

Netechnické zhrnutie projektu: 2425/14-221

Názov projektu: Vplyv antioxidantov pri ischemicko-reperfúznom poškodení priečne pruhovaného svalu

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

Účel projektu: Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

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

V klinickej praxi predstavuje akútna končatinová ischemia závažný problém, keďže nezvratné ischemicko - reperfúzne poškodenie končí často až amputáciou postihnutej končatiny a súčasne patrí medzi najakútnejšie stavy v medicíne. Tá môže byť spôsobená trombózou, embóliou, úrazom, prípadne iatrogénne. Nakoľko kolaterálne riečisko nie je dostatočne rozvinuté, dôsledkom akútnej končatinovej ischemie a následnej reperfúzie môžu byť lokálne (compartment syndrom) a celkové (myonefropaticometabolický syndróm = reperfúzny syndróm) komplikácie. Ischemicko - reperfúzne poškodenie je veľmi závažnou komplikáciou akútnych arteriálnych uzáverov a svojimi lokálnymi a celkovými prejavmi môže ohroziť život pacienta (hrozí multiorgánové zlyhanie).

Najdôležitejším predpokladom pre zabránenie rozvoja multiorgánového zlyhania následkom akútnej končatinovej ischemie je včasná endovaskulárna alebo chirurgická intervencia. V modernej komplexnej prevencii/terapii ischemicko - reperfúzneho poškodenia však nesmú chýbať antioxidačnej pôsobiace látky, ktorých úlohou je znížiť poškodenie vyvolané ROS.

Hlavným cieľom predkladaného projektu je preto skúmať protektívny účinok jednotlivých antioxidantov – melatonínu a N-acetylcysteínu na priečne pruhované svalstvo dolných končatín v ischemicko - reperfúznom období a ich vplyv na zmiernenie poškodenia tkanív po navodení reperfúzie, detekovať biochemické a morfológické zmeny priečne pruhovaného svalstva (m. gastrocnemius med. et lat.) po navodení akútnej končatinovej ischemie po podaní antioxidantov v presne stanovených intervaloch. Ischemicko - reperfúzne poškodenie bude navodené obliteráciou

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Vybrané stavy vyskytujúce sa v klinickej medicíne nie možné inak, ako s použitím experimentálnych zvierat verifikovať. Medzi takéto stavy patrí aj akútne ischemicko reperfúzne poškodenie kostrovej svaloviny. Tento experimentálny model sa snaží do určitej miery simulovať zmeny, ktoré prebiehajú v kostrovej svalovine vplyvom jej poškodenia. V súčasnosti nie je vhodné tento model inak verifikovať iba v experimentálnom modeli. Iné alternatívne modeli (bunkové kultúry) nie sú vhodné, pretože nesimulujú priamo stav akými prebiehajú jednotlivé mechanizmy v živom organizme. Preto je použitie experimentálnych zvierat nevyhnutné na opísanie nových mechanizmov ischemicko-reperfúzneho poškodenia kostrovej svaloviny ako aj potencionálne pozitívny vplyv antioxidačne pôsobiacich látok.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Z hľadiska experimentálneho výskumu je nutné zabezpečiť dostatočný počet experimentálnych zvierat so snahou o redukciu chýb v priebehu spracovania výsledkov ako aj na zabezpečenie štatisticky spracovateľných výsledkov. Redukcia bola uskutočnená vzhľadom na reperfúzny interval, kde by bolo aj prínosom uskutočniť viacero reperfúzných periód, avšak vzhľadom na počet sme zahrnuli časové intervaly, ktoré najmarkantnejšie opisujú vznikajúce zmeny. Navrhnutý počet zvierat bol ustanovený na základe súčasných metód v experimentálnom výskume ako aj vzhľadom na štatistickú signifikanciu.

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)

Výber druhu laboratórneho zvierat'a sa opiera o mnohé vedecké práce z odboru experimentálnej chirurgie, ktorý detailne aplikuje poznatky o rozvoji a patogenéze zmien prebiehajúcich pri jednotlivých chorobných stavoch. Aplikácia a translácia stavov z klinickej medicíny do experimentálnych podmienok predstavuje základnú jednotku výskumu v tejto oblasti. Redukcia stresu, utrpenia a bolesti bude zabezpečená na podklade aplikácie anestetík a analgetík perioperačnom ako aj pooperačnom období, aby bol čo v najvyššej miere redukovaný distress zvierat.

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

Názov projektu: Hodnotenie antineoplastických vlastností prirodzených substancií v modeli rakoviny prsníka

Predkladateľ: _____

Netechnické zhrnutie projektu 2679/14-221

a) Informácie o cieľoch projektu:

Cieľom projektu sú *in vivo* štúdie, v ktorých budeme analyzovať antineoplastický účinok prirodzených substancií v modeli rakoviny prsníka u samíc potkanov. Postupy budú tvoriť dlhodobé štúdie s chemicky indukovanou mamárnou karcinogénou u samíc potkanov. Postupne vyhodnotíme tumorsupresívnu efektivitu pamajoránu obyčajného - oregana (*Origanum vulgare*), listy rozmarínu lekárskeho (*Rosmarinus officinalis*), kôpor voňavý (*Anethum graveolens*), výťažok semena pagaštanu konského (*Aesculus hippocastanum*), škoricie čínskej (*Cinnamomum cassia*), prípadne aj inej prirodzenej substancie.

V experimentoch budú zvieratá týždenne vážené a palpované. Pri pitve odoberieme krv, nádory vypitveme a vyhodnotíme prípadné makroskopické zmeny na sledovaných orgánoch. V jednotlivých skupinách štatisticky vyhodnotíme parametre mamárnej karcinogenézy: frekvenciu, latenciu, incidenciu, objem nádorov. Vykonáme histologickú typizáciu nádorov, ich grading a staging. Stanovíme vybrané parametre plazmatického lipidového a sacharidového metabolizmu (predpokladané sú preventívne účinky fytosubstancií aj u kardiovaskulárnych ochorení) a vplyv prírodných látok na telesnú hmotnosť a príjem potravy. Budeme hodnotiť mechanizmus účinku použitých substancií (Western blot analýza markerov v mamárnych nádoroch). Vyhodnotíme parametre apoptózy (Bcl-2, Bax, kaspáza-3, príp. iné), angiogenézy (VEGF, VEGFR-2, FGFb) a proliferácie (Ki67). Stanovíme parametre oxidačného poškodenia v nádorových bunkách (tryptofán, dityrozín, konj.lyzín) a expresiu endogénnych antioxidačných enzýmov (glutathion peroxidáza, superoxid dizmutáza, kataláza).

b) Prínos projektu:

Na základe protinádorových vlastností môžu fytochemikálie v prirodzených substanciách priniesť pre klinickú onkológiu nové terapeutické prístupy v či už v chemoprevencii alebo v liečbe nádorového ochorenia. Na našom pracovisku sa problematikou experimentálnej mamárnej karcinogenézy zaoberáme vyše 16 rokov, pričom analýze protinádorového účinku fytofarmák/fytosubstancií sa venujeme posledné 4 roky.

Výhody diéty bohatej na rastlinné zložky spočívajú v komplexnom pôsobení veľmi širokého spektra fytochemikálií. Práve aditívne, či synergické pôsobenie fytochemikálií zodpovedá za ich predpokladané antioxidačné a protinádorové účinky. Táto skutočnosť vysvetľuje fakt, prečo samostatne aplikovaný antioxidant nemôže nahradiť kombinované pôsobenie desiatok rôznych fytochemikálií prítomných v rastlinných produktoch a nemôže dosiahnuť s nimi porovnateľné účinky na zdravie človeka (Liu, 2004).

V experimentálnej rakovine prsníka *in vivo* a *in vitro* doteraz neboli hodnotené antineoplastické účinky ani jednej z prirodzených substancií, ktoré plánujeme testovať. **Oregano** je zaujímavé obsahom 56 chemických látok patriacich prevažne k terpenoidom a fenolickým látkam. Oregano sa vyznačuje vysokým zastúpením hlavne karvakrolu, tiež tymolu, gama terpinínu, skvalénu, p-ciméninu, linalolu a iných (Hu et al., 2004).

Fytochemikálie listov **rozmarínu** sa vyznačujú vysokým zastúpením terpenoidov 1,8-cineolu, kamforu, alfa-pinénu, limonínu, kamfénu a linalolu (Szumny et al., 2010). Z fenolických látok rozmarín obsahuje hlavne karnozol a rosmarinol. Chemická analýza **kôpru** zistila prítomnosť 35 fytochemikálií – a to hlavne karvon, alfa-felandrín, limonín, 2-propanon, dillapiol, linalool, kyselinu linolénovú, trans-anetol, p-anisaldehyd, myristicín, kyselinu rosmarínovú a iné (Orhan et al., 2013, Isbilir et al., 2011). Liečebné účinné látky v **semenách pagaštanu konského** tvorí zmes triterpénových saponínov – escín, aglikóny, protoescigenín, baritogenol a flavónové glykozidy a katecholové triesloviny (Mojžišová et al., 2009). **Škorica** je bohatá na anthokyaníny, cinamaldehyd, eugenol, cineol, cinamyl acetát.

Chceme zdôrazniť, že riešením tohto projektu získame prvotné experimentálne výsledky, ktoré môžu byť veľmi prínosné pre klinickú prax. V projekte budeme analyzovať základné parametre tumorového rastu a určíme histologickú typizáciu nádorov. Budeme hľadať mechanizmus účinku očakávaného chemopreventívneho pôsobenia použitých farmák. Vyhodnotíme celkové vedľajšie účinky látok na organizmus zvierat, stanovíme parametre lipidového a sacharidového metabolizmu. Prínosné bude porovnanie *in vivo* a *in vitro* účinkov fytosubstancií.

c) Počet a typ zvierat:

V projekte použijeme panenské samice laboratórnych potkanov kmeňa Sprague-Dawley v celkovom počte 375 kusov.

Predpokladaná doba riešenia projektu – 4 roky (1. 1. 2015 - 31. 12. 2018), počas ktorých uskutočníme **5 pokusov**, pričom v každom použijeme 75 zvierat.

d) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

K metóde použitej v predkladanom projekte nie je možné využiť alternatívne metódy, pretože chemopreventívum sa musí testovať aj na celistvom organizme, nestačí iba testovanie *in vitro* na bunkových líniiach, vzhľadom na to, že pri týchto experimentoch nie je možné sledovať komplexný vplyv všetkých parametrov a súčinnosti v celistvom organizme. Oregano, kôpor, pagaštan, škorica ani rozmarín neboli doteraz testované v uvedenom modeli mamárnej karcinogenézy u potkanov (viď priložené výpisy z databázy Web of Science).

