCVAM (<http://ntpsearch.niehs.nih.gov>, ICCVAM Site) PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) AltTox (www.alttox.org) DrugLib (www.druglib.com) sme nenašli zodpovedajúcu alternatívnu metódu

METÓDA

1. *Povrchové krvácanie (v. jugularis externa)*

24 hod pred pokusom sa zvieratám odoberie strava a nechá sa voľný prístup k vode. Tesne pred pokusom sa zvieratá odvážia a uvedú do narkózy – kombinácia izofluran, N₂O, kyslík. Zvieratá sa umiestnia na vyhrievanú podložku v polohe na chrbte. Miesto na spodnej časti krku sa vystrihá a dezinfikuje Ajatínom. Približne 2-3 cm rez sa vedie stredom krku a vypreparuje sa v. jugularis. Zvieratám sa podá jednorázovo i.v. heparín v dávke 50 UI. V distálnej časti vypreparovanej cievy sa nožnicami urobí 2mm otvor a prekryje sa tampónom obsahujúcim fyziologický roztok, alebo rekombinantný trombín.. Sleduje sa množstvo krvi a čas za ktorý krvácanie zastaví. Predpokladá sa skrátenie času krvácania a menšie množstvo krvi pri použití tampónu s rekombinantným trombínom.

Zvieratá budú usmrtené vykvrvením (odber krvi zo srdca) v inhalačnej anestéze. Odoberatá krv bude použitá v pokusoch in vitro.

2. *Hĺbkové krvácanie*

24 hod pred pokusom sa zvieratám odoberie strava a nechá sa voľný prístup k vode. Tesne pred pokusom sa zvieratá odvážia a uvedú do narkózy – kombinácia izofluran, N₂O, kyslík. Zvieratá sa umiestnia na vyhrievanú podložku v polohe na chrbte. Spodná časť brušnej dutiny sa vyholí a dezinfikuje ajatínom. Brušná dutina sa otvorí po linea alba asi na 4-5cm a pečeň sa opatrne vytiahne. Jeden z lalokov sa nožnicami nastrihne v dĺžke 5-6mm. Ďalší postup je identický ako pri metóde povrchového krvácania – jednotlivým skupinám zvierat sa prikladá na ranu tampón s fyz.roztokom, alebo s trombínom. Tak ako v prvom prípade sleduje sa čas a množstvo vytečenej krvi. Po zastavení krvácania sa brušná dutina zatvorí rana dezinfikuje a zvieratá sa vrátia do chovných vaníc. Na zmiernenie bolesti sa podá zvieratám vhodné analgetikum. 24 hodín po zákroku sa zvieratá usmrtia cervikálnou dizlokáciou a pečeň sa vyberie na histopatologické hodnotenie hojenia rany.

3. *In vitro hodnotenia zrážanlivosti krvi*

Pomocou prístroja Coagulometer CL4 sa bude hodnotiť čas zrážania krvi:

- Normálnej
- S pridaním heparínu
- S pridaním heparínu a rek.trombínu

In vitro pokusmi sa bude sledovať či lokálne aplikovaný trombín neprechádza do celkového systému.

Na túto časť štúdie budú použité zvieratá z prvej časti experimentu (*metóda povrchového krvácania*)

Celkový počet použitých zvierat

Metóda 1 – kontrolná skupina - 10ks

- kontrolná skupina s heparínom – 10ks
- skupiny zvierat s rôznym typom liekovej formy, budú testované tri liekové formy, každá v troch koncentráciách – 90ks
- referenčný trombín v troch koncentráciách – 30ks

Metóda 2 – skupiny zvierat s rôznym typom liekovej formy trombínu, budú testované tri liekové formy, každá v troch koncentráciách – 90ks

- referenčný trombín v troch koncentráciách – 30ks

Metóda 3 - 0 ks (budú použité zvieratá z metódy 1)

Celkom 260ks

Späť na posedenie – nie

Netechnické zhnutie projektu:

2623/13-221

BIODISTRIBÚCIA RH-TROMBINU NA POTKANOCH

CIEĽ

Cieľom štúdie je hodnotenie biodistribúcie rekombinantného ľudského trombinu (rh trombinu) a jeho liekových foriem na potkanoch. Sledovaná bude systémová a orgánová dostupnosť rôznych formulácií rh trombinu použitím rádioaktívne značeného ¹²⁵I-trombinu v modele hemostatického účinku.

Experimenty budú vykonané v rámci EÚ projektu "Prírodný výskum nových liečiv na báze rekombinantných proteínov" č. 26240220034.

Rekombinantný trombin, ktorý bude predmetom testovania, je produkt firmy SCL, ktorý nebol z hľadiska účinnosti a bezpečnosti zatiaľ testovaný.

TESTOVACÍ SYSTÉM

Zvieratá: potkan, Wistar, samce (ŠPPB-00186-AH)

Zdroj: Velez Praha, CR

Počet: počet zvierat spoľu 54 ks + 6 zvierat ako rezerva (dôvod: doplnenie časového bodu v prípade nízkeho objemu vzorky krvi pri odbere z retrobulbárneho plexu)

Pre jeden experiment = jedna formulácia rh trombinu bude 18 ks 6 časových bodov odberov orgánov z toho 3 zvieratá na 1 časový bod, t.j. 3 formulácie (roztok, lyofilizát, gél) = 3 x 18 = 54 kusov.

Karanténna zvieratá: karanténna bude minimálne 5 dní (ŠPPB-00188-AH).

Ustajnenie: Zvieratá budú usťajnené v chovnom miestnostiach oddelenia hobernárneho zverinca v označených umelomimotných vaničkách na (BIOFER) a plná voda *ad libitum*.

Klimatické podmienky: teplota 22 ± 2°C a relatívna vlhkosť vzduchu 45 - 65% v chovných priestoroch sú riadené klimatizovanou jednotkou (ŠPPA-00141-AH).

Počas experimentu budú mať zvieratá riadený svetelný režim (svetlo/dna 12/12).

Manipulácia: Potkany pred experimentom budú rozdelené do experimentálnych skupín, označené na chvoste (čiarovým kódom I - III) a transportované do vaníc (minimálne 3 zvieratá/časový interval) opatrených etiketou s údajmi (číslo štúdie a experimentálnej skupiny, názvom liekovej formy a časovým intervalom). Počas experimentu budú zvieratá označené na chvostoch neznazateľnou farbou.

Anestézia: Zvieratá pred odoberom krvi budú umiestnené v exkítore a uspané inhaláciou dietyléteru.

Eutanázia: Eutanázia zvierat bude podľa ŠPPA-00187-AH. Pred výberom orgánov budú zvieratá humanitne usmrtené vykrvácaním punkciou zo srdca v celkovej anestéze.

PREUKÁZANIE SÚĽADU S POŽIADAVKAMI NAHRADENIA, OBMEZDENIA A ZIEMNENIA

Posúdenie pokusu z hľadiska 3R

- Refinement – vzhľadom na to, že v pokuse nebudú vykonané žiadne bolestivé zákroky, nie je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť

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

- Replacement – po preskúmaní databáz:

TOXNET (<http://toxnet.nlm.nih.gov>)

ICCVAM (<http://nrcsearch.niehs.nih.gov/ICCVAM/Site>)

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

AltTox (www.alttox.org)

DrugLib (www.druglib.com)

sa nenašli zodpovedajúca alternatívna metóda.

METÓDY

1. Spôsob aplikácie

Použitá dávka, príprava aplikácie formy a spôsob podania rôznych formulácií rh trombinu a ostatné údaje budú upresnené po vývoji formulácií trombinu a charakterizácii použitého rádioaktívneho materiálu ¹²⁵I-trombinu.

¹²⁵I-trombin bude aplikovaný ako roztok subkutánne alebo lokálne po namočení tampónu resp. špongie do pripraveného rádioaktívne označeného ¹²⁵I-trombinu a pod, ako napr. gél a priamo aplikovaný na ranu zvierat (nasledujúci vena jugularis resp. laloku pečene zvierat) v rovnakom modeli ako pri sledovaní hemostatického účinku.

2. Biodistribúcia ¹²⁵I-trombinu

Experimentálne podmienky sledovania biodistribúcie rh trombinu a jeho rôznych formulácií budú určené po zistení rýchlosti biodostupnosti ¹²⁵I-trombinu v systéme a v selektovaných orgánoch ako aj v mieste aplikácie jeho formulácií.

