

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 3400/13-221

Úloha endogénnych katecholamínov v mezenterickom tukovom tkanive pri modulácii neuroimunoendokrinnej odpovede na stres

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

Mezenterické adipocyty, endogénne katecholamíny, stres, imunitný systém

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)

Cieľom predloženého projektu je objasniť mechanizmy produkcie a sekrécie endogénnych katecholamínov v mezenterickom tukovom tkanive potkanov ako aj ich fyziologický význam a úlohu pri regulácii imunitného systému. Projekt možno rozdeliť do 5 základných etáp:

Etapa 1. Produkcia endogénnych katecholamínov v mezenterickom tukovom tkanive a ich sekrécia

Etapa 2. Úloha osi hypotalamus-hypofýza-kôra nadobličky (HPA) v stresom indukovanej produkcii sympatikových a endogénnych katecholamínov v mezenterickom tukovom tkanive

Etapa 3. Sledovať vplyv prerušenia periférnej ako aj centrálnej noradrenergickej inervácie na hladinu katecholamínov (KA) v mezenterickom tukovom tkanive počas stresu. Určiť či dochádza k stresom indukovanému zvýšeniu syntézy endogénnych KA aj po sympatektómii.

Etapa 4. Určiť vplyv systémového zápalu vyvolaného endotoxínom na produkciu endogénnych katecholamínov v bunkách mezenterického tukového tkaniva potkana. Zistiť vplyv predchádzajúcej expozície na jednorázový a opakovaný stres na zápalovú odpoveď vyvolanú endotoxínom. Výsledky porovnať s priamym účinkom endotoxínu na izolované mezenterické adipocyty v podmienkach *ex vivo*.

Etapa 5. Identifikácia spúšťacieho mechanizmu pre syntézu a sekréciu endogénnych KA v adipocytoch pomocou farmakologickej stimulácie izolovaných adipocytov a ďalších buniek produkujúcich KA. Úloha kortikoidov a osi hypotalamus-hypofýza-dreň nadobličky (HPA) v regulácii syntézy endogénnych KA

Etapa 6. Fyziologický význam endogénnych KA v adipocytoch a imunitných bunkách izolovaných z mezenterického tukového tkaniva.

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

Prínos tohto projektu je predovšetkým v objasnení mechanizmov komunikácie medzi adipocytmi a imunitnými bunkami (makrofágy, T a B lymfocyty) v mezenterickom tukovom tkanive počas pôsobenia psychologického stresu. V oblasti gastrointestinálneho traktu (GIT) dochádza k významnej stimulácii zložiek imunitného systému na čo má významný vplyv neuroimunoendokrinná aktivita mezenterického tukového tkaniva. O úlohe mezenterického tukového tkaniva pri rozvoji črevných zápalových ochorení niet pochyb a preto je dôležité poznať mechanizmy ako adipocyty svojou produkciou adipokínov, cytokínov, katecholamínov a iných mediátorov modulujú aktivitu imunitných

buniek. Odhalenie mechanizmov sekrécie katecholamínov ako aj ich fyziologického významu a úlohy pri regulácii imunitnej odpovede môže pomôcť pochopiť vplyv stresu na poruchy imunity akými sú alergie, únavový syndróm a predovšetkým veľmi závažné autoimunitné ochorenia ako napr. Crohnova choroba. Pomocou špecifických agonistov a antagonistov adrenergických receptorov (AR) identifikujeme typy AR zodpovedné za možnú reguláciu imunomodulačných funkcií adipocytov a imunitných buniek, čo môže viesť k cielej farmakologickej terapii pri poruchách imunity resp. autoimunitných ochoreniach.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

- laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*) kmeň Sprague-Dawley, samci, počet: 392 jedincov
- laboratórne myši (*Mus musculus*) kmeň C57 Black:

samce divého kmeňa: 252

samice divého kmeňa: 156

kortikoliberín-deficientné (CRH knockout) samce: 252

kortikoliberín-deficientné (CRH knockout) samice: 156

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

Zvieratá budú jednorázovo a opakovane stresované zamedzením pohybu v špeciálnych zariadeniach v maximálnej dĺžke jedného vystavenia 2 hodiny pričom budú pociťovať intenzívny emočný stres. Pri intraperitoneálnej aplikácii vybraných látok (anestetiká, lipopolysacharid, 6-hydroxydopamín) budú pociťovať miernu bolesť a stres. Po operácii mozgu budú po odoznení účinkov anestézy pociťovať miernu bolesť a diskomfort do zahojenia rán.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

- i.p. injekčné podávanie vybraných látok experimentálnym zvieratám

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

- restraint myši v 50 ml skúmavke s otvormi
- restraint potkanov v špeciálnom zariadení
- stereotaktické operácie mozgu (elektrokoagulačné prerušenie noradrenergickej inervácie v mozgovej oblasti Locus coeruleus)

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

K plánovanému pokusu neexistujú alternatívne metódy keďže reguláciu aktivity neuroimunoendokrinného systému v mezenterickom tukovom tkanive nie je možné sledovať na bunkových kultúrach. Mezenterické tukové tkanivo je komplexný systém pozostávajúci z veľkého počtu typov buniek medzi ktoré patria: adipocyty, preadipocyty, endoteliálne bunky, fibroblasty, makrofágy, rôzne populácie T a B leukocytov a mezenchymálne kmeňové bunky. Toto tkanivo je husto inervované sympatikovými, parasympatikovými a senzorickými nervami a obsahuje cievny a lymfatický systém čo je nemožné simulovať v *in vitro* podmienkach. Nervový systém môže fungovať ako celistvý, integrovaný a neporušený systém jedine v živých organizmoch. V práci budú použité tukové tkanivá, ako aj bunky tukových tkanív - adipocyty, ktoré budú čerstvo izolované z tukového tkaniva zvierat vystavených stresu. Keďže počas vystavenia stresu sa aktivuje niekoľko systémov, ktorý je najvýznamnejším systémom ovplyvňujúcim metabolizmus tukových tkanív nie je možné použiť bunkové línie adipocytov, ale len čerstvo izolované adipocyty.

Spätné posúdenie - nie

Netechnické zhrnutie projektu 3467/13-221

Názov projektu:

Antagonisty histamínových receptorov H3 a H4 a ich potenciálne antitusické účinky v modeli u morčiat so zápalom horných dýchacích ciest

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

histamín, horné dýchacie cesty, antihistaminiká, kašeľ, liečba

Účel projektu *: projekt sa vykonáva za účelom translačného alebo aplikovaného výskumu, s cieľom zabránenia, prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka, zvierat alebo rastlín alebo ich účinkov na ľudí, zvieratá alebo rastliny,

Ciele projektu:

Primárnym cieľom predloženého projektu je zistiť, či použitie antagonistov H3 a H4 histamínových receptorov má potenciálne klinické aplikácie pre pacientov s postinfekčným kašľom asociovaným ochoreniam horných dýchacích ciest. Potvrdenie tejto hypotézy si vyžaduje skúmať danú problematiku komplexne a na viacerých úrovniach.

Cieľ 1. Zistiť lokalizáciu a fenotypizáciu neurónových populácií exprimujúcich H3R a H4R v selektovaných oblastiach centrálného nervového systému, trigemniálneho ganglia a trigeminálnych aferentov v nosovej sliznici a napokon vágových ganglií a dolných dýchacích cestách.

1.1. Identifikácia neurónových populácií mozgového kmeňa a mozgovej kôry morčiat, ktoré exprimujú H3/H4 receptor a popis ich stereotaktickej pozície a pozíciu vo vzťahu k neurónovým okruhom mozgového kmeňa podieľajúcim sa na neurogenéze a modulácii kašľa

1.2. Identifikácia neurónových populácií v ganglion Gasseri n. trigemini, ktoré exprimujú H3 a H4 receptory relevantných pre inerváciu nosovej sliznice, popis lokalizácie ich periférnych a centrálnych zakončení a oblastí prepojenia na neuróny druhého rádu v centrálnom nervovom systéme, fenotypizácia H3R a H4R exprimujúcich neurónov a zistenie koexpresie ďalších kanálov, predovšetkým zo skupiny TRP

1.3. Zisťovanie expresie H3R a H4R kanálov na neurónových populáciách nodózneho (neurokrestálneho) ganglia a jugulárneho (plakodálneho) ganglia blúdivého nervu. Tento cieľ je primárne zaujímavý z dôvodu, následných translačných štúdií, nakoľko neurofyziológia a

kašľa, trvajúceho viac ako 8 týždňov, pri negatívnom náleze na RTG hrudníka a fyzikálnom vyšetrení.

Diagnostickým algoritmom je spravidla možné definovať tri základné skupiny príčin, prečo pacienti kašľú aj pri negatívnom náleze na hrudníku a to sú ochorenia horných dýchacích ciest - rinosinopatie, ďalej priedušková astma a jej klinické fenotypy, a nakoniec gastroezofágový reflux (Dicpinigaitis, 2011). Hoci sú tieto diagnostické postupy prepracované v Európe ako aj USA, stále na konci diagnostického protokolu zostávajú pacienti, u ktorých sa príčina kašľa nezistí a teda ich nevieme ani adekvátne liečiť. Pre predstavu uvádzame, že takýto pacient navštevuje rôznych odborníkov – pneumológov, alergológov, otorinolaryngológov, gastroenterológov, pričom priemerný počet návštev u lekárov špecialistov s cieľom zistiť príčinu kašľa je šesť a viac ročne (Morice a spol., 2012)

Na základe dostupných literárnych údajov ako i našich vlastných publikovaných výsledkov predpokladáme, že H3R a H4R antagonisty podané lokálne pri zápale do nosovej dutiny tlmia symptómy ochorenia horných dýchacích ciest a tým sekundárne tlmia aj kašeľ. Predpokladáme, že aj perorálne podanie H4R a H3R antagonistov má antitusický potenciál, a tieto hypotézy budeme testovať v predkladanom projekte. Projekt prinesie odpoveď na otázku, či antagonisy H3a H4 receptorov sú vhodné liečivá na potlačenie kašľa u subjektov s rinosinuitídou.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Na celú dobu trvania projektu a na dosiahnutie stanovených cieľov projektu je celkový plánovaný počet zvierat **200** jedincov, samcov, Dunkin Hartley, V projekte sú vytýčené tri základné ciele a na ich uskutočnenie bude použité (na cieľ 1. **45** jedincov) (na cieľ 2. **70** jedincov) (na cieľ 3. **85** jedincov) – detailné rozpísanie počtov jedincov sú nasledovné:

Cieľ 1 - všetky uvedené postupy v cieli jedna prebiehajú na morčatách, ktoré sú anestetizované (1. časť postupu na označenie neurónov prebieha v krátkej anestézii ketamínom/xylazínom, nakoľko ide o mini invazívny výkon s rýchlym nadobudnutím vedomia a dobrým zotavením) druhá časť postupov prebieha v hlbokjej anestézii bez možnosti zotavenia (1.1). alebo až na tkanivách odobratých z humánne usmrtených zvierat

- 1.1. Identifikácia neurónových populácií mozgového kmeňa a mozgovej kôry morčiat, ktoré exprimujú H3/H4 . **Plánovaný počet jedincov: n = 15 jedincov (zvieratá budú humánne usmrtené predávkovaním anestetika a tkanivo bude odobrané na imunohistochemické spracovanie -klasifikácia krutosti – bez možnosti zotavenia)**
- 1.2. Identifikácia neurónových populácií v ganglion Gasseri n. trigemini, ktoré exprimujú H3 a H4 receptory relevantných pre inerváciu nosovej sliznice. **Plánovaný počet jedincov: n = 15 jedincov (prvá časť postupu v krátkodobej anestézii ketamínom/xylazínom, druhá etapa – humánne usmrtenie a odobratie tkaniva na ďalšie vyšetrenia – klasifikácia krutosti – slabá pre prvú časť a bez možnosti zotavenia pre druhú časť)**
- 1.3. Zisťovanie expresie H3R a H4R kanálov na neurónových populáciách nodózneho (neurokrestálneho) ganglia a jugulárneho (plakodálneho) ganglia blúdivého nervu. **Plánovaný počet jedincov: n = 15 jedincov (prvá časť postupu v krátkodobej anestézii ketamínom/xylazínom, humánne usmrtenie a odobratie tkaniva na**

d'alšie vyšetrenia – klasifikácia krutosti – slabá pre prvú časť a bez možnosti zotavenia pre druhú časť)

Cieľ 2. Sledovanie potencie a efektivity H3R a H4R antagonistov inhibovať aktiváciu značených neurónov metódou „calcium imaging“ a „patch clamp“, sledovanie potencie H3 antagonistov inhibovať kašeľ po mikroinjikovaní do „kašľu“ asociovaných oblastí mozgového kmeňa

2.1. Sledovanie efektov H3R a H4R antagonistov na kašeľ po ich mikroinjikovaní do oblastí relevantných pre neurogenézu a moduláciu kašľa u anestézovaných morčiat **Plánovaný počet jedincov: n = 30 jedincov (anestézované jedince – klasifikácia krutosti postupov - bez možnosti zotavenia) – testované budú centrálne podané 3 antagonisty H3 – thioperamide, clobenpropid a JNJ 5207852 – 10 jedincov pre každý dielčí postup**

2.2. Sledovanie inhibície aktivácie neurónov odobratých z trigeminálneho ganglia, a neurónov z nodózneho a jugulárneho ganglia, pričom budeme sledovať ich aktiváciu histamínom v prítomnosti antagonistov H4R JNJ 7777120 a JNJ 10191584, thioperamidu (H4R/H3R antagonista), clobenpropidu pre relevantné neuróny metodikou patch clamp a calcium imaging. Budeme sledovať neuróny od zdravých zvierat a neuróny od zvierat s modelom senzorieurálnej hyperreaktivity – plánované testovanie 4 antagonistov po 10 jedincov pre každý, **Plánovaný počet jedincov: n = 40 jedincov (prvá etapa na označenie neurónov – prvá časť postupu v krátkodobej anestézii ketamínom/xylazínom, druhá etapa – humane usmrtenie s odberom neurónov na d'alšie vyšetrenia – klasifikácia krutosti – slabá pre prvú časť a bez možnosti zotavenia pre druhú časť)**

Cieľ 3.

Cieľ 3: Zisťovanie potencie a efektivity H3R a H4R antagonistov na kašeľ u anestézovaných a bdelych zvierat po per orálnom a lokálnom intranazálnom podaní vybraných antagonistov. Je nutné vyšetriť kašeľ aj v bdelom stave aj u anestézovaných jedincov, nakoľko ide o rôzne nervové vlákna, ktoré sa podieľajú na vzniku kašľa v bdelom stave a v anestézii (C vlákna versus A δ vlákna)

3.1. Sledovanie účinku intranazálne podaných H4R/H3R antagonistov na symptómy a znaky alergickej rinitídy a kašeľ vyvolaný v bdelom stave. **Postupy u bdelych zvierat n = 15 jedincov**, pokus bude prebiehať v sériách vždy na tých istých jedincoch sa otestuje postupne JNJ 7777120, JNJ 10191584, thioperamid, clobenpropid a JNJ 5207852 – klasifikácia krutosti - slabá

3.2. Sledovanie účinku perorálne podaných H4R/H3R antagonistov na symptómy a znaky alergickej rinitídy a kašeľ vyvolaný v bdelom stave a anestézii.

Pokusy u bdelych zvierat n = 15 jedincov, pokus bude prebiehať v sériách vždy na tých istých jedincoch sa otestuje postupne JNJ 7777120, JNJ 10191584, thioperamid, clobenpropidu a JNJ 5207852 – klasifikácia krutosti postupov – slabá

Pokusy u anestézovaných zvierat si vyžadujú na každý pokus jedno zviera, preto plánujeme testovať len tie, ktoré sa ukážu ako najpotentnejšie u bdelych zvierat – vyberieme tri najefektívnejšie a preto **plánovaný počet bude 50 jedincov, po 10 do každého dielčieho postupu – v dielčích postupoch sa bude hodnotiť potencia nasledovných látok (JNJ**

7777120, JNJ 10191584, thioperamid, clobenpropidu a JNJ 5207852) – klasifikácia krutosti – bez možnosti zotavenia

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

V postupoch, kde sa zvieratá používajú v bdelom stave môže dôjsť k narušeniu pohody a zdravotného stavu tým, že morčatám senzibilizovaným ovalbumínom bude tento alergén podaný do nosa. Zvieratá budú kýchať, mať sekréciu z nosa a môžu pociťovať iritáciu – svrbenie nosa – ako ľudia pri alergickej nádche. Tieto prejavy akútnej fázy alergickej rinitídy sú ale prechodné a spontánne odznejú do cca 15-20 minút, najintenzívnejšie sú prvých 5-10 minút. Ďalej zvieratá môžu pociťovať strach a dyskomfort pri pobyte vo valci pletyzmografu, kde sú umiestnené tak, aby mohli inhalovať aerosól tusigénu, ktorý im vyvolá kašeľ počas 10 minút. Zvieratá priemerne počas tohto intervalu zakašľú 10 krát (v prípade kontrol), v prípade keď majú rinitídu to môže byť aj viac krát. Na zmiernenie stresu počas postupov sú zvieratá, ktoré sa budú používať v postupoch v bdelom stave postupne adaptované na pobyt v pletyzmografe (vložia sa doň na minútu, potom na dve, neskôr sa im podá aerosól fyziologického roztoku, aby boli privyknuté na pobyt v pletyzmografe a na inhaláciu). Adaptácia podľa našich dlhodobých skúseností limituje stres zvierat a ich správanie počas postupu je primerané.

Ďalšie postupy sa vykonávajú v celkovej anestézii, buď krátkodobej (ketamin/xylazin) po ktorej zvieratá nadobudnú vedomie, alebo hlbokoj (uretan) kedy zvieratá v postupe už vedomie nenadobudnú. Krátkodobá anestézia sa využíva na intranazálne injekčné vpravenie neuronálneho tracers – farbiva, ktoré sa vychytáva neurónmi a transportuje sa do tela nervovej bunky, ktorá je lokalizovaná v gangliu. Toto podanie sa realizuje dvoma presne cieľenými vpichmi do sliznice. Pri značení trigeminálnych neurónov sa tracer instiluje do sliznice nosa v celkovej anestézii dvoma vpichmi. Pri značení neurónov v trachei sa v celkovej krátkodobej anestézii ketamínom a xylazínom vykoná malá 1 cm incízia kože na krku zvieratá, prístupní sa trachea a dvoma vpichmi sa vpraví neuronálny tracer do tkaniva trachey. Incízia sa zašije a ošetrí antibiotickým práškom. Máme skúsenosti, že zvieratá sa po tomto výkone dobre zotavujú, pomerne rýchlo nadobúdajú vedomie, pohybujú sa, prijímajú tekutiny a potravu a ich správanie nenaznačuje, že by mali bolesti. Použitá kombinácia ketamínu a xylazínu má vlastne aj analgetický účinok.

Predpokladaná úroveň krutosti:

V rámci predkladaného projektu budú prebiehať postupy, ktoré spadajú podľa prílohy 4 nariadenia vlády 377 do kategórie

- a) Postupy bez možnosti zotavenia – ide o postupy, ktoré sa celé vykonávajú v celkovej anestézii, po ktorej už zvieratá nenadobudnú vedomie
 - a. Mikroinjektovanie antagonistov do vybraných oblastí mozgového kmeňa zisťovanie vplyvu na kašeľ
 - b. Vyšetrenie kašľa u anestézovaných zvierat

- c. Odber tkanív a buniek po ich predchádzajúcom značení na ďalšie skúmanie – elektrofyziológia na bunkovej úrovni

b) Slabé

- a. Senzibilizácia a vyvolanie alergickej rinitídy
- b. Vyvolanie kašľa inhaláciou tusigénneho aerosólu
- c. Značenie neurónov nosovej sliznice a trachei v krátkodobej anestézii

Senzibilizácia sa realizuje jedným injekčným vpichom alergénu intraperitoneálne. Alergická rinitída sa vyvoláva podaním kvapky suspenzie alergénu do nosových otvorov morčiat (nosové kvapky). Senzibilizácia môže spôsobiť slabú bolesť pri vpichu a alergická rinitída môže spôsobiť krátkodobé narušenie pohody a zdravotného stavu morčiat.

Pri inhalácii predpokladáme, že zvieratá nebudú pociťovať bolesť (ide o inhaláciu aerosólov, ktorá nie je bolestivá, predpokladáme, že zvieratá budú pociťovať strach a dyskomfort spojený s pobytom v komore pletyzmografu, hoci sa na tento stav vopred adaptujú (v prípravnej fáze postupov). Predpokladáme, že zvieratá nebudú mať závažne narušenú pohodu ani celkový zdravotný stav.