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

Najpoužívanejším **laboratórnym modelovým zvieraťom** sú hlodavce, pretože majú mnohé jedinečné vlastnosti, ktoré ich predurčujú k získavaniu a hodnoteniu všeobecných princípov experimentálnej onkológie. Potkan je najnižším druhom živočíchov, ktorý vyhovuje danému typu experimentov, t.j. nie je nahraditeľný iným druhom. Hlavnou výhodou použitia potkanov je to, že ich nádory mliečnej žľazy sa veľmi podobajú ľudským, tak v etiológii ako aj v patológii (Medina et al., 1982). Veľmi dôležitým kritériom v experimentálnej onkológii na definovanie terapeutických možností alebo karcinogénnej aktivity farmaka je spontánny výskyt tumorov. Vďaka spontánnemu vzniku nádorov pri

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu: 2636/14-221

Názov projektu:

„*In vivo* infekcia kurčiat kmeňom *Campylobacter jejuni* po preventívnej aplikácii bakteriocín-produkujúceho a probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* AL41, sledovanie imunopatologických zmien v čreve a krvi a expresie cytokínov v rôznych tkanivách“

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

kurča, cytokíny, *Enterococcus faecium* AL41, *Campylobacter jejuni*

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)

Zvýšený výskyt kampylobakteriôzy u ľudí z dôvodu kolonizácie čreva kurčiat *Campylobacter jejuni* a potriesnením mäsa počas spracovania vedie k hľadaniu postupov, ktoré by mohli napomáhať pri znižovaní počtov týchto kolonizujúcich baktérií, a tým znižovať riziko infekcie v humánnej populácii.

V predkladanom projekte bude *in vivo* u kurčiat testovaný preventívny účinok probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* AL41 (produkujúceho antimikrobiálnu látku – bakteriocín EntM) na infekciu *Campylobacter jejuni*. Overovanie prospešnosti probiotického kmeňa v interakcii s kampylobakterom bude zamerané na zisťovanie imunologických, morfológických a mikrobiologických parametrov. Determinované zmeny budú zisťované v krvi, slezine, ceku a truse metódami polymerázovej reakcie (RT-PCR), prietokovej cytometrie, spektrofotometrie, histológie, imunohistochemie a bakteriológie. Testovanie tohto kmeňa *in vitro* u kurčiat už bolo vykonané po infekcii so *Salmonella* Enteritidis PT4 a preukázalo pozitívny vplyv na produkciu cytokínov imunokompetentnými bunkami izolovanými z krvi kurčiat.

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

Predpokladaný prínos bude spočívať v získaní poznatkov vplyvu uvedeného probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* AL41 na imunitný stav kurčiat bez infekcie, aj po infekcii s *Campylobacter jejuni* a zistenia možnosti ovplyvnenia kolonizácie čreva kurčiat. V budúcnosti by tieto poznatky mohli byť využité na vývoj liečebného prípravku pri prevencii znižovania osídľovania čreva kampylobakterom jeho vytesnením alebo ovplyvnením skladby hlienovej vrstvy probiotickým kmeňom.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

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

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

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

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Z dôvodu sledovania interakcií medzi *C. jejuni* a *E. faecium* AL41 v organizme je použitie živých zvierat nevyhnutné. Jedným z dôvodov je detekcia oboch kolonizujúcich baktérií a ich počtov, druhým dôležitým dôvodom je možný výskyt morfológických zmien v čreve po aplikácii oboch uvedených baktérií. Aplikácia probiotického kmeňa v súčinnosti s kampylobakteriálnou infekciou môže viesť aj k zmenám parametrov v periférnej krvi a parenchymatóznych orgánov, preto je potrebné zaradiť testovanie na živých zvieratách.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

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

3. Zjemnenie:

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

Do pokusu budú zaradené jednodňové kurčatá a infekcia bude vykonaná na 4. deň z toho dôvodu, že so stúpajúcim vekom sa zvyšuje rezistencia kurčiat na kampylobakteriálnu infekciu. Niekedy u kurčiat nespôsobuje zjavné klinické príznaky. V našom prípade pôjde o vyššiu dávku nízko invazívneho kmeňa, ktorý sa klinicky môže prejaviť iba slabou hnačkou, ale potenciálne s možnosťou indukcie zmien detegovaných genetickými, histologickými, imunologickými a bakteriologickými metódami.

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

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

V priebehu pokusu bude zvieratám venovaná štandardná veterinárna starostlivosť. Kontrola bude vykonávaná veterinárnym lekárom, zodpovedným za starostlivosť o zvieratá. Zvieratám nehrozí ani predávkovanie ani intoxikácia, jedná sa v podstate o štandardné postupy pre daný typ overovania pri zachovaní všetkých podmienok podľa prílohy č. 5 k nariadeniu vlády č.377/2012 Z.z.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

PRÍLOHA 2

Netechnické zhrnutie projektu 2616/14-221

Na rakovinu zomiera ročne viac ako desať miliónov ľudí, a preto je predovšetkým jej skorá diagnostika stredobodom záujmu. Hoci v klinickej praxi existuje množstvo onkomarkerov, iba niekoľko z nich je dostatočne senzitívnych a špecifických na to, aby dokázali zachytiť rakovinu v jej včasnom štádiu vývoja, kedy je najlepšie prístupná liečbe. Dnešné metódy diagnostiky onkologických ochorení nie sú dostačujúce, nádor je často diagnostikovaný až vo vyšších štádiách, čo často znemožňuje účinný terapeutický zásah. Na rýchlu diagnostiku sú vhodné najmä techniky vyznačujúce sa čo najmenšou invazivitou. Jednou z potenciálnych diagnostických alternatív, vzbudzujúcou veľký záujem je fluorescenčná spektroskopia. Prirodzene fluoreskujúce látky sú metabolitmi mnohých významných metabolických dráh, typické najmä konjugovanými násobnými väzbami. Pre nádorové tkanivo je typická alterácia metabolizmu, vrátane metabolizmu natívnych fluorofórov, čím je ovplyvnená aj prirodzená fluorescencia biologických tekutín vrátane moču. Okrem vyšetrenia moču je jednou z neinvazívnych diagnostík aj termovízia. Termovízia alebo termovízne zobrazovanie je založené na teórii, že okolie najmä prsných, ale aj inde lokalizovaných nádorov, je teplejšie ako okolité tkanivá. Technika využíva infračervenú kameru na zachytenie „teplotných obrázkov“ na detekciu rakoviny. Termovízia je jednou z najnovších metód na štúdium diagnostiky nádorových ochorení, založenou na teórii zvyšujúcej sa teploty v potenciálnom mieste vzniku nádoru, kvôli zvýšenej miere angiogenézy a potenciálnemu zápalu.

Cieľom tohto projektu (projekt základného výskumu) je analyzovať fluorescenčné matrice moču na prítomnosť aj nepredvídaných metabolitov, ktoré sú v súčasnosti perspektívnym nástrojom v diagnostike karcinómov prsníka, hrubého čreva a iných druhov rakoviny a sledovanie teplotných gradientov, zachytených termovíziou kamerou, meniacich sa v čase so vznikajúcimi a rastúcimi nádormi.

V súčasnosti stále pretrváva nedostatok klinických štúdií, zaoberajúcich sa natívnym vyšetrením moču onkologických pacientov a využitie termovízie pri diagnostike rakoviny je dokonca úplnou novinkou. Preto je tento fakt v centre záujmu vedeckej komunity.

V rámci projektu zvieratám indukujeme karcinogézu, ktorá môže vyvolať u zvierat nepriaznivú ujmu v podobe mierneho stresu, resp. krátkodobej miernej bolesti. V prípade zväčšenia nádoru, u ktorého by vzniklo riziko krvácania a zároveň by u zvierat'a neboli pozorované zmeny v správaní spôsobené bolesťou, rozhodne vedúci projektu ^{o preloženie do samostatnej kľetky} s osobitnou záznamovou kartou a zároveň so zvýšenou ostražitosťou a pozornosťou, venovanou zvierat'u. V prípade neočakávaného zhoršenia zdravotného stavu zvierat počas experimentu rozhodne vedúci projektu o usmrtení zvierat'a chloralhydrátom. Za súlad vykonávaného projektu je zodpovedný vedúci projektu.

Predkladaný projekt je v súlade so zásadami 3R:

Zásada nahraditeľnosti:

Nádorové ochorenia sú druhou najčastejšou príčinou úmrtí na celom svete. Dnešné metódy diagnostiky onkologických ochorení nie sú dostačujúce, nádor je často diagnostikovaný až vo vyšších štádiách, čo mnohokrát znemožňuje účinný terapeutický zásah. Na rýchlu diagnostiku sú vhodné najmä techniky vyznačujúce sa čo najmenšou invazivitou. Vzhľadom na charakter pokusu je nevyhnutné, aby bol experiment prevedený v podmienkach *in vivo*, ktoré tvoria systém dejov a odpovedí na stimuly z vonkajšieho a vnútorného prostredia. *In vitro* podmienky nikdy nevystihnú takú komplexnosť stimulov a dejov, ako je to v živom organizme. Moč zvierat predstavuje komplex metabolitov, ktoré sa postupne uvoľňujú v priebehu času a tým tvoria unikátnu tekutinu. Tak isto, vznikajúce nádory tvoria súbor rozličných buniek a ich meniacich sa línií a vytvárajú tak mikroprostredie s meniacou sa teplotou a charakteristickými vlastnosťami. *In vivo* pokusy tvoria nepostrádateľný stupienok v predklinickom výskume. Projekt je zároveň naplánovaný tak, aby výsledky z neho mohli prejsť priamo do klinickej praxe.