Obsah a koncentrácia ¹²⁵I-trombinu v získaných vzorkách budú kvantifikované meraním gama rádioaktivity použitím gama spektrometra Wizard 2 (PerkinElmer).

3. Odber a spracovanie biologického materiálu

Biologický materiál bude odobratý v rôznych časových intervaloch po aplikácii rôznych formulácií rh trombinu.

Odber krvi sa bude robiť podľa ŠPPB-00180-BIO. Krv bude odobratá z anestezovaných zvierat 2-krát z toho istého zvieratá: z retrobulbárneho plexu a punkciou zo srdca. Krv po odbere bude spracovaná na EDTA-plazmu.

Z usmrtených zvierat vykrvácaním pri odbere krvi punkciou z myokardu budú odobraté vitálne orgány a tkanivá, ktoré budú omývané vo fyziologickom roztoku a zviazané (ŠPPA-00072-GEN) - vlhká imotnosť.

Spätné posúdenie - nie

Netechnické zhrnutie projektu: Experimentálna infekcia laboratórnych zvierat kliešťami prenášanými mikroorganizmami.

Kliešte majú celosvetový význam ako rezervoáre a prenášače rôznych patogénnych mikroorganizmov (vírusy, baktérie, prvoky), ktoré vyvolávajú závažné ochorenia ľudí a zvierat, akými sú kliešťová encefalitída, lymská borelióza, rickettsiázy, anaplazmóza. V Európe je najvýznamnejším prenášačom patogénnych mikroorganizmov kliešť *Ixodes ricinus*. Štúdium cirkulácie kliešťami prenášaných patogénov medzi kliešťami a hostiteľmi je možné jedine na *in vivo* systémoch a zahŕňa sledovanie nákazy hostiteľa (stavovec) a nákazy kliešťov patogénmi v rôznych vývinových štádiách, ako aj ich transštádiálneho prenosu. Neoddeliteľnou súčasťou života kliešťov je cicanie krvi teplokrvných živočíchov, počas ktorého kliešte vylučujú do hostiteľov prostredníctvom slín aj patogénne mikroorganizmy a zároveň sa nakazia patogénmi spolu s prijatou krvou infikovaných zvierat.

Predložený projekt pokusu je súčasťou riešenia medzinárodného a domáceho projektu a je zameraný na:

1/ Sledovanie interakcie borélií a rickettsií v infikovaných kliešťoch a vplyvu koinfekcie na prenos nákazy do hostiteľov, jej horizontálny prenos do ďalších kliešťov ako aj jej vertikálny prenos v populácii kliešťov s cieľom rozšíriť poznatky o udržiavaní nákaz v prírodných ohniskách.

2/ Vypracovanie modelu experimentálnej infekcie vynárajúcim sa patogénom *Anaplasma phagocytophilum* s použitím laboratórnej myši, európskych izolátov baktérie a kliešťa *Ixodes ricinus* s cieľom rozšíriť poznatky o úlohe hlodavcov pri cirkulácii rôznych kmeňov *A. phagocytophilum* a o epidemiológii anaplazmózy v Európe.

Vyplývajú z ektoparazitického spôsobu života kliešťov a nutnosti sledovať cirkuláciu kliešťami prenášaných mikroorganizmov medzi kliešťami a teplokrvnými živočíchmi za účelom štúdia mechanizmov prenosu týchto mikroorganizmov, ich diseminácie v nakazených živočíchov a patogenézy, pre daný druh pokusov neexistujú *in vitro* systémy, ktoré by nahradili použitie laboratórnych zvierat. Vzhľadom na nevyhnutnosť použitia laboratórnych zvierat sa v projekte sleduje a uplatňuje najnovšia legislatíva v súvislosti so smernicami o použití zvierat na vedecké účely, ktorú uzákonil Európsky parlament vo forme revidovanej smernice 2010/63/EU o zvieratách používaných na vedecké účely, ktorá nadobudla účinnosť 1. januára 2013, ako aj Nariadenie Vlády Slovenskej republiky zo 14. novembra 2012, ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely (Zbierka zákonov č. 377/2012) a Vyhláška 436 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky zo 14. decembra 2012, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o požiadavkách na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely. Nové právne predpisy prísne dbajú na dodržiavania pravidiel troch Rs (replacement, reduction, refinement) (t.j. nahradenie, obmedzenie a zmiernenie testov na zvieratách), t.j. aby sa minimalizoval počet zvierat používaných na pokusy a aby sa vždy, keď je to možné, využívali alternatívne metódy, a aby sa v prípade keď nie je možné použiť alternatívne metódy, zlepšili a zjemnili metódy v postupoch pri ktorých sa odstráni alebo obmedzí na najnižšiu mieru bolesť, utrpenie, strach alebo trvalé poškodenie zvierat.

V projekte sa ako modelový druh používa myš laboratórna. Maximálny počet zvierat, ktoré sa v pokusoch použijú za 36 mesiacov, je 490 ks Balb/c a 310 ks C3H/N myši (samičky). Použitie dvoch kmeňov myši je zdôvodnený tým, že myši Balb/c sa považujú vo všeobecnosti za menej náchylné na infekciu kliešťami prenášanými baktériami, hoci môžu

slúžiť ako rezervoáre infekcie pre kliešte, kým myši C3H/N sú na infekciu náchylnejšie a sú vhodné pre sledovanie patologických zmien vyvolaných nákazou.

V údajoch o plánovaných počtoch zvierat je zahrnutý aj počet potrebný pre opakovanie niektorých pokusov. Opakovania pokusov sa však obmedzia na nevyhnutné minimum a budú slúžiť výlučne pre overenie sporných výsledkov a objektívne štatistické vyhodnotenia experimentov.

Laboratórne zvieratá budú počas celého pokusu chované za štandardných podmienok podľa platnej normy EU, pričom sa budú rešpektovať základné etické princípy požadované pri zaobchádzaní s pokusnými zvieratami. V súlade s 3Rs zásadami sa počas celého pokusu budú dodržiavať postupy maximálne zjemňujúce pokus. Pre laboratórne myši budú počas pokusov vytvorené dobré životné podmienky, obmedzí sa ich bolesť, utrpenie, ako aj prípadná trvalá ujma na minimum. Nakoľko budú myši nakazené kliešťami prenosnými baktériami európskeho pôvodu, ktoré sa vyskytujú v našej prírode, je predpoklad, že priebeh infekcie pre myši nebude zaťažujúci a mortalita súvisiaca s infekciami bude minimálna alebo žiadna. Použité kliešte budú pochádzať z laboratórneho chovu a pri ich aplikácii na zvieratá sa použijú metodiky použité v experimentoch s kliešťami, ktoré sú opísané v mnohých publikáciách, napr.: Bouchard K.R. & Wikel S.K. 2005: Care, maintenance and experimental infestation of ticks in the laboratory setting. In: Marquardt W.G. et al. (eds), *Biology of disease vectors*, Elsevier).

Barthold, S.W., Beck, D.S., Hansen, G.M. a kol. 1990. Lyme borreliosis in selected strains and ages of laboratory mice. *J. Infect. Dis.* 162 : 133-138.

Pri výskyte bolestivých stavov bude zvieratám podaný prípravok na zníženie bolesti. Ani v jednom štádiu pokusu nebudú mať zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prístup potravy a vody. Na konci experimentov budú zvieratá humanne usmrtené. Ich orgány budú vypreparované a poslúžia na potvrdenie nákazy mikroorganizmami a sledovanie diseminácie mikroorganizmov do rôznych orgánov.

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov postupy, ktoré sa budú vykonávať na zvieratách v plánovaných pokusoch, je možné zaradiť do kategórie „slabé“.

Každodennú starostlivosť o zvieratá v pokusoch bude vykonávať školený personál - pracovníci pokusného zariadenia.

Nakoľko sú pokusy plánované v rámci predloženého projektu časovo obmedzené na trvanie výskumných úloh, nie je potrebné jeho spätné posúdenie.