Do kategórie slabé spadajú aj postupy v krátkodobej anestézii ketamínom/xylazínom, pri ktorých sa pomocou injekčných vpichov (miniinvazívny prístup) podáva do tkanive nervový tracer – farbivo vychytávané neurónmi a transportované do ganglia, kde možno neuróny vizualizovať. Po tomto výkone sa zvieratá zotavujú rýchlo, spontánne sa pohybujú, pijú a prijímajú potravu a ich správanie nenasvedčuje tomu, že by mali bolesti. Podľa prílohy 4, nespádajú do kategórie postupov so stredným stupňom krutosti

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Pokus nie je možné vykonať bez použitia zvierat. Postupy sú zamerané na štúdium kašľa ako komplexného neuromuskulárneho deja živého organizmu, ktorý nemôže byť nahradený sledovaním tkanivových kultúr, buniek, či molekúl. Ide o princíp študovania javu, ktorý nie je možné iným spôsobom vyšetriť, než použiť laboratórne zvieratá. Na výskum kašľa boli v minulosti využívané aj pes, či mačka, avšak morča sa ukazuje ako najvhodnejší model. Morča domáce je jeden z najrelevantnejších modelov aferentnej inervácie dýchacích ciest a pľúc vo vzťahu ku kašľu. Neurofyziologické a neurofarmakologické parametre u morčiat sú ideálne pre vykonanie translačných štúdií s validáciou dát priamo u človeka. Pri tomto plánovanom pokuse neexistujú alternatívne metódy, pretože na pokus nie je možné použiť nižší druh laboratórnych zvierat (myš, potkan, pretože nemajú vyvinutý kašľový reflex (prehľadne spracované v Coughsensors, I. Handb Exp Pharmacol, 2009, (187,:23-47. Prieskum databáz ukázal, že vzhľadom na komplexnosť centrálnej nervovej regulácie kašľa nie je možné použiť modelovanie ani jednoduchšie systémy (bunkové kultúry a pod.

Overovanie v registroch medzinárodne overených a uznávaných alternatívnych metód:

Doklad o overovaní v databázach je samostatnou prílohou žiadosti označenou ako príloha 3.

2. Redukcia počtu zvierat:

Jednotlivé postupy či už na bdelých, alebo anestézovaných zvieratách budú vykonané na najnižšom počte jedincov tak, aby bol výsledok pokusu štatisticky hodnotiteľný a dáta získané z pokusu relevantné. Maximálny počet zvierat použitých v celom projekte bude $n=200$ jedincov.

Na postupy u bdelých zvierat – kde sa sleduje kašeľ sa použije 15 jedincov (7 jedincov bude kontrolných – nesenzibilizovaných a 8 jedincov bude tvoriť experimentálnu skupinu senzibilizovanú ovalbumínom). Počet $n=8$ pre experimentálnu skupinu a $n=7$ pre kontrolnú skupinu považujeme za dolný limit štatistickej relevantnosti hodnotenia výsledkov postupu, vzhľadom k vysokej variabilite, ktorú morčatá v kašľovej odpovedi vykazujú.

Na postupy u anestézovaných zvierat bude použitých po $n=10$ jedincov. Pri tejto metodike postupu ide o chirurgické postupy, ktoré sú náročné na preparáciu a aj pri najväčšom sústredení sa môže stať, že dôjde k poškodeniu nervov v oblasti hrtana, alebo poškodeniu ciev s ďalšími komplikáciami. Predpokladáme preto, že chirurgické postupy môžu byť rizikom, ktoré by mohli spôsobiť to, že sa zníži celkový počet jedincov, u ktorých bude možné získať relevantné výsledky vo vzťahu k cieľom projektu.

Celkovo sa použije 200 jedincov, dospelých samcov, morčiat Dunkin Hartley

3. Zjemnenie:

Postupy u bdelých morčiat sú minimálne traumatizujúce pre zvieratá. Pri vyšetrení kašľa v bdelom stave sú zvieratá umiestnené v dvojkomorovom pletyzmografe, kde inhalujú aerosól kyseliny citrónovej. Tento postup zvieratá znášajú pokojne, hlavne po predchádzajúcej adaptácii na túto situáciu (na začiatku pokusu sa zvieratá minimálne 2 krát exponujú aerosólu fyziologického roztoku, aby si zvykli na pobyt v pletyzmografe. Inhalácia kyseliny citrónovej a pobyt v pletyzmografe nespôsobujú zvieratám bolesť.

Druhá časť postupov sa vykonáva v celkovej anestézii uretanom resp. (ketamín/xylazín) pre krátkotrvajúce mini invazívne chirurgické výkony použité na značenie neurónov. Zvieratá sa usmrcujú humánne v súlade s nariadením vlády predávkovaním anestetika.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

nie

Príloha č. 1 3440/13 - 221

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Vplyv losartanu a vildagliptínu na renálne poškodenie a myogénnu konstrikciju u potkana po podaní doxorubicínu.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): losartan, vildagliptín, myogénna konstrikcija, doxorubicín, proteinúria

Účel projektu*: Translačný alebo aplikovaný výskum

Opísať ciele projektu:

Cieľom tohto projektu je objasniť, či CKD (Chronic Kidney Diseases) navodená podaním doxorubicínu je spôsobená zníženou renálnou myogénnou konstrikciou (MC) a či terapia losartanom, alebo vildagliptínom dokáže normalizovať MC a tým spomaliť/zastaviť rozvoj CKD.

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

Výsledky tejto práce by mohli byť užitočné pre pacientov liečiacich sa na rakovinu doxorubicínom. Táto liečba má toxický účinok na obličky, kde očakávame ochranný vplyv terapie na obličky.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan (*Rattus norvegicus*), druh Wistar, samce.

Počet na celú dobu trvania experimentu: 160 zvierat

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

Potkanom bude aplikovaný doxorubicín intraperitoneálne, v následku čoho potkany vyvinú do 7 týždňov chronické poškodenie obličiek, ktoré sa prejavuje nadmernou diurézou. Z toho aj vyplýva nadmerné pitie vody, ale zvieratá nemajú žiadnu bolesť ani diskomfort. Zvieratám bude meraný tlak metódou tail cuff, pri čom sú fixované vo valci. Na túto procedúru budú zvieratá tréňované, aby voľne vošli do valca a ostanú pokojne počas celého merania. Potkany budú umiestnené raz za dva týždne do metabolických klieťok, individuálne ubytované, s jedlom

a vodou, na dobu 24 hodín za účelom zbierania 24 hodinového moču (na stanovenie poškodenia obličiek) , čo prinesie zvieratám ľahký diskomfort. Po uplynutí 7 týždňov budú zvierat usmrtené v anestézii exsanguináciou – bez spôsobenia ujmy pred uspatím.

Predpokladaná úroveň krutosti: b) slabé

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Nahradenie zvierat nie je možné, keďže poškodenie obličiek u ľudí/potkanov po podaní cytostatík má komplexný charakter, zahŕňa cievne zmeny, ktoré plánujeme sledovať.

Experimenty na bunkových kultúrach sú v tomto projekte plánované, ale keďže sa jedná hlavne o sledovanie vplyvu liečiv na celú obličku a organizmus ako celok, z hľadiska fyziológie/farmakológie, tento druh štúdií ani nie je úplný. Tu je síce možné sledovať a ovplyvňovať signálne dráhy v jednotlivých renálnych bunkách, ale keďže oblička obsahuje mnoho rôznych typov buniek, ktoré sú vzájomne prepojené je potrebné pozrieť sa na problematiku doxorubicínovej CKD/terapie v širšom kontexte; zahrnúť možný vplyv ďalších systémových elementov. Jedná sa o zistenie účasti možných regulačných proteínov a preto v tomto type projektu nie je možné použiť ani počítačové simulácie.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Na skúmanie protektívneho účinku liečiv je potrebných 6 experimentálnych skupín:

1 – kontrola, 2 – doxorubicín, 3 – doxorubicín + losartan, 4 – doxorubicín + vildagliptín, 5 – doxorubicín + losartan + vildagliptín, 6 – kontrola + losartan, 7 – kontrola + vildagliptín, 8 – kontrola + losartan + vildagliptín

Z našich predošlých experimentov vieme, že rozsah poškodenia obličiek po doxorubicíne je značne variabilný (proteinúria od 50 do 1500 mg/24 hodín), preto je nutný väčší počet zvierat v jednotlivých skupinách, ako pri iných experimentoch. Aby bolo možné experiment následne štatisticky správne vyhodnotiť, navrhujeme 20 potkanov na skupinu – 10 na fixáciu formaldehydom a histológiu + 10 na cievne experimenty a ostatné orgány na metodiky molekulárnej biológie. To znamená 160 potkanov na celý experiment.

Uplatnenie 3R, redukciu počtu zvierat plánujeme avšak využiť tým, že v preliminárných experimentoch na bunkových kultúrach stanovíme optimálne dávky liečiv a tým sa zníži počet zvierat (v nasledujúcich možných experimentoch), ak by dávky liečiv neboli dostatočné. Na

bunkových kultúrach budeme ďalej sledovať bunkový mechanizmus poškodenia a efektu liečiv na jednotlivých bunkách ktoré tvoria cievny systém.

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)

Chceme použiť samce kmeňa Wistar, ktoré sú najčastejšie používané na podobný výskum a možno teda porovnať naše experimenty z prácami iných autorov. Tento vedecký problém sa nedá riešiť alternatívne, preto chceme použiť potkany. Chceme použiť metódu tail cuff na stanovenie krvného tlaku. Pri tejto metóde potkany môžu byť v strese a preto budú na tento proces tréňované. Bude im dovolené voľne sa pohybovať vo valci a budú tréňované aby pokojne ostal vo valci počas merania, čo značne zníži stres zvierat z tejto metodiky.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: **Selekcia vhodných kmeňov laktobacilov pre použitie v probiotických prípravkoch**

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): *Lactobacillus*, probiotiká, hypercholesterolemia, butyrylocholinesteráza

Účel projektu: Translačný alebo aplikovaný výskum

1. zabránenia, prevencie chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka alebo zvierat ich účinkov na ľudí alebo zvieratá,
2. usmerňovania alebo úpravy regulácie alebo zmeny fyziologického stavu alebo fyziologických procesov ľudí alebo zvierat

Opísať ciele projektu:

Probiotiká sú využívané na profylaxiu a zmierňovanie prejavov niektorých ochorení (laktózová intolerancia, hypercholesterolemia) a udržiavanie fyziologickej mikroflóry v tráviacom trakte a pošve. S cieľom vyselektovať nové probiotické baktérie pre humánnu resp. veterinárnu medicínu budeme charakterizovať 8 kmeňov laktobacilov, ktoré boli izolované zo žalúdočnej sliznice jahňata (*L. murinus* C, *L. mucosae* D a *L. reuteri* E) a koziatka (*L. reuteri* KO4b, *L. reuteri* KO4m, *L. reuteri* KO5, *L. plantarum* KG1 a *L. plantarum* KG4). Obe zvieratá mali 3 týždne a boli chované na mliečnej strave. Každý z testovaných kmeňov bol jednoznačne identifikovaný použitím metód molekulárnej biológie. Nukleotidové sekvencie 16S rDNA každého z kmeňov sú zaradené do databázy GenBank. Predkladateľ projektu je súčasťou žiadosti o VEGA grant z MSVT SR, ktorý je plánovaný na trojročné časové obdobie (2014-2016). Prvý rok riešenia VEGA grantu zahŕňa *in vitro* experimenty, ktoré nám umožnia doplniť doterajšie výsledky, získané pri charakterizácii všetkých 8 kmeňov testovaných laktobacilov. Jednotlivé kmene očakarakterizujeme po mikrobiologickej, biochemickej a molekulárno-biologickej stránke. Keďže zdraviu prospešné účinky probiotických baktérií sú kmeňovo špecifické, na základe získaných výsledkov vyselektujeme najperspektívnejší probiotický kmeň pre prax, ktorý otestujeme v pokuse *in vivo* na modeli

1

potkana. Parametre výberu vhodného kmeňa laktobacila: vitalita, adhezivita na eukaryotické bunky v podmienkach *in vitro* a *in vivo*, rezistencia na: pôsobenie žľových kyselín, pôsobenie nízkych hodnôt pH, rezistencia voči antibiotikám a chemoterapeutikám, schopnosť produkovať antimikrobiálne látky, imunomodulačné vlastnosti. Niektoré z vyššie uvedených parametrov už boli opublikované vo vedeckých časopisoch (Biliková a kol., 2008; Bilková a kol., 2011; Kiňová Sepová a kol., 2011; Kiňová Sepová a kol., 2013). Pre konkrétny kmeň, sa rozhodneme na základe najvhodnejšej kombinácie vyššie uvedených parametrov.

Na modeli potkana *in vivo* budeme sledovať vplyv laktobacilov na metabolizmus lipidov, otestujeme hypocholesterolemický účinok a stanovíme zmeny v aktivite butyrylocholinesterázy.

Pri plánovaní postupu na zvieratách vychádzame z predpokladov, že enzým butyrylocholinesteráza (BChE) má spojitost s lipidovým metabolizmom (Šišková a kol. 2012) a niektoré probiotické mikroorganizmy majú schopnosť ovplyvňovať cholesterolemiu. Otráve alebo pôsobilo preventívne na vznik hypercholesterolemie u myši chovaných na strave bohatej na tuky (Taranto a kol. 2000). Mechanizmus, na základe ktorého dochádza po podaní laktobacilov k zníženiu hladín cholesterolu v plazme nie je stále vysvetlený. Predpokladá sa, že prítomnosť laktobacilov v čreve znižuje resorpciu cholesterolu v bunkách črevného epitelu. Potkanom v rôznych experimentálnych skupinách budú podávané v definovaných dávkach na tuky bohatá strava, fenofibrát a/alebo testovaný kmeň laktobacila. V skupine, v ktorej bude zvieratám podávaná kombinácia fenofibrátu s laktobacilmi predpokladáme dva rôzne mechanizmy zníženia hladín cholesterolu v plazme, čo by mohlo zabezpečiť efektívnejší výsledok hypolipidemickej terapie.

U potkanov užijúcich laktobacily budeme sledovať modulačnú lipidového metabolizmu a možné ovplyvnenie aktivity a expresie BChE. Modelové zvieratá použijeme aj na štúdium imunomodulačných schopností laktobacilov.

1. Bilková, A., Kiňová Sepová, H., Bilka, F., Bukovský, M., Balažová, A., Bezáková, L.: Identification of newly isolated lacticbaccily from the stomach mucus of lamb. Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae, 2008, 55, 64-72.
2. Bilková, A., Kiňová Sepová, H., Bukovský, M., Bezáková, L.: Antibacterial potential of lacticbaccilli isolated from lamb. Vet. Med., 2011, 56, 319-324.

3 Kiňová Sepová, H., Dubničková, M., Bilková, A., Bukovský, M., Bezáková, L.: Identification and biological activity of potential probiotic bacterium isolated from the stomach mucus of breast-fed lamb. Braz. J. Microbiol., 2011, 42, 1189-1196.

4 Kiňová Sepová H., Bilková A. Isolation and identification of new lactobacilli from goatling stomach and investigation of reuteri production in Lactobacillus reuteri strains. Folia Microbiol. 2013; 58, 33-38.

5 Šišková K., Bilková F., Adameová A., Balážová A., Mydla M., Paulíková I. Influence of lipid imbalance on butyrylcholinesterase activity and biotransformation efficiency. Pharmazie. 2012 Apr;67(4):345-50. PMID:22570941 (3.7.2013)

6 Pereira DJ, Gibson GR. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2002;37(4):259-81. PMID:12236466 (3.7.2013)

7 Taranto MP, Medici M, Perdigón G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF. Effect of Lactobacillus reuteri on the prevention of hypercholesterolemia in mice. J Dairy Sci. 2000 Mar;83(3):401-3. PMID:10750094 (3.7.2013)

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

Selekcia nového probiotického kmeňa/kmeňov laktobacilov pre použitie vo výživových doplnkoch ľudí a/alebo zvierat, na úpravu hypercholesterolemie a moduluáciu imunitného systému. Dosiahnutie vytyčeného prínosu je vysoko pravdepodobné, nakoľko v už realizovanej časti *in vitro* testov sme získali veľmi relevantné výsledky aplikovateľného charakteru.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Polkan, Rattus norvegicus Wistar – samci 112 ks

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

Zvieratá budú individuálne ustajnené, čo narušuje ich sociálne kontakty, avšak z dôvodu sledovania príjmu potravy je nutný takýto typ ustajnenia. Všetkým zvieratám sa zabezpečí dostatočný životný priestor (kľetka 55x35x20 cm). Budú sa navzájom počuť a priestor v kľetkách sa obohací o drevené paličky na žuvanie a obhýzanie, ruky a škatule, umelohmotné skumavky – falkonky.

Počas experimentu bude u časti zvierat potravou bohatou na tuky navodená hypercholesterolemia. Každodenná aplikácia fyziologického roztoku alebo laktobacilov vo fyziologickom roztoku gastrickou sondou môže predstavovať slabú až stredne veľkú stresovú záťaž. Vzhľadom na charakter experimentu je nutné podávať presné množstvá testovaných laktobacilov a tiež fyziologického roztoku pre porovnateľnosť u experimentálnych skupín. Po zadaní kľúčových slov („rat gastric pain probe compensation“) sme vo vyhladávači nenašli žiadny relevantný vedecký článok o možnosti kompenzovať stres pri podávaní. Laktobacily sú z toxikologického hľadiska považované za inértné. Vzhľadom na celkovú dĺžku trvania postupu neočakávame vznik žiadnych zdravotných komplikácií, ktoré by zvieratám spôsobovali bolesť alebo utrpenie. Navyše, počas celého postupu budú pod dohľadom zazmluvneného veterinára.

Počas života zvierat neplánujeme žiadne odbery biologického materiálu.

Na konci projektu budú všetky zvieratá usmrtené v celkovej pentobarbitalovej anestéze, odoberať im krv z brušnej aorty.

Štatistické metódy a výpočet sily štatistických testov:

Na vyhodnotenie bude použitá štatistická metóda ANOVA, resp. neparametrický ekvivalent. Dizajn experimentu predpokladá použitie 80% štatistickej sily pre použitý test. Počet subjektov bol stanovený na základe predchádzajúcich skúseností, získaných na pracovisku v podobných štúdiách, vzhľadom na efekt, resp. priemernú odozvu pre danú intervenčnú skupinu a jej typickú variabilitu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

HODNOTENIE KRUTOSTI POSTUPOV V PROJEKTE

Postup	V projekte	Kategória
Aplikácia opakovaná	p.o. (Lactobacillus) – sondou p.o. (fyziol. roztok) - sondou p.o. (tuky, fenofibrát) – v strave	slabé-stredné
Aplikácia jednorazová	i.p. (pentobarbital)	slabé
Ustajnenie	4 týždne – individuálne Narušenie sociálnych vzťahov	stredné
Riziko zhoršenia klinického stavu		slabé

Spôsob eutanázie	pentobarbital	slabé
Celkové hodnotenie	Postupy z hľadiska krutosti:	slabé- stredné

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Podľa údajov v literatúre sa mnohé probiotické laktobacily vyznačujú protizápalovými a antioxidačnými vlastnosťami ako aj schopnosťou priaznivo ovplyvňovať parametre lipidového metabolizmu (hladiny cholesterolu a triacylglycerolov). Na základe mikrobiologickej, biochemickej, molekulárno-biologickej charakterizácie, a *in vitro* experimentov vyselektujeme z testovaných laktobacilov kmeň s najvhodnejšími vlastnosťami pre potencionálne využitie v praxi. Tento kmeň budeme následne testovať *in vivo* podmienkach na potkanoch. V pokuse sa zameriame na sledovanie vplyvu v potrave prijímaných laktobacilov na moduliáciu hypercholesterolemie a vybraných, biochemických a imunologických parametrov. Kým syntetický fenofibrát ovplyvňuje priňatné metabolizmus tukov v pečeni na úrovni transkripcie génov, ako mechanizmus hypcholesterolemického účinku sa u laktobacilov predpokladá zníženie vstrebávania cholesterolu v čreve. V skupine zvierat, ktoré budú dostávať laktobacily v kombinácii s fenofibrátom by sa mali uplatniť oba uvedené mechanizmy. Nakoľko ide o potenciáciu medziorgánových mechanizmov a predpokladá sa aj zapojenie regulácie vylučovania cholesterolu na úrovni spätnej väzby, pre overenie synergistického účinku je potrebné použiť zvieracie modely.

V databázach na internete sme hľadali alternatívnu metódu, avšak vzhľadom na charakter experimentu nie je možné použiť žiadnu alternatívnu metódu okrem testovania na zvieratách.

Podmienky experimentu je potrebné čo najviac priblížiť reálnemu organizmu, nakoľko imunomodulačný a protizápalový vplyv laktobacilov si vyžaduje kooperáciu viacerých obranných systémov makroorganizmu, sprostredkovaných rôznymi typmi buniek. Rovnako štúdiom metabolizmu cholesterolu a triacylglycerolov na úrovni komunikácie medzi pečeňou a tukovým tkanivom, nie je možné sledovať oddelene na bunkových kultúrach *in vitro*. Pretože sa jedná o kmeň laktobacilov s možnosťou využitia v klinickej praxi, je nutné overiť ich účinky v podmienkach *in vivo* na zvieracích modeloch. Toto experiment na nezvieraciach modeloch neumožňuje.