Zásada zníženia:

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

Zásada zdokonalenia (zjemnenia):

Počas experimentu bude zabezpečená komplexná starostlivosť o zvieratá. Bežnú starostlivosť o zvieratá budú zabezpečovať laborantky, ktoré sú príslušne školené a poučené. Všeobecne sa dá konštatovať, že uvedené experimentálne postupy nespôsobia neprimeraný diskomfort pokusných zvierat a že ide o štandardné typy pokusov (bežne používané v špičkových vedeckých pracoviskách) v súlade s etickými požiadavkami. Je však potrebné rátať s nepriaznivou ujmou zvierat v podobe mierneho stresu. V prípade zväčšenia nádoru, u ktorého by vzniklo riziko krvácania a zároveň by u zvieraťa neboli pozorované zmeny v správaní spôsobené bolesťou, rozhodne vedúci projektu, RNDr. Terézia Kisková, PhD., o preloženie do samostatnej kletky s osobitnou záznamovou kartou a zároveň so zvýšenou ostražitosťou a pozornosťou, venovanou zvieraťu. V prípade neočakávaného zhoršenia zdravotného stavu zvierat počas experimentu rozhodne vedúci projektu o usmrtení zvieraťa chloralhydrátom. Za súlad vykonávaného projektu je zodpovedný vedúci projektu.

Projekt nebude podliehať opätovnému schvaľovaniu.

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU 2592/13-221

Názov projektu:

**VZNIK A PROGRESIA MAMÁRNEHO KARCINÓMU U POTKANA A ICH VPLYV
NA INDUKCIU NEUROZÁPALU**

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

- mamárny karcinóm, laboratórne potkany, neurozápal, periférny zápal, neurobiológia nádorov

Účel projektu:

- a) základný výskum
- b) translačný alebo aplikovaný výskum
- c) regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z. z.)
- d) ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat
- e) ochrana druhov
- f) vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie
- g) zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch.

Opísať ciele projektu:

- A/ zistiť, či chemickou karcinogénou indukovaný mamárny karcinóm vyvoláva vznik periférneho zápalu,
- B/ zistiť, či chemickou karcinogénou indukovaný mamárny karcinóm vyvoláva zápalovú reakciu mozgu,
- C/ zistiť, v ktorých oblastiach mozgu, predovšetkým hypotalamu, dochádza k zápalovým reakciám,
- D/ zistiť, či zápalová reakcia mozgu a periférny zápal navzájom korelujú, a či sú závislé, resp. odrážajú stupeň nádorovej progresie.

Prínos z vykonaného projektu:

Zápal v mozgu, ktorý vzniká v dôsledku periférneho nádorového rastu môže zásadne ovplyvniť regulačné pôsobenie centrálného nervového systému. Jedným z takýchto negatívnych dôsledkov je potenciácia nádorovej kachexie. Pritom nádorová kachexia signifikantne determinuje prežívanie onkologických pacientov. Preto skúmanie neurozápalu v animálnych modeloch nádorov môže pripieť k zavedeniu takých terapeutických postupov, ktoré by neurozápal tlmili, obmedzovali rozvoj nádorovej kachexie, a tým pozitívne ovplyvňovali prežívanie onkologických pacientov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*), samice kmeňa Sprague-Dawley: 108 ks

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

Vzhľadom nato, že laboratórnym potkanom bude chemicky indukovaný vznik mamárneho karcinómu, budú zvieratá vystavené nepriaznivým účinkom súvisiacim s progresiou tohto ochorenia, ktoré ovplyvnia ich zdravotný stav. Všetkým predvídateľným zdravotným komplikáciám sa budeme snažiť zabrániť, prípadne ich zmierniť.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

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

- intraperitoneálne podanie N-metyl-N-nitrózurey,
- intraperitoneálne podanie anestézie,
- intraperitoneálne podanie lipopolysacharidu.

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

- zápal vyvolaný intraperitoneálnym podaním LPS,
- rast mamárnych karcinómov.

Uplatňovanie zásad 3R:

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

Neurozápal, periférny zápal a nádorovú progresiu je možné študovať len na animálnom modeli s dostatočne vyvinutým nervovým systémom, imunitným systémom a s možnosťou indukcie mamárneho karcinómu. Preto nie je možné navrhovaný experiment realizovať na systematicky nižšom druhu živočíchov, *in vitro* a ani za využitia počítačovej simulácie. Je nevyhnutné využiť laboratórne potkany, z dôvodu indukcie mamárneho karcinómu samice, kmeňa Sprague-Dawley.

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

Počet zvierat je minimalizovaný na najmenšiu možnú hranicu tak, aby získané údaje mohli byť štatisticky spracované a mali serióznú výpovednú hodnotu. Avšak, z dôvodu reprodukovateľnosti a validity pokusov a z dôvodu nie 100% incidencie nádorov u laboratórnych zvierat po chemicky navodenej karcinogenéze, je potrebné zaradiť do jednej experimentálnej skupiny priemerne 10 - 12 zvierat. V kontrolných skupinách postačujú 4 zvieratá.

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)

Utrpenie zvierat bude minimalizované dodržiavaním každej z piatich zásad uvádzaných pri definícii welfare zvierat. Všetky experimentálne procedúry budú uskutočňované tak, aby zvieratá čo najmenej strádali. Zvieratá budú chované v klietkach maximálne po 3 za prísunu peletovanej stravy a vody *ad libitum*, čo im umožní plne realizovať prirodzené formy správania, vrátane sociálneho. Zdravotný stav zvierat bude denne monitorovaný. Pri výskyte zhoršeného zdravotného stavu u zvierat, budú tieto po konzultácii s veterinárnym lekárom z pokusu vyradené a humánne usmrtené.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno nie

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu 2582/14-221

Názov projektu:

Kognitívny deficit ako možný cieľ antidepressívnej liečby

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

depresia, paroxetín, vortioxetín, kognitívny deficit

Účel projektu:

- a) základný výskum
- b) translačný alebo aplikovaný výskum
- c) regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z. z.)
- d) ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat
- e) ochrana druhov
- f) vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie
- g) zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch.

Opísať ciele projektu:

V plánovaných experimentoch budeme overovať hypotézy, že:

- 1) animálny model depresie založený na tryptofánovej deplícii vyvolá u potkanov kognitívny deficit
- 2) vortioxetín bude pôsobiť antidepressívne v našom SSRI rezistentnom modeli depresie
- 3) vortioxetín bude pôsobiť pozitívne na kognitívne funkcie a zvráti kognitívny deficit

Prínos z vykonaného projektu:

V súčasnosti neexistuje optimálny animálny model depresie, ktorý by súčasne zahrňoval aj simuláciu porúch kognitívnych funkcií. Očakávame, že chronická deplécia tryptofánu vyvolá špecifický komplex zmien správania a chemických markerov, ktoré budú relevantné nielen k depresívnej poruche, ale tiež ku kognitívnemu deficitu. V prípade potvrdenia našich hypotéz poukážeme na vortioxetín ako relevantné liečivo pre farmakoterapiu klinicky závažných porúch kognitívnych funkcií u depresívnych pacientov. Výsledky, ktoré predpokladáme

získať pri overovaní stanovených hypotéz prehĺbia poznatky o patofyziológii depresie a kognitívneho deficitu.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórne potkany *Rattus norvegicus*, samce a samice kmeňa Sprague-Dawley (n=280).

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

V plánovanom experimente bude zvieratám podávaná ochudobnená o tryptofán. Keďže ide o esenciálnu aminokyselinu, ktorú si organizmus nedokáže syntetizovať, tak dôjde k narušeniu metabolickej rovnováhy organizmu a k rozvoju depresívneho správania.

Zvieratám budú súčasne podávané antidepresíva namiešané v strave. Jedine ondansetron bude podávaný injekčne, ale len jednorázovo.

Pred koncom experimentu budú zvieratá testované v teste na rozpoznávanie nového objektu (NOR test, zvieratám nespôsobuje bolesť ani nepohodu) a v teste núteného plávania (FST, je pre zvieratá nepohodlný a vyčerpávajúci).

Na konci experimentu budú zvieratá usmrtené dekapitáciou, ktorú vykoná skúsený vedecký pracovník. Dekapitácia bude rýchla, šetrná a utrpenie zvierat bude minimalizované na najmenšiu možnú mieru.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

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

- jednorazové podávanie ondansetronu, i.p.

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

- test núteného plávania (FST)

Uplatňovanie zásad 3R:

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

V predloženom projekte budeme sledovať rozvoj kognitívneho deficitu v animálnom modeli depresie. Zvieratám budeme následne podávať antidepresíva s cieľom zvrátiť vyvolané zmeny v kognícii a depresívnom správaní. Tieto experimenty preto nie je možné uskutočniť na nižších živočíchoch alebo bunkových kultúrach. Experimenty v predloženom projekte vyžadujú použitie animálneho modelu potkana kmeňa Sprague-Dawley, s ktorým máme bohaté skúsenosti.

Príloha č. 2 podľa §40 nariadenia 377/2012 k žiadosti o schválenie projektu „Stanovenie referenčných hodnôt vybraných biochemických a hematologických ukazovateľov u potkanov kmeňa Wistar“

2575/14-221

Netechnické zhrnutie projektu

Referenčné údaje alebo očakávané hodnoty niektorých fyziologických, reprodukčných, biochemických a hematologických parametrov môžu byť užitočným nástrojom pre interpretáciu toxikologických a ochranných, metabolických a mnohých ďalších vedeckých štúdií. Násť takéto informácie je občas zložitá. Aj keď sú výsledky kontrolnej skupiny zahrnuté a porovnávané s testovanými údajmi, ako samostatné údaje v literatúre sú prezentované zriedka a skoro nikdy ako hlavný predmet experimentálnej práce, a preto je problém aj pri vyhľadávaní podľa kľúčových slov. Z tohto dôvodu sú kontrolné dáta často prehliadané pri vyhľadávaní pomocou počítača.

Vedecké ciele projektu

Hlavným cieľom projektu bude doplniť vybrané fyziologické ukazovatele u potkanov kmeňa Wistar:

- sledovanie vybraných biochemických ukazovateľov v období pol roka trvania pokusu
- odber vybraných orgánov pre stanovenie koncentrácie Hg a Cd u potkanov v období pol roka trvania pokusu

Vedľajšími cieľmi projektu sú:

- upresnenie trvania rozhodujúcich etáp a podobnosti/odlišnosti medzi ľudským a potkaním vekom
- vývoj príjmu krmiva a vody
- ostatné vybrané biochemické parametre v krvi
- hematologické parametre
- hmotnosť vybraných orgánov
- sledovanie výskytu patologických zmien v organizme

Kvôli určeniu dynamiky vývoja sledovaných fyziologických parametrov budeme potkany sledovať a vyšetrovať v týždňových intervaloch počas 26 týždňov so začiatkom od 3. mesiaca života (0. deň sledovania).