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

In vivo sledovanie expresie cytokínov, mucínového génu a imunopatologických zmien v čreve a krvi kurčiat pri akútnej fáze infekcie so *Salmonella enterica* po preventívnej aplikácii *Enterococcus faecium* AL41

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2730/13-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): kurča, cytokíny, *Enterococcus faecium* AL 41, salmonela

Účel projektu*: Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania
v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

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

V predkladanom projekte bude u kurčiat *in vivo* testovaný preventívny účinok novo izolovaného environmentálneho probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* AL41 na akútnu fázu infekcie so *Salmonella enterica*. Overovanie prospešnosti probiotického kmeňa v interakcii so salmonelou bude zamerané na zisťovanie imunologických, morfológických a mikrobiologických parametrov. Determinované zmeny budú zisťované v krvi, slezine, ceku a truse metódami polymerázovej reakcie (RT-PCR), prietokovej cytometrie, spektrofotometrie, histológie, imunohistochemie a bakteriológie. Testovanie tohto kmeňa *in vitro* bolo vykonané a preukázalo pozitívny vplyv na produkciu cytokínov imunokompetentnými bunkami izolovanými z krvi kurčiat. Potvrdenie účinnosti ovplyvnenia produkcie cytokínov po aplikácii tohto kmeňa je potrebné overiť aj *in vivo* v infekčných podmienkach, kedy vynikne jeho imunomodulačný účinok.

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

Predpokladaný prínos bude spočívať v získaní poznatkov vplyvu daného probiotického kmeňa na imunitný stav kurčiat bez infekcie, aj po infekcii salmonelou. V budúcnosti by tieto poznatky mohli byť využité na vývoj liečebného prípravku pri prevencii salmonelózy prípadne na podporu rastu kurčiat ako náhrada v súčasnosti zakázaných antibiotických preparátov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Do pokusu bude zaradených 220 kusov jednodňových brojlerových kurčiat hybridu COBB 500, zmiešaného pohlavia, rozdelených do 4 skupín ($n=55$).

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

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

Predpokladaná úroveň krutosti:

Nakoľko ide o štúdiu na zistenie rozsahu dávky s akútnym účinkom, je navrhovaná „stredná kategória krutosti“.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Z dôvodu sledovania interakcií v organizme je použitie živých zvierat nevyhnutné. Počas salmonelovej infekcie dochádza k zmenám v periférnej krvi, parenchymatóznych orgánoch aj na črevách, preto nie je možné vykonať pokus alternatívnym spôsobom v *in vitro* podmienkach, kedy sú sledované iba jednotlivé systémy alebo dokonca iba niektoré bunky. Taktiež aplikácia probiotického kmeňa v súčinnosti so salmonelovou infekciou vedie k zmenám parametrov v periférnej krvi a čreve, preto je potrebné zaradiť testovanie na živých zvieratách.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Do pokusu bude zaradených 220 ks kurčiat, bude vykonaných 5. odberov, pre každý odber a skupinu najmenší počet, na ktorom je možné robiť relevantné štatistické vyhodnotenie a následné publikovanie v karentových časopisoch. Pri väčších odberoch je použitie viacerých zvierat nevyhnutné, pretože budú vykonávané viaceré metódy, a orgány u kurčiat vo veku do 2 týždňov, počas ktorých pokus bude trvať, sú veľmi malé.

3. Zjemnenie:

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

Do pokusu budú zaradené jednoduchové kurčatá a infekcia bude vykonaná na 4. deň z toho dôvodu, že so stúpajúcim vekom sa zvyšuje rezistencia kurčiat na salmonelovú infekciu. Salmonelóza spôsobuje klinické príznaky u kurčiat iba pri vyšších dávkach a invazívnejších kmeňoch. V našom prípade ide o vyššiu dávku, avšak málo invazívny kmeň, ktorý sa klinicky môže prejaviť iba slabou hnačkou, ale môže indukovať zmeny detegované genetickými, histologickými, imunologickými a bakteriologickými metódami.

V prípade výskytu príznakov budú choré zvieratá prednostne použité na odber biologických vzoriek. Zvieratá nebudú opätovne zaradené do pokusu, pretože všetky budú usmrtené a použité na odber vzoriek biologického materiálu.

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

V priebehu pokusu bude zvieratám venovaná štandardná veterinárna starostlivosť. Kontrola bude vykonávaná veterinárnym lekárom, zodpovedným za starostlivosť o zvieratá.

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

§ 40 **Neotechnické zahrnutie projektu** 2778/13-221

Cieľ projektu

Cieľom projektu je nájsť liečivo s vhodnou obmenou štruktúry potenciálnych hybridných beta- blokátorov (BB) s antihypertenzným a antidylymiotickým účinkom, s vyššou kardioselektivitou a so súčasnou $\alpha 1$ -adenolytickou aktivitou vyvolávajúcou vazodilatáciu. Hlavným cieľom tohto projektu je definovať základný farmakologický profil štyroch originálnych fenykاربamátových zlúčenín s inkorporovaným N-tenylpiperazínom, zosynetizovaných na Katedre farmaceutickej chémie Farmaceutickej fakulty UK.

Očakávaný prínos a ujma

Na základe získaných výsledkov by sme mohli prispieť k objaveniu vhodnej liečby dysrytmii, hypertenzie či ischemickej choroby srdca. V prípade priaznivých výsledkov by tieto látky mohli byť zaradené do ďalšej fázy štúdií smerujúcich k ich využitiu v humánnej medicíne a k zabráneniu prechodu z hyperťovaného do zlyhávajúceho myokardu a komplikáciami s tým spojenými.

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa budú hodnotiť fyziologické, patologické parametre a vhodnosť terapie, je potrebné, aby sa experimenty vykonali „in vivo“ na celom zvierati, poprípade na izolovanom orgáne (aorta, srdce). Keďže ide o hodnotenie účinku potenciálnych liečiv, je potrebné aby sa aplikovali aspoň 1 mesiac. V našom experimente sa budú látky aplikovať SHR zvieratám subkutánne. Pri tejto aplikácii budú zvieratá pociťovať krátkodobú slabú bolesť, ktorá však, vo významnej miere nebude narušovať pohodu ani celkový stav zvierat. Experimenty na Wistar zvieratách budú vykonávané v hlbokej anestéze, pri ktorej zvieratá nebudú pociťovať žiadnu bolesť spojenú s vykonávaním pokusu. Za dostatočnú anestézu, budeme považovať stav, keď po stlačení zadnej labky (“toe pinch”) nedôjde k jej reflexnému stiahnutiu. Po skončení pokusu, zvierata nenadobudne vedomie.

Počet a typ zvierat

Potkany, samice rodu Wistar 96
Potkany, samice rodu SHR 58

V predkladanom projekte sa preukázala požiadavka súladu zásad 3R Replacement

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa budú hodnotiť fyziologické, patologické parametre a vhodnosť terapie, je žiaduce aby sa experimenty vykonali „in vivo“ na celom zvierati namiesto bunkových kultúr. Podobne počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom.

Reduction

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie použitím ANOVA testu a Studentovho t-testu pre analýzy týkajúce sa vyhodnotenia vhodnosti zvolenej terapie a sledovania rozdielov v jednotlivých skupinách zvierat vo vzťahu ku zvolenej liečbe. Bude používaná iba jedna kontrolná skupina a zvieratá budú objednávané v rovnakom časovom intervale, aby sa predišlo sezónnym zmenám a potrebe ďalších opakovaní. Taktiež homogénne geneticky rovnaké skupiny zvierat budú zahrnuté v experimentoch.

Refinement

Výsledky jednotlivých častí štúdie budú priebežne vyhodnocované a v prípade zistenia nevhodných neočakávaných udalostí bude experiment ukončený a následne predložený nový projekt tak aby sa znížil počet používaných zvierat.

Predkladany projekt nepodlieha spätnému posúdeniu.

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Tvorba a vývoj diagnostického postupu pri liečbe traumou poškodenej miechy.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2812/13 -221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): trauma miechy, minipig, neuroprotektívne látky

Účel projektu*:

Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Opísať ciele projektu:

Zadefinovanie terapeutického účinku lokálnej perfúzie miechy a lokálneho miechového podchladenia v období, keď sa s terapiou začne 12-18 hodín po úraze miechy, t.j. v časovom úseku, ktorý zodpovedá klinicky novej intervencii po prevoze pacientov na traumatologické resp. neurochirurgické jednotky. Po zadefinovaní terapeutického účinku u miniprasiat, môže byť tento terapeutický postup adaptovaný na klinické použitie u humánnych pacientov s použitím preplachovacích médií a terapeutických komponentov (rastové faktory). Rovnako sa zadefinuje využitie derivátov pluripotentných buniek.