- <http://www.lib.ucdavis.edu/dept/animalalternatives/databaseapproach.php>;
- Lactobacillus plantarum strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. Huang Y, Wang X, Wang J, Wu F, Sui Y, Yang L, Wang Z. J Dairy Sci. 2013 May;96(5):2746-53. doi: 10.3168/jds.2012-6123. Epub 2013 Mar 15. PMID:23498020 (2.7.2013)

- Effects of two Lactobacillus strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. Xie N, Cui Y, Yin YN, Zhao X, Yang JW, Wang ZG, Fu N, Tang Y, Wang XH, Liu XW, Wang CL, Lu FG. BMC Complement Altern Med. 2011 Jul 3;11:53. doi: 10.1186/1472-6882-11-53. PMID:21722398 (2.7.2013)

- Probiotic Lactobacillus rhamnosus GG and Aloe vera gel improve lipid profiles in hypercholesterolemic rats. Kumar M, Rakesh S, Nagpal R, Hemalatha R, Ramakrishna A, Sudarshan V, Ramagani R, Shujaiddin M, Verma V, Kumar A, Tiwari A, Singh B, Kumar R. Nutrition. 2013 Mar;29(3):574-9. doi: 10.1016/j.nut.2012.09.006. Epub 2013 Jan 1. PMID:23287067 (2.7.2013)

- Effect of dietary inclusion of Lactobacillus acidophilus ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats. Park YH, Kim JG, Shin YW, Kim SH, Whang KY. J Microbiol Biotechnol. 2007 Apr;17(4):655-62. PMID:18051279 (4.7.2013)

- Effect of administration of Lactobacillus gasseri on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats. Usman, Hosono A. J Dairy Sci. 2000 Aug;83(8):1705-11. PMID:10984145 (4.7.2013)

- The hypcholesterolaemic effects of Lactobacillus acidophilus American type culture collection 4356 in rats are mediated by the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1. Huang Y, Wang J, Cheng Y, Zheng Y. Br J Nutr. 2010 Sep;104(6):807-12. doi: 10.1017/S0007114510001285. Epub 2010 May 5. PMID:20441669 (4.7.2013)

- Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing Lactobacillus plantarum strains in Sprague-Dawley rats. Kumar R, Grover S, Batish VK. Br J Nutr. 2011 Feb;105(4):561-73. doi: 10.1017/S0007114510003740. Epub 2010 Oct 6. PMID:20923582 (4.7.2013)

- Databáza Anzccart :

- > How to Reduce the Number of Animals Used in Research by Improving Experimental Design and Statistics (2011) (4.7.2013)
- > Using Animals in Science > Balancing Harm & Benefit (4.7.2013)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>:
- Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans, Pereira DI, Gibson GR. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2002;37(4):259-81. PMID:12236466 (3.7.2013)
- Effect of Lactobacillus reuteri on the prevention of hypercholesterolemia in mice, Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF. J Dairy Sci. 2000 Mar;83(3):401-3. PMID:10750094 (3.7.2013)
- Influence of lipid imbalance on butyrylcholinesterase activity and biotransformation efficiency, Šišková K, Bilka F., Adamcová A., Balážová A., Mydla M., Paulíková I. Pharmazie. 2012 Apr;67(4):345-50. PMID:22570941 (3.7.2013)

2. Redukcia počtu zvierat:

Počet subjektov, 14 pre každú skupinu, zohľadňuje predošlé skúsenosti potvrdené a priori výpočtom očakávanej sily štatistického testu pri zohľadnení individuálnej variability pre stanovenie širokého spektra parametrov lipidového metabolizmu, markerov oxidačného poškodenia lipidov a iných významných makromolekúl, ako aj vybraných prozápalových markerov a parametrov vrodenej imunity, ktorý je možné štatisticky verifikovať.

3. Zieňenie:

Počas života zvierat nie sú v postupe naplňované žiadne odbery biologického materiálu. Vzorky tkanív a orgánov budú odobraté na konci postupu po usmrtení zvierat v celkovej anesteze pentobarbitalom (i.p. 60 mg/kg, 2,5% roztok).

Zvieratá budú počas trvania celého experimentu monitorované a v prípade zistenia nevhodných neočakávaných udalostí bude experiment ukončený a následne predložený nový projekt tak, aby sa znížil počet používaných zvierat.

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu 3649/13-22A

Názov projektu: Úloha kalsequestrínu v luminálnej regulácii ryanodínového receptora v srdci.

Kľúčové slová: ryanodínový receptor, kalsequestrín, luminálny Ca^{2+} , iónový kanál

1. Účel projektu

Hlavným cieľom projektu je systematicky preskúmať úlohu kalsequestrínu (CSQ2) v luminálnej regulácii ryanodínového receptora (RYR2) v srdci a zároveň definovať jej fyziologickú relevanciu. Tento typ regulácie sa v posledných rokoch skúma ako potenciálna molekulárna príčina niektorých závažných srdcových arytmií, a preto všetky poznatky v tejto oblasti priamo alebo nepriamo prispievajú k urýchleniu vývoja nových stratégií v liečení srdcových arytmií.

2. Ciele projektu:

Kontrakcia srdcových svalových buniek nastáva po masívnom uvoľnení Ca^{2+} z cisterien sarkoplazmatického retikula (SR) cez aktivované RYR2 kanály. Hlavným fyziologickým aktivátorom RYR2 kanálov je Ca^{2+} , ktorý sa naväzuje na objemnú cytozolickú doménu. Dôležitú úlohu však zohráva aj luminálna regulácia, ktorá je sprostredkovaná väzbou Ca^{2+} na minoritnú luminálnu časť RYR2 kanála. Doterajší výskum naznačuje, že kalsequestrín (CSQ2) ako hlavný Ca^{2+} viažúci proteín v SR by mohol plniť úlohu Ca^{2+} senzora pre RYR2 kanál. Túto hypotézu podporuje aj blízka lokalizácia týchto proteínov v bunke, čo vedie k vytvoreniu objemného kanálového komplexu. Naším cieľom je systematické preskúmanie úlohy CSQ2 v luminálnej regulácii RYR2 kanála spojením elektrofyziologického a biochemického prístupu, čím by sme chceli prispieť k detailnému pochopeniu molekulárneho mechanizmu funkčnej komunikácie medzi CSQ2 a RYR2 kanálom z biofyzikálneho ako aj fyziologického hľadiska.

3. Prínos z vykonaného projektu

Regulácia RYR2 kanála luminálnym Ca^{2+} sa v posledných rokoch stala veľmi atraktívnou oblasťou výskumu regulácie RYR2 kanála, pretože sa predpokladá, že jej narušenie by mohlo byť zodpovedné za generovanie závažných srdcových arytmií vyvolaných buď mutáciami na RYR2 kanáli alebo na CSQ2. Cieľom našej práce je detailné preskúmanie úlohy CSQ2 v luminálnej regulácii RYR2 kanála v širokom spektre experimentálnych podmienok, ktoré pokrývajú aj fyziologicky relevantnú oblasť. Prínos našej práce vidíme aj v spojení elektrofyziologického a biochemického prístupu, čím sa výrazne eliminuje intuitívne interpretovanie výsledkov. V tomto ohľade by naše výsledky okrem získania kvalitatívne nových informácií mohli prispieť aj k zrevidovaniu doteraz akceptovaného názoru na úlohu CSQ2 v luminálnej regulácii RYR2 kanála.

4. Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty

Na skúmanie funkcie RYR2 kanála je potrebné izolovať mikrozomálne vzorky zo srdcového tkaniva. V našich projektoch používame laboratórnych potkanov. Srdce vyberáme až po uvedení potkana do celkovej anestézie a následnej dislokácii krčných stavcov, čím dôjde krátko usmrteniu zvieraťa. Protokol na izoláciu mikrozomálnych vzoriek s RYR2 kanálmi sme upravili tak, aby sme dosiahli maximálny výťažok. Projekt bol optimalizovaný z hľadiska počtu použitých potkanov a plánovaný počet na celú dobu riešenia projektu je 72.

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

V rámci celého projektu je jedinou ujmov rýchle usmrtenie anestetizovaných potkanov dislokáciou krčných stavcov s následnou excíziou srdcového tkaniva, ktoré potrebujeme ako zdroj mikrozomálnych vzoriek na skúmanie funkcie RYR2 kanálov.

6. Predpokladaná úroveň krutosti

Klasifikácia krutosti plánovaných postupov podľa prílohy č. 4 nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 377/2012 Z.z. je „bez možnosti zotavenia“. Rýchlu smrť potkanov spôsobíme dislokáciou krčných stavcov po uvedení do celkovej anestézie.

7. Uplatňovanie zásad 3R

požiadavka nahradenia

Funkcia RYR2 kanálov sa dá v určitých špecifických prípadoch skúmať aj na rekombinovaných kanáloch, na expresiu ktorých je najvhodnejšia bunková kultúra HEK293. V našom prípade však nie je možné túto alternatívnu metódu použiť, pretože RYR2 kanál je in vivo spojený s rôznymi asociovanými a pomocnými proteínmi, pričom niektoré z nich sú už známe, iné zatiaľ nie. V bunkových líniiach ako náhradných zdrojov iónových kanálov sa syntetizuje RYR2 kanál osamotene bez pomocného proteínového komplexu. Nami skúmaný regulačný mechanizmus je však sprostredkovaný asociovaným proteínom CSQ2, ktorý sa v HEK293 nesyntetizuje. Z týchto dôvodov potrebujeme pracovať s RYR2 kanálom, ktorý má na sebe naviazaný CSQ2 ako aj ostatné fyziologicky relevantné asociované proteíny a to dokážeme zabezpečiť iba tak, že RYR2 kanál izolujeme z jeho prirodzeného prostredia (svalovej bunky srdca).

požiadavka obmedzenia

Protokol na izoláciu mikrozomálnych vzoriek s RYR2 kanálmi sme upravili tak, aby sme dosiahli maximálny výťažok. Projekt bol optimalizovaný z hľadiska počtu použitých potkanov. Minimálny počet na jednu izoláciu sú 4 potkany, počet izolácií potrebných na dosiahnutie relevantných výsledkov je približne 18. Plánovaný počet potkanov na celú dobu riešenia projektu je teda 72.

požiadavka zjemnenia

V našich projektoch štandardne používame ako zdroje srdcového tkaniva potkany, aj keď je známe, že lepšími modelmi funkcie a stavby ľudského srdca je srdce psov alebo ošípaných. Na molekulárnej úrovni sa však rozdiely vo funkcii a regulácii RYR2 kanála v skupine cicavcov neočakávajú a preto sme zvolili ako zdroj srdcového tkaniva menších cicavcov – potkany. Aby sme minimalizovali bolesť, utrpenie a strach potkanov počas vpichu anestetika používame tenké ihly, ktoré sú určené pre diabetikov. Srdce vyberáme až po navodení celkovej anestézie a následnej dislokácii krčných stavcov, čím zabezpečíme rýchle usmrtenie s najmenšou mierou bolesti.

7. Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno

☒ nie

Podľa § 37 nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 377/2012 Z.z. ods. 3 sa spätné posúdenie projektu nevyžaduje, lebo projekt zahŕňa iba postup usmrtenia zvierat klasifikovaný ako „bez možnosti zotavenia“.

Príloha č. 2
Netechnické zhrnutie projektu 3650/13-221

Názov projektu: Štúdium molekulárnych mechanizmov biologických účinkov H₂S

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte:

krvný tlak, regulačné mechanizmy, sirovodík (H₂S)

Účel projektu: základný výskum

Opísať ciele projektu:

Poznávanie príčin vysokého krvného tlaku pomáha v hľadaní nových preventívnych i terapeutických postupov na liečenie vysokého krvného tlaku. Aby však bolo možné podchytiť jednotlivé chorobné procesy, je potrebné najskôr spoznávať základné mechanizmy a vzájomné vzťahy medzi reguláciou a funkciou srdcovo-cievneho systému. Príklad tejto nevyhnutnosti je zachytený v nedávnych štúdiách zameraných na riešenie nových postup pri liečbe vysokého krvného tlaku, v ktorých sa uvádza ako farmaceuticky perspektívnou cestou liečby, vývin liečiv na báze uvoľnenia H₂S. Avšak mechanizmy, akými uskutočňuje H₂S svoje signálne úlohy v srdcovo-cievnom systéme, sú popísané nedostatočne alebo chýba poznanie na hlbšej fyziologickej úrovni. Ciele projektu sú zamerané na získanie detailnejších poznatkov o regulačnom pôsobení H₂S v srdcovo-cievnom systéme, s dôrazom kladeným na identifikáciu mechanizmov tohto pôsobenia. Účelom je nielen rozvinúť poznanie H₂S ako fyziologickej signálnej molekuly, ale skúmaním vlastností podaných donorov H₂S vytvoriť predpoklady budovania stratégie pre výber do organizmu dodaných látok uvoľňujúcich H₂S. Stanovené ciele chceme dosiahnuť posunutím úrovne charakterizácie biologického účinku H₂S zo systémovej - sledovaním hemodynamickej odpovede, cez tkanivovú - sledovaním kontrakčno-relaxačnej svalovej odpovede aorty, až k molekulárnej - sledovaním reakcie iónových kanálov, predovšetkým aniónových kanálov mitochondrií, pochádzajúcich z rôznych tkanivových štruktúr potkana.

Prínos z vykonaného projektu:

Prínos projektu vidíme v poskytnutí detailnejšieho popisu regulačného pôsobenia H₂S v srdcovo-cievnom systéme, ktorý spolu s charakterizáciou účinku H₂S vo vzťahu k jeho uvoľňovaniu z vybraných donorov, môže prispieť k vytvoreniu kritérií pre návrh vhodnej látkovej štruktúry, vyznačujúcou sa silnou fyziologickou relevanciou.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan laboratórny: a/ kmeň Wistar v navrhovanom počte 174 jedincov za obdobie 3 rokov
b/ kmeň SHR v navrhovanom počte 54 jedincov za obdobie 3 rokov

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

Pred uskutočnením postupov na zvieratách bude užívateľom sledovaný zdravotný stav a komfort zvierat, nebude im spôsobená zbytočná bolesť, strach ani utrpenie. Postupy zamerané na získanie orgánov sú spojené s usmrtením zvierat a prestrihnutím miechy, ktoré je vykonávané v celkovej anestéze navodenej intraperitoneálnym podaním anestetika. Postup zameraný na kontinuálne sledovanie hemodynamickej odpovede modelu prebieha v celkovej anestéze navodenej intraperitoneálnym podaním anestetika a po jeho ukončení je zviera usmrtené predávkovaním anestetikom.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Podľa klasifikácie krutosti postupov ustanovenej § 14 príslušného predpisu* sú postupy vykonávané v projekte zahrnuté do kategórie "Bez možnosti zotavenia".

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Pretože projekt je postavený z veľkej časti na sledovaní špecifických ukazovateľov spojených so zložitým biologickým systémom, integrujúcim viacero uplatňujúcich sa faktorov, nie je možné pristúpiť k nahradeniu za teoretický alebo nižší biologický experimentálny model. V prípade štúdie iónových kanálov nie je možné vykonať charakterizáciu na *in vitro* modely, pretože bunkové kultúry nemajú typovo potrebnú expresiu iónových kanálov a modulačných proteínov, a preto je nutné ich získať v originálnej podobe zo živého organizmu.

2. Redukcia počtu zvierat:

Navrhnutý počet laboratórnych potkanov na celé obdobie riešenia projektu zodpovedá náročnosti experimentálnych postupov a špecifickým potrebám zadaných cieľov. Jednotlivé protokoly sú posudzované a optimalizované pre požiadavku redukcie počtu zvierat na minimum v súlade s nenarušením dosiahnutia cieľov projektu a poskytnutím dôveryhodnej výpovednej hodnoty štúdie.

3. Zjemnenie:

Laboratórny potkan je štandardný objekt, ktorý sa celoplošne využíva pri štúdiu štruktúrnych a funkčných vlastností srdcovo-cievneho systému, čo vytvára predpoklady pre náležité porovnanie výsledkov medzi laboratóriami. Z odporúčaných vlastností dobre vyhovuje technickým požiadavkám použitia našich experimentálnych metód, ako aj poskytuje možnosť vyššieho výťažku vzorky pre štúdium iónových kanálov. Zvieratá v období od dodania až do zaradenia do stanovených postupov (vrátane obdobia karantény) budú

umiestnené v, na tento účel schválenej, klimatizovanej miestnosti /zverinci/ a kontrolované osobou zodpovednou na starostlivosť o zvieratá a ich dobré životné podmienky.

Činnosť súvisiaca s manipuláciou so zvieratom pred uskutočnením postupu, vrátane intraperitoneálneho podania anestetika, bude prevádzaná s úmyslom vyhnúť sa resp. minimalizovať bolesť a stres, ktoré by mohlo zviera touto činnosťou pociťovať. Ďalšie výkony na zvierati sú uskutočnené v celkovej anestéze, pričom zviera je usmrtené v bezvedomí.

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

Názov projektu:

Úloha chemokínov pri viscerálnej aferentnej hypersenzitivite vyvolanej ezofagitídou

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): eozinofilná ezofagitída, pažerák, nociceptor, bolesť, chemokíny

Účel projektu * : Základný výskum, (translačný)

Opísať ciele projektu:

Eozinofilná ezofagitída (EoE) je alergické ochorenie pažeráka charakterizované symptómami, ktoré sú kompletne (abdominálna bolesť, pálenie záhy, zvracanie) alebo čiastočne (dysfágia, dyspepsia) sprostredkované aktiváciou aferentných nervov. Symptomatologická liečba EoE je často neefektívna, preto sú nutné nové látky na inhibíciu aferentných nervov a útlm týchto symptómov. Pretože EoE má alergicko-imunologickú etiológiu, EoE je ideálnym modelom štúdia hypersenzitivity viscerálnych aferentných nervov vyvolaných chemokínmi. Lepšie pochopenie týchto mechanizmov má význam aj pre ďalšie viscerálne zápalové ochorenia. Predpokladáme, že produkcia chemokínov pri EoE prispieva k aferentnej hypersenzitivite cez chemokínové receptory s aktiváciou signálnych dráh na TRP (Transient Receptor Potential) kanály. Uvedenú hypotézu budeme študovať kombináciou metódik: elektrofyziológiou individuálneho nervového vlákna a metodikou single cell RT-PCR a qRT-PCR v našom novom modeli masívnej pažerákovkej eozinofilnej infiltrácie analogickej s humánnou EoE.

Predpokladáme, že pri EoE pažerákové aferentné nervy 1) sa vyznačujú zmenami manifestovanými mechanickou a chemickou hypersenzitivitou, 2) začínajú exprimovať receptory pre chemokíny spôsobené zápalom pažeráka. Ďalej predpokladáme, že chemokínmi vyvolaná senzitivizácia a aktivácia pažerákových aferentných nervových podtypov je mediovaná cez TRP (Transient Receptor Potential) kanály.

Naša hypotéza je adresovaná na nasledujúce ciele:

1. cieľ - optimalizovať model EoE a charakterizovať mechanickú a chemickú hypersenzitivitu pažerákových aferentných nervových podtypov (vágové – plakodálne (nodózne), neurokrestálne (vágové jugulárne a spinálne) nociceptory a mechanosenzory).
2. cieľ – vyhodnocovať expresiu chemokínov v zapálenom pažeráku a ich receptorov v aferentných nervových podtypoch v modeli EoE.
3. cieľ – skúmať iónové kanály zodpovedné za hypersenzitivitu v pažerákových aferentných nervoch indukovanú chemokínmi. Všetky chemokínové receptory viažu sa na G-proteín cez signálne dráhy aktivujú iónové kanály a tak indukujú senzitivizáciu a/alebo aktiváciu aferentných dráh. V tomto celi budeme hodnotiť expresiu a úlohu iónových kanálov z rodiny TRP (Transient Receptor Potential) kanálov.

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

Testovaním našich hypotéz očakávame 1) identifikáciu adenozinových receptorov sprostredkujúcich aktiváciu a senzibilizáciu pažerákových nociceptívnych podtypov v modeli EoE a 2) prispieť k mechanistickému pochopeniu viscerálnej nociceptívnej modulácie cez receptory spriahnuté s G-proteínom. Naše očakávané výsledky budú potom relevantné pre rozšírenú skupinu viscerálnych ochorení (funkčná viscerálna bolesť, špecificky funkčné pálenie záhy a bolesť z pažeráka). V tejto súvislosti identifikácia adenozinových receptorov zodpovedných za zvýšenie pažerákovkej nociceptívnej aktivity (1. cieľ) môže mať relatívne okamžité uplatnenie. Pretože bežné selektívne adenozinové receptorové agonisty sú vždy prístupné pre klinické štúdie, a teda klinické štúdie môžu

byť navrhnuté u pacientov s funkčným pálením záhy a bolesťou pažeráka a hrudníka podľa našich výsledkov. Ďalšou cennou informáciou je, že TRPA1 receptorové antagonisy schválené pre klinické štúdie budú pravdepodobne prístupné v dohľadnom čase a môžu byť použité v paralelných štúdiách podľa našich výsledkov v 3. celi zameraných hlavne na úlohu TRPA1 receptora.

Očakávame, že naše výsledky budú mať tiež širšie uplatnenie pre nociceptívny (bolestivý) signálny systém aktivovaný prostredníctvom GPCR (receptory spriahnuté s G proteínom). Väčšina zápalových molekúl je aktivátorom GPCR. Existuje niekoľko GPCR receptorov (typicky spriahnuté s G-proteínom ako je bradykinínový B2 a adenosínový A1 receptor, naše predbežné dáta) evokujúcich nociceptívnu aktiváciu a/alebo senzibilizáciu cez relatívne limitovaný set iónových kanálov (CLCA a TRP kanály). Preto farmakologické látky cielene pôsobiace na tieto kanály môžu mať širšie využitie pri liečbe bolesti a získané výsledky v tomto projekte môžu poskytnúť nové a významné pochopenie mechanizmu GPCR vo viscerálnych nociceptoroch (receptory spriahnuté s G proteínom).

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Morča domáce, outbredné, Dunkin Hartley, samce, predbežne 458/4roky

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

Postupy tohto druhu sa v literatúre neuvádzajú. Nie je známy a validovaný model eozinofilnej ezofagitídy u morčiat. Plánovaný pokus je minimálne traumatizujúci v zmysle senzibilizácie (injekcia ovalbumínu) a krátkodobej inhalácie alergénu (ovalbumín). V snahe vyhnúť sa novej anafylaktickej reakcii, zvieratá sú premedikované antihistaminikom pred inhaláciou alergénu. Počas inhalácie v plastických boxoch je pozorovaná individuálna variabilita, u niektorých morčiat môže byť pozorované prechodne zrýchlené dýchanie, ktoré po ukončení inhalácie cca 5 min sa upraví do normálu.