Na základe získaných výsledkov bude ďalším cieľom projektu porovnať získané parametre s už existujúcimi výsledkami a na základe analýzy vytipovať hlavné neistoty (či už metodologického, technického alebo biologického charakteru).

Konkrétny návrh postupu na dosiahnutie cieľov projektu, vrátane časového harmonogramu na jednotlivé roky riešenia

Do pokusu bude zaradených 40 potkanov kmeňa Wistar (20 samcov a 20 samíc, vo veku 12 týždňov). Budú držané v klietkach po 2 jedincech rovnakého pohlavia s voľným prístupom k vode a potrave (Larsenova diéta), pri teplote $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relatívnej vlhkosti 50% so svetelným režimom 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Pokus sa ukončí po 26 týždňoch trvania. Experimenty budú vykonané na pracovisku,

Koncentrácie antioxidantov by sme potrebovali doplniť z dôvodu nesúrodosti získaných výsledkov v predchádzajúcom pokuse, kde nám výsledky vykazujú odchýlky a pre štatistické spracovanie výsledkov by sme potrebovali ďalšie údaje.

Orgány by sme potrebovali ako kontrolu k predchádzajúcemu pokusu, kde sme odobrali orgány pre stanovenie ťažkých kovov (Hg, Cd) v orgánoch (nebolo hlavným cieľom pokusu) z dôvodu rôzneho spracovania vzoriek pre stanovenie týchto kovov a tiež finančnej náročnosti stanovení a tým pádom potreby dvojnásobného počtu kontrol.

Ďalej by bolo prínosom získanie širokého rozsahu biochemických a hematologických parametrov (zo získanej krvi toľko parametrov, koľko budeme schopní stanoviť), ďalej anatomických a fyziologických ukazovateľov, ktoré môžu byť použité pre porovnanie, resp. extrapoláciu s humánnymi parametrami, a tým je možné získať lepšiu a presnejšiu predstavu pri vyvodzovaní záverov z experimentov na zvieratách, ktoré by chceli poukázať na dopad pre ľudskú populáciu.

Projekt je súčasťou schváleného grantu VEGA č. 1/0901/13.

Dodržiavanie zásady 3R

Pri riešení a zostavení pokusov bude venovaná maximálna pozornosť moderným trendom starostlivosti a ochrany zvierat, zohľadnenie zásady 3R.

Reduction. Počty zvierat boli zredukované na dostatočne početnú skupinu pre získanie potrebných vzoriek. Priebeh pokusu je naplánovaný tak, aby odobraná vzorka mohla byť do ďalšieho odberu plnohodnotne nahradená organizmom bez ovplyvnenia ďalších výsledkov.

Replacement. Keďže sa jedná o získanie fyziologických referenčných hodnôt daného druhu, nie je možné tento druh pokusu realizovať použitím inou metódou ako experimentom na pokusnom zvierati.

Refinement. Pri pokuse bude využívaný profesionálny prístup a manipulačné postupy minimalizujúce diskomfort zvierat. Experimenty budú vykonané na pracovisku, ktoré má akreditáciu na vykonávanie pokusov na zvieratách za podmienok a v súlade s Nariadením vlády SR uverejneným v Zbierke zákonov č. 377/2012. Zdravotný stav zvierat bude denne kontrolovať vedúci pokusu alebo ním poverená osoba s veterinárnym vzdelaním, resp. vedúca pokusného pracoviska v rámci svojej dennej inšpekcie. Zvieratá sú z vlastného chovu, preto nevyžadujú karanténizáciu, len krátku adaptáciu (2 – 3 dni) na nového spolubývajúceho a miestnosť. Invazívne postupy budú bezbolestné a bude ich vykonávať vedúci projektu alebo ním poverená a zaškolená osoba s vysokoškolským vzdelaním. Ide o odober krvi z chvostovej veny. Na konci pokusu budú zvieratá eutanazované predávkovaním kombináciou anestetík xylazín a ketamín a kadávery budú podrobené patologicko - anatomickej pitve.

Spätné posúdenie

nie

Netechnické zhrnutie projektu: 2575/14-221/1a

Názov projektu: Vplyv humínových a polyénových kyselín na produkčné zdravie zvierat, antioxidačný status, aktivitu mitochondrií, lipidový profil, resorpciu niektorých toxických kovov a pesticídov z krmiva.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: etická komisia LF UPJŠ č. 4/2013

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): olovo, otrava, prevencia, liečba

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:

Cieľom je preveriť možnosť prevencie a liečby otráv s olovom perorálnou aplikáciou prírodných látok, humínových kyselín, ktoré sú povolené EMEA.

Nutnosť vykonať animálny experiment vychádza z potreby nájsť účinný prírodný prostriedok podávaný perorálne na prevenciu, ale najmä na liečbu otráv olovom a nahradiť tak doteraz používanú, nie veľmi efektívnu liečbu i.v. a/alebo perorálnym podávaním rôznych chelatačných látok. Spomínané látky, napr. DMSA (2,3 dimerkaptosukcinát), CaNa_2EDTA sa používajú intravenózne, DMPS (2,3 dimerkapto-1-propánsulfónová kyselina) a penicillamin perorálne. Uvedené syntetické látky sa používajú iba v liečbe akútnej otravy. Ani v databázach PubMed, Medline alebo Cochrane Database for Systematic Reviews nie sú dostatočné údaje o liečbe akútnej otravy olovom a žiadne o chronickej.

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

Predpokladaným prínosom je možnosť znížiť akumuláciu olova v tele zvierat a ľudí žijúcich alebo pracujúcich v zamorenom prostredí, resp. získať účinný a neinvázny spôsob liečby postihnutých zvierat a ľudí.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórne potkany kmeňa Sprague-Dawley v celkovom počte 210 ks pre tri etapy výskumu.

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

Podávanie olova v uvedených dávkach môže negatívne ovplyvniť funkciu CNS (kognitívne funkcie), periférnych nervov a obličiek a vyvolať anémiu (inhibíciou syntézy hému). Uvedené zmeny nevyvolávajú bolesť.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Podľa prílohy č. 4 Nariadenia vlády č. 377/2012 Z.z. o Oddieli 3, kategória krutosti patrí medzi stredné body d a i. Ukončenie experimentu Oddiel I – bez možnosti krutosti.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Nutnosť vykonania pokusu na laboratórnych zvieratách vychádza z toho, že iné alternatívne metódy uvedené v ECVAM a ICCVAM neumožnia odhaliť kompletnú metabolickú odozvu organizmu, jednotlivých orgánov a bunkových organel.

2. Redukcia počtu zvierat:

V projekte je počet zvierat redukovaný na min. tak, aby sa ešte dal štatisticky vyhodnotiť vplyv v každej fáze pokusu. Počet zvierat je menší ako je dané v OECD (test č. 452) pre štúdium chronickej toxicity kde sa používa 20 ks z každého pohlavia. V našom pokuse je len 18 zvierat z jedného pohlavia.

3. Zjemnenie:

V pokuse používané laboratórne zvieratá sú v podstate domestikované. Počas celého pokusu budú v kontakte s tými istými ľuďmi, čím je eliminovaný stres. Podávanie humínových kyselín v potrave a octanu olovnatého v pitnej vode nie je násilnou aplikáciou látok a nenarušuje welfare zvierat. Pokus sa uskutoční v Laboratóriu výskumných biomodelov LF UPJŠ, ktoré pracuje v súlade s § 25 a 26 Nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z. z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na vedecké alebo vzdelávacie účely.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: ☒ áno ☐ nie

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu 2422/14-221

Názov projektu: Úloha fyziologicky aktívnych iónov Mg^{2+} a Zn^{2+} v luminálnej regulácii srdcového ryanodínového receptora.

Kľúčové slová: RYR2 kanál, luminálna regulácia, luminálne Mg^{2+} , luminálny Zn^{2+} , planárna lipidová membrána

1. Účel projektu

Hlavným cieľom projektu je preskúmať luminálnu reguláciu RYR2 kanála zo srdca potkana komplexnejšie, čo sa týka katiónového zloženia luminálneho prostredia kanála.

2. Ciele projektu:

Ca^{2+} potrebný na kontrakciu srdcových myocytov sa uvoľňuje z lumenu sarkoplazmatického retikula (SR) cez ryanodínový receptor (RYR2). Hlavnou regulačnou oblasťou RYR2 kanála je jeho objemná cytozolická doména. Avšak aj menšia luminálna časť sa významne zapája do regulácie, pričom dysfunkcia regulácie kanála z tejto strany môže viesť až k vážnym poruchám srdcového rytmu. Hlavným fyziologickým regulátorom RYR2 kanála z luminálnej strany je Ca^{2+} . V lumene SR sú však prítomné aj ióny Mg^{2+} a Zn^{2+} , ktoré taktiež môžu interagovať s luminálnymi RYR2 miestami. Predpokladá sa, že tieto interakčné luminálne miesta sú umiestnené buď priamo na kanálovom proteíne alebo na asociovanom proteíne – kalsequestríne (CSQ2). Naším cieľom je preskúmať luminálnu reguláciu RYR2 kanála komplexnejšie, čo sa týka katiónového zloženia jeho luminálneho prostredia. Konkrétne preštudujeme na úrovni jednotkových kanálov úlohu Mg^{2+} a Zn^{2+} v luminálnej regulácii RYR2 kanála v prítomnosti diastolickej alebo systolickej koncentrácie luminálneho Ca^{2+} . Pri interpretácii získaných výsledkov bude zohľadnená aj prítomnosť CSQ2 v RYR2 proteínovom komplexe testovaná vo vybratých experimentálnych podmienkach.

3. Prínos z vykonaného projektu

Luminálna regulácia RYR2 kanála sa v posledných rokoch stala veľmi atraktívnou oblasťou výskumu regulácie RYR2 kanála, pretože sa predpokladá, že jej dysfunkcia by mohla byť zodpovedná za generovanie závažných srdcových arytmií. Cieľom našej práce je preskúmanie luminálnej regulácie RYR2 kanála v experimentálnych podmienkach, ktoré bližšie mimikujú prirodzené katiónové zloženie luminálneho prostredia RYR2 kanála. Doteraz sa uvažovalo, že hlavným fyziologickým regulátorom kanála je luminálny Ca^{2+} , ale ukazuje sa, že je potrebné zvážiť aj účinok ďalších fyziologicky dôležitých katiónov - luminálneho Mg^{2+} a Zn^{2+} . Prínos našej práce vidíme v tom, že preskúmame reguláciu RYR2 kanála v podmienkach, ktoré komplexnejšie mimikujú katiónové zloženie luminálneho prostredia.

4. Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty

Na skúmanie funkcie RYR2 kanála je potrebné izolovať mikrozomálne vzorky obsahujúce iónové kanály zo srdcového tkaniva. V našich projektoch používame laboratórne potkany (kmeň WISTAR – samce). Protokol na izoláciu mikrozomálnych vzoriek sme optimalizovali tak, aby sme dosiahli maximálny výťažok RYR2 kanálov. Na jednu izoláciu potrebujeme srdcia zo štyroch potkanov, počet izolácií potrebných na dosiahnutie relevantných výsledkov je približne 18. Plánovaný počet zvierat na celú dobu riešenia projektu je 72.

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

Zvieratá až do začiatku pokusu nebudú vystavené žiadnemu nepriaznivému vplyvu ani ujme. Po navodení celkovej anestézie sa zvieratá usmrťia dislokáciou krčných stavcov a následne sa odoberie srdcové tkanivo, ktoré neskôr použijeme na prípravu mikrozomálnych vzoriek s RYR2 kanálmi.

6. Predpokladaná úroveň krutosti

Podľa prílohy č. 4 nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 377/2012 Z.z. klasifikujeme krutosť našich plánovaných postupov na úrovni „bez možnosti zotavenia“. Rýchlu a tým najmenej bolestivú smrť zvierat zabezpečíme dislokáciou krčných stavcov po uvedení zvieraťa do celkovej anestézie.

7. Uplatňovanie zásad 3R

požiadavka nahradenia

Alternatívnou formou ako skúmať vlastnosti RYR2 kanála je použitie rekombinovaných typov kanálov namiesto natívnych RYR2 kanálov izolovaných z ich prirodzeného prostredia - srdcového tkaniva zvierat. Avšak tento alternatívny prístup má jednu veľkú nevýhodu a tou je, že používané rekombinované systémy (napr. HEK293 bunky) nie sú tak dokonalé ako srdcové bunky a nedokážu exprimovať všetky súčasti proteínového komplexu RYR2 kanála s celou skupinou prídavných a pomocných proteínov, ktoré modulujú funkciu RYR2 kanála. A práve luminálna regulácia RYR2 kanála, ktorú chceme v projekte skúmať, je modifikovaná prídavnými proteínmi (najznámejší je kalsequestrín). Čiže ak chceme skúmať luminálnu reguláciu RYR2 kanála komplexne musíme použiť iba natívnu formu RYR2 kanála izolovaného zo srdcového tkaniva zvierat.

požiadavka obmedzenia

Izolačný protokol na izoláciu mikrozomálnych vzoriek s RYR2 kanálmi sme upravili tak, aby sme dosiahli maximálny výťažok RYR2 kanálov. Počet zvierat na jednu izoláciu sú 4 potkany, počet izolácií potrebných na dosiahnutie relevantných výsledkov je približne 18. Na riešenie projektu predpokladáme použiť 72 zvierat.

požiadavka zjemnenia

Ako zdroj srdcového tkaniva sme zvolili menších cicavcov – potkany, ktorých hrudný kôš sa dá rýchlo otvoriť a to nám umožňuje rýchly prístup k srdcu a manipuláciu s ním, čím sa významne znižuje riziko degradácie tkaniva a tým jeho nepoužiteľnosť. Aby sme minimalizovali bolesť, utrpenie a strach potkanov počas vpichu anestetika, používame iba tenké sterilné ihly s rozmermi 0,4 x 20mm (priemer x dĺžka). 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“.

NÁZOV PROJEKTU - 2364/14-221

VPLYV TESTOSTERÓNU A ESTRADIOLU PRI ROZVOJI A PRIEBEHU RENÁLNEJ FIBRÓZY NA MODELI REKURENTNÝCH INFEKCIÍ MOČOVÝCH CIEST, ČASŤ B

PREDKLADATEĽ PROJEKTU:

377/2012 Z.z. NARIADENIE VLÁDY Slovenskej republiky

§ 40 Netechnické zhrnutie projektu

CIEĽ PROJEKTU

Cieľom projektu je na etablovanom modeli rekurentných infekcií močových ciest realizovať sériu experimentov a popísať rozdiely v prieniku baktérií u mužov a žien. Základom tohto experimentu je fakt, že ženy trpia rekurentnými infekciami močových ciest niekoľkokrát častejšie ako muži. Časť týchto infekcií sa dá pripísať anatomickým pomerom, avšak tieto nevysvetľujú reálnu incidenciu u žien a mužov. Jeden z faktorov, ktorý by mohol hrať úlohu v patogenéze tohto ochorenia sú pohlavné hormóny a ich rozdielne zastúpenie/koncentrácia u mužov a žien. I keď samotná infekcia močových ciest je nezávažné ochorenie, jej rekurencia vedie k poškodzovaniu obličiek a následne vzniku podstatne závažnejšieho (biologicky aj ekonomicky) ochorenia a to je fibróza a v konečnom dôsledku aj zlyhanie obličiek. Projekt nadväzuje na časť A. rovnomenného projektu.

OČAKÁVANÝ PRÍNOS

Prínosom by v menej ideálnom prípade malo byť zistenie či sa pohlavné hormóny spolupodieľajú na patogenéze infekcií močového traktu. V optimálnom prípade očakávame aj mechanizmus tohto účinku ako i zistenie možností prevencie rekurentných infekcií. V najideálnejšom prípade sa nám podarí objasniť aj mechanizmu vzniku fibrózy obličiek pri rekurentných infekciách, čo by malo priamy dopad aj v liečbe pacientov. Potvrdenie tohto mechanizmu na ľudských vzorkách by malo byť ďalším štádiom nášho výskumu zameraného na obličky.

POČET ZVIERAT

Samce a samice myši kmeňa C57/Bl6 v počte 160 pre každé pohlavie

PODROBNÝ POPIS POKUSU

Všetky chronické ale aj opakované závažné akútne ochorenia obličiek vedú v konečnom dôsledku ku vzniku renálnej fibrózy. Odhaduje sa, že približne 500 miliónov ľudí v súčasnosti trpí obličkovými ochoreniami, pričom toto číslo rastie, za posledných 25 rokov sa počet chorých zdvojnásobil [1]. Pri obličkových ochoreniach sa pôvodne funkčné tkanivo mení na fibrotické, nefunkčné, preto výskum renálnej fibrózy má svoj opodstatnený význam. Dôležitosť fibrózy, a špeciálne tubulointersticiálnej komponenty v tomto procese je ilustrovaná jej úzkou koreláciou so znížením funkcie obličiek. Fibróza je základný biologický proces dôležitý pri oprave a regenerácii poškodeného tkaniva. Avšak, pretrvávajúca a nekontrolovaná tvorba fibrotického tkaniva sa stáva patologickou, keďže funkčné tkanivo je vymieňané za vznikajúce jazy, ktoré predstavujú nefunkčné tkanivo. Základnými charakteristikami renálnej fibrózy sú nadmerné ukladanie extracelulárnej matrix (ECM), infiltrácia zápalovými bunkami a zmena fenotypu lokálnych renálnych buniek ako aj ich strata.

Epidemiologické štúdie ukázali, že mužské pohlavie je rizikovým faktorom pri vzniku a rozvoji chronického ochorenia obličiek (chronic kidney disease, CKD) v porovnaní so ženami pred menopauzou, ale nie u postmenopauzálnych žien [2, 3]. Pohlavné hormóny sú zjavne hlavnými kandidátmi zodpovednými za pozorované medzipohlavné rozdiely v progresii renálnych ochorení. Napriek tomu, len málo experimentálnych štúdií sledovalo vplyv pohlavných hormónov na rozvoj renálnych ochorení.

Možnosti farmakologickej intervencie zahŕňajú podanie inhibítorov aromatázy, t.j. blokácia premeny testosterónu na estradiol (Anastrozol, Letrozol), inhibítorov reduktázy, t.j. blokácia premeny testosterónu na dihydrotestosterón (Finasterid), blokáciu väzby androgénov na androgénový receptor (Cyproteron acetát, Flutamid), alebo blokáciu estrogénových receptorov (Tamoxifén). Poznanie uvedených metabolických ciest a možnosti ich blokácie je dôležité pri potenciálnom skúmaní mechanizmu účinku androgénov alebo estrogénov.

Estradiol a fibróza

In vitro, estradiol potláča syntézu kolagénu v mezangiálnych bunkách [4, 5], znižuje proliferáciu mezangiálnych buniek [6], zabraňuje testosterónom sprostredkovanej apoptóze tubulárnych buniek [7] a stimuluje aktivitu metaloproteinázy-2 štiepiacej kolagén [8]. Stimulácia aktivity metaloproteinázy-2 po vystavení estradiolu bola tiež pozorovaná in vivo v myšacom modeli diabetu, spolu so zvýšenou aktivitou metaloproteinázy-9 a zníženou expresiou profibrotického TGF- β [9]. Tieto výsledky načrtli možné antifibrotické účinky, avšak žiadna štúdia nesledovala účinky estradiolu priamo na produkciu ECM renálnymi fibroblastmi – čo predstavuje principiálny proces a hlavne bunky pri vzniku renálnej fibrózy. Ochranné účinky estrogénov boli zaznamenané v modeli hypertenzie u potkanov, kde ovariektómia viedla k zvýšenej proteinúrii, zatiaľ čo orchiektómia mala ochrannú funkciu [10]. U myší náchylných na glomerulosklerózu, ROP Os/+ (oligosyndaktylné myši, rádiáciou indukovaný model so zvýšeným počtom a veľkosťou glomerulov), ovariektómia signifikantne zhoršila glomerulosklerózu v porovnaní s myšami bez ovariektómie [11]. V tom istom myšacom kmeni ROP Os/+, kontinuálna substitučná liečba estradiolom u ovariektomovaných myší viedla k ochranným účinkom na obličky [12]. Ovariektomované, estradiolom liečené potkany vystavené 5/6 nefrektómii, teda modelu chronického zlyhávania obličiek, mali zníženú expresiu profibrotických mediátorov ako TGF- β , PDGF-B a znížené vylučovanie proteínov močom, avšak autori nesledovali samotnú fibrózu ani infiltráciu zápalových buniek [13]. Liečba estradiolom u myší s nad-exprimovaným TGF- β v pečeni, znížila apoptózu

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu 2284/14-221

Názov projektu:

Sú antidepresívne a anxiolytické účinky fyzickej aktivity sprostredkované cez neuropeptidy?