Prínos z vykonaného projektu:

- Zavedenie a využitie derivátov pluripotentných buniek (indukované pluripotentné kmeňové bunky) do klinickej praxe, ktoré bude eliminovať potrebu imunosupresívnej terapie (autológne bunkové transplantáty), a bude predstavovať využívanie najmodernejšej technológie v oblasti bunkovej terapie neurodegeneratívnych chorôb v regióne.
- Po úspešnom zavedení môže byť technológia expandovaná do iných regiónov, alebo centralizovaná s ponukou vytvorenia bunkovej banky indukovaných pluripotentných buniek.
- Jedinečnosť tejto technológie môže týmto spôsobom priamo prispieť k rozvoju ďalších pododvetví v regióne, vrátane produkcie kultivačných médií, rastových faktorov a k vytvoreniu centier, produkujúcich tieto bunkové deriváty na úrovni GLP (good laboratory practice), s cieľom ich využitia v humánnej klinickej praxi.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V postupe budú použité 4 mesačné minipig (Gottingen-Minesota) samičieho pohlavia. Bude použitých (max. 20ks zvierat).

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

Kompresia lumbálnej miechy bude uskutočnená z jej dorzálnej strany, ale tlak na miechu vyvolá poškodenie, ktoré sa rozšíri aj do okolia. Porušia sa základné motorické (proprioceptívne, t.j. myotatické) reflexy, ktoré zabezpečujú stálu adaptáciu dĺžky svalu na pohyb, ďalej polysynaptické reflexy, ktoré ukončujú kontrakcie vyvolané napínavým reflexom a exteroceptívne reflexy, ktoré sa vybavujú dráždením receptorov uložených predovšetkým v koži a sú plurisegmentové. Tieto reflexy budú zachované po traumatickom poškodení lumbálnej miechy iba čiastočne.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Na základe posudzovaných faktorov navrhujeme klasifikáciu krutosti postupu označiť ako **strednú / bez možnosti zotavenia**.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Pokus nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov. Spôsob terapie zahŕňajúci prípravu ľudských neurálnych prekursorov z izolovaných fibroblastov a následné využitie týchto bunkových línií na transplantáciu do traumou poškodenej miechy, nie je možné uskutočniť alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat.

2. Redukcia počtu zvierat:

Počet zvierat 20ks bolo stanovené vzhľadom k tomu, že sa jedná o technicky nové riešenie a časť experimentov bude prirodzene nehodnotiteľných. Budú zostavené a testované 3 skupiny po 6 zvierat, čo je minimálny počet zvierat pre štatistické vyhodnotenie a následné možné opublikovanie detegovaných zmien. Dve zvieratá tvoria skupinu záložných zvierat.

3. Zjemnenie:

Všetky zákroky, ktoré budú na zvieratách realizované, budú vykonávané pod celkovou anestéziou, t.j. nebudú pre zvieratá bolestivé.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno

nie

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu

Fermentované biokrmivá obohatené o polynenasýtené mastné kyseliny a pigmenty a ich vplyv na produkčné ukazovatele, zdravotný stav hydiny a kvalitu hydinového mäsa (VEGA 1/0457/14)

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

3090/13-221

Kľúčové slová (max. 5 slov): výkrm kurčiat, biokrmivo, polosuché kultivácie, polynenasýtené mastné kyseliny, kvalita mäsa

Účel projektu*:

Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónii geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Opísať ciele projektu

Základnými cieľmi projektu bude:

1. Fermentáciou nižších vlákňitých húb (*Mortierella*, *Thamnidium* a *Mucor*), na potravinárskych odpadoch pripraviť biokrmivá obohatené o PNMK (kys. gamalinolénová - GLA, eikozapentaénová - EPA, dihomogamalinolénová - DGLA) a pigmenty (zdroj karotenoidov).
2. V *in vivo* podmienkach na zvieratách skrmovaním fermentovaného biokrmiva v rôznych koncentráciách (5 – 10 %) brojlerovým kurčatám sledovať vplyv podávania vyprodukovaného biokrmiva na zloženie mastných kyselín produkovaného mäsa.

3. V *in vivo* podmienkach na zvieratách sledovať vplyv podávania biokrmiva na klinický stav a produkčné parametre hydiny.
4. V *in vivo* podmienkach na zvieratách sledovať vplyv podávania biokrmiva na imunitný systém hydiny.
5. Sledovať vplyv podávaneého biokrmiva na oxidačnú stabilitu produkovaného hydínového mäsa počas skladovania v mrazničke a chladničke.
6. Sledovať vplyv podávaneého biokrmiva na histologické a chemické zmeny vo svalovine hydiny.
7. Zhodnotiť vplyv pridaných biokrmív na kvalitu produkovaných tepelne opracovaných hydínových výrobkov (obsah masných kyselín, oxidačná stabilita).
8. Vykonať organoleptické hodnotenie produkovaného mäsa a masových výrobkov.
9. Na základe získaných výsledkov jednotlivých pokusov vybrať zloženie optimálne biokrmivo, ako aj podávané množstvo do krmnej dávky na dosiahnutie optimálneho zvýšenia množstva významných masných kyselín v mäse hydiny a zlepšenia produkčných ukazovateľov. Zvýšenie podielu polynenasýtených masných kyselín nesmie byť sprevádzané zmenou oxidačnej stability alebo senzoričných a technologických vlastností mäsa.

Prínos z vykonaného projektu

Predpokladaný prínos bude spočívať vo využití potravinárskych odpadov vo výžive hydiny. Fermentáciou nižších mikroskopických vláknitých húb na odpadoch sa získa krmivo, ktoré je bohaté na polynenasýtené masné kyseliny a pigmenty. Skrmovaním takto pripraveného biokrmiva hydine získame nové poznatky vplyvu tohto krmiva na produkčné parametre, zdravotný stav a biochemické parametre krvi hydiny. Významný prínos bude aj v získaní poznatkov použitia biokrmív vo výkrmе hydiny na kvalitu produkovaného mäsa, hlavne na zloženie masných kyselín tukov mäsa. Výrazne vyšší podiel významných masných kyselín v biokrmive by mal mať vplyv aj na zvýšenie podielu týchto kyselín v mäse, čo by malo mať priaznivý vplyv na zdravie konzumentov.

Druhy použitých zvierat

V jednotlivých experimentoch budú použité jednodňové kurčatá brojlerového komerčného hybridu Cobb 500 samčieho aj samičieho pohlavia. V jednom experimente bude použitých 120 kusov kurčiat rozdelených do troch skupín (3 x 40 ks). Počas celého pokusu bude do experimentov zaradených 360 kusov kurčiat.

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

Počas sledovaného obdobia zvieratám nebude zabránené v prirodzenom správaní, vrátane obmedzenia štandardov na umiestnenie, chov a starostlivosť a nebude im vo významnej miere narušaná pohoda ani celkový stav.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Na základe posudzovaných faktorov navrhujeme klasifikáciu krutosti postupu označiť ako „slabú“.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Postup nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov (mechanizmu účinku biokrmív) na makroorganizmus. Súčasne sa jedná o štúdium vplyvu biokrmív z hľadiska klinických, imunologických a biochemických parametrov hydiny ako aj chemického zloženia a kvality produkovaného mäsa. Jedná sa o interakciu organizmu a biokrmiva, čo nie je možné uskutočniť v *in vitro* podmienkach.

2. Redukcia počtu zvierat:

V postupe bude použitých 120 kusov jednodňových brojlerových kurčiat, rozdelených do 2 pokusných skupín (2 x 40 kurčiat) a jednej kontrolnej skupiny (1 x 40 kurčiat). V rámci každej skupiny sa uskutoční väzbenie kurčiat na 1., 14., 21. 28 a 35. deň výkrmu. Pre štatistické vyhodnotenie konvenčného experimentu je postačujúce zastúpenie zvierat v jednej skupine. Počty kusov kurčiat v skupine (40 ks) považujeme za dolnú hranicu pri pozorovaní tohto druhu, aby výsledky pozorovaní mohli byť doporučené aj pre použitie v praxi.