U senzibilizovaných zvierat sa v krátkodobej anestéze vykoná veľmi šetrný minimálny chirurgický zákrok pri retrográdnom značení, rana bude štandardne ošetrená a zvieratá budú udržiavané vo zverinci s najväčšou starostlivosťou do dvoch týždňov. Podľa protokolu a časového harmonogramu budú zvieratá usmrtené vykrvácанím po predchádzajúcej anestézii ketamin/xylazín (predávkovaním anestetika), prípadne inhaláciou CO₂ a v pokuse sa bude ďalej pracovať už len s tkanivom.

Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh, metodika senzibilizácie morčiat je veľmi dobre tolerovaná a taktiež morčatá sa veľmi dobre zotavujú po krátkodobej ketamín/xylazínovej anestézii, po prebudení rýchlo nastupuje motorická aktivita a po hodine sú úplne čulé so záujmom o krmivo a vodu. Zhoršený zdravotný stav očakávame výnimočne u senzitivných – precitlivých zvierat, alebo u zvierat s primárne zhoršeným zdravotným stavom. 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, ktoré môžu pozitívne obohatiť farmakoterapiu. Veľká pozornosť bude zameraná na adaptáciu s personálom a laboratórnym prostredím.

Predpokladaná úroveň krutosti:

- **slabé** – modelovanie eozinofilnej ezofagitídy

- **slabé** - retrográdne značenie neurónov inervujúcich pažerák – malý chirurgický zákrok v krátkodobej anestéze (cca 1cm kožná incízia v krčnej oblasti na exponovanie pažeráka – injekcia Dil mikropipetou do steny pažeráka cca 20μl). Pozn. Aj napriek tomu, že chirurgický zákrok je klasifikovaný ako stredný stupeň krutosti, v našom prípade nejde o závažný chirurgický výkon ako je popísané v bode 2. Stredné - písmeno c (zvieratá už po hodine sú čulé s dobrou motorickou aktivitou a príjmom potravy)

- **bez možnosti zotavenia** zvieratá pre nasledujúce metodiky, scRT-PCR a qRT-PCR a elektrofyziológické štúdie, sú usmrtené exsanguináciou po predchádzajúcej anestézii ketamín/xylazín (predávkovaním anestetika) alebo inhaláciou CO₂ a potom sa už pracuje len s tkanivom.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Tento projekt nie je možné vykonať bez použitia týchto špecifických zvierat na štúdium neurónov z periférnych nervových ganglií. preparát so zachovaným intaktným vágovým nervovým systémom inou alternatívnou metódou. Morča domáce je jeden z najrelevantnejších modelov aferentnej inervácie vnútorných orgánov človeka. Alternatívne metódy na štúdium vágovej aferentnej hypersenzitivity neexistujú. Nie je možné použiť nižší laboratórny živočíšny druh, pretože nižšie laboratórne druhy (myš a potkan) majú odlišnú biológiu kľúčových buniek eozinofilného-alergického zápalu obzvlášť mastocytov-žírných buniek, ktoré sú kľúčové pre moduláciu aferentných nervových dráh (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007 Oct;293(4):G850-6. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009 Jul;297(1):G34-420. Prieskum databáz ukázal, že vzhľadom na komplexnosť jednotlivých typov aferentných vágových nervových dráh nie je možné použiť modelovanie ani jednoduchšie systémy (bunkové kultúry a pod.)

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Z našich predchádzajúcich štúdií, kde sme použili uvedené metodiky sme zistili, že počty postupov tak ako sú špecifikované v protokole sú nevyhnutné (minimálne) na hodnoverné (štatisticky signifikantné) zachytenie predpokladaných efektov na dosiahnutie našich cieľov. Ďalšie znižovanie počtu zvierat v postupe je spojené s rizikom falošne negatívnych alebo falošne pozitívnych výsledkov, ktoré by potenciálne viedli k neopodstatneným postupom na ďalších zvieratách. Inými slovami, počty zvierat pri jednotlivých pokusoch sú vybrané tak, aby minimalizovali celkový počet pokusov nevyhnutných na dosiahnutie cieľov projektu. Hlavným dôvodom pre nevyhnutné minimálne počty zvierat je biologická variabilita odpovedí aferentných vlákien a expresie študovaných génov. Počet zvierat je tiež maximálne redukovaný logistikou pokusov, t.j. použitím minimálne možnej (jednej) kontrolnej skupiny pre všetky skupiny s testovanými látkami. S ohľadom na kvalitu života zvierat, ale aj limitované financovanie a časovú náročnosť experimentov a ich analýzy je v našom najlepšom záujme vykonať čo najmenej experimentov na získanie interpretovateľných výsledkov a použiť čo najmenej zvierat na získanie validovaných dôležitých poznatkov nevyhnutných pre pochopenie mechanizmov chorôb a vývoja nových liečiv u pacientov s alergickou ezofagitídou.

3. Zjemnenie:

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

Metodiky na elektrofyziologické a RT-PCR štúdie u morčatá sa vyvíjali a vylepšovali (refinement) v období posledných viac ako 15 rokov a sú v súlade s najnovšími poznatkami o aferentnej neurofyziológii a najmodernejšími celosvetovými metódami na ich štúdium.

Modelovanie eozinofilnej ezofagitídy

Plánovaný postup pri modelovaní eozinofilnej ezofagitídy je minimálne traumatizujúci v zmysle senzibilizácie (injekcia ovalbumínu) a krátkodobej inhalácie (5 min) alergénu (ovalbumín). Senzibilizované morčatá sú potom umiestnené do centrálného zverinca so štandardnou starostlivosťou v súlade s platnou legislatívou. Neočakávame anafylaktickú reakciu, pretože zvieratá budú predliečené antihistaminikom.

Retrográdne značenie pažerákových neurónov

V krátkodobej celkovej anestéze (ketamín-xylazín) sa za sterilných podmienok malým kožným rezom (cca 1cm) exponuje pažerák a retrográdny tracer Dil (0.1%, 2 x 10 μ l) sa pomocou mikropipety injikuje do svalovej vrstvy pažeráka. Rana bude štandardne ošetrená, zviera sa sleduje a po odznení

anestézy sa premiestni do Centrálného zverinca JLF UK a bude udržiavané vo zverinci s najväčšou starostlivosťou do dvoch týždňov.

Podľa protokolu a časového harmonogramu pred použitím metodiky extracelulárnej elektrofyziológie a RT-PCR zvieratá budú usmrtené predávkovaním anestetika alebo inhaláciou CO₂ a v pokuse sa bude ďalej pracovať už len s tkanivom.

Počas experimentu je zabezpečený komfort zvieratá, minimálna manipulácia, kožný rez je minimálny, rýchle hojenie, takže zvieratá nie sú traumatizované a prípadná bolesť je len minimálna.

Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne zaobchádzanie so zvieratami, v záujme odbúravania stresu zvieratá budú adaptované na personál a laboratórne podmienky ešte pred samotným vykonávaním postupov. 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. Postupy 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 efektívnej farmakoterapii.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie



Príloha 2 3951/13-221

Netechnické zhrnutie projektu

Stanovenie akútnej toxicity na potkanoch po i. v. podaní.

Cieľ

Cieľ tejto štúdie je získať informácie o akútnej toxicite látky APOSEC (sponzor APOSCIENCE AG Martenengysse 14 1090 Viena, Austria) stanovením Maximálne Tolerovanej Dávky MTD na potkanoch po i.v. podaní do chvostovej vény zvierat. Hodnotí sa prežítie, klinické príznaky toxicity, zníženie telesnej hmotnosti a pitevné nálezy. V prípade pozitívnych náleзов je možné po dohode so zadávateľom vyhodnotiť histopatologické parametre postihnutých orgánov. Predklinické hodnotenie toxicity potenciálneho lieku je podmienkou na jeho posun na klinické skúšky a registráciu lieku.

Postup

Preštúdiá - Sighting study

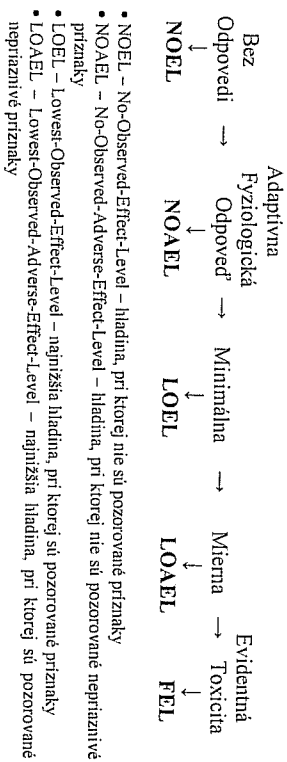
Účelom „sighting study“ je vybrať vhodné dávky pre hlavný test. V tomto teste je len jedno zviera aplikované vybranou dávkou. Dávka sa zvyšuje v logaritmickom merítke, až kým sú pozorované evidentné príznaky toxicity okrem pľúcnej, hnačky a neupraveného vzhľadu. Potom sa eskalácia zastaví a vyberú sa dávky pre hlavný test. Eskalácia dávok je daná progresívnym faktorom P_r číslo, ktorým násobíme alebo delíme predchádzajúcu dávku v závislosti na odpovedi na predchádzajúcu dávku.

Hlavný test

Na stanovenie MTD sa používajú skupiny o piatich zvieratách a 4 – 5 dávkových hladín. MTD sa stanoví z rozsahu dávok medzi LOEL a FEL viď obrázok 1. Po jednorazovej intravenózne aplikácii sa zvieratá pozorujú počas 4 hodín a potom denne počas 14 dní. Po skončení pozorovania sa všetky zvieratá podrobia detailnej pitve. Pozorovanie minimálnych, miernych alebo evidentných príznakov aspoň v jednej dávkovej hladine umožňuje stanovenie MTD.

Obrázok 1

Spektrum biologických odpovedí v vzostupnom poradí



• FEL – Frank-Effect-Level – hladina pri ktorej sú pozorované zreteľné príznaky

Testovací systém

Experimentálne zvieratá

Potkan Wistar: 35 samcov 35 samíc - 5 zvierat na sighting study, 25 zvierat na 5

dávkových skupin a 5 zvierat - kontrolná skupina z každého pohlavia

Iniciálna hmotnosť 170 – 190g

Dodávateľ zvierat : Velaz Praha, CZ

Identifikácia zvierat bude zabezpečená označením fixom na chvoste zvierat s ošišovaním vanie s uvedením pohlavia, dávky a dátumom aplikácie.

Zvieratá budú uštieňené v klimatizovanej miestnosti experimentálneho zverinca v typizovaných vaniciach, v skupinách po 5 zvierat, podľa pohlavia na podstielke (hobľovance). Hygiena uštieňovacích priestorov a ošetrovanie zvierat podľa Zasad SLP (2) kap. 5 a SPP (3). Teplota miestnosti bude udržiavaná v rozpätí 20 - 24°C a relatívna vlhkosť vzduchu v rozmedzí 55 ± 10 %. Krátkodobu môže byť aj vyššia v čase čistenia miestnosti. Svetelný režim (6–18h svetlo, 18–6h tma (3,4). Na konci pokusu budú všetky zvieratá humane utratené cervikálnou dislokáciou

Diéta

Podávaná bude štandardná certifikovaná laboratória strava, ktorá je rutinne analyzovaná výrobcom na nutričné komponenty a kontaminanty.

Voda

Ad libitum,

5.2.1.5 Aklimatizácia

Minimálne 5 dní pred začatím experimentu

Klinické pozorovanie

V deň aplikácie budeme sledovať reakciu na podanú látku a správanie zvierat. Tieto pozorovania budeme robiť denne v priebehu 14 dní. Hmotnosti zvierat budeme zaznamenávať raz týždenne (1).

Oblasť pozorovania

Koža a srst', oči, mukózy, respiračný systém, cirkulčný systém, CNS, somatomotorická aktivity a správanie (tremor, kŕče, silenie, diaréza, letargia, spánok, kóma) čas individuálneho úhynu.

Dôvodom pre predčasné utratenie zvierat sú silné bolesti, alebo utrpenie zvierat. Tieto prípady sa zaznamenajú ako smrť spôsobená testovanou látkou (1).



Telesné hmotnosti a spotreba krmiva

Individuálne hmotnosti zvierat sú zistené krátko pred aplikáciou, každý 2-3 deň počas pozorovacieho obdobia a pred pitvou. Zapisané sú aj zmeny hmotnosti po každom väzení. Spotreba krmiva je zaznamenaná pri každom väzení zvierat

Patológia

U všetkých uhynutých zvierat a zvierat prežívajúcich po 2 týždňoch bude vykonaná pitva s makroskopickým vyšetrovaním (5). Pitvy budú vykonané štandardnou sekčnou technikou po eutanázii zvierat cervikálnou dislokáciou.

Vyhodnotenie experimentu

Hmotnosti zvierat, aplikované dávky látok a úhyny budú zaznamenané do tabuliek spolu s časovými údajmi a klinickými príznakmi. Údaje spolu s výsledkami morfológického vyšetrovania budú podkladom pre záverečnú správu. Akútna toxicita bude vyhodnotená podľa ŠPP (1) v zmysle definície MTD - najvyššia dávka, ktorá nespôsobí neakceptovateľné vedľajšie efekty a zníženie telesnej hmotnosti nepresiahne 10 % po jednorazovom podaní.

Posúdenie pokusu z hľadiska 3R

- Refinement – zvieratá vykazujúce bolesť a utrpenie budú humane utratené cervikálnou dislokáciou
- Reduction – počty zvierat v pokuse sú na dolnej hranici štatistického vyhodnotenia pokusu ďalšie zníženie počtu zvierat by znížilo výpočetnú hodnotu
- Replacement – po preskúmaní databáz ECVAM (<http://ecvam.jrc.it>), ICCVAM (<http://iccvam.nihs.nih.com>) a FRAME (<http://www.frame.org.uk>) náhrada in vitro pre posúdenie akútnej toxicity stanovením MTD nie je dostupná

Hodnotenie z hľadiska krutosti

Zvieratá prejavujúce bolesť budú neodkladne humane utratené, nie je však vylúčené, že príde k úhynu vplyvom látky, preto je pokus hodnotený ako stredne krutý až krutý a bude spätne posúdený etickou komisiou. Do 3 mesiacov od ukončenia pokusu bude spätné posúdenie zaslané na ŠVPS.

Cieľ projektu:

Rádioterapia je jednou zo základných liečebných modalít v terapii nádorového ochorenia. Jej nedostatkom je poškodenie aj zdravého tkaniva a nedostatočná dávka v závislosti od lokality a citlivosti nádoru. Výsledky navrhovaných pokusov by mali prispieť k optimalizácii rádioterapie onkologických ochorení. Ich overenie v predklinických štádiách na zvieratách je nevyhnutné.

Cieľom projektu je sledovať vplyv nízkych dávok externého žiarenia na citlivosť resp. rezistenciu zdravého tkaniva na následné vysoké terapeutické dávky žiarenia. Myši budú vystavené nízkej (0,3Gy) a/alebo vysokej (3,0Gy) dávke žiarenia a bude sledovaný vplyv na prežívanie.

Ožarovanie nízkou dávkou nebude mať bezprostredne negatívny vplyv na zvieratá, pri závažnom zhoršení zdravotného stavu budú zvieratá eutanazované predávkovaním tiopentalu. Získané výsledky môžu pomôcť ku skvalitneniu liečby onkologických pacientov.

Počet a druh použitých zvierat:

Myš laboratórna kmene BDA/2 a C57/Bl6 288 jedincov.

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie

Pred začatím experimentov na laboratórnych zvieratách boli vykonané experimenty *in vitro* a boli nastavené základné parametre postupov.

Obmedzenie:

Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Použitie dvoch kmeňov laboratórnych myší je potrebné za účelom vylúčenia, že odpoveď na ožarovanie je špecifická len pre jeden kmeň laboratórnych myší.

Projekt nadväzuje na predchádzajúce experimenty s použitím zvierat, základné parametre účinkov *in vivo* sú známe a umožnia zredukovať počet zvierat.

Zjemenie:

Myši budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prístupom potravy a pitnej vody. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. Väčšina pozorovaní bude prebiehať bez toho, aby zvierat opustilo prostredie svojej klietky

Spätne posúdenie projektu:

Vzhľadom k tomu že postupy boli klasifikované ako kruté, projekt podlieha spätnému posúdeniu. Toto bude možné vykonať po jeho ukončení v priebehu roka 2017.

Príloha č. 1 4160/13-221

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

Názov projektu: „Zinok vo výžive hospodárskych zvierat a bezpečnosť konzumentov“

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: (APVV-0667-12)

Kľúčové slová v projekte: zinok, biovyužitelnosť, depozícia v potravinách živočíšneho pôvodu, expozícia konzumentov

Účel projektu:

Popísaný postup bude vykonaný na účely základného výskumu. Preto by jeho kľúčovým prínosom malo byť získanie lepších a detailnejších znalostí o metabolizme a depozícii zinku v potravinách živočíšneho pôvodu (mäso a produkty), pochádzajúceho predovšetkým z jeho organických zdrojov používaných ako aditíva vo výžive zvierat.

Ciele projektu:

Ciele predkladaného projektu sú zamerané na sledovanie metabolického osudu zinku z jeho rôznych zdrojov, ktoré sa v súčasnosti používajú ako krmné aditíva vo výžive zvierat. Určité riziko predstavuje zavádzanie nových organických alebo chelátových foriem zinku do výživy zvierat, ktoré môžu modifikovať jeho depozíciu v potravinách a produktoch živočíšneho pôvodu. Informácie o metabolickom osude nových chelátových zdrojov Zn ako aj o depozícii Zn v tkanivách a produktoch od zvierat prijímajúcich krmivo suplementované jeho anorganickými a organickými formami sú kontroverzné a málo hodnoverné. Zameriame sa na sledovanie dopadu aplikácie rôznych zdrojov zinku do diét na jeho absorpciu, retenciu, exkréčne cesty a depozíciu tohto esenciálneho prvku do tkanív hydiny a prežúvavcov. Jedným z hlavných cieľov predkladaného projektu je tiež stanoviť optimálny obsah zinku v krmivách súčasných moderných plemien hospodárskych zvierat tak, aby nebolo ohrozené ich zdravie ani úžitkovosť, čo by malo za následok podstatné zníženie kontaminácie životného prostredia zinkom zo živočíšnej výroby.

Prínos z vykonaného projektu:

Výskum aplikácií rôznych zdrojov Zn do výživy zvierat by mohlo priniesť nové základné informácie o využitelnosti a depozícii Zn, hlavne z chelátov, v tkanivách a produktoch zvierat určených na konzum. Na základe výsledkov získaných z našich experimentov posúdime potenciálne riziko pre konzumentov prijímajúcich zinok z potravín a produktov živočíšneho pôvodu podľa oficiálnych údajov EÚ o príjme potravy ľuďmi (EFSA Comprehensive European Food Consumption Database). Získané nové poznatky o biovyužitelnosti Zn by mohli prispieť, na vedeckom základe, k redukcii všeobecne rozšíreného používania Zn v diétach, čo by však nemalo obmedziť zdravie a úžitkovosť zvierat.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Použitie nosníc, brojlerových kurčiat a oviec v pripravovanom pokuse je opodstatnené, keďže jedným z hlavných cieľov je sledovanie depozície zinku v požívateľných tkanivách a produktoch živočíšneho pôvodu (mäso, vajcia). Pokusné zvieratá budú pochádzať zo schválených chovných zariadení.

V pokusoch plánujeme použiť nasledovné druhy zvierat:

Kurčatá nosivého typu/Nosnice: Lohmann Brown resp. Isa Brown - predbežný počet spolu: 440 jedincov.

Kurčatá výkrmové/Ross 308 - predbežný počet spolu: 440 jedincov.

Ovce/Zošľachtená Valaška – predbežný počet spolu: 48 jedincov

Pri zohľadnení všetkých potrieb vedeckého výskumu i predpisov stanovených v nariadení vlády 377/2012 Z.z. maximálny počet počet použitých zvierat za celé obdobie trvania projektu (01.10.2013-30.09.2017) nepresiahne hore uvedený počet zvierat daného druhu, keďže takéto množstvo je postačujúce na zabezpečenie zmysluplného vyhodnotenia získaných výsledkov.