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

Dobrovoľné behanie, fyzická aktivita, aktivita neurónov, antidepresíva, elektrofyziológia

Účel projektu:

- a) základný výskum
- b) translačný alebo aplikovaný výskum
- c) regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z. z.)
- d) ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat
- e) ochrana druhov
- f) vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie
- g) zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch.

Opísať ciele projektu:

cieľ 1: Objasniť účinok dobrovoľného behania v kolese na aktivitu neurónov produkujúcich neuropeptidy β -endorfín, oxytocín a vazopresín *in vivo*.

cieľ 2: Zistiť účinok dobrovoľného behania v kolese na aktivitu neurónov produkujúcich monoamíny serotonin, noradrenalin a dopamin *in vivo*.

cieľ 3: Objasniť účinok podávaných antidepresív na aktivitu β -endorfinových, oxytocinových a vazopresinových neurónov *in vivo*.

cieľ 4: Preskúmať funkčné interakcie medzi neurónmi produkujúcimi monoamíny a neurónmi produkujúcimi neuropeptidy.

Prínos z vykonaného projektu:

Depresia je závažné psychiatrické ochorenie, ktorého prevalencia v spoločnosti sa stále zvyšuje. Etiológia je nejasná a liečba je nákladná, zdĺhavá a často krát neúčinná. Predkladaný projekt objasní mechanizmy, ktorými fyzická aktivita a vybrané antidepresíva ovplyvňujú mozog. Nadobudnuté výsledky budú užitočné pri vývoji nových a účinnejších antidepresív.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórne potkany *Rattus norvegicus*, samce kmeňa Wistar (Velaz, Praha Česká republika): 150 jedincov

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

Okrem dobrovoľného behania, ktoré má pozitívny vplyv, implantácie minipúmp a elektrofyziologického merania nebudú zvieratá vystavené ďalšej manipulácii počas experimentu. Implantácia ako aj samotné meranie bude vykonané v celkovej anestézii a utrpenie zvierat bude teda minimalizované. Hoci budú všetky chirurgické zákroky u zvierat vykonané pod anestéziou (implantácia osmotických minipúmp), predpokladáme ich krátkodobý nepriaznivý vplyv na zdravotný stav zvierat (predovšetkým pooperačná bolesť).

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

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

- i.p. podávanie anestézie pred vykonaním chirurgických zákrokov a elektrofyziologického merania

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

- implantácia osmotických minipúmp

Kategória bez možnosti zotavenia

- elektrofyziologické meranie aktivity neurónov

Uplatňovanie zásad 3R:

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

Vzhľadom na to, že v predloženom projekte budeme sledovať vplyv dobrovoľného behania a podávania antidepresív na aktivitu vybraných skupín neurónov v mozgu, nie je možné tieto experimenty uskutočniť na nižších živočíchoch alebo bunkových kultúrach. Experimenty v predloženom projekte vyžadujú použitie animálneho modelu potkana kmeňa Wistar, s ktorým máme bohaté skúsenosti.

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

Počet použitých zvierat je minimalizovaný na najnižšiu možnú mieru. V každej experimentálnej skupine je 10 zvierat, 5 kontrolných a 5, ktoré podstúpia experimentálne zásahy. Tento počet je úplné minimum preto, aby elektrofyziologické merania mali ešte štatisticky výpovedný hodnotu. Elektrofyziologické meranie aktivity neurónov je časovo náročné a medzi jednotlivými experimentmi môže byť dlhý časový rozstup. Pokiaľ to však personálne a technické kapacity umožnia, bude

možné použiť spoločné kontroly a tým pádom znížiť počet zvierat v jednotlivých experimentoch.

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

Utrpenie zvierat bude minimalizované dodržiavaním každej z piatich zásad uvádzaných pri definícii welfare zvierat. Testy budú uskutočňované tak, aby zvieratá čo najmenej strádali. Zvieratá budú chované v klimatizovanom zverinci ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) s 12 hod. svetelným režimom v kliebkach po 2-3, čo im umožní plne realizovať prirodzené formy správania, vrátane sociálneho. Prístup k peletovanej strave a vode bude *ad libitum*.

Zvieratám budú pred operačným zákrokom podané anestetiká (Narcostart $500\mu\text{g/kg}$, i.p. na uvedenie do anestézie a Narcostop $500\mu\text{g/kg}$, i.p. na prebudenie z anestézie) čím sa minimalizuje ich utrpenie na najmenšiu možnú mieru. Na zmiernenie bolesti zvierat po operačnom zákroku im bude jednorazovo i.p. podané analgetikum Rometar. Po operačných zásahoch budú zvieratá ponechané na vyhrievacích podložkách do doznenia účinkov anestézie. Následne budú preložené do chovných kliebok, kde budú pravidelne monitorované.

Pred samotným elektrofyzologickým meraním bude zvieratám podané anestetikum Chloralhydrát (400 mg/kg , i.p.). Hĺbka anestézie bude po celý čas monitorovaná a po ukončení merania budú zvieratá usmrtené predávkovaním anestetikom.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno nie

Klíčové slova v projektu: antidepressiva, antipsychoitika, cytokiny, nervus vagus, zápal

2. Ciele projektu:

dávkach pri ich aktívnom a opakovanom podaní na rôzne behavtorálne, neuroendokrinné a imunitné funkcie u potkanov exponovaných imuniznému podnetu.

antipysychotika môžu potenciovateľ protizápalové pôsobenie antidepresív u poškánov exponovaných imunitnému podnetu.

Indukovaným intaperitoneálnym podaním hipodýsacharidu (mACHr) podávaním selektívneho antagonistu a agonistu $\alpha 7$ podtypu nikotinových receptorov ($\alpha 7$ nAChR) protiľadivo účinnok vybraných psychotrópik u potkanov so zápalom

Antidepresíva sa používajú v klinickej praxi už niekoľko desaťročí, napriek tomu presný

monominné, ktoré sú spôsobené neurotransmitami (serotonínom, noradreálnym dopamínom) v systéme mozgu, a vyplývajú z plasticity pôsobenia antidepressívnej a protizápalovej dráhy. V prípade jej poruchy dochádza k porušeniu rovnováhy neurotransmitov a následne k depresii. Teória depresie, ktorá poukazuje na príčinu súvislosti medzi vznikom depresie a zvýšenou aktiváciou makrofágov s následne zvýšenou produkciou protizápalových cytokínov. Zvýšená prozápalová aktivita spôsobená u pacientov s depresiou môže byť dôsledkom zvýšenej zápalovej aktivity gastrointestinálnom trakte alebo môže súvisieť s narušením protizápalového pôsobenia nervus vagus (vagus je sprostredkované zvýšením protizápalového pôsobenia eferentných dráh nervus vagus (vagus a spol.). Predložený projekt vychádza z tejto našej hypotézy. V prípade jej platnosti by rozpracovanie racionálny podklad pre dizajn nových antidepressív, ktoré budú cieľene účinkovať na centrálny stimulácie protizápalových dráh prebiehajúcej v nervus vagus. V prítomnosti robok sa choraz širšie používajú v liečbe depresie a bykické antipsychotiká, ktoré rovnako ako niektoré antidepressíva spôsobujú protizápalový. Originálnou zložkou projektu je skúmanie protizápalového pôsobenia antidepressív použitých v monoterapii a v kombinácii podaného

4. Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratorné potkany *Rattus norvegicus*, dospelé samce kmeňa Sprague-Dawley: 468 jedincov

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

laboratórne poklony budú vystavené pôsobeniu farmakologických látok, ktoré môžu krátkodobovo uplynúvať ich združený stav (napr. aplikácia lipopolysacharidu). Zarovň podstupia štandardné behavioálne testy (EMP, FST), pri ktorých budú splošne všetky všeobecné podmienky (dĺžka trvania kvestu, adaptácia zvierat, pomôcky, hygienické podmienky), ktoré sú dané protokolom. Tieto testy predstavujú pre zvieratá mierny stresor, ale vo významnej miere nebude narušená ich pohoda ani celkový združený stav. Zvieratá tiež podstupia niekoľko chirurgických zákrokov (implantácia osmotických minipump, chirurgická subdiaphragmatická a sham vagotómia, steroidické operácie mozgu), ktoré budú vykonané v celkovej anestézii s primeranou analgéziou, napriek tomu nepodkladáme, že zvieratá budú pociťovať krátkodobú strednú bolesť, dokonca narúša pohodu a celkový stav zvierat. Všetky predvídavé združené komplikácie sa budeme snažiť zmieniť, prípadne ich zabrániť.

5. Predpokladaná úroveň krutosti:

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

i.p. podávanie anestézie pred vykonaním chirurgických zákrokov,
i.p. injekčné podávanie vybraných farmák laboratórnym zvieratám,

i.m. podávanie pendeponu po operačných zákrokoch.

vyholenie zvierat pred chirurgickými zákrokmi použitím elektrického holiaceho stroja, handling po dobu 7 dní,

test zvýšeného plusového bludiska (EPM),

anúšia pohodu alebo celkový stav zvierat):

chirurgická subdiafragmatická vagotómia a slavná vagotómia,

s.c. implantáciu osmotických minipump,

centrálne (intracerebroventrikulárna) implantácia sterilných kanyí z nehrdzavejúcej ocele pomocou stereotaktického aparátu

Uplatňovanie zásad 3R

požiadavka nahradenia

K plánovanejmu rústu neexistujú alternatívne, ako napríklad využitie bunkových kultúr, keďže sledujeme interakcie medzi nervovým, imunitným a endokrinným systémom a celkové pôsobenie vlnitých psychotomiek na tieto systémy, najmä na aktivitu alternatívnych a cieletných čŕtidi X. hlavového nervu (nervus vagus). Nervus vagus má významné postavenie v regulácii celého organizmu, čo je dané rozsahom motorickej a senzitívnej inervácie, ktorú zabezpečuje širokým spektrom receptorov na jeho senzitívnych nervových zakončeníach. Nedavno bola popísaná tzv. cholinergická protizápalová dráha, ktorú tvoria cholinergické cieletné dráhy nervu vagus. Ktorú zabezpečujú ionické alebo nepretržité neuronálne modulačné systémy cyklov nervu vagus. Ktoré zabezpečujú protizápalovú dráhu, ktorú tvoria cholinergické cieletné dráhy nervu vagus. Ktoré zabezpečujú protizápalovú dráhu, ktorú tvoria cholinergické cieletné dráhy nervu vagus.

prícom fungujú ako regulátor, ktorý ohraničuje rozsah imunitnej reakcie v organizme. Je možné, že protizápalové pôsobenie niektorých antidepresív a antipsychotík je výsledkom ich centrálného stimulačného pôsobenia na eferentné dráhy nervus vagus, ktoré inhibujú zápal v periférnych tkanivách. V našich experimentoch budeme teda sledovať prepojenie centrálného nervového systému s perifériou, kde bude prebiehať zápal, čo je možné len s použitím animálneho modelu.