3. Zjemenie:

V experimentoch budú použité jednodňové kurčatá samčieho aj samičieho pohlavia, ktoré sú z hľadiska štúdia požadovaných parametrov najideálnejším modelovým zvieratom, a v plnej miere spĺňajú charakter pilotných štúdií pri sledovaní vplyvu aplikovaných biokrmív na produkčné ukazovatele a zdravotný stav kurčiat ako aj kvalitu produkovaného hydínového

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

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Príloha č. 4 3110/13-221

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

Názov projektu: **Farmakologická modulácia frekvencie kmitania cílií respiračného epitelu**

Predkladateľ:

Mukociliárny aparát respiračného epitelu zohráva dôležitú úlohu v očisťovaní dýchacích ciest od nadmerného množstva hlienu a iných patogénov. Mukociliárny transport (MCT) je jedným z hlavných, vrodených obranných a nereflexných mechanizmov, ktorý chráni pľúca od škodlivých vplyvov inhalačných polutantov, alergénov a patogénov. Za jeho účinnosť je zodpovedný mukociliárny aparát, zložený z troch funkčných kompartmentov: cílií, ochrannej vrstvy hlienu a tekutej vrstvy povrchu DC. Za fyziologických podmienok ich vzájomnou spoluprácou dochádza k účinnému odstraňovaniu cudzorodých častíc a nadmerného množstva hlienu z pľúc.

Spomalenie pohybu cílií vedie k stagnácii hlienu v dýchacích cestách, sekundárnym infekciám, čo si vyžaduje ďalšiu terapiu. Dysfunkcia MCT bola potvrdená v priebehu akútnych, ako aj chronických ochorení dýchacieho systému. Môže sa týkať samotných riasiniek v dôsledku zmien vo frekvencii a koordinácie ich kmitania,

Zmeny frekvencie kmitania cílií boli potvrdené v priebehu vírusových, bakteriálnych infekcií respiračného traktu, ako aj ťažkého stupňa bronchiálnej astmy. Klinické symptómy týchto respiračných ochorení sú spojené najmä so suchým/produktívnym kašľom, sťaženým dýchaním, alebo pískaním na hrudníku v dôsledku prítomnosti bronchiálnej hyperreaktivity a/alebo nadmernej sekrécie viskózneho hlienu. Ich zmiernenie, alebo úplné odstránenie môžeme v klinickej praxi docieľiť liečbou expektoranciami, antitusikami a antiastmatikami. Niektoré látky zo spomenutých skupín potvrdili v experimentálnych a klinických štúdiách, že dokážu pôsobiť na úrovni DC moduláciou obranných reflexov

fórach v rámci diskusií alebo v oponentských posudkoch publikovaných článkov. Pokusy sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie pokusných zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov prispievajúcich k účelnej farmakoterapii. Riešitelia preto považujú navrhované metódy za vhodné aj pre realizáciu predkladaného projektu.

Pri realizácii pokusov sa budeme snažiť dodržiavať všeobecné zásady 3R:

- nahradenie, zníženie a zjemnenie (Replace, Reduce a Refine).

Nahradenie – v experimentoch použijeme na sledovanie zmien reaktivity dýchacích ciest a frekvencie cílií metódu in vitro. Na rozdiel od metódy in vivo sledujeme reaktivitu hladkých svalov dýchacích ciest a kinetiku cílií respiračného epitelu na preparátoch pripravených zo zvieraťa usmrteného humánnym spôsobom a nevystavujeme tak zviera priamemu pôsobeniu látok a bronchokonstrikčných mediátorov. Okrem toho nám táto metóda umožní pripraviť viac preparátov z trachey, čím bude možné použiť menej zvierat.

Zníženie - na získanie platných výsledkov použijeme namiesto 10 len 8 zvierat v každej skupine, čo považujeme za optimálny počet tak z hľadiska reprodukovateľnosti ako aj získania nevyhnutných údajov a objektívne hodnotiteľných výsledkov. Menší počet zvierat by mohol spôsobiť výraznejšie pôsobenie interindividuálnych rozdielov s možnosťou spochybnenia objektívnosti výsledkov.

Zjemnenie (Refinement) – metódu in vitro považujeme pri tomto type pokusu za vhodnú z toho dôvodu, že zviera nevystavujeme priamo pôsobeniu sledovaných látok a mediátorov, ktoré by mohli spôsobiť zvieraťu za určitých podmienok diskomfort.

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

Netechnické zhrnutie projektu podľa § 35 ods. 2 písm. b) a § 40 nariadenia

Názov projektu: Nové stratégie v liečbe akútneho poškodenia pľúc

a) Informácie o cieľoch projektu:

Cieľom projektu je overiť hypotézu, že vhodný spôsob ventilačnej a farmakologickej intervencie zlepši pľúcne funkcie a zmierni zápal a dysfunkciu pľúcneho surfaktantu pri akútnom poškodení pľúc.

Experimentálny model akútneho poškodenia pľúc (ALI/ARDS) vytvoríme opakovaným lavážovaním pľúc experimentálnych zvierat – dospelých králikov – fyziologickým roztokom. Tým odstránime významnú časť pľúcneho surfaktantu a spôsobíme zvýšenie povrchového napätia v alveolách, prenikanie tekutiny do alveol, pľúcny edém a zápal. Tento model ALI/ARDS je všeobecne akceptovaný a používaný v rámci experimentálneho testovania účinnosti rôznych druhov liečby ALI/ARDS (26-29).

V prvej fáze projektu zároveň porovnáme rôzne druhy umelej pľúcnej ventilácie – konvenčnú mechanickú ventiláciu (CMV alebo IPPV), vysokofrekvenčnú oscilačnú (VFOV) a vysokofrekvenčnú tryskovú (VFTV) ventiláciu. Predpokladáme, že použitie vysokofrekvenčných ventilačných techník zabezpečí efektívnejšiu výmenu dýchacích plynov a zlepšenie respiračných parametrov ako CMV, pričom bude viesť k menším nežiaducim účinkom v zmysle oplyvnenia kardiovaskulárnych parametrov či poškodenia pľúcneho parenchýmu.

Cieľom ďalších etáp projektu bude zhodnotiť účinky viacerých druhov farmakologickej liečby na respiračné parametre, pľúcny edém, pľúcnu vazokonstrikciu, apoptózu a zápal. V druhej etape projektu porovnáme efekt klasických syntetických glukokortikoidov so selektívnymi agonistami glukokortikoidových receptorov (SEGRAs), a to po ich podaní intratracheálne a intravenózne. V tretej etape projektu porovnáme účinky nitro-steroidov s klasickými glukokortikoidmi a inhalovaným oxidom dusnatým, prípadne iným donorom NO. Vo štvrtej etape projektu porovnáme účinky neselektívnych a selektívnych inhibítorov fosfodiesteráz.

Účinky jednotlivých druhov liečby budeme hodnotiť počas 5 hodín od vytvorenia modelu ALI/ARDS.

Rozdiely v účinnosti jednotlivých typov liečby posúdime na základe:

- krvných plynov a iných respiračných parametrov (indexov oxygenácie a ventilácie, poddajnosti pľúc, pravo-ľavých pľúcnych skratov)
- zmien celkového a diferenciálneho počtu leukocytov v krvi a BAL tekutine
- povrchových vlastností BAL tekutiny zistených pomocou surfaktometra
- stanovenia stupňa pľúcneho edému (wet-dry ratio)
- markerov zápalu a oxidačného stresu v krvi, BAL a homogenáte pľúc biochemickými metódami (ELISA, rtPCR, Western-blot)
- hodnotenia apoptózy buniek v BAL tekutine a pľúcnom tkanive rôznymi metódami
- histologického hodnotenia poškodenia pľúcneho parenchýmu umelou pľúcnou ventiláciou

- zmeny in vitro reaktivity dýchacích ciest na bronchokonstrikčné mediátory
- analýzy možných nežiaducich účinkov liečby na kardiovaskulárne parametre (tlak krvi, frekvencia srdca, variabilita frekvencie srdca) a markery poškodenia organizmu (aldosterón, AST, ALT, GGT atď.) v korelácii s hladinami liečiv v plazme (analýza HPLC/hmotnostným spektrofotometrom).