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

Nepriaznivý vplyv na použité zvieratá nepredpokladáme. Pokusy sú zostavené tak, aby sa minimalizovala bolesť alebo stres a aby bol zabezpečený a dodržiavaný welfare. Kurčatá budú chované v kotercoch s podstielkou z drevených hoblín, ktorá sa im denne vymieňa. Chov nosníc bude v moderných, obohatených klietkach, ktoré vyhovujú požiadavkám predpisov EÚ proti týraniu zvierat. Pre každú nosnicu bude zabezpečený podlahový priestor najmenej 900 cm² a klietka bude primerane vybavená podľa počtu zvierat. Klietky budú obohatené primerane na vekovú kategóriu zvierat. Bude sa dbať na predpísané zootechnické podmienky ich chovu (teplota, vlhkosť, plocha/vták a pod). Voda a krmivo budú k dispozícii *ad libitum* a zootechnické podmienky chovu (teplota a vlhkosť vzduchu) budú dodržiavané podľa technologického postupu pre chov daného plemena zvierat. Ovce budú ustajnené individuálne v kotercoch (výška 120 cm, podlahová plocha 2,06 m²) s vyhovujúcimi rozmermi a priestorovými podmienkami, pri dodržiavaní príslušných zootechnickým podmienok a budú krmené 2 x denne pri voľnom prístupe k vode počas celého pokusu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Všetky postupy vykonávané v rámci pokusov (príjem diét suplementovaných zinkom z jeho rôznych zdrojov) spadajú podľa prílohy 4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z. do kategórie krutosti postupov „slabé“, čo znamená, že zvieratá v ich dôsledku nebudú pociťovať žiadnu alebo iba krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach. 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. Navrhnuté spôsoby usmrcovania zvierat (dekapitácia a usmrtenie nadmernou dávkou anestetika) sú v súlade s § 5 a prílohou č. 2 NV 377/2012 Z.z.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Na tento typ pokusu je potrebné použiť zviera – hydinu, prežúvavca (ovcu). Tento typ experimentu nie je možné vykonať v podmienkach *in vitro*. Na dosiahnutie cieľa pokusu neexistuje alternatívna metóda bez použitia zvierat. Keďže cieľom experimentu je sledovať metabolizmus zinku, jeho absorpciu, retenciu, exkrečné cesty a depozíciu do telových tkanív hydiny a prežúvavcov je nevyhnutné podávať zvieratám rôzne zdroje/dávky zinku do diét. Cieľom projektu je aj vyhodnotiť bezpečnosť konzumentov, ktorá bude hodnotená podľa najnovšej databázy príjmu potravy ľudskou populáciou EÚ podľa Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín (EFSA, 2011). Na dosiahnutie cieľa pokusu neexistuje alternatívna metóda bez použitia odberu materiálu zo živých zvierat.

2. Redukcia počtu zvierat:

Uvádzané počty zvierat sú minimálne množstvá potrebné pre preukazné zhodnotenie sledovania stanovených parametrov. V experimentoch na kurčatách sú nami zvolené počty nevyhnutné z dôvodu vytvorenia viacerých replikátov s určitým počtom zvierat, keďže len z takto organizovaného experimentu je možné získať dostatočné množstvo interpretovateľných

a štatisticky preukazných vedeckých výsledkov. Uvedené počty boli nami zvolené preto, aby bolo možné jednotlivé experimenty správne štatisticky vyhodnotiť.

3. Zjemnenie:

V priebehu pokusu nebudú vykonávané bolestivé zákroky na zvieratách a bude s nimi šetrne zaobchádzané. Počas experimentov bude ujma spôsobená zvieratám z hľadiska utrpenia, bolesti a strachu minimálna a odôvodnená vzhľadom k očakávaným výsledkom i s ohľadom na etické aspekty. Experiment je nastavený tak, aby bol minimalizovaný stres použitých pokusných zvierat a aby bola zabezpečená primeraná starostlivosť. Všetci pracovníci, ktorí prichádzajú do styku so zvieratami sú príslušne poučení. Odber vzoriek budú uskutočňovať veterinárni lekári. Osoby zodpovedné za starostlivosť o zvieratá sa riadia pokynmi popísanými v Prevádzkovom poriadku schváleného pokusného zariadenia a sú pravidelne školené. Neustále budeme dbať na humánny prístup k zvieratám. Pokusné zvieratá budú chované v takých podmienkach, ktoré u nich nebudú vyvolávať žiaden stres – zohľadní sa veľkosť kletky/koterca podľa veku zvierat, počet zvierat, svetelný a kŕmny režim a pod. Vo všeobecnosti, uvedené experimentálne postupy nespôsobia neprimeraný diskomfort pokusných zvierat, v podstate sa jedná o štandardné typy pokusov (bežne používané na špičkových vedeckých pracoviskách) v súlade s etickými požiadavkami. V dôsledku podávania zinku ako kŕmneho aditíva nehrozí zvieratám žiadne predávkovanie a intoxikácia.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Keďže 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.

Príloha č.2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 4234/13-221

Štúdium stabilizačného účinku dvoch prípravkov SUL109 a SUL136 na králičie trombocyty z hľadiska možnosti ovplyvnenia doby krvácavosti u králikov s experimentálne navodenou trombocytopeniou.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): trombocytopenia, králiky, SUL109, SUL136

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:

Testovanie schopností ľudských trombocytov ošetrovaných prípravkami SUL109 a SUL136, uskladnenými po dobu 3 dní pri teplote 20°C, 15 dní pri teplote 4°C a ovplyvniť dobu krvácania na králikoch.

Prínos z vykonaného projektu:

- Po overení pozitívneho vplyvu prípravkov SUL109 a SUL136 na dobu krvácania u králikov je predpoklad adaptácie tohto postupu na klinické použitie vo veterinárnej, ako aj humánnej medicíne.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V postupe budú použité dospelé novozélandské králiky biele. Bude použitých (max. 40ks zvierat).

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

Vyvolaná trombocytopenia spôsobí u zvierat prejavy kožno-slizničného typu krvácania, ktorý sa prejavuje ako petéchie, ekchymózy, hemotómy, ľahká tvorba hematómov (modriny), krvácanie z nozdier (epistaxus), neúmerné krvácanie pri bežných poraneniach, krvácanie do tráviaceho (krv v truse) a močového traktu (krv v moči).

Predpokladaná úroveň krutosti:

Na základe posudzovaných faktorov navrhujeme klasifikáciu krutosti postupu označiť ako „stredne/kruté bez možnosti zotavenia“.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Postup nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov.

Testovanie protektívneho účinku SUL109 a SUL136 zložiek na ľudské trombocyty je unikátnym pokusom, ktorý doposiaľ nebol nikde vykonaný, keďže sa jedná o novoobjavené zložky, ktorých účinkov nebol doposiaľ publikovaný.

2. Redukcia počtu zvierat:

V pokuse budú zostavené a testované 2x 20ks zvierat, negatívna kontrola (4ks), pozitívna kontrola (7ks) a pokusná skupina (9ks), čo je minimálny počet zvierat pre štatistické vyhodnotenie a následné možné opublikovanie detegovaných zmien.

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

4245/13-221

Podrobný účel postupu:

Netechnické zhrnutie

Počas každého časťového pokusu sa na myšiach vykoná subkutánna, intramuskulárna alebo intravenózna injekcia nádorových buniek v 200 µl fyziologického roztoku. Rast nádorov sa bude povrchovo merať posuvným meradlom a zaznamenávať každý druhý deň po celú dobu jednotlivých časťových experimentov. Myši taktiež podstúpia intravenóznou aplikáciu terapeutických a kontrolných látok. Protilátky a inhibitory budú aplikované každý druhý deň bez anestézie. Nanopartikelie obsahujúce liečivo sa budú aplikovať jedenkrát týždenne intraperitoneálne. Úkony nevyžadujú znecitlivenie (anestézia predstavuje väčšiu záťaž organizmu zvieratá, než samotná injekcia). Vpich bude trvať asi 10 s.

Účinné látky - Tiletamine 25mg/ml, Zolazepam 25 mg/ml, intraperitoneálne v dávke 10 µl/10g telesnej hmotnosti zvieratá. Zvieratá budú uvedené do celkovej anestézy v trvaní 30 min za účelom dokumentovania rastu nádorov na zobrazovacom zariadení KODAK InVivo Imaging system FX raz do týždňa. Na konci časťového pokusu budú zvieratá uvedené do celkovej anestézy kvôli usmrteniu.

Keď nádory dosiahnu objem cca 1 cm³, pokus sa ukončí usmrtením zvieratá, nádory, prípadne niektoré orgány alebo krv sa odoberú a použijú na histopatologickú a molekulárnu analýzu. Rozhodnutie o usmrtení je nevyhnutné pre získanie nádorového tkaniva a iných orgánov. V tomto prípade nie je možné zachovať život zvieratá. Myši sa usmrtnia krčnou dislokáciou pri celkovej anestézii. Pred jej vykonaním budú myši testované na reflexy dotykcom oka, a iba ak sa nepreukáže žiadny reflex, vykoná sa cervikálna dislokácia.

Zvieratá budú po dobu 7 dní umiestnené v karanténnej miestnosti. Potom budú prenesené do miestnosti, kde bude prebiehať pokus. Tam zostanú po celú dobu pokusu, až do jeho ukončenia. Zvieratá budú umiestnené v plastových celo-priesvitných klietkach, ktoré budú umiestnené v stojane pre laboratorne zvieratá so vzduchotechnikou Reck (Trigon). Rozmery klietky sú dostatočné pre skupinu 6 dospelých myši. Kombinácia klietok umiestnených v stojane Reck zabezpečuje dostatočnú izoláciu každej skupiny od vonkajšieho prostredia s prísunom vzduchu filtrovaného cez Hepa filter a tým zbaveného akýchkoľvek patogénov z ovzdušia, zároveň s konštantnou teplotou a vlhkosťou prívádzaného vzduchu.

V každej klietke bude podstielka pozostávajúca z vyčistených sterilných drevených pilín. Každá skupina myši bude mať k dispozícii dostatočný prísun pitnej vody a granulovanej potraviny. Všetkým zvieratám sa zabezpečí postačujúci priestor a rozmanité prostredie, aby sa mohli prirodzene správať a aby sme zamedzili prejavom stresového správania. Priestor klietok zariadenie prvkami na fyzické cvičenie, hľadanie potraviny, manipulatívne a kognitívne činnosti. Ďalej prostredie obohatíme o vhodné papierové valce, ktoré budú slúžiť ako úkryt a drevenými paličkami na žuvanie a obhrýzanie, nŕkani a škatulkami. Každodenná starostlivosť bude zabezpečená vyskoleným personálom pokusného zariadenia. Denne sa bude vykonávať kontrola zdravotného stavu zvierat.

Myši v jednotlivých skupinách sa budú označovať tetovaním v lokálnej anestéze. Použijeme systém bodiek vytvorených pomocou injekčnej ihly a tetovacej farby určenej pre zvieratá.

Počas pokusu sa použije 1000 myši CD1 a NOD.SCID (SHN). Zvieratá budú pochádzať zo schváleného chovu ANLAB s.r.o; Videnská 1083; 142 20 Praha, Česká republika; IČ: 45796301, ktorý má aj schválenie pre dopravu zvierat nad 65 km.

Začiatok pokusu by sa mal konať dňa 01. 11. 2013 a trvať by mal do 31.10.2017.

Na základe toho, že časť postupov je klasifikovaná ako krmná (viď bod. 8, Príloha 3), bude potrebné spĺňať posúdenie pokusu, najmä vzhľadom k metastatickým modelom.

PRÍLOHA 2

Netechnické zhrnutie projektu 4261/13-221

Názov projektu: Signálne dráhy NO a H₂S a ich interakcia v regulácii cievneho tonusu počas skorej fázy vývoja experimentálnej hypertenzie.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová: oxid dusnatý, sírovodík, NO-syntáza, vazoaktivita, kardiovaskulárny systém

Účel projektu: Základný výskum s cieľom zabránenia, prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov zvierat alebo ich účinkov na zvieratá, stanovovania, odhaľovania, usmerňovania alebo úpravy posúdenia, zistenia, regulácie alebo zmeny fyziologického stavu alebo fyziologických procesov zvierat.

Hlavné priority predloženého projektu budú hľadanie a potvrdenie originálnych signálnych dráh, ktoré sa zapájajú do regulácie kardiovaskulárneho systému. Výskum bude zameraný na podiel dvoch plyných transmiterov, NO a H₂S, ich interakciu, v regulácii cievneho tonusu a vazoaktivity. Projekt nadväzuje na výsledky predchádzajúceho projektu, kde bola sledovaná predovšetkým NO signalizácia— nešpecifická i špecifická (neuronálna izoforma NO-syntázy). V tomto projekte sa výskum rozšíri o sledovanie zapojenia ďalšej významnej signálnej molekuly - H₂S. Bližšie sa zameriame na vzájomné prepojenie účinkov NO produkovaného neuronálnou izoformou enzýmu, H₂S a renín-angiotenzínovým systémom (RAS), ktoré sa vzájomne pretínajú v obličke. Sledovania budú vykonané ako na úrovni celého kardiovaskulárneho systému (in vivo), tak na úrovni izolovaného hladkého svalu rôznych ciev u potkanov (in vitro). Informácie o úlohe týchto signálnych dráh a ich prepojenia sú ako u mladých normotenzných jedincov tak aj u prehypertenzných jedincov s rozvíjajúcou sa experimentálnou hypertenziou neúplné alebo úplne chýbajú.

Jednotlivé kroky pre dosiahnutie cieľov:

- a) Charakterizovať a porovnať vazoaktívne odpovede (zapojenie endotelovej a neurogénnej regulácie cievneho tonusu) u mladých normotenzných potkanov a potkanov s rozvíjajúcou sa experimentálnou hypertenziou (NO-deficitná hypertenzia, esenciálna hypertenzia)
- b) Charakterizovať podiel H₂S signalizácie, najmä jej interakciu s NO-signalizáciou, u mladých normotenzných potkanov a u potkanov s rozvíjajúcou sa experimentálnou hypertenziou (NO-deficitná hypertenzia, esenciálna hypertenzia)
- c) Charakterizovať model dlhodobej inhibície neuronálnej izoformy NOS u mladých normotenzných a spontánne hypertenzných potkanov - potvrdiť resp. vyvrátiť špecifickosť tejto signálnej dráhy, zistiť význam interakcie tejto signálnej dráhy s RAS a H₂S signalizáciou
- d) Vzhľadom na medzidruhové rozdielnosti, získané poznatky na experimentálnych zvieratách korelovať s odpoveďami cievneho systému u normotenzných ľudí a u pacientov s esenciálnou hypertenziou. e) projektu

Prínos projektu

U dospelých normotenzných potkanov už bola dokázaná úloha NO pochádzajúceho z endotelovej izoformy NOS ako aj špecifickosť a originalnosť funkcie signálnej dráhy NO uvoľňovaného z neuronálnej izoformy enzýmu. Podobne sa u dospelých normotenzných potkanov potvrdila existencia špecifickej NO-H₂S interakcie v podobe zatiaľ však bližšie nešpecifikovanej nitrózo-sulfidovej signalizácie. Informácie o pôsobení týchto signálnych dráh

u mladých jedincov, v čase, keď sa patologické procesy ešte len spúšťajú a sú vo svojej iniciálnej fáze chýbajú. Cestou objasňovania účinku NO a H₂S môžeme pomôcť predchádzať rozvoju patologických zmien spojených s rozvojom hypertenzie a tým znížiť ekonomickú záťaž spoločnosti spojenú so zvýšenou morbiditou a mortalitou obyvateľov. Taktiež simultánne sledovanie a porovnanie základných signálnych dráh na rovnakých tkanivách zvieracieho modelu (normotenzný, hypertenzný potkan) a ľudského modelu (normotenzný, hypertenzný človek) predstavuje aktuálny a primeraný spôsob ako prepojiť poznatky základného výskumu s klinickou praxou.

V jednotlivých krokoch očakávame nové informácie:

- a) ktoré prispievajú k objasneniu rozporuplnosti údajov týkajúcich sa vazoaktívnych (najmä úloha NO) vlastností cievneho stromu u dospelých spontánne hypertenzných potkanov a doplnia chýbajúce informácie v tomto ohľade u mladých normotenzných i prehypertenzných jedincov,
- b) týkajúce sa úlohy a bližšej charakterizácie nitrózo-sulfidovej signalizácie u mladých normotenzných jedincov a jedincov s experimentálnou hypertenziou rôznej etiológie,
- c) ktoré potvrdia resp. vyvrátia originalnosť signálnej dráhy NO produkovaného neuronálnou izoformou NOS a jej vzťah k H₂S a RAS u mladých normotenzných jedincov a u jedincov s rozvíjajúcou sa spontánnou hypertenziou,
- d) porovnávajúce základné vazoaktívne vlastnosti artérií ľudskej a potkanej obličky, ako i zapojenie a prepojenie nitrózovej a sulfidovej signalizácie na tejto úrovni.

Počet a druh zvierat

- Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*) kmeň
- Wistar potkany 64 ks
 - Spontánne hypertenzné potkany 64 ks

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

V experimente sa použijú postupy, ktoré sa celé vykonávajú v celkovej anestézii, po ktorej zviera nenadobudne vedomie. V týchto postupoch je takto zabezpečené, aby zvieratá nepociťovali bolesť. Súčasťou štúdie je týždenné meranie tlaku krvi neinvazívnou metódou, čo môže byť spojené s krátkodobým strachom, ktorý sa časom znižuje.

Predpokladaná úroveň krutosti

Bez možnosti zotavenia, slabá

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obnovenia a zjemnenia

1. Nahradenie zvierat: Cieľom plánovaného pokusu je odhaliť účasť resp. podiel špecifického regulačného mechanizmu v etiopatogenéze hypertenzie. Pre sledovanie funkcie kardiovaskulárneho systému s hlavným zreteľom na reguláciu krvného tlaku a rozvoj hypertenzie je najvhodnejší model laboratórneho potkana. Spontánne hypertenzný potkan predstavuje model, ktorý sa svojimi vlastnosťami najviac približuje ľudskej esenciálnej hypertenzii a je vhodným modelom pre jej fyziologické, histopatologické a biochemické štúdie. Zatiaľ neexistuje alternatívna metóda, ktorá by nahradila laboratórneho potkana. Dokumentuje to príloha Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód.

2. Redukcia počtu zvierat: V plánovanom experimente je zabezpečený čo najnižší počet experimentálnych zvierat, tak aby bol experiment štatisticky vyhodnotiteľný a závery všeobecne prijateľné. Zabezpečí sa, aby nedochádzalo k duplicite kontrolných skupín. Zvieratám použitým na in vitro experiment sa odoberie maximálne množstvo vzoriek na

sledovanie fyziologických, biochemických prípadne histochemických parametrov. Jednotlivé skupiny bude tvoriť najnižší možný počet jedincov.

3. Zjemnenie: Pre dosiahnutie vedeckých cieľov projektu je najvhodnejší laboratórny potkan, ktorý predstavuje druh, ktorému navrhnuté postupy spôsobia minimálne utrpenie a strach. U skupiny zvierat, kde sa uskutoční meranie tlaku krvi invazívnym spôsobom bude intraperitoneálne aplikovaná anestéza. Počas experimentu bude podľa potreby v príslušných časových intervaloch aplikovaná intraperitoneálne dávka anestetika. Na konci experimentu budú zvieratá usmrtené aplikáciou letálnej dávky anestetika. U skupiny zvierat, kde budú sledované fyziologické parametre na izolovaných cievach potkana a súčasne budú odobraté potrebné orgány pre stanovovanie biochemických parametrov, budú zvieratá humanne utratené. Najskôr sa vystavia pôsobeniu oxidu uhličitého v uzavretej nádobe až do straty vedomia. V hlbokom bezvedomí budú následne dekapitované, nechajú sa vykrvácať a po otvorení hrudnej a brušnej dutiny budú odobraté príslušné cievy a orgány.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu 4341/13-221

Názov projektu:

Testovanie biologickej aktivity a štrukturálnej integrity imunogénu v biologickom testovacom systéme

Podrobný účel postupu:

Alzheimerova choroba, rovnako ako veľa ďalších neurodegeneračných ochorení, sa spája s akumuláciou abnormálnej formy proteínov v centrálnej nervovej sústave, ktorá spôsobuje degeneráciu a následnú dysfunkciu neurónov. Podľa súčasných štatistík trpí Alzheimerovou chorobou 24 miliónov ľudí a každý rok sa toto číslo zväčší o 4,5 milióna nových prípadov. Podľa predpokladov počet pacientov do roku 2040 stúpne celosvetovo v priemere o 200 percent. Súčasné liečebné postupy spočívajú najmä v symptomatickej a podpornej terapii avšak terapia kauzálna zatiaľ neexistuje.

Predložený projekt má za úlohu testovať biologickú aktivitu a štrukturálnu integritu imunogénu v biologickom testovacom systéme. Schopnosť produkovať imunitnú odpoveď je považovaná za jednu z najdôležitejších vlastností potrebných pre stanovenie stability imunogénu. Táto forma testovania je požadovaná regulačnými orgánmi EU (napr. EMEA). Pri prezentácii projektu bol kladený dôraz na význam študovanej problematiky a dôležitosť použitia animálneho modelu (myš) pre získanie biologických vzoriek. Boli preštudované možné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili nahradiť zvieratá za bunkové systémy. Komplexnosť sledovaných molekulárnych procesov si však vyžaduje použitie cicavčí model. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Projekt prebehne v niekoľkých čiastkových experimentoch:

- 4 experimenty s 1 skupinou myší po 7 ks v skupine. Celkom $4 \times 7 = 28$ myší.
- 4 experimenty s 2 skupinami myší po 6 ks v skupine. Celkom $4 \times 12 = 48$ myší.
- 1 experiment s 3 skupinami myší po 6 ks v skupine. Celkom $1 \times 18 = 18$ myší.

Celkom bude použitých 94 myší C57 (samice) vo veku približne 6 týždňov.

Po vstupnej karanténe a veterinárnom vyšetrení budú zvieratá priradené do príslušného experimentu.