Nakoľko sledujeme mechanizmus účinku psychofarmák používaných v ľudskej praxi uvedení model je najlepšou alternatívou náhrady ľudského modelu. Použijeme laboratorné potkany kmeňa Sprague Dawley, s ktorými máme v našom laboratóriu bohaté skúsenosti a zároveň nadväzujeme na experimentálne štúdie, pri ktorých sme sledovali úlohu nervus vagus v regulácii stresu.

požiadavka obmedzenia

Z pohľadu štatistickej významnosti, reprodukovateľnosti pokusov a s ohľadom na predpokladané chirurgické zákroky sú počty zvierat minimalizované na najnižšiu možnú mieru. Pri testovaní protizápalového účinku vybraných psychofarmák a behaviorálnych testoch je predpokladaný počet 12 zvierat na skupinu. Aby získané údaje mohli byť štatisticky spracované a mali serióznu výpovednú hodnotu je potrebné, aby minimálny počet zvierat v skupine bol 12 jedincov. Okrem toho je pri použití behaviorálnych testov vyššia miera variácie medzi jednotlivými zvieratami v rámci skupiny, čo zásadným spôsobom ovplyvňuje vyhodnotenie a štatistickú analýzu získaných výsledkov. Pri štam a subdiafragmatickej vagotómii je potrebných 12 zvierat na skupinu, nakoľko vagotómia výrazne ovplyvňuje činnosť organizmu a dôležité je i úspešnosť vykonanej vagotómie. Zo štúdie musia byť vyňaté zvieratá s nekompletnou vagotómiou. V prípade, že sa nepreukáže protizápalové pôsobenie niektorého z vybraných antidepresív a antipsychotík v prvej etape projektu, v ďalších etapách projektu ho už nepoužijeme, čím sa zredukuje počet experimentálnych skupín.

požiadavka zjemnenia

Minimalizácia možného utrpenia a utrpenia zvierat bude dosiahnutá dodržiavaním platieh sílôbôd uvádzaných pri definícii welfare zvierat. Zvieratám bude poskytnuté zodpovedajúce prostredie v klimatizovanej miestnosti ($22\pm1^{\circ}\text{C}$) s 12 hodinovým svetelným režimom so svetlou fázou začínajúcou ráno o 6:00 hodine, kde budú umiestnené v štandardných chovných kletkách v počte 3 jedincov (potkany) s možnosťou prirodzeného správania, vrátane sociálneho. Všetky zvieratá budú mať narušený prístup k pitnej vode a štandardnej pelotovej potravine *ad libitum*.

Zvieratám budú pred chirurgickými zákrokmi (subdiafragmatická a štam vagotómia, subkutánna implantácia osmotických minipump, intracerebroventrikulárna implantácia kanyí) pomocou stereotaktického aparátu podané anestetiká pre celkovú anestéziu s primeranou analgéziou (kombinácia tielatinu, zolazepam /xylozine v pomere 3:5, v množstve 30 mg / kg hmotnosti potkana, intraperitoneálnej), čím sa zminimalizuje ich utrpenie na najmenšiu možnú mieru. Po chirurgických zákrokoch budú zvieratá ponechané na vyhnívacích podložkách až do ich prebratia z anestézie. Následne budú preložené do chovných kletiek, kde budú pravidelne monitorované.

Počas behaviorálnych testov bude diskomfort zvierat minimalizovaný na najmenšiu možnú mieru, respektívnym ich fyziologickým potrebám a potrebám správania. Zvieratá budú pravidelne handlované a adaptované na testovaciu miestnosť.

Počas všetkých experimentov sa zdŕžiame konania, ktoré by mohlo spôsobiť poranenie, iné poškodenie zdravia zvierat alebo ich zbytočné utrpenie.

8. Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Netechnické zhrnutie projektu

1500/14-221

Názov projektu: Vplyv inhibície angiogenézy na postnatálnu neurogenézu a migráciu buniek do poškodených oblastí mozgu

Kľúčové slová v projekte: inhibícia angiogenézy, postnatálna neurogenéza, migrácia, excitotoxické poškodenie

Účel projektu*: Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

Ciele projektu:

Mechanizmy regulácie postnatálnej neurogenézy nie sú napriek intenzívnemu výskumu a príbúdajúcim poznatkom dosiaľ dostatočne vysvetlené. Ich pochopenie je dôležité pre prípadné terapeutické využitie neurálnych prekursorov ako endogénneho zdroja náhrady poškodených a degenerovaných nervových buniek mozgu. Postnatálna neurogenéza prebieha iba v určitých, tzv. neurogénnych oblastiach mozgu. Najnovšie poznatky naznačujú, že krvné cievy napomáhajú migrácii buniek z miesta ich vzniku na miesto ich určenia. Cieľom projektu je zistiť ako ovplyvni inhibícia angiogenézy migráciu buniek v neurogénnej oblasti mozgu za normálnych podmienok. Ďalším cieľom je sledovať vplyv excitotoxického poškodenia mozgu na vypúšťanie buniek z neurogénnych oblastí na miesto lézie a to za normálnych okolností, a po podaní inhibítora angiogenézy.

Prínos z vykonaného projektu

Projekt by mal prispieť k objasneniu úlohy krvných ciev pri migrácii a proliferácii neurálnych prekursorov prebiehajúcich v postnatálnom období. Inhibícia angiogenézy nám môže dať odpoveď na otázku, akú úlohu zohráva špecifické usporiadanie ciev pri migrácii novovznikajúcich buniek v danej oblasti. Experimentálne navodenie poškodenia mozgu/neurodegenerácie a následná inhibícia angiogenézy nám umožní skúmať úlohu krvných ciev pri migrácii neurálnych prekursorov do miesta poškodenia.

V súčasnej medicíne stále chýbajú uspokojivé terapeutické postupy, ktorými by bolo možné nahradiť poškodené nervové bunky v mozgu. Keďže mozog cicavcov disponuje neurálnymi prekursorami buniek, ktoré by mohli byť zdrojom náhrady poškodených buniek, je veľkou výzvou skúmať mechanizmy ovplyvňujúce produkciu, migráciu a začlenenie sa týchto novovzniknutých buniek do už existujúcich neurálnych okruhov.

Poznatky tohto projektu môžu prispieť k vývoju stratégie pomocou, ktorých by bolo možné presmerovať neurálne prekursory do oblastí poškodenia, alebo neurodegenerácie.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimente budú použité potkany kmeňa Wistar albino oboch pohlaví v počte 80 ks

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

Angiogenézu budeme inhibovať po dobu jedného týždňa u neonatálnych a dospelých zvierat, pomocou látky endostatín, ktorá sa vyskytuje v tele prirodzene, avšak v nižších koncentráciách. Nepredpokladáme, že by inhibícia angiogenézy negatívne ovplyvnila celkový zdravotný stav zvierat.

Excitotoxické poškodenie mozgu (samotné/ v kombinácii a inhibíciou angiogenézy) budeme robiť iba u dospelých zvierat. Látku spôsobujúcu excitotoxické poškodenie – iboténát podáme jednorázovo na presne určené miesto v mozgu (v oblasti striatia) čo bude mať za následok neurodegeneráciu buniek v danej oblasti. Po zákroku budú zvieratá prežívať krátkodobu (7 dní). Uvedený zákrok môže spôsobiť zmeny v sociálnom správaní zvieratá.

Všetky zákroky budú robené v narkóze. V pooperačnom období bude zvieratám venovaná zvýšená starostlivosť. V prípade bolesti budeme zvieratám podávať analgetiká.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Predpokladáme, že postupy, ktoré budeme vykonávať budú prevažne „slabé“ nanajvýš „stredné“, podľa Klasifikácie krutosti postupov - prílohy č. 4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z. z.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Po zadani kľúčových slov tohto projektu nebola v databáze European Centre for Validation of Alternative Methods (<http://altweb.jhsph.edu/news/current/evcvalidb-altm.html>) nájdená žiadna alternatívna metóda.

2. Redukcia počtu zvierat:

V experimentálnych skupinách použijeme minimálny počet zvierat (5-7). Tento počet je nevyhnutný, aby bolo možné štatisticky vyhodnotiť výsledky.

3. Zjemnenie:

So zvieratami budú ohľaduplne manipulovať skúsení vedeckí pracovníci a doktorandi (prírodovedci, veterinári lekári). Prípady bolesti budeme zvieratám minimalizovať podaním analgetík.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Príloha č. 2

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

1435/14-221

Názov projektu:

Vplyv signalizácie z vnútorných orgánov na rozsah neuroendokrinnéj stresovej reakcie u potkana

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

neuroendokrinná stresová reakcia, katecholamíny, glukokortikoidy, viscerálna signalizácia, nervus vagus

Účel projektu:

a) základný výskum

- b) translačný alebo aplikovaný výskum
- c) regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z. z.)
- d) ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat
- e) ochrana druhov
- f) vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie
- g) zakladanie kolónii genetiky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch.

Opísať ciele projektu:

Cieľ 1. Určiť ako podanie ivabradínu (selektívny inhibitor pacemakerových buniek sinoatriálneho uzla) ovplyvní plazmatické hladiny katecholamínov a kortikosterónu počas pokojových podmienok a počas expozície potkanov rôznym stresorom (handling, restraint stres a imobilizácia). Cieľom inhibíciou srdcovej činnosti, obzvlášť počas expozície rôznymi formami stresorov, určíme význam prenosu signálov zo srdca (napr. mechanoreceptory) v spätnoväzobnej regulácii rozsahu neuroendokrinnéj stresovej reakcie.

Cieľ 2. Určiť vplyv opakovaného intravenózneho podania adrenalínu v kombinácii so zvukovým podnetom na plazmatické hladiny katecholamínov a kortikosterónu u potkana. Pomocou podnietenia sa určí, akú úlohu v stresovej reakcii zohráva naučená reaktivita na zmeny v aktivite vnútorných orgánov vyvolaných adrenalinom.

Cieľ 3. Určiť efekt zníženia srdcovej frekvencie podaním ivabradínu na správanie potkanov. Bude sa sledovať miera úzkosti ako prejav stresovej reakcie vo vyvyšenom plusovom bludisku.

Prínos z vykonaného projektu:

Stresová odpoveď organizmu spúšťa mnoho fyziologických mechanizmov, ktoré organizmu umožňujú odpovedať na prichádzajúcu hrozbu a nastoliť rovnováhu. Na jednej strane môže byť stresová odpoveď pre organizmus pozitívna, avšak s predĺžením sa časom vysvetlenia stresorom prípadne opakujúcim sa stresovým podnetom sa stáva poškodzujúca a významným faktorom rozvoja mnohých ochorení či už kardiovaskulárnych, imunitných alebo onkologických. Poškodenie podmienené stresorom môže byť významné najmä v prípade, ak činnosť orgánov bola u daného jedinca narušená už v minulosti. Terapeutickým ovplyvnením rozsahu neuroendokrinnéj stresovej reakcie možno nielen predísť, ale aj zmieriť priebeh chorôb, v ktorých etiopatogenéze zohráva úlohu aj nepríjemná neuroendokrinná stresová reakcia. Příkladom potenciálnej klinickej aplikácie predloženého projektu by mohla byť ivabradín (selektívny inhibitor pacemakerových buniek sinoatriálneho uzla). Zníženie srdcovej frekvencie môže predstavovať preventívny postup obmedzujúci nadmerný stresovú reakciu pri pôsobení psychologických stresorov (napr. úzkosť), kedy môže byť nadmerná aktivácia kardiovaskulárneho systému patologicá. Ďalším príkladom využitia predloženej projektu môžu byť kognitívne behaviorálne postupy zamerané na inhibíciu „podmienej“ stresovej reakcie. Poznanie mechanizmov prenosu a centrálného spracovania signálov z vnútorných orgánov počas stresovej reakcie môže vytvoriť podklad pre zavedenie nových terapeutických postupov zameraných na ovplyvnenie (redukcii) stresovej reakcie na centrálnej i periférnej úrovni.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

- laboratorné potkany (*Rattus norvegicus*) kmeň Sprague-Dawley, samce, počet: 276 jedincov

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

Zvieratá budú vystavené krátkodobému, jednorazovému (2 hodiny) restraintu alebo imobilizácii, počas ktorých im bude zamedzené v pohybe a budú pociťovať intenzívny emočný stres. Počas imobilizácie budú zvieratá tiež pociťovať krátkodobú bolesť bez ďalších následkov alebo zhoršenia zdravotného stavu. Okrem toho, niektoré zvieratá podstúpia chirurgické zásahy, ktoré tiež môžu ovplyvniť ich zdravotný stav. Hoci budú všetky chirurgické zákroky u zvierat vykonané pod anestéziou (kaniulácia vena jugularis, implantácia telemetrických prístrojov), predpokladáme ich krátkodobý nepriaznivý vplyv na zdravotný stav zvierat (predovšetkým pooperačná bolesť). Všetkým predvídaným zdravotným komplikáciám sa budeme snažiť zabrániť, prípadne ich zmieriť.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

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

- i.p. podávanie anestézie pred vykonaním chirurgických zákrokov
 - vyholenie zvierat pred chirurgickými zákrokmi použitím elektrického holiaceho strojačka.
 - handling jednorazový 10 minút
 - test vyvýšeného plusového bludiska (EPV)
 - podmieňovanie – krátkodobé vystavenie zvuku o sile 60-70dB
- Kategória stredné (zvieratá budú pociťovať krátkodobú strednú bolesť a je pravdepodobné, že stredne narušia pohodu alebo celkový stav zvierat):
- kanyliácia *vena jugularis*
 - implantáciu telemetrických prôb
 - restraint jednorazový na 2 hodiny
 - imobilizácia jednorazová na 2 hodiny

Uplatňovanie zásad 3R:

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

Vzhľadom na to, že v predloženom projekte budeme sledovať vzájomné interakcie dvoch biologických systémov, nervového a endokrinného, nie je možné tieto experimenty uskutočniť na bunkových kultúrach. V rámci projektu sa budeme snažiť aj o to, aby získané údaje rozšírili poznatky o mechanizmoch periférnej regulácie neuroendokrinnéj stresovej reakcie, čo by mohlo viesť ku prípadným klinickým aplikáciám. Aj preto si experimenty v predloženom projekte vyžadujú komplexný prístup, ktorý je zabezpečený práve použitím animálneho modelu pokana kmeňa Sprague Dawley, s ktorým máme bohaté skúsenosti v rámci štúdia stresovej reakcie orgánizmu.

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

Počet použitých zvierat bude minimalizovaný na najnižšiu možnú mieru v závislosti od typu pokusu: kanyličné experimenty a dekapitačný experiment 12 zvierat v skupine, telemetrický experiment 4 pokusy v skupine a behaviorálne štúdie 10 zvierat v skupine, tak aby boli získané údaje štatisticky relevantné a mali tak požadovanú výpočetnú hodnotu. Vyšší počet zvierat v skupine (v pomere ku počtu skupín) určených na behaviorálne experimenty je spôsobený povahou používaných testov (EPV), kde na rozdiel biochemických alebo molekulárno-biologických analýz je vyššia miera variácie medzi jednotlivými zvieratami v rámci skupiny, čo zásadným spôsobom ovplyvňuje vyhodnotenie a štatistickú analýzu získaných výsledkov.

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

Utrpenie zvierat bude minimalizované dodržiavaním každej z piatich zásad uvádzaných pri definícii welfare zvierat. Testy budú uskutočňované tak, aby zvieratá čo najmenej stratili.

Zvieratá budú chované v klimatizovanom zverinci ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) s 12 hod. svetelným režimom v kliečkach po 3-4, čo im umožní plne realizovať prirodzené formy správania, vrátane sociálneho. Prístup k pelletovanej strave a vode bude *ad libitum*.

Zvieratám budú pred operačným zákrokom podané anestetiká (kombinácia Zoletil/Xylarium v pomere 3:5 a v množstve 10 mg/kg hmotnosti zvieratá intraperitoneálne, i.p.) a počas celého zásahu (kanyliácia *vena jugularis*, implantácia telemetrických prôb) budú zvieratá udržiavané v celkovej anestéze, čím sa minimalizuje ich utrpenie na najmenšiu možnú mieru. Na zmiernenie bolesti zvierat po operačnom zákroku im bude jednorazovo i.p. podané analgetikum Romectar. Po operačných zásahoch budú zvieratá ponechané na vyhrievacích podložkách do doznenia účinkov anestézie. Následne budú preložené do chovných kliečok, kde budú pravidelne monitorované.

Pri experimentoch, kedy budú zvieratá vystavené jednorazovému dvojhodinovému restraintu alebo imobilizačnému stresu, zvieratám nebudú podávané utišujúce látky, nakoľko ich podanie významným spôsobom ovplyvňuje aktivitu sympatoadrenálneho systému a interferuje so sledovanými biochemickými a molekulárno-biologickými parametrami. Aj napriek diskomfortu, ktorý môžu použiť stresory vyvolať, ide iba o ich jednorazovú aplikáciu a doteraz sme nestreli so žiadnymi nefyziologickými reakciami prípadne vonkajšími či vnútornými zraneniami.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno nie

Príloha 2

Netechnické zhrnutie projektu 1431/14-221

Názov projektu: Regenerácia špecifických regiónov mozgu dospelých spevavcov skúmaná pomocou in vivo magnetickej rezonancie

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): striatum, MRI, dopamínový D3 receptor, neurogenéza, BDNF,

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:

Zistiť funkciu novovzniknutých neurónov v striatálnej vokálnej oblasti Area X:

1/ Otestovať a optimalizovať metódu MRI pre vizualizáciu vokálnej oblasti Area X v striate a pre jej vizualizáciu spolu s neurotoxickou léziou u samcov zebričky červenozobej. Otestovať rozlíšenie, dobu pobytu experimentálneho spevavca v magnete spolu s optimalizáciou MR impulzných sekvencií a validovať presné opakovanie skenov v určenej oblasti mozgu v dlhšom časovom intervale. Porovnať s metódou lokalizovanej 1H MR spektroskopie (MRS; hlavne N-acetylaspartátu, glutamátu, glutamínu, taurínu, creatínu, cholínu a laktátu).

2/ Porovnať veľkosť lézie Area X nameranej pomocou MRI so skutočnými hodnotami až do 6 mesiacov. Vyhodnotiť MRI mapy v oblasti záujmu a validovať výsledky MRI pre výpočet veľkosti lézie (pomocou T2 máp aj pomocou difúzne vážených obrazov, DWI).

3/ Určiť úlohu regenerujúcej sa Area X pre spev u dospelých vtákov. Využiť MRI, prípadne aj MRS, pre kontinuálnu identifikáciu zmien v regenerovanej Area X a korelovať ich so zmenami v speve, hlavne v tempe a v opakovaní slabík.

4/ Určiť vplyv elektrolytickej lézie Area X bez následnej regenerácie na spev u dospelých vtákov.

Využiť MRI a MRS pre sledovanie regenerácie mozgu. Sledovať mechanizmus vplyvu dopamínových D3 receptorov (D3R) na regeneráciu mozgu po neurotoxickom poškodení:

1/ Zistiť vplyv lézie na expresiu BDNF, jeho receptorov TrkB a na expresiu D3R receptorov v neurogéennej subventrikulárnej zóne (SVZ) a v nepoškodenom striate.

2/ Zistiť vplyv farmakologickej manipulácie D3R na expresiu BDNF a TrkB receptorov v SVZ a v striate. Výsledky porovnať s MRI mapami a kvantifikáciou dôležitých mozgových metabolitov získaných z lokalizovanej 1H MRS.

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

Zvýšená neurogenéza v dôsledku lézie bola zistená u cicavcov aj u vtákov. U cicavcov však obnova striata po poškodení predstavuje maximálne 0,2-1 % v závislosti na type poškodených neurónov, zatiaľ čo podľa našich výsledkov je obnova Area X v striate spevavcov takmer úplná. Nahrádzovanie stratených alebo nefunkčných neurónov novými má potenciál v medicíne. Preto štúdium mechanizmov tejto obnovy u spevavcov môže byť prínosom