Predpokladaný prínos projektu:

Dynamika postupne sa rozvíjajúceho zápalu pri ALI/ARDS má výrazný vplyv nielen na pľúcne parametre pacienta, ale aj na jeho ďalšiu prognózu. Vo všeobecnosti platí, že čím skôr sa podá cielená protizápalová liečba, tým lepší efekt je možné pozorovať na pľúcnych funkciách pacienta. Jedným z prínosov nášho projektu bude zhodnotenie dynamiky zmien prebiehajúcich v akútnej fáze po vytvorení modelu ALI/ARDS a posúdenie bezprostredných účinkov podanej liečby na základe priebežného monitorovania respiračných a zápalových parametrov. Nakoľko doteraz nie je úplne objasnený podiel apoptózy na procesoch poškodenia pľúc pri ALI/ARDS, v projekte budeme hodnotiť aj apoptotické zmeny v pľúcach viacerými dostupnými metodikami.

Výsledky štúdií z nedávnych rokov ukázali, že základom kauzálnej liečby by mala byť šetrná umelá pľúcna ventilácia vhodne doplnená o látky s protizápalovým, antioxidačným a antiedematóznym účinkom. Našou snahou bude porovnať účinnosť jednotlivých typov umelej pľúcnej ventilácie (CMV, VFOV, VFTV) na krvné plyny a ostatné parametre pľúcnych funkcií, pričom predpokladáme, že šetrné (vysokofrekvenčné) spôsoby ventilácie budú viesť k efektívnejšej ventilácii a menšiemu poškodeniu pľúcneho tkaniva ako CMV.

V ďalšej fáze projektu sa zameriame na hodnotenie efektu glukokortikoidov a PDE inhibítorov, ktoré majú v sebe veľký potenciál pre priaznivé ovplyvnenie priebehu ALI/ARDS. Vzhľadom na výrazné nežiaduce účinky klasických glukokortikoidov a neselektívnych PDE inhibítorov zároveň očakávame, že by nové spôsoby farmakologického ovplyvnenia glukokortikoidových receptorov ako aj použitie selektívnych PDE inhibítorov mohli predstavovať vhodnú alternatívu liečby, ale s cielenejším efektom a menším výskytom nežiaducich účinkov. Sľubným môže byť aj podanie nitro-steroidov, u ktorých sa predpokladá výrazný protizápalový a vazodilatačný účinok. Keďže farmakologické interakcie týchto látok sú zatiaľ veľmi málo známe, cenným prínosom tohto projektu bude objasnenie ich účinkov v podmienkach ALI/ARDS. Z pohľadu klinickej aplikácie sú tieto poznatky jedinečné a môžu predstavovať prelom v zaužívaných terapeutických intervenciách.

Prínosom projektu bude aj objektívne posúdenie možných nežiaducich účinkov zvolenej ventilačnej a farmakologickej liečby na kardiovaskulárne parametre (tlak krvi, frekvenciu srdca, variabilitu frekvencie srdca), ktoré budú analyzované použitím najnovších matematických metód, doteraz neaplikovaných v experimentálnom výskume.

Predpokladáme, že exaktne mierené protizápalové a ventilačné intervencie zvýšia efektivitu liečby ALI/ARDS. Sledovanie účinnosti liečby na viacerých úrovniach poskytne možnosť cielene zamerať terapiu tak, aby sa eliminovali jej možné nežiaduce účinky v rámci celkového monitoringu terapie. Originalita predloženého projektu je založená na komplexnom prístupe optimalizácie terapeutických postupov pri ALI/ARDS, ktoré z klinického hľadiska môžu znamenať záchranu života pacientov.

Predpokladaná doba riešenia projektu:

Predpokladaná doba riešenia projektu – **4 roky (1.1.2014-31.12.2017)**, počas ktorých uskutočníme **127 čiastkových postupov**, pričom v každom použijeme iba **jedno zviera (králik domáci)**.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Charakter nášho projektu nedáva možnosť dosiahnuť požadovaný, reprodukovateľný a validitný výsledok inou dostupnou metódou bez použitia zvierat. Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami ako aj medzinárodne zavedenými osvedčenými metódami v starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne a zodpovedné zaobchádzanie so zvieratami.

Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované a prezentované na mnohých odborných fórach doma aj v zahraničí. Z hľadiska dodržiavania zásad práce s pokusnými zvieratami neboli voči nim vznesené žiadne námietky, či už na odborných fórach v rámci diskusií alebo v oponentských posudkoch publikovaných článkov.

Postupy projektu sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov prispievajúcich k účelnej farmakoterapii. Považujeme preto nami navrhované metódy za vhodné aj pre realizáciu predkladaného projektu.

Pri realizácii postupov projektu sa budeme snažiť dodržiavať všeobecné **zásady 3R:**

- **zjemnenie** (Refinement), **zníženie** (Reduction) a **nahradenie** (Replacement).

Zjemnenie (Refinement): 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.*

Operačné výkony budú vykonávané v celkovej anestéze (ketamín 20 mg/kg hmot. + xylazín 5 mg/kg hmot. i.m.). Počas ďalšieho priebehu postupu budú zvieratá v celkovej anestéze, ktorá bude udržiavaná kontinuálnym i.v. podaním ketamínu (20 mg/kg hmot.) injekčným dávkovačom. Po operácii bude zvieratám venovaná štandardná pooperačná starostlivosť.

Zníženie (Reduction): Na získanie platných výsledkov použijeme 8 zvierat v každej ventilovanej resp. liečenej skupine a 7 zvierat v kontrolnej skupine, čo považujeme za najnižší možný počet tak z hľadiska reprodukovateľnosti, ako aj z hľadiska získania nevyhnutných údajov a objektívne hodnotiteľných výsledkov. Menší počet zvierat by mohol spôsobiť výraznejšie pôsobenie inter-individuálnych rozdielov s možnosťou spochybnenia objektívnosti výsledkov.

Nahradenie (Replacement): Postupy projektu nie je možné vykonať bez použitia zvierat. Králik domáci je v súčasnosti akceptovaný ako najrelevantnejší model ALI/ARDS vyvolaného opakovanou lavážou pľúc fyziologickým roztokom. Pri takto plánovanom projekte nie je možné použiť nižší živočíšny druh, nakoľko pre posúdenie zmien respiračných, kardiovaskulárnych a zápalových parametrov v súvislosti s opakovaným intratracheálnym podaním fyziologického roztoku a následne aplikovanou ventilačnou a protizápalovou liečbou je potrebné použiť zvieratá s čo najväčšou hmotnosťou a priemerom dýchacích ciest, aby sa zabezpečila optimálna výťažnosť výsledkov. Vzhľadom na protokol postupov projektu je králik domáci najvhodnejším živočíšnym druhom použiteľným v našich podmienkach.

Príloha č. 4 32 80/13-221

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

Názov projektu: **Nové názory na farmakologické ovplyvnenie alergickej astmy**

Predkladateľ: _____

Identifikácia nových liečebných možností farmakorezistentnej astmy je vysoko aktuálna vedecko-výskumná téma. Prírodné produkty typu rastlinných polysacharidových biopolymérov a polyfenolických látok a ich využitie nielen v rámci prevencie ale aj ako nová súčasť kombinovanej liečby ochorenia u nás doteraz neboli dostatočne študované a literárne údaje týkajúce sa témy projektu v literatúre sú skromné. Rovnako aj liečivá, ktoré boli vyvinuté v súvislosti s pribúdajúcimi poznatkami o patofyziológii bronchiálnej astmy – modulátory aktivity iónových kanálov a glutamátergnych receptorov, či selektívne inhibítory fosfodiesteráz, neboli doteraz v súvislosti s alergickým zápalom dýchacích ciest tak podrobne študované ako predkladá projekt.

V predchádzajúcom období pracovisko _____ veľmi významne prispelo k rozšíreniu poznania najmä v oblasti rastlinných polysacharidov a farmakoterapie alergického zápalu dýchacích ciest. U širokej škály substancií polysacharidovej a polyfenolickej štruktúry sme identifikovali schopnosť tlmiť experimentálne vyvolané obranné reflexy DC ako novú farmakodynamickú schopnosť. Zároveň sme v posledných rokoch získali viacero originálnych výsledkov týkajúcich sa detailov mechanizmu účinku rastlinných polysacharidov a účasti niektorých iónových kanálov, NMDA receptorov a izoforiem fosfodiesteráz na patomechanizme alergickej astmy. Analýza vlastného antitusického a bronchodilatačného účinku nových látok prírodného pôvodu zo skupín rastlinných polysacharidov a polyfenolických látok, vrátane identifikácie **mechanizmu účinku** je jedným z cieľov prekladaného projektu.

Keďže nežiaduce účinky centrálnych antitusík ale aj niektorých klinicky používaných bronchodilatancií na riasinkový epitel DC sú všeobecne známe, je jedným z nosných cieľov projektu aj sledovanie **pohyblivosti cilií** po podaní kontrolného antitusika (kodeínu), štandardne používaných aj nových bronchodilatačne pôsobiacich

Iónové kanály identifikované najmä v posledných rokoch (TRP, CRAC) predstavujú potenciálne ciele pre vývoj nových, efektívnejších liečiv (Valverde a spol., 2011).

Jedným z cieľov predloženého projektu je experimentálne sledovanie a posúdenie úlohy niektorých typov kalciových a káliových iónových kanálov v obranných reflexoch DC (v mechanizmoch kašľového reflexu a reaktivity HSDC) a zmena ich funkcie v podmienkach alergického zápalu dýchacích ciest (Sutovska a spol., 2007). Projekt sa zároveň zameriava na možnosť využitia modulátorov aktivity iónových kanálov na supresiu patologického kašľa, hyperreaktivity dýchacích ciest a alergickej zápalovej reakcie.

- *Látky selektívne inhibujúce aktivitu fosfodiesteráz*

V súčasnosti je známych 11 rodín enzýmu fosfodiesteráza (PDE). Napriek tomu sa odhaduje, že existuje viac ako 100 rôznych produktov mRNA (Bender and Beavo, 2006). Na rozdiel od neselektívnych PDE inhibítorov akým je teofylín sú selektívne inhibítory PDE schopné ovplyvniť rôzne funkcie a patologické stavy bez ovplyvnenia iných orgánov alebo systémov, t.j. s výrazne nižším rizikom nežiaducich účinkov (Francis a spol., 2011).

K najštudovanejším selektívnym inhibítorom PDE, ktoré majú vzťah k imunitným odpovediam v dýchacích cestách (DC), patria inhibítory PDE 3, 4, 5, a 7.

PDE3, 4 a 7 sú enzýmy, ktoré špecificky hydrolyzujú cAMP, kým PDE5 štiepi cGMP. V dýchacom systéme je aktivita PDE3 dokázaná najmä v alveolárnych makrofágoch, endoteliálnych bunkách, krvných doštičkách a hladkej svalovine DC (Chung, 2006). Okrem priameho relaxačného pôsobenia, ktoré je výraznejšie po aplikácii PDE3 inhibítorov v porovnaní s PDE4 inhibítormi, inhibícia PDE3 vedie k zosilneniu relaxácie navodenej stimuláciou β_2 -receptorov. Zároveň sa zistilo, že súčasné podanie siguazodanu (inhibítor PDE3) a rolipramu (inhibítor PDE4) vedie k zosilneniu relaxačnej odpovede, čo naznačuje synergizmus a možný benefit paralelnej inhibície PDE3 a PDE4. Enzymová rodina PDE4 sa exprimuje v rôznych zápalových bunkách, ako napríklad T-bunky, B-bunky, eozinofily, neutrofile, epitelové bunky DC a endotelové bunky). Aj preto je pôsobenie selektívnych inhibítorov PDE4 najmä protizápalové a imunomodulačné (Sanz a spol., 2005). Rolipram ako predstaviteľ prvej generácie

inhibítorov PDE4 potláča neutrofilový a eozinofilový zápal, sekréciu interleukínov a aktivovaných T-helperových buniek (Th1 and Th2), epitelových buniek DC, bazofilov, monocytov a makrofágov (Sanz a spol., 2005). Maximálny pokles účinku makrofágov a relaxáciu hladkej svaloviny DC je však možné dosiahnuť len súčasnou inhibíciou PDE3 a PDE4 (Francis a spol., 2011). Preto sa považuje PDE4 inhibícia za dôležitý cieľ pre moduláciu obranných reflexov v DC, a to najmä v podmienkach alergického zápalu. Rolipram však zapríčiňuje relatívne často nauzeu a zvracanie. Preto boli vyvinuté a testované novšie inhibítory PDE4, napr. roflumilast, cilomilast a piklamilast. Ide o látky, ktoré sú schopné potlačiť hyperreaktivitu DC, uvoľňovanie TNF- α , fibrotizáciu a remodeláciu pľúcneho parenchýmu a ich účinnosť sa očakáva najmä pri chronických zápalových ochoreniach, ako je bronchiálna astma a CHOCHP (Matera a spol., 2011).

Ďalší potenciálny cieľ pre moduláciu alergického zápalu je inhibícia PDE7 (jej expresia bola dokázaná v T-bunkových líniiach, periférnych T-lymfocytoch, líniiach epitelových buniek, v bunkách hladkej svaloviny DC a ciev, pľúcnych fibroblastoch a eozinofiloch (Ghosh et al., 2009). V súčasnosti je k dispozícii viacero selektívnych inhibítorov PDE7, ktorých účinnosť v potlačení niektorých zápalových buniek (ľudské monocyty, pľúcne makrofágy a CD8+ T lymfocyty) bola už dokázaná v podmienkach *in vitro* (Christensen a spol., 2012). O ich schopnosti ovplyvniť obranné reflexy DC ako sú kašeľ a bronchokonstrikcia v podmienkach alergického zápalu však existuje málo údajov. Okrem toho sa zdá, že ich účinnosť po samostatnom podaní je relatívne slabá. Aj preto je potrebné sa zamerať na kombináciu inhibítorov PDE4 a PDE7 (napr. rolipram a BRL50481). Tento prístup bol popísaný aj v literatúre a viedol k štúdiu protizápalového pôsobenia nových, tzv. duálnych inhibítorov PDE (napr. PDE3/4 a PDE4/7), avšak zatiaľ len v podmienkach CHOCHP a nie alergickej astmy (Francis a spol., 2011).

Inhibícia PDE5 vedie k poklesu pľúcnej vaskulárnej rezistencie, zníženiu pľúcnej hypertenzie a potlačeniu cievnej prestavby. Sildenafil (inhibítor PDE5) vyvoláva inhibíciu bunkovej proliferácie, podporuje apoptózu (Wharton a spol., 2005) potláča bronchiálnu hyperreaktivitu, infiltráciu leukocyty a hladiny vydychovaného NO (Toward a spol., 2004). Naznačuje to možné využitie kombinácie inhibítorov PDE4/5 pri liečbe bronchiálnej astmy a chronickej obštrukčnej choroby pľúc (CHOCHP). Roflumilast ako jeden z druhogeneračných inhibítorov PDE4 bol schválený na liečbu.

Spätné posedenie - nie

Príloha č. 2 3286/13-221

Netechnické zhrnutie projektu:

Duloxetine - biodostupnosť novej liekovej formy po p.o. podaní psom.

ZDOVODNENIE POSTUPU

Postup bude vykonaný v rámci projektu vývoja nových liekovej foriem [REDACTED] firmy hameln rds. Tieto nové liekové formy sú zamerané na pacienta pre jednoduchšie a bezpečnejšie podávanie liečiva.

Pre registráciu nového generika je potrebné urobiť overenie bezpečnosti a účinnosti na ľuďoch, ktorému predchádza predklinické testovanie na zvieratách: biologická dostupnosť a tolerančné štúdie.

Výsledky tejto štúdie budú slúžiť pre potvrdenie biologickej dostupnosti po jednorazovom podaní vyžadované pri registrácii novej liekovej formy.

CIEĽ

Cieľom štúdie je hodnotenie biodostupnosti novej liekovej formy [REDACTED] v porovnaní s komerčne dostupným referenčným prípravkom po per os podaní psom. Výsledky projektu budú použité ako podklady pre I fázu klinického skúšania na ľuďoch.

VÝBER TESTOVACIEHO SYSTÉMU

Vzhľadom na cieľ štúdie – biodostupnosť [REDACTED] – sme zvolili ako najvhodnejší testovací systém psa. Výhodou psa pri tomto type postupu – oproti králikovi a miniprasaťu – je ľahká aplikácia testovanej liekovej formy a jednoduchý odber vzoriek krvi. Náš výber testovacieho pokusu ovplyvnil aj fakt, že máme k dispozícii 4 psov z predchádzajúcej štúdie.

TESTOVACÍ SYSTÉM

Postup bude vykonaný celkovo na 6 psoch Beagle (4♂ a 2♀), vo veku 3 rokov, z akreditovaného chovu - WOBÉ Budapešť. V postupe budú použité 4 zvieratá z predchádzajúcej štúdie MTD látky SEL-24 (Ro-1099/12-221) a 2 novo nakúpené zvieratá. Zvieratá budú identifikované tetovacím číslom, čipom a sériovým číslom 1-6 na obojku.

Ustajnenie zvierat:

Zvieratá budú voľne ustajnené v chovných priestoroch exp. zverinca v počte 2-4 psov v jednej miestnosti. Štandardná peletovaná strava (dávkovanie podľa hmotnosti zvierat a odporúčania výrobcu), pitná voda - ad libitum. Na obohatenie prostredia budú mať zvieratá počas postupu k dispozícii hračky dostupné v špecializovaných predajniach. V čase aplikácie látky a pri klinických pozorovaniach (sledovanie príjmu potravy a pitnej vody) budú zvieratá ustajnené v označených klietkach. Klimatické podmienky v chovných priestoroch – teplota 15-21°C pri 10 výmenách vzduchu za hodinu.

Karanténa zvierat – 21 dní (ŠPPB-00188-AH).

Starostlivosť a veterinárna starostlivosť o zvieratá sa bude riadiť ŠPP pre daný druh (SPPB-00183-AH) a Veterinárna starostlivosť o lab.zvieratá (ŠPPA-00189-AH).

PREUKÁZANIE SÚLADU S POŽIADAVKAMI NAHRADENIA, OBMEDZENIA A ZJEMNENIA

Posúdenie pokusu z hľadiska 3R

- Refinement – vzhľadom na to, že v pokuse budú vykonané minimálne bolestivé zákroky, nie je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť
- Reduction – počty zvierat v pokuse sú primerané, redukované v maximálnej miere; ich ďalšie zníženie by mohlo ovplyvniť reprodukovateľnosť a validitu pokusu
- Replacement – po preskúmaní databáz TOXNE(<http://toxnet.nlm.nih.gov>), ICCVAM (<http://ntpsearch.niehs.nih.gov>, ICCVAM Site) PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) AltTox (www.alttox.org) DrugLib (www.druglib.com) sme nenašli zodpovedajúcu alternatívnu metódu

METÓDA

24 hod pred pokusom sa zvieratám odoberie strava a nechá sa voľný prístup k vode. Každému zvieraťu budú jednorázovo p.o. podané 2 kapsle podľa ŠPPB-00199-PH. Kapsle sa umiestnia na koreň jazyka a spláchnu 10-15 ml pitnej vody.

Odber vzoriek krvi (maximálne 3ml pre jeden odber) bude robený podľa ŠPPB-00180-BIO z v. cephalica. Na stanovenie plazmatických hladín budú odobrané krvné vzorky v časových intervaloch 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300min a 8, 10, 14 a 24hod po aplikácii. Odbery vzoriek krvi budú robené bez anestézy pomocou odberovej kanyly – pre každý odber bude použitá nová kanyla. Vzhľadom na voľné ustajnenie zvierat použitie permanentnej kanyly nie je možné, pretože hrozí jej vytrhnutie iným psom.

Aplikácia kapsúl a odber krvných vzoriek budú vykonané v miestnosti na to určenej, mimo chovných priestorov.

Po minimálne 10 dňovej pauze (potrebná na vyliečenie miesta vpichu) bude za rovnakých podmienok postup zopakovaný s referenčnou látkou.

V prípade výskytu závažných vedľajších účinkov bude pokus okamžite prerušený. V závislosti od závažnosti klinických príznakov, prípadne utrpenia zvierat môžu byť tieto utratené podľa ŠPPA-00187-AH. Dôvody na utratenie posúdi vet. lekár spolu s etickou komisiou hameln rds.

Zvieratá po ukončení pokusu budú vrátené do vonkajších výbehov a môžu byť použité na prípadné ďalšie experimenty.

Starostlivosť o zvieratá počas ustajnenia sa bude riadiť platnými štandardnými postupmi Odd. exp. zverinca pre daný druh laboratórneho zvieraťa.

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Farmakologické ovplyvnenie kmeňových buniek v modeli antracyklínmi navodeného srdcového zlyhávania

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3352/13-221

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom projektu je farmakologickým ovplyvnením kmeňových buniek predísť poškodeniu srdca po antracyklínových cytostatikách a vyliečiť ho, alebo aspoň zmierniť ho.

Prínos z vykonaného projektu:

Na základe získaných výsledkov by sme mohli nájsť spôsob ako pomocou jestvujúcich, bezpečných a v praxi používaných liekov zabrániť poškodeniu srdca antracyklínovými cytostatikami, ktoré sú v humánnej medicíne široko používané a účinné protinádorové liečivá. Bohužiaľ, majú dávkovo závislé kardiotoxické nežiaduce účinky, ktoré môžu vyústiť až do rozvoja srdcového zlyhávania a následnej mortality. Spôsoby, pomocou ktorých by sa dalo ako úplne predísť zlyhaniu srdca alebo vyliečiť poškodenie srdca po antracyklínoch, neexistujú. Potenciálny prínos pre humánnu prax by bol veľký, nakoľko by umožnil bezpečnejšiu onkologickú liečbu v zmysle minimalizácie jej nežiaducich účinkov a liečby následkov poškodenia srdca antracyklínovými cytostatikami.

Ide o experimenty, kde sa hodnotí vplyv dlhodobej liečby na fyziologické parametre ako elektrická a mechanická funkcia srdca, histologické hodnotenie počtu kmeňových buniek v krvi a v srdci, je potrebné vykonať experiment in vivo, teda na celom zvierati. Zvieratá môžu pri subkutánnej aplikácii látok pociťovať krátkodobú bolesť, ktorá významne nebude významne narúšať pohodu, ani celkový stav zvierat. Samotné experimenty zamerané na zistenie funkcie srdca budú vykonávané v hlbokéj celkovej anestéze, po ktorej zvieratá nenadobudnú vedomie a budú humánne utratené.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty : Potkany, samce rodu Wistar 300

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

Očakáva sa poškodenie srdca a obličiek po podaní daunorubicínu, zníženie fyzickej výkonnosti a telesnej hmotnosti.

Predpokladaná úroveň krutosti:

stredná

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie:

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa bude hodnotiť vplyv farmák na mobilizáciu buniek z kostnej drene, migráciu a usadenie kmeňových buniek v ľavej komore srdca pri jeho poškodení podávaním daunorubicínu, histologické zmeny, molekulárno-biologické parametre, EKG, bazálnu a beta adrenergicky stimulovanú funkciu ľavej komory in situ, nie je možné pokus vykonať bez použitia zvierat. Počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako in vitro pokusy, keďže na bunkových kultúrach nie je možné relevantne posúdiť funkciu kardiomyocytov, najmä v rámci ľavej komory ako celku. Rovnako nemožno hodnotiť komplexné deje, akými je mobilizácia kmeňových buniek.

2. Obmedzenie:

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie a zachovanie relevantnosti pokusu. Počet $n=15$ v skupinách, ktorým je podávaný daunorubicín, je určený na základe výsledkov iných autorov, ktorí poukázali na 30% úmrtnosť po podávaní daunorubicínu, ako aj prípadnú perioperačnú mortalitu, spojenú s invazívnym zákrokom pri meraní ľavokomorovej funkcie. Zvieratá, ktoré budú použité na meranie ľavokomorovej funkcie nie je možné použiť na molekulárne analýzy a histológiu, vzhľadom na pôsobenie anestézy a dobutamínu, ktorý môže dramaticky ovplyvniť génovú expresiu. Preto je nutné mať rovnako ovplyvnené skupiny zvierat v prvej i druhej fáze.

3. Zjemnenie:

Výsledky jednotlivých častí štúdie budú priebežne vyhodnocované a v prípade zistenia nevhodných neočakávaných udalostí bude experiment ukončený a následne predložený nový projekt tak, aby sa znížil počet používaných zvierat. Intravenózna injekcia daunorubicínu bude aplikovaná v celkovej anestéze, rovnako ako hemodynamické merania. Zvieratá budú humánne utratené oxidom uhličitým.

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