- V deň 1, 8 a 15 sa každej myške v experimente aplikuje testovaný imunogén subkutánnou injekciou v dávke 300 μ l pro toto.
- V deň 22 sa zvieratám odoberie krv z retroorbitálneho plexu v objeme asi 100-150 μ l. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieratá neprekračuje stanovené normy.
- Myšky potom ostanú v experimente bez ďalšej terapie a krv sa podobným spôsobom odoberie ešte na konci mesiacov 3, 6, 9 a 12.
- Následne budú zvieratá z experimentu vyradené a humánne usmrtené v súlade so zákonom: anestézia a dislokácia krčných stavcov.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Testovanie schopnosti imunogénu navodiť imunitnú odpoveď je považované za štandardnú metódu testovania jeho biologickej aktivity. Vzhľadom na skutočnosť, že v súčasnosti nie je dovolené tieto metódy skúmať na ľudských pacientoch, a na fakt, že daný experiment sa v súčasnosti nedá vykonať v podmienkach in vitro, je použitie animálnych modelov nevyhnutné.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia (3x v intervaloch 7 dní)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 1 minútu.
Odber krvi (retroorbitálny plexus)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Sklenená kapilára sa jemne zasunie pod očnú guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť stredná. Trvanie 1 minútu.
Usmrtenie v anestéze dislokáciou krčných stavcov	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Intraperitoneálne sa podá anestetikum v dávke 100μl. Cervikálna dislokácia sa vykoná v anestézii. Bolesť žiadna. Trvanie 30 sekúnd

Začiatok pokusu je plánovaný na 20.12.2013 a bude sa realizovať počas nasledujúcich dvoch rokov, do 31.12.2015.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu 4344/13-221

Názov projektu: Rozdielna úloha a vzájomná kooperácia plyných transmitterov oxidu dusnatého a sírovodíka v regulácii kardiovaskulárneho systému.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2012/51-SAV-1

Kľúčové slová: oxid dusnatý, neuronálna NO-syntáza, sírovodík, kardiovaskulárny systém

Účel projektu: Základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom projektu je sledovanie účinku oxidu dusnatého (NO) produkovaného konštitutívnymi izoformami NO-syntázy (NOS) a sírovodíka (H₂S) zároveň ich spoločnej interakcie z morfológického a funkčného účinku na kardiovaskulárny systém (KVS). Hľadanie nových originálnych signálnych dráh zapojených do regulácie KVS za normotenzných a hypertenzných podmienok vedie k objasňovaniu príčin vzniku hypertenzie a s ňou spojených zmien cievného riečiska. Pre dosiahnutie tohto cieľa budú podávané inhibitory systémov zapojených do regulácie KVS v chronických a akútnych experimentoch so zameraním na odhalenie účinkov NO a H₂S samotných a tiež ich vzájomného pôsobenia.

- Zisťovanie rozdielneho pôsobenia NO uvoľňovaného pomocou neuronálnej (nNOS) a endotelovej (eNOS) NOS na funkciu a štruktúru KVS za normálneho a zvýšeného tlaku krvi.
- Hľadanie súvislostí medzi signálnymi dráhami nNOS a renín-angiotenzínovým systémom (RAS) a sympatikovým nervovým systémom (SNS), ktoré výrazne ovplyvňujú zmeny KVS počas hypertenzie.
- Sledovanie účinku exogénnych látok schopných uvoľňovať H₂S a zároveň odhalenie špecifickej interakcie nNOS/NO s H₂S a ich zásah do regulácie KVS.

Na originalitu vytýčených cieľov poukazuje snaha hľadania nových signálnych dráh pôsobenia nNOS/NO a RAS v obličke, spojenia nitrózovej (NO) a sulfidovej signalizácie (H₂S) prejavujúcich sa na tenzii a trofike KVS.

Prínosu projektu

Problematicku, ktorú sme si zvolili za hlavný cieľ: hľadanie nových a originálnych dráh nitrózovej (nNOS) a sulfidovej (H₂S) signalizácie so zameraním na špecifickú interakciu NO a H₂S, prípadne vytvorenie nového doposiaľ neznámeho komplexu týchto látok, je doteraz neodhalená a preto vysoko aktuálna. Tak, ako sa po zistení relaxačných účinkov NO začalo obdobie intenzívneho sledovania jeho účinkov, tak dnes stojíme pred výzvou riešenia problematiky novej terapeuticko-cesty pri liečení kardiovaskulárnych ochorení pomocou použitia "H₂S donorov".

Do regulácie tlaku krvi, vazoaktivity a štruktúrneho remodelingu sú zahrnuté viaceré mechanizmy, ktorých vzájomná interakcia je zodpovedná za výsledný stav KVS. Našou snahou je preukázať existenciu špecifickej interakcie nNOS, RAS a SNS, ktorá môže byť príčinou odlišnej odpovede KVS oproti deficitu NO vyvolaného inhibíciou eNOS u normotenzných aj spontánne hypertenzných potkanov. RAS sa pravdepodobne podieľa na regulácii nNOS. Viaceré štúdie ukázali vysokú koncentráciu exprese nNOS v obličkách, predovšetkým v bunkách macula denza (19,20,21). Tu produkovaný NO sa podieľa na modulácii aktivity SNS, regulácii renálnej a glomerulárnej hemodynamiky (22), natriurézy a diurézy (23) a tiež ako pozitívny regulátor sekrécie renínu a regulátor RAS (24). V protiklade k NO je angiotenzín II jeden z najsilnejších induktorov cievnej proliferácie a hypertrofie. Preto nami pozorovaná hypotrofia srdca a cievnej steny po chronickej inhibícii nNOS môže byť spôsobená znížením tvorby angiotenzínu II. Navyše renálna sympatiková aktivita závisí od negatívnej spätnej väzby medzi angiotenzínom II a NO (25), kedy zvýšený angiotenzín II vyvoláva sympatiko-excitačný účinok.

Ďalšie smerovanie našich experimentov sa zameriava na odhalenie interakcie medzi NO a H₂S, ktorá v KVS existuje. Táto interakcia existuje pravdepodobne na úrovni H₂S a nNOS/NO. Významnú úlohu pri sledovaní danej interakcii zohráva aj odhalovanie pôsobenia samotného H₂S rôznych, rýchlo a pomaly účinkujúcich H₂S donorov. Účinok H₂S na KVS a cievnu reaktivitu vykazuje značnú heterogenitu. Viaceré práce ukazujú, koncentračne závislé odpovede cievnej reaktivity a tlaku krvi, čo naznačuje spustenie príslušnej signálnej dráhy (14,26). Práve hľadanie látok, ktoré by mohli účinne zasahovať do nNOS/NO signálnej dráhy je kľúčové pre nájdenie nového terapeutického prostriedku.

Pochopenia a preventívne vstupovanie do jadra procesov vedúcich k vývinu hypertenzie by mohli prerušiť vznik patologických procesov v KVS. Hlavným prínosom je snaha objasniť aspoň niektoré účinky NO a H₂S, tým pomôcť predchádzať rozvoju kardiovaskulárnych chorôb a tak prispieť aj k odľahčeniu ekonomickej záťaže spoločnosti, ktorá je nesporne spojená so zvýšenou morbiditou a mortalitou obyvateľov.

19. Mundel, P. a spol.: *Kidney Int.*, 42, 1017-1019, 1992
20. Tojo, A. a spol.: *Kidney Int.*, 58, 2075-2083, 2000
21. Mount, PF. a spol.: *Nephron Physiol.*, 102(2), 36-50, 2006
22. Majid DSA, a spol.: *Am J Physiol Renal Physiol.* 262: F718-F722, 1993
23. Lahera V. a spol.: *Am J Physiol.*, 261: F1033-F1037, 1991
24. Kihara M, a spol.: *Kidney Int.*, 53: 1585-1593, 1998
25. Liu JL a spol.: *J Hypertens*, 16, 1165-1173, 1998
26. Ali M.Y. a spol.: *Br. J. Pharmacol.* 149: 625-634, 2006

Počet a druh zvierat

- Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*) kmeň - Wistar potkany 60 ks
- Spontánne hypertenzné potkany 60 ks

Predpokladaná úroveň krutosti

slabá krutosť

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Účelom pokusu je odhaľovanie mechanizmov podieľajúcich sa na vzniku funkčných a štrukturálnych zmien srdca, cievneho systému a obličiek. Sledovanie pôsobenia NO (syntetizovaného cez nNOS) a H₂S a ich vzájomnej interakcie za normálnych podmienok a patologických zmien KVS vedúcich k vzniku chronickej hypertenzie.

Účinok blokády odlišných izoform konštitutívnych NOS (eNOS a nNOS) na tlak krvi, štruktúru srdca, obličiek a cievnej steny budeme sledovať u rôzne starých normotenzných a spontánne hypertenzných potkanov. Následne budeme zisťovať, ako sa H₂S donory samotné a v prítomnosti NO-donorov zapájajú do regulačnej dráhy NO. Pre sledovanie vzájomných interakcií inhibície nNOS s ďalšími regulačnými systémami budú aplikované v chronických a akútnych experimentoch rôzne vazoaktívne látky (antioxidanty, mimetiká a blokátory sympatikového nervového systému, renín-angiotenzínového systému, H₂S donory a inhibitory CBS, CSE, 3MST).

Zatiaľ neexistuje alternatívna metóda, ktorá by nahradila laboratórneho potkana. Dokumentuje to príloha Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód. Pre sledovanie nami vytýčených cieľov je teda najvhodnejší model laboratórny potkan. V projekte sme zvolili normotenzné Wistar potkany a Spontánne hypertenzné potkany. Podľa mnohých štúdií predstavujú najvhodnejšie modely na sledovanie rozvíjajúcich sa a vyvinutých zmien počas hypertenzie.

2. Redukcia počtu zvierat:

V plánovanom experimente je zabezpečený čo najnižší počet experimentálnych zvierat, tak aby bol experiment štatisticky vyhodnotiteľný a závery všeobecne prijateľné. Pokiaľ je to možné spájame vyhodnotenie parametrov so spolupracujúcimi laboratóriami, aby sme dosiahli čo najväčší počet výsledkov pre štatistickú analýzu pri čo najmenšom počte experimentálnych zvierat.

Po humánnom usmrtení zvierat sa odoberie maximálne množstvo vzoriek na sledovanie fyziologických a morfológických parametrov. Je zabezpečená spolupráca medzi laboratóriami (ako v rámci ÚNPF SAV tak aj s ostatnými ústavmi), aby sa v rámci experimentov jednotlivých laboratórií dalo použiť čo najväčšie množstvo spoločných experimentálnych zvierat.

3. Zjemnenie:

V experimente nebudú použité žiadne bolestivé invazívne metódy pokiaľ zviera nebude humánne usmrtené. U skupiny zvierat, kde budú odobraté potrebné orgány pre stanovovanie fyziologických a morfológických parametrov, budú zvieratá humánne utratené. Najskôr sa vystavia pôsobeniu oxidu uhličitého v uzavretej nádobe až do straty vedomia. V hlbokom bezvedomí budú následne dekapitované, odkrvené a po otvorení lebky, hrudnej a brušnej dutiny budú odobraté príslušné orgány. U zvierat potrebných na vyšetrenie integrovaných odpovedí KVS budú zvieratá uspané adekvátnou dávkou zmesi anestézy a po experimente usmrtené vysokou dávkou anestézy s následnou perfúziou KVS pre odobratie materiálu na morfológické vyšetrenia.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu 4367/13-221

Názov projektu:

Analýza účinkov novosyntetizovaných mednatých zlúčenín na oxidačné poškodenie beta buniek pankreasu

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Účel projektu: *základný výskum*

Cieľ projektu

Cieľom projektu je zistiť, či komplexy medi typu Schiffových báz sú schopné zmierňovať oxidačné poškodenie β -buniek pankreasu.

Prínos z vykonaného projektu

Predložený projekt sa zameriava na skríning nových komplexných štruktúr s predpokladom výberu najúčinnějších molekúl ako podklad pre ďalšie štúdium mechanizmov ich pôsobenia. V ďalšej fáze experimentov budú vybrané najúčinnšie látky hodnotené aj na ich priamy účinok po vyvolaní diabetu.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: myši, samce kmeň ICR, 70 ks

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

V experimente sa bude hodnotiť hladina glukózy zo vzorky krvi odberatej z laterálnej chvostovej žily (v. caudalis lateralis). Pri intravenóznom odbere krvi môžu zvieratá pociťovať minimálnu krátkodobú bolesť, ktorá nebude významne narušať ich pohodu a celkový stav. Po ukončení experimentu budú zvieratá humánne utratené (inhalácia oxidu uhlíkového) a tkanivo pankreasu dané na histologické spracovanie. Samotný experiment nebude prevádzaný v celkovej anestéze, pretože sa jedná o odber krvi, nie chirurgický zákrok.

Predpokladaná úroveň krutosti: slabé

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie

Predložený projekt vyžaduje použitie živých jedincov. Existujú síce možnosti stanovenia antioxičného pôsobenia látok formou ich schopnosti znižovať reaktívne formy kyslíka, ktoré sa participujú na rozvoji diabetu, resp. biochemické stanovenie prítomnosti antioxičných enzýmov superoxidodismutázy, glutatiónperoxidázy alebo stanovením biodegradačných produktov typu malondialdehydu. Aj pri týchto metódach je však potrebné experimentálne zviazať pre získanie krvi, resp. tkaniv pre histologické vyšetrenie. Pokusy na intaktných zvieratách sú však potrebné pre určenie účinku na jednotlivé orgánové systémy a je dôležité zistiť účinky pri modelových metabolických ochoreniach, medzi ktoré patrí aj diabetes mellitus.

2. Obmedzenie

V experimente bude použitý minimálny počet zvierat, ktoré sú potrebné pre adekvátnu štatistickú interpretáciu získaných výsledkov, t.j. 10 zvierat v skupine za predpokladu nízkej citlivosti v dôsledku biologickej variability zvierat a nutnosti niektorých vyradení zo súboru. Zvieratá budú rovnakého pohlavia, veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt. Zvieratá nebudú opakovane použité, budú humánne utratené.

3. Zľemenie

Výsledky jednotlivých častí experimentu budú priebežne vyhodnocované a v prípade zistenia nevhodných neočakávaných udalostí bude pokus ukončený a následne predložený nový projekt. Zvieratá budú v kontakte iba s odbornými ošetrovateľkami. Po skončení pokusu budú zvieratá humánne utratené inhaláciou oxidu uhlíkového.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

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

Názov projektu:

Molekulové modelovanie, syntéza a biologická aktivita substituovaných pyridoindolov v prevencii diabetických komplikácií

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

Podstatou projektu je štúdium možnosti farmakologického využitia inhibítorov aldózareduktázy na báze substituovaných 1-indolctových kyselín pri prevencii a liečbe diabetických komplikácií. Budú navrhnuté, syntetizované a testované nové zlúčeniny s očakávanou schopnosťou inhibovať enzým aldózareduktázu. Návrh nových štruktúr na báze substituovaných 1-indolctových kyselín, bude spočívať v počítačovej selekcii vhodných farmakofórových fragmentov potrebných pre interakciu s inhibičným väzobným miestom enzýmu. Očakávaným prínosom projektu bude vývoj vysoko účinných látok farmakologicky využiteľných v prevencii a liečbe chronických diabetických komplikácií a zápalu, s cieľom znížiť morbiditu a mortalitu diabetikov a zlepšiť kvalitu ich života.

V časti projektu *in vitro* sa použije celkom 324 zvierat (dospelých laboratórnych potkanov, samcov, kmeňa Wistar). Experimentálnym zvieratám pred usmrtením nebudú aplikované žiadne cudzorodé látky. Testované látky neprídu do kontaktu so živými zvieratami.

V časti projektu *in vivo* sa použije celkom 192 zvierat (dospelých laboratórnych potkanov, samcov, kmeňa Wistar). Experimentálny diabetes sa navodí navodí i.p. podaním troch dávok streptozotocínu [STZ, 30 mg/kg] v troch po sebe nasledujúcich dňoch. Tento spôsob je šetrnejší a menej bolestivý ako jednorazové i.v. podanie STZ v dávke 50 mg/kg, ktoré je navyše spojené s 25 %-nou mortalitou. Kontrolným a diabetickým zvieratám v liečených skupinách budú po dobu 5 dní (t.j. 6. až 10. deň od začiatku postupu) podávané každý deň testované zlúčeniny pracovníkom s dlhodobou praxou sondou do žalúdka. Prípadné nežiaduce účinky testovaných nových látok budú minimalizované dĺžkou postupu obmedzenou na dobu piatich dní.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

Rozhodujúca časť porojektu bude realizovaná v podmienkach *in vitro*, kedy nebudú experimentálnym zvieratám pred usmrtením aplikované žiadne cudzorodé látky. Testované látky neprídu do kontaktu so živými zvieratami. V postupoch *in vivo* sa bude testovať len obmedzený počet najúčinnnejších derivátov z postupov *in vitro*. Aby sa zmiernilo utrpenie zvierat, použije sa len krátkodobý postup *in vivo* v celkovej dĺžke 10 dní. Nutnosť realizácie postupov hodnotiacich účinkov novosyntetizovaných látok na celých zvieratách podporuje aj skutočnosť, že sa jedná o komparatívnu štúdiu biologickej aktivity viacerých zlúčenín. 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. Pre komplexnosť procesov absorpcie, distribúcie a metabolizácie liečiv v živých organizmoch nie je možné v projekte nahradiť navrhnutý animálny model alternatívnymi metódami.

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 postupu pre fyziologické, biochemické a morfológické analýzy a ich štatistické vyhodnotenie. Zvieratá budú rovnakého pohlavia, veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom.

Zásada zjemnenia (refinement)

Zvieratá budú po privezení z chovného zariadenia karantenizované: po dobu 7 dní budú umiestnené po dvoch v dostatočne veľkých vaniciach (minimum 25x50x14cm) za stanoveného svetelného, tepelného a krmného režimu. Budú v kontakte len so školenými pracovníkmi zverinca. Potkany v priebehu postupu prežívajú stres, ktorý budeme minimalizovať šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia klieťky predmetmi na hru a ohryzovanie. Pri injekčnej aplikácii STZ sa stres zmierni používaním tenkých jednorazových ihlíc a šetrným a ohľaduplným zaobchádzaním so zvieratami. Usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v hlbokéj celkovej anestéze.

Spätné posúdenie – nie

Netechnické zhrnutie projektov: Charakterizácia nového motívu v M1 proteíne chrípkového vírusu a využitie NS1 delečných mutantov v nádorovej terapii (APVV 0676-12) a Štúdium terapeutického potenciálu RNA interferencie a interferónov proti infekcii vírusom chrípky (VEGA 2/0005/12)

Vírusy chrípky typu A patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce patogény v ľudskej populácii. Vírusy chrípky spôsobujú infekcie respiračného traktu. Častá zmena antigénnej štruktúry (antigénny drift) a vznik nových rekombinantných kmeňov pomocou reasortmentu medzi dvomi cirkulujúcimi vírusmi (antigénny shift) znemožňujú prípravu univerzálnej vakcíny a vhodných antivírusových látok. Preto sa vyvíjajú nové stratégie, ktoré by špecificky interagovali s replikáciou vírusov chrípky. Nedávny objav interferujúcich RNA predstavil nový prístup v terapii proti vírusom a iným patogénom založenej na báze nukleových kyselín. NS delečné vírusy predstavujú model pre testovanie antivírusového účinku interferónov a zároveň predstavujú novú terapeutickú možnosť lyzovania tumorov.

Predložený projekt pokusu je súčasťou riešenia 2 domácich projektov (Charakterizácia nového motívu v M1 proteíne chrípkového vírusu a využitie NS1 delečných mutantov v nádorovej terapii APVV 0676-12 a Štúdium terapeutického potenciálu RNA interferencie a interferónov proti infekcii vírusom chrípky VEGA 2/0005/12) a je zameraný na:

1. Testovať na Balb/c myšiach terapeutický účinok siRNA namierených proti rôznym génom vírusu chrípky. si RNA sa budú podávať jednorázovo v rôznom čase po infekcii vírusom chrípky.
2. Testovať hladinu jednotlivých interferónov indukovaných vírusom chrípky a NS mutantami vírusu chrípky.
3. Otestovať terapeutické využitie IFNov, zvlášť IFNov-lambda proti chrípkovému ochoreniu, využitie a testovanie NS mutantov vírusu chrípky.
4. Testovať schopnosť rôznych delečných mutantov vírusu chrípky lyzovať tumory.
5. Červené krvinky získané z krvi morčat'a domáceho používať na stanovenie hemaglutinačného titra vírusu chrípky v alantoickej tekutine.

Výsledky experimentov prinesú nové poznatky v oblasti využitia siRNA a interferónov a môžu sa v budúcnosti na liečbu chrípkového ochorenia a delečné vírusy by mohli byť využité v klinickej praxi na liečenie nádorov.

Odozva organizmu na infekciu vírusom chrípky a jeho mutantov, najmä ak sa sleduje imunitná odpoveď, ako aj reakcia organizmu na siRNA alebo interferóny je komplexný proces, na ktorom sa podieľa veľa faktorov a práve preto sa v tomto prípade nedá *in vivo* nahradiť bunkovými kultúrami. Morča domáce potrebujeme ako zdroj erytrocytov pomocou ktorých sa stanovuje hemaglutinačný titer vírusu chrípky ako aj prítomnosť vírusu chrípky vo vzorke. Na hemaglutinačné titre je možné použiť kohútie erytrocyty, ale v súčasnosti nemáme na našom ústave podmienky pre chov kohútov. Podľa zoznamu registra alternatívnych metód z European Centre for the Validation of Alternative Methods (ecvam.jrc.it/publication/MAB_statement.pdf; ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/-2k; http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/conf_2006.htm), analýza patogenézy infekcie spôsobenej

provides protection against pneumovirus infection in vivo. Vaccine. 2011 Mar 24;29(15):2777-84.

7. Jewell NA, Cline T, Mertz SE, Smirnov SV, Flaño E, Schindler C, Grieves JL, Durbin RK, Kotenko SV, Durbin JE. Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection in vivo. J Virol. 2010 Nov;84(21):11515-22.

8. Kaefer V, Semedo JG, Silva Kahl VF, Von Borowsky RG, Ganesini J, Ledur Kist TB, Pereira P, Picada JN. DNA damage in brain cells and behavioral deficits in mice after treatment with high doses of amantadine. J Appl Toxicol. 2010 Nov;30(8):745-53.

9. Sturlan S a kol. Endogenous expression of proteases in colon cancer cells facilitate influenza A viruses mediated oncolysis. Cancer Biol Ther. 2010, 15;10(6):592-9.

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 infekcie vírusom chrípky a na stanovenie hladiny interferónov a ďalších sledovaných proteínov.

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. 1

Netechnické zhrnutie projektu: 4399 / 13-221

Názov projektu: Účinok hydrogélových scaffoldov hyaluronanu na osteochondrálne defekty v kolennom kĺbe ošípaných.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): hyaluronan, scaffold, osteochondrálny defekt, ošípané

Účel projektu*: Aplikovaný výskum

Ciele projektu:

Doposiaľ na Slovensku nebol študovaný vplyv hyaluronanu sodného substituovaného tyramínom v hydrogélových scaffoldoch na liečbu osteochondrálnych defektov v kolennom kĺbe u ošípaných. Výsledky štúdie môžu byť perspektívne využiteľné pre terapeutické postupy v humánnej medicíne. Cieľom projektu je zistiť účinok aplikácie hyaluronanu sodného substituovaného tyramínom v hydrogélových scaffoldoch neosiatych, príp. osiatych chondrocytmi na proces liečby osteochondrálnych defektov v kolennom kĺbe ošípaných.

Prínos z vykonaného projektu:

Predkladaná štúdia prinesie originálne výsledky, ktoré obohatia naše znalosti o vplyve hydrogélového scaffoldu hyaluronanu substituovaného tyramínom neosiateho, resp. osiateho chondrocytmi na model osteochondrálnych poškodení kolenného kĺbu. Výsledky postupu na zvieratách sa využijú v príprave nových implantátov s terapeutickým účinkom pri liečbe chorôb pohybového aparátu človeka. Experimentálna terapia novými substanciami tkanivového inžinierstva môže rozšíriť spektrum liečebných postupov pri patologických zmenách spojivového a kostného tkaniva v kolennom kĺbe.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Postup bude realizovaný na modeli osteochondrálneho poškodenia chrupky kolenného kĺbu samcov ošípaných plemena biele ušľachtilé (živá hmotnosť 70 ± 5 kg). Experimentálne zvieratá budú rozdelené v postupe do dvoch skupín liečby neosiatym, príp. osiatym hydrogélovým scaffoldom v rámci šetrenia zvierat po 3 jedince v každej skupine. Vplyv hyaluronanu sodného substituovaného tyramínom v hydrogélach na liečbu osteochondrálnych defektov sa bude sledovať po 8 týždňoch štúdie. V experimente sa použije jednorázový zástav 6 ošípaných v dvoch skupinách po 3 zvieratá.

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

Zvieratá sa zaradia do experimentov po dosiahnutí štandardných hmotnostných parametrov. V projekte sa použijú ošípané s osteochondrálnymi defektmi s podaním testovaných hydrogélů. Liečba bude profylaktická, čo znamená, že testovaná látka sa bude aplikovať od prvého dňa štúdie. Po výbere zvierat a umiestnení v karanténe počas postupu bude zvieratám venovaná štandardná

veterinárna starostlivosť zmluvným veterinárnym lekárom. V prípade výskytu ochorenia alebo zhoršenia zdravotného stavu ošípaných v projekte, ktoré nesúvisí s experimentom, budú choré jedince po dohode s veterinárnym lekárom vyradené z postupu a humánne usmrtené. Pri výskyte bolestivých stavov sa budú zvieratám podávať prostriedky na zníženie bolesti (xylazín, mezokaín, tramadol). So všetkými ošípanými sa bude manipulovať tak, aby sa im nespôsobila zbytočná bolesť, strach a utrpenie. Operácie na experimentálnych jedincoch budú robené v celkovej anestézii (Zoletil/Tiletamin + xylazín, ketamín+azaperon, inhalácia anestetických plynov: oxid dusný a kyslík v pomere 2:1 plus 0,5-1,5 % izofluran) spolu s lokálnou anestéziou (mezokaín). Na zabránenie pociťovania bolesti po operácii budú zvieratám podávané analgetiká (Tramadol) denne počas celej štúdie.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Postup sa vykoná u dospelých jedincov samčieho pohlavia v celkovej a lokálnej anestézii jednorázovo pri aplikácii scaffoldov do indukovaného osteochondrálneho defektu kolenného kĺbu ošípaných s primeranou analgéziou počas celého obdobia projektu a pooperačnou starostlivosťou. Navrhovaná klasifikácia krutosti postupu je stredná.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

V dostupných databázach neboli zistené nezvieracie techniky, ktoré by ukazovali na možnosť náhrady zvierat požadovaného druhu v projekte. Podľa doterajších poznatkov neexistuje adekvátna náhrada alternatívnymi metódami sledovania pôsobenia testovaných látok pri liečbe osteochondrálnych defektov na živý organizmus.

2. Redukcia počtu zvierat:

Experimentálne zvieratá budú rozdelené v postupe do dvoch skupín liečby neosiatym, príp. osiatym hydrogélom v rámci šetrenia zvierat po 3 jedince v každej skupine. Vplyv hyaluronanu sodného substituovaného tyramínom v hydrogélach na liečbu osteochondrálnych defektov sa bude sledovať po 8 týždňoch štúdie. V projekte sa použije jednorázový zástav 6 ošípaných v dvoch skupinách po 3 zvieratá, aby sa získala prvotná informácia o procese obnovy chrupky kolenného kĺbu a vplyve testovaných látok na celý organizmus ošípaných.

3. Zjemnenie:

Osteochondrálne poškodenie kolenného kĺbu sa používa v predklinickom testovaní látok s možným liečivým účinkom ako predstupeň klinického sledovania v humánnej medicíne. Ošípané sa svojou anatómiou a fyziologickými vlastnosťami podobajú ľudskému organizmu, preto sa používajú v projektoch na simuláciu overení liečebných postupov používaných v organizme človeka. Spôsob, akým sa pokusy vykonávajú, budú zabezpečené tak, aby zvieratá trpeli čo najmenej, pričom sa im zabezpečia štandardné chovné podmienky a zvolia sa manipulácie, ktoré zminimalizujú bolesť a znížia úroveň stresu. Po aklimatizácii a umiestnení v karanténe, počas pokusov bude zvieratám venovaná štandardná veterinárna starostlivosť zmluvným veterinárnym lekárom. So

všetkými jedincami sa bude manipulovať tak, aby sa im nespôsobila zbytočná bolesť, strach a utrpenie. Ako operačná miestnosť sa použije vydláždená miestnosť pre etologické sledovanie správania sa zvierat v Experimentálnom centre hospodárskych zvierat SPU Nitra (schválené zariadenie užívateľa č.k. 2781/13-221/7 zo dňa 28.10.2013) s možnosťou rýchleho čistenia, dezinfekcie, sterilizáciou germicídnymi žiaričmi, vybavená klimatizáciou, operačným stolom a operačnou lampou. Zákroky na zvieratách budú robené v celkovej anestézii zmesou Zoletil/Tiletamin + xylazín (dávka podľa živej hmotnosti zvierat) a alternatívne potom ketamín v kombinácii azaperonom (v dávkovaní doporučenom výrobcem) podanou intramuskulárne. V celkovej anestézii budú ošipané udržiavané inhaláciou anestetických plynov: oxid dusný a kyslík v pomere 2:1 doplnené 0,5- 1,5 % izofluranom pomocou laryngeálnej masky. Na znecitlivenie v mieste operácie sa použije lokálna anestézia 1 % mezokaínom. Po operačných zárokoch bude zvieratám poskytnutá štandardná pooperačná starostlivosť. Ustajnia sa vo vydezinfikovaných individuálnych boxoch vo vysterilizovaných priestoroch pôrodnice, s vydezinfikovanou podlahou. Na zabránenie pociťovania bolesti po operácii budú zvieratám podávané analgetiká (Tramadol) denne počas celej štúdie. V prípade výskytu ochorenia alebo zhoršenia zdravotného stavu zvierat v pokuse, ktoré nesúvisí s experimentom, budú choré jedince po dohode s veterinárnym lekárom vyradené z postupu a podrobené eutanázii predávkovaním zmesou ketamín/xylazín s následným podaním tiopentalu intramuskulárne. Podobným spôsobom budú zvieratá usmrtené i po ukončení projektu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu: Anti-tick Vaccines to Prevent Tick-borne Diseases in Europe, ANTIDotE (FP7 call HEALTH.2013.2.3.4-1, 602272)

Kliešť *Ixodes ricinus* prenáša bakteriálne, protozoálne a vírusové patogény, ktoré zapríčiňujú lymskú boreliózu, babeziózu a kliešťovú encefalitídu. Počas cicania kliešte vpúšťajú do kože proteíny slinných žliaz, ktoré sa dostávajú do kontaktu s obrannými mechanizmami hostiteľa a uľahčujú tak prenos patogénov. Opakované cicanie kliešťa vedie k rezistencii hostiteľa a zníženiu prenosu patogénov. Takto vznikla myšlienka vytvoriť proti-kliešťovú vakcínu, ktorá by zároveň chránila aj pred kliešťami prenášanými ochoreniami. V rámci projektu 7. rámcového programu Európskej únie, Anti-tick Vaccines to Prevent Tick-borne Diseases in Europe budeme na našom pracovisku skúšať tento model na víruse kliešťovej encefalitídy (TBEV). Zahraniční partneri projektu budú model skúšať aj na iných patogénoch, pôjde o lymskú boreliózu a babeziózu. V prvej fáze, pôjde o dva čiastkové pokusy, na základe ktorých sa vyberú kandidáti na proti-kliešťovú vakcínu.

Predložený projekt pokusu je zameraný na:

1. Transkriptómovú analýzu génov v slinných žľazách kliešťa počas cicania
2. Testovanie vybraných génov vyblokovovaných prostredníctvom RNAi v kliešťovi na BALB/c myšiach
3. Testovanie kandidátov na proti-kliešťovú vakcínu na BALB/c myšiach

Výsledky experimentov prinesú nové poznatky v oblasti prenosu kliešťami prenášaných patogénov a môžu sa v budúcnosti využiť v prevencii týchto ochorení. Farmakologicky aktívne látky v slinách kliešťa potláčajú imunitnú odpoveď hostiteľa a tým napomáhajú prenosu kliešťami prenášaných patogénov. Práve porozumenie funkcie všetkých zložiek v slinách kliešťa nám pomôže odhaliť mnohé zákonitosti v prenose patogénov. Interakcia slín kliešťa s organizmom hostiteľa je komplexný proces, na ktorom sa podieľa veľa faktorov a práve preto sa v tomto prípade nedá *in vivo* nahradiť bunkovými kultúrami.

Podľa zoznamu registra alternatívnych metód z European Centre for the Validation of Alternative Methods (<http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu>) a The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (<http://iccvam.niehs.nih.gov>) analýza patogenézy infekcie spôsobenej testovaným vírusom nie je možná bez modelového systému a je nevyhnutné použiť vhodný zvierací model. V tomto prípade je možné použiť myš. 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 alebo vzdelávacie účely. Nové právne predpisy prísne dbajú na dodržiavanie 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. Keď nie je možné použiť alternatívne metódy, aby sa zlepšili a zjemnili metódy v postupoch,

pri ktorých sa odstráni alebo obmedzí na najnižšiu mieru bolesť, utrpenie, strach alebo trvalé poškodenie zvierat.

V projektoch sa ako modelový druh používa myš laboratórna. Maximálny počet zvierat, ktoré sa v pokusoch použijú za 5 rokov je 400 ks Balb/c myši (samičky).

V údajoch o plánovaných počtoch zvierat je zahrnutý aj počet potrebný pre opakovanie niektorých pokusov. Počet myši je plánovaný na 5 rokov a bude sa robiť niekoľko rozličných experimentov. 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.

1. Willadsen P 2004: Anti-tick vaccines. *Parasitol* 129 Suppl: S367-87. Review.
2. Merino O, Alberdi P, Pérez de la Lastra JM, de la Fuente J 2013: Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.*;3:30. doi: 10.3389 / fcimb. 2013.00030.
3. Havlíková S, Roller L, Koči J, Trimnell AR, Kazimírová M, Klempa B, Nuttall PA 2009: Functional role of 64P, the candidate transmission-blocking vaccine antigen from the tick, *Rhipicephalus appendiculatus*. *Int J Parasitol.* 39(13):1485-94.
4. Labuda M, Trimnell AR, Ličková M, Kazimírová M, Davies GM, Lissina O, Hails RS, Nuttall PA. 2006: An antivector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathog.* 2(4):e27.
5. Havlíková S, Ličková M, Ayllón N, Roller L, Kazimírová M, Slovák M, Moreno-Cid JA, Pérez de la Lastra JM, Klempa B, de la Fuente J. 2013: Immunization with recombinant subolesin does not reduce tick infection with tick-borne encephalitis virus nor protect mice against disease. *Vaccine* 15;31(12):1582-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.01.017. n
6. Havlíková S, Ličková M, Klempa B 2013: Non-viraemic transmission of tick-borne viruses. *Acta Virol.* 57(2):123-9. Review.

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 infekcie vírusom TBEV.

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.

Netechnické zhrnutie projektu: 4430/13-221

Názov projektu: Účasť HMGB1 proteínu v experimentálnom infarkte myokardu: ochrana vs. poškodenie myokardu.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2/0144/14 (registračné číslo projektu)

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

High-mobility-group box 1 (HMGB1), Affimolekuly, infarkt myokardu

Účel projektu: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

Cieľom projektu je zistiť účinky novo objaveného HMGB1 proteínu, ktorý sa vylučuje počas mozgovej príhody ako aj srdcovej ischémie. Na tento účel použijeme dva typy experimentálneho infarktu myokardu:

Ex vivo model – perfúzia srdca podľa Langendorffa

In vivo model – experimentálny infarkt myokardu bude vyvolaný podvázom koronárnej artérie potkana

Podľa údajov dostupných v literatúre sa autori prikláňajú skôr na stranu škodlivého, než ochranného účinku HMGB1 proteínu pri infarkte myokardu. Preto prvým krokom projektu bude neuralizovať HMGB1 proteín pomocou špecifických protilátok, ako aj prostredníctvom affimolekúl. V prípade, že veľkosť infarktu myokardu sa zmenší, budeme testovať dávky protilátok alebo affimolekúl, tak aby sme vyselektovali konkrétnu dávku, ktorú treba pridať pre optimálnu ochranu myokardu. Naopak, ak sa veľkosť infarktu zväčší, môžeme predpokladať, že úlohou HMGB1 proteínu je skôr ochrana myokardu. V takom prípade budeme pridávať rôzne dávky proteínu priamo do myokardu po infarkte. Následne vyhodnotíme optimálnu dávku s protektívnym účinkom.

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

Originalita predkladaného projektu je založená na kompletne novom postupe, ktorý môže prispieť k priaznivej liečbe po infarkte myokardu. Hlavným cieľom tohto projektu je teda nájsť optimálnu dávku HMGB1 proteínu alebo jeho protilátky resp. affimolekuly, ktorá dokáže efektívne prispieť k ochrane myokardu pred poškodením po infarkte.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: POTKAN LABORATÓRNY (*rattus norvegicus*) lúnia WKY 120 ks

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

Chirurgický zákrok v celkovej anestéze a s primeranou analgéziou môže byť spojený s miernou pooperačnou bolesťou a celkovou nepohodou.

Predpokladaná úroveň krutosti: *ex vivo* experimenty – bez možnosti zotavenia
In vivo experimenty – stredná krutosť

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Vedeckým odôvodnením použitia zvierat na experiment je, že sú to žijúce organizmy poskytujúce interaktívny a dynamický systém, s ktorým sa dá manipulovať za účelom zistenia mechanizmu normálnych funkcií ako aj mechanizmu pri rôznych patologických ochoreniach. Výsledkom je lepšie pochopenie živého organizmu a tak poznatky môžu byť čiastočne zovšeobecnené na iné druhy, vrátane človeka, smerujúc k vývoju účinných terapií a lepšej metodologickej diagnostike v skorých štádiách ochorenia. Zvieracie modely sú zvyčajne vo všetkých oblastiach biomedicínskeho výskumu a výrazne sa podieľajú na lekárskom vývoji.

Pre sledovanie nami vytýčených cieľov nie je možné použiť počítačový model zvierat a najvhodnejším modelom je laboratórny potkan. V projekte sme zvolili kmeň Wistar Kyoto potkanov, u ktorých by HMGB 1 proteín mal byť podľa literárnych údajov identický s ľudským na 99%.

2. Redukcia počtu zvierat:

V plánovanom experimente je zabezpečený čo najnižší počet experimentálnych zvierat tak, aby bol experiment štatisticky vyhodnotiteľný a závery všeobecne prijateľné. Keďže projekt je rozdelený na dve rozdielne štúdie *ex vivo* a *in vivo* experimentov, potrebujeme 2 samostatné skupiny laboratórnych zvierat. Literárne údaje o torakotómii uvádzajú 60% úspešnosť prežitia. O tento počet sme navýšili plánovaný počet zvierat. Pokiaľ je to možné, spájame vyhodnotenie parametrov so spolupracujúcimi laboratóriami, aby sme dosiahli čo najväčší počet výsledkov pre štatistickú analýzu pri čo najmenšom počte experimentálnych zvierat.

Po humánnom usmrtení zvierat sa odoberie maximálne množstvo vzoriek na sledovanie fyziologických, biochemických a morfológických parametrov. Je zabezpečená spolupráca medzi laboratóriami (ako v rámci ÚNPF SAV, tak aj s inými laboratóriami), aby sa v rámci experimentov jednotlivých laboratórií dalo použiť čo najväčšie množstvo spoločných experimentálnych zvierat.

3. Zjemnenie:

Zvieratá budú chované v modernom, oficiálne schválenom zariadení s maximálnym komfortom. Budú pod stálou kontrolou zmluvného veterinárneho lekára. Osoby, ktoré budú manipulovať so zvieratami majú viacročné skúsenosti.

U skupiny zvierat použitých na *ex vivo* experimenty, budú zvieratá humánne usmrtené. Najskôr sa vystavia pôsobeniu oxidu uhličitého v uzavretej nádobe až do straty vedomia. V hlbokom bezvedomí im bude prevedená dislokálna cervikácia a následne vypreparované srdce pre Langendorffovu perfúziu. Po ukončení tejto časti experimentu, bude myokard spracovaný pre biochemické a morfológické vyhodnocovanie.

U skupiny zvierat na *in vivo* experimenty bude vykonaný chirurgický zákrok v celkovej anestéze. Po zákroku budú zvieratám podávané analgetiká na zmiernenie pooperačnej bolesti a diskomfortu (podrobný postup vid' návrh projektu).

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Príloha II

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

4453/13-221

Názov projektu:

Animálny model neurodegenerácie monitorovaný *in vivo* pomocou magnetickej rezonancie (MR) pred a po terapii

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

Podstatou projektu je štúdium skorých štádií demencií Alzheimerovho typu a možnosti ovplyvnenia neuroprotektívami. *In vivo* MRI/MRS experimenty sú zamerané na skúmanie a pochopenie bunkových a molekulárnych mechanizmov, podieľajúcich sa na zabezpečení funkčnej a štruktúrnej integrity mozgového tkaniva glie a neurónov po aplikácii neurotoxínu, ktorý simuluje zápalový a neskôr neurodegeneračný proces v tomto regióne. Rovnako budeme sledovať možnosť terapie na tento región mozgu vhodne vybraným neuroprotektívom, čo predstavuje nové terapeutické možnosti. Prínosom projektu budú originálne poznatky o využití neuroprotektív v skorých štádiách neurodegenerácie mozgu, ktoré by prispeli k poznatkom pri prevencii a ochrane integrity mozgového tkaniva glie a neurónov pred poškodením. V postupe použijeme 30 dospelých laboratórnych potkanov, samcov, kmeňa Wistar/DV.

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. V súčasnej dobe neexistuje iná šetrnejšia predklinická metóda, ktoré by nahradila *in vivo* MRI/MRS techniku na preskúmanie neurodegenerácie mozgu v *in vivo* podmienkach.

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. Toto minimálne použitie zvierat je umožnené práve použitím modernej a unikátnej *in vivo* MRI/MRS techniky, ktorá je zatiaľ jedinou svojho druhu na Slovensku.

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 D-galaktózy a trimetylcínu aj anestetika sa bude stres potláčať používaním veľmi tenkých jednorazových sterilných ihlíc a šetrným a ohľaduplným zaobchádzaním so zvieratami. Usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v hlbkej celkovej anestézii.

Späťne posúdenie - mē

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Zmena funkcie Ca^{2+} transportérov v cerebelárnych granulárnych neurónoch (CGNs) počas poškodenia.

Kľúčové slová v projekte: IP3 receptory, neuróny, rast, neurodegenerácia, neuroregenerácia

1. Účel projektu: základný výskum

2. Ciele projektu:

1. Zaviest primárnu kultúru cerebelárnych granulárnych buniek pestovaných na „in vitro“ vytvorenej fibrotickej jazve ako model poškodenia CNS.
2. Porovnať morfometrické parametre neuritov rastúcich na fibrotickej jazve a neuritov rastúcich v kontrolných podmienkach.
3. Identifikovať zmeny exprese jednotlivých vnútrobunkových transportérov vápnika - IP3 receptorov, ryanodínových receptorov (RyR) a vápnikovej pumpy (SERCA) a zmerať zmeny uvoľňovania vápnika z vnútrobunkových zásobární v „in vitro“ modeli poškodenia centrálnej nervovej sústavy (CNS) a v kontrolných podmienkach.
4. Popísať rozdiel v excitabilite poškodených a kontrolných neurónov meraním iónových prúdov a akčných potenciálov metódou „patch clamp“.

3. Prínos z vykonaného projektu:

Dôsledky poškodenia CNS na úrovni jednotlivých neurónov, celých oblastí mozgu a proces následnej neuroregenerácie nie sú dostatočne preskúmané, pritom predstavujú závažný medicínsky problém. Sumarizácia experimentálnych výsledkov z plánovaných experimentov prinesie nové poznatky o zmenách dynamiky vnútrobunkového vápnika a jej vplyve na excitabilitu neurónov a o procese rastu neuritov počas poškodenia CNS.

Výhodou nášho modelu fibrotickej jazvy (teda „in vitro“ modelu poškodenia CNS) je možnosť sledovať časový priebeh zmien a možnosť zasahovať do procesu napr. pridávaním rôznych protektívnych látok. Súhrn týchto pozorovaní môže byť potenciálne zaujímavý i pre klinické aplikácie.

4. Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Projekt je optimalizovaný z hľadiska počtu použitých zvierat na dosiahnutie maximálneho výťažku. Na získanie štatisticky významných výsledkov je potrebných približne 20 izolácií na 1 rok. Vzhľadom na to, že pri objednávke 5-7 dní starých mláďat musíme vždy zobrať samicu + celý vrh (čo zvyčajne predstavuje asi 10 jedincov), predpokladaný počet zvierat na 3 roky je maximálne 600 mláďat a 60 samíc-matiek.

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

V rámci projektu je jedinou ujmov rýchle usmrtenie jedincov dekapitáciou a následnou izoláciou mozgového tkaniva potrebného na prípravu primárnych kultúr neurónov.

6. Predpokladaná úroveň krutosti:

Klasifikácia krutosti plánovaných postupov podľa prílohy č.4 nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z. je v kategórii: "bez možnosti zotavenia".

7. Uplatňovanie zásad 3R

požiadavka nahradenia

Nami plánované experimenty nie je možné vykonávať na imortalizovaných líniiach neurónov z toho dôvodu, že v súčasnosti dostupné imortalizované línie (prakticky iba HT22 línia hipokampálnych buniek, ktorá reprodukuje glutamátovú toxicitu ale úplne stratila elektrickú excitabilitu) majú natoľko pozmenený fenotyp, že iba minimálne korehujú s fyziologickými vlastnosťami a správaním sa neurónov v podmienkach „in vivo“ resp. primárnych kultúr neurónov.

požiadavka obmedzenia

Projekt je optimalizovaný z hľadiska počtu použitých zvierat na dosiahnutie maximálneho výťažku a štatisticky relevantných výsledkov. Maximálny počet izolácií počas 3 rokov je 60. Plánovaný počet jedincov na celé obdobie trvania projektu (3 roky) je 60 samíc a odhadom maximálne 600 mláďat.

zjemnenie

Laboratórny potkan je štandardný objekt, ktorý sa celoplošne využíva pri štúdiu štruktúrnych a funkčných vlastností neuronálneho tkaniva, čo vytvára predpoklady pre náležité porovnávanie výsledkov medzi laboratóriami. Rýchla dekapitácia mláďat v experimente predstavuje rýchle usmrtenie s najmenšou mierou bolesti. Usmrtenie samíc-matiek bude vykonávané podaním letálnej dávky anestetika tenkou ihlou určenou pre diabetikov, intraperitoneálne.

8. Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno ☒ nie

Podľa §37 nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z. odst. 3 sa nevyžaduje spätné posúdenie projektu, z toho dôvodu, že projekt zahŕňa iba postup usmrtenia zvierat klasifikovaných ako „bez možnosti zotavenia“.


RNDr. Ľubica Lacinová, DrSc.
Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV
Vlárska 5, 833 34 Bratislava
lubica.lacinova@savba.sk

V Bratislave, dňa 26.11.2015

Netechnické zhrnutie projektu 4532/13-221

Názov projektu:

Hodnotenie biologickej aktivity novosyntetizovaných derivátov aryloxyaminopropanolu ako potenciálnych antihypertenzív v podmienkach in vitro

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom projektu je formou skrínového hodnotenia na izolovaných predsieňach srdca i aortách potkanov zistiť schopnosť testovaných látok pozitívne ovplyvňovať základné kardiovaskulárne parametre, t.j. tepovú frekvenciu spontánne tepajúcich aj izoprenalínom stimulovaných predsiení experimentálnych zvierat ako aj schopnosť relaxovať hladkú svalovinu ciev.

Prínos z vykonaného projektu

Predložený projekt systematicky nadväzuje na štúdium vzťahu štruktúry a účinku u nových biologických aktívnych látok, u ktorých je predpoklad priaznivého ovplyvňovania základných kardiovaskulárnych funkcií. Na základe získaných výsledkov bude možné doplniť informácie o schopnosti týchto štruktúr ovplyvňovať niektoré fyziologické funkcie. Najúčinnnejšie látky budú vybrané k detailnejším experimentálnym postupom za použitia iných metodických prístupov, pričom vzdialeným cieľom nášho snaženia je nájdenie nového liečiva s optimálnymi farmakologickými vlastnosťami.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: potkany, kmeň Wistar v počte 48 ks

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

Ide o experimenty, kde sa hodnotí účinok testovaných látok na izolovaných orgánoch potkanov. Pri *in vitro* experimentoch sú orgány odoberané v celkovej anestézii a zvieratá sa utratia. Počas ustajnenia nebudú vykonávané žiadne postupy, ktoré by narúšali pohodu a celkový stav zvierat.

Predpokladaná úroveň krutosti: slabá

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie

V predkladanom projekte plánujeme sledovať inhibičný účinok originálnych novosyntetizovaných látok na kontrakciu aorty navodenú fenylefrínom, ako aj vplyv látok na spontánne tepajúce izolované predsieň. V súčasnosti ani bunkové kultúry, ani počítačové simulácie nedokážu poskytnúť relevantné informácie, týkajúce sa ovplyvnenia ciev a funkcie prevodového systému srdca.

2. Obmedzenie

V jednotlivých experimentálnych skupinách bude použitých 8 pokusných zvierat, čo zabezpečí adekvátnu štatistickú interpretáciu získaných výsledkov pre prípad, že by došlo k náhodnému zlyhaniu experimentálnej techniky. Z každého zvieraťa budú súčasne odobraté a experimentálne spracované 2 orgány (srdce a aorta). Zvieratá budú rovnakého pohlavia, veku, *resp.* hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt, a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom.

3. Zjemnenie

V priebehu prvého týždňa po ustajnení, v dostatočne veľkých chovných nádobách, za stanoveného svetelného a kŕmneho režimu, budú zvieratá karantenizované. Budú v kontakte iba s odbornými ošetrovateľkami. Keďže sa jedná o akútnu *in vitro* experimentálnu techniku, zvieratá budú pred odobratím orgánov utratené v pokuse za použitia celkového anestetika tiopentalu (80 mg/kg *i.p.*).

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

PRÍLOHA č. 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

„Štúdia hodnotenia biologickej aktivity vzorky lieku Imunor (Transfer faktor)“

Podrobný opis účelu projektu a východisková situácia projektu:

Účelom projektu je otestovanie biologickej aktivity každej novo vyrobenej šarže prípravku Imunor, ktorý sa používa na prevenciu a liečbu porúch imunity. Inbredné myši kmeňov Balb/c alebo C3H sú nevyhnutným schváleným a overeným zdrojom imunitných buniek. Na súčasnom stupni vedeckého poznania neexistuje alternatívny validovaný *in vitro* testovací systém na bunkových líniiach, ktorý by nahradil používaný model. Meranie *in vitro* proliferácie aktivity slezinových lymfocytov myši po ovplyvnení imunomodulačnou látkou – Imunorom je šetrný spôsob zisťovania biologickej aktivity lieku a výrazne redukuje utrpenie zvierat aj manipuláciu s nimi.

Špecifické ciele projektu:

- **Kvalitatívny** - Testovaním novo vyrobených šarží lieku Imunor prispieť k dobrej účinnosti a vysokej kvalite vyrobeného lieku.
- **Terapeutický** – liek pre ľudí so zníženou imunitou. Liek Imunor je indikovaný najmä pre liečbu v prípadoch laboratórne dokázanej poruchy bunkovej imunity (zníženie celkového počtu T lymfocytov, zníženie CD4+ T- helper lymfocytov, zvýšenie CD8+ T supresorových lymfocytov), ďalej v klinických prípadoch ochorení, o ktorých je známe, že sú zvyčajne spojené s poruchou bunkovej imunity. Ďalej je indikovaný pri deficitoch humorálnej imunity s laboratórne dokázaným znížením hladiny imunoglobulínov a kolísavými nálezmi porušenej bunkovej imunity s klinickým obrazom recidivujúcich infekcií rôznych lokalít.
- **Ekonomický** – bez otestovania šarže nie je možné liek prepustiť do distribúcie.

Počet a typ zvierat, ktoré sa v projekte použijú:

Použijú sa mladé dospelé negravidné samice inbredného kmeňa myši Balb/c alebo C3H. Na začiatku štúdie budú zvieratá vo veku 8-10 týždňov a hmotnosti 18-24 g.

Počet zvierat v pokuse na celé požadované obdobie (rok 2014 – 2018):

Počet novo vyrobených šarží lieku Imunor	50 šarží
Počet zvierat na otestovanie 1 šarže – 6 zvierat, 3 opakovania	18 ks
Počet zvierat celkom na otestovanie 50 vzoriek Imunoru	50x18= 900 ks

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Požiadavka nahradenia:

Slezina pokusných zvierat bude slúžiť ako zdroj na izoláciu slezinových lymfocytov, ktoré sa použijú pri realizácii testu Proliferačnej aktivity lymfocytov. Neexistuje relevantná náhrada pre izoláciu potrebných buniek (**Požiadavka nahradenia**).

Počet zvierat v jednom pokuse je uvedený v štandardných pracovných postupoch. Realizácia prebieha v 3 nezávislých opakovaniach, pričom v každom opakovaní sa použije 6 ks zvierat. Celkovo použijeme

18 ks zvierat, čo je minimálne množstvo na to, aby sa neznížila reprodukovateľnosť a validita pokusu (**Požiadavka obmedzenia**).

Realizácia pracovného postupu bude slúžiť za účelom vysokoškolského vzdelávania na LF SZU na praktických cvičeniach z predmetu imunológia a pri laboratórnych cvičeniach atestujúcich lekárov v odbore imunológia (**Požiadavka obmedzenia**).

V prípade, že zadávateľ požiadava súčasne o otestovanie 2 nových šarží lieku Imunor, na pokus sa použijú tie isté zvieratá, čiže ich množstvo sa nenavýši (**Požiadavka obmedzenia**).

Zvieratá budú pred pokusom ustajnené v kletke spolu a bude im zabezpečená štandardná starostlivosť (**Požiadavka zjemnenia**).

Zvieratá budú usmrtené dekapitáciou pri slabej dietyléterovej anestézii (**Požiadavka zjemnenia**).

Opis vzniknutej ujmy na zvieratách (doplnenie netechnického zhrnutia projektu)

Počas realizácie projektu budú na zvieratách vykonávané postupy zaradené podľa klasifikácie krutosti postupov v súlade s Prílohou č. 4 k Nariadeniu vlády č. 377/2012 Z. z. nasledovne: Dekapitácia zvierat v inhalačnej anestézii dietyléterom: slabé postupy

Spätné posúdenie : nie

Netechnické zhrnutie projektu 4546/13-221

Názov projektu:

Chronofarmakológia antihypertenzív v modeli spontánne hypertenzného potkana

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom pokusu je zistiť vplyv chronofarmakologického konceptu (aplikácia lieku ráno vs. aplikácia lieku večer) na efektivitu zníženia tlaku krvi pri porovnaní monoterapie a kombinovanej liečby valsartanom a amlodipínom u spontánne hypertenzných potkanov.

Prínos z vykonaného projektu:

Napriek veľkej pozornosti zdravotníckeho systému a neustálemu vývoju a dostupnosti nových liekov je liečba vysokého krvného tlaku oblasťou, kde je naďalej potrebné zlepšenie kontroly tohto ochorenia, keďže epidemiologické štúdie naznačujú neustále zvyšovanie prevalencie hypertenzie. Na mieste je preto individuálny prístup k liečbe. Hoci liečba hypertenzie sa zvyčajne začína ako monoterapia, vo väčšine prípadov je potrebná kombinovaná liečba, t.j. použitie viacerých antihypertenzív súčasne. Kombinovaná liečba poskytuje lepšiu kontrolu krvného tlaku a je zvyčajne lepšie znášaná ako monoterapia s vysokými dávkami jedného liečiva. Klinických údajov porovnávajúcich rozdiely medzi ranným a večerným podávaním kombinovanej liečby je však v odbornej literatúre zatiaľ podstatne menej ako je tomu v prípade monoterapie. Z experimentov dokonca ešte nebola zverejnená žiadna práca zaoberajúca sa chronofarmakológiou kombinovanej liečby.

Prínosom projektu bude získanie poznatkov v oblasti chronofarmakoterapie vysokého krvného tlaku kombinovanou liečbou a ponúknutie nových údajov ako východisko pre uplatnenie v lekárskej praxi.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty : Potkany, samce rodu spontánne hypertenzný potkan 160 ks

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

Ide o experimenty, kde sa hodnotí vplyv dlhodobej liečby na systémový tlak krvi, funkciu srdca a obličiek, preto je potrebné vykonať experiment *in vivo*, teda na celom zvierati. V experimente sa plánuje intraperitoneálna aplikácia anestetika (Avertin). Zvieratá môžu pri intraperitoneálnej aplikácii anestetika pociťovať krátkodobú bolesť, ktorá nebude významne narúšať pohodu, ani celkový stav zvierat. Samotné experimenty zamerané na zistenie funkcie srdca budú vykonávané v hlbokoj

celkovej anestéze, po ktorej zvieratá nenadobudnú vedomie a budú humánne utratené. Celkovo sa neočakáva výrazne poškodenie srdca a obličiek (v zmysle zlyhania orgánov a prejavov ako dýchavičnosť, edémy, zníženie telesnej hmotnosti, či zníženie fyzickej aktivity, hravosti zvierat) po podaní antihypertenzív. V prípade neočakávaného náhleho zhoršenia zdravotného stavu budú zvieratá humánne utratené.

Predpokladaná úroveň krutosti:

slabá

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie:

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa bude hodnotiť vplyv antihypertenzív valsartanu, amlodipínu, resp. ich kombinácie na systémový tlak krvi, dychovú frekvenciu, EKG, bazálnu a beta adrenergicky stimulovanú funkciu ľavej komory *in situ*, funkciu obličiek, histologické zmeny a molekulárno-biologické parametre, 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 systémové účinky antihypertenzív a komplexné deje s nimi súvisiace.

2. Obmedzenie:

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat ($n=10$ v skupinách) potrebný pre štatistické vyhodnotenie (pri dostatočnej sile štatistickej metódy) a zachovanie relevantnosti pokusu. Zvieratá, ktoré budú použité na meranie ľavokomorovej funkcie v prvej fáze nie je možné použiť na molekulárne analýzy 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. Hemodynamické merania budú realizované u zvierat v celkovej anestéze, všetky zvieratá v prvej aj druhej fáze budú humánne utratené oxidom uhličitým.

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

Netechnické zhrnutie projektu 4548/13-221

Názov projektu: Oxid dusnatý v mozgovej kôre: od génov k schizofrénii

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová: oxid dusnatý, prepulzná inhibícia, sociálna izolácia

Účel projektu: Základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom projektu je objasniť význam signalizácie pomocou NO v patofyziológii schizofrénie. V modeli schizofrénie, založenom na sociálnej izolácii zvierat preskúmame úlohu NO vo vývoji mozgu, udržiavaní redoxnej rovnováhy, GABAergickej neurotransmisii a senzoricko-motorickom vráťovaní. Ďalej sa zameriame na sledovanie zmien v tvorbe NO a jej vzťah ku kortikálnemu GABAergickejmu systému, redoxnému stavu a efektívnosti senzoricko-motorického vráťovania. Preskúmame tiež účinok antioxidačnej liečby na tieto fenotypy.

Zameriame sa na doteraz nepreskúmané genetické a molekulárne aspekty interakcie medzi neuronálnou NO-syntázou (NOS1), enzýmami regulácie redoxného stavu, redoxnou signalizáciou a funkciou GABAergickej interneurónov, ktoré sú s najväčšou pravdepodobnosťou veľmi významné pre patofyziológiu schizofrénie.

Prínosu projektu

Originálnosť nášho cieľa spočíva v prínose nových poznatkov o úlohe NO signalizácie vo vývoji mozgu, GABAergickej neurotransmisii, udržiavaní kortikálnej redoxnej rovnováhy, neurotrofickej signalizácii a vráťovaní irelevantných senzorických podnetov.

Výsledky tohoto projektu významne prispievajú k pochopeniu patofyziológie schizofrénie. Naše zistenia môžu byť využité pri vývoji nových diagnostických a prognostických metód a hľadanií nových terapeutických možností.

Očakávame, že chov potkanov v sociálnej izolácii bude mať za následok zníženie prepulznej inhibície (prepulse inhibition – PPI) a zvýšenie expresie NOS1, NF-kappaB a NADPH-oxidázy vo frontálnej kôre a hipokampe. Naproti tomu, očakávame zníženie expresie a aktivity antioxidačných enzýmov a enzýmov syntézy glutatiónu (superoxid-dismutáza, GCL, glutathión- syntetáza). Očakávame tiež zníženú koncentráciu redukovaného glutatiónu v tkanive. Tiež očakávame zníženú expresiu GAD67, GAT, BDNF, trkB, somatostatínu a parvalbumínu, nie však kalretinínu a pokles denzity SST+ a PV+ neurónov, nie však CR+ neurónov. Predpokladáme, že podávanie N-acetyl-cysteínu aspoň čiastočne zvráti tieto zmeny a zlepší PPI.

Počet a druh zvierat

Potkan laboratórny (<i>Rattus norvegicus</i>) kmeň	-	Sprague – Dawley	72 ks
	-	Wistar Kyoto	72 ks

Predpokladaná úroveň krutosti

slabá krutosť

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Cieľom projektu je objasniť význam signalizácie pomocou NO v patofyziológii schizofrénie.

V modeli schizofrénie, založenom na sociálnej izolácii zvierat preskúmame úlohu NO vo vývoji mozgu, udržiavaní redoxnej rovnováhy, GABAergickej neurotransmisii a senzoricko-motorickom vrátkovaní. Ďalej sa zameriame na sledovanie zmien v tvorbe NO a jej vzťah ku kortikálnemu GABAergickejmu systému, redoxnému stavu a efektívnosti senzoricko-motorického vrátkovania. Preskúmame tiež účinok antioxidačnej liečby na tieto fenotypy.

Pre dosiahnutie tohto cieľa budú zvieratá vystavené po dobu 10 týždňov sociálnej izolácii. Od 6. týždňa budú zvieratá liečené N-acetyl-cysteínom a po 4. týždňoch liečby usmrtené a použité na ďalší výskum.

Zatiaľ neexistuje alternatívna metóda, ktorá by nahradila laboratorátorného potkana. Dokumentuje to príloha Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód. Pre sledovanie nami vytýčených cieľov je teda najvhodnejší model laboratórny potkan. V projekte sme pre navodenie schizofrénie modelom sociálnej izolácie, zvolili kmene Sprague - Dawley a Wistar Kyoto potkanov. Podľa viacerých štúdií predstavujú najvhodnejší model, pri ktorom boli pozorované poruchy správania vyskytujúce sa pri schizofrénii.

2. Redukcia počtu zvierat:

V plánovanom experimente je zabezpečený čo najnižší počet experimentálnych zvierat, tak aby bol experiment štatisticky vyhodnotiteľný a závery všeobecne prijateľné. Pokiaľ je to možné spájame vyhodnotenie parametrov so spolupracujúcimi laboratóriami, aby sme dosiahli čo najväčší počet výsledkov pre štatistickú analýzu pri čo najmenšom počte experimentálnych zvierat.

Po humánnom usmrtení zvierat sa odoberie maximálne množstvo vzoriek na sledovanie fyziologických, biochemických a morfológických parametrov. Je zabezpečená spolupráca medzi laboratóriami (ako v rámci ÚNPF SAV tak aj s ostatnými ústavmi), aby sa v rámci experimentov jednotlivých laboratórií dalo použiť čo najväčšie množstvo spoločných experimentálnych zvierat.

3. Zjemnenie:

V experimente nebudú použité žiadne bolestivé invazívne metódy pokiaľ zviera nebude humánne usmrtené.

U skupiny zvierat, kde budú odobraté potrebné orgány pre stanovovanie biochemických a morfológických parametrov, budú zvieratá humánne utratené. Najskôr sa vystavia pôsobeniu oxidu uhličitého v uzavretej nádobe až do straty vedomia. V hlbokom bezvedomí budú následne dekapitované, odkrvené a po otvorení lebky, hrudnej a brušnej dutiny budú odobraté príslušné orgány.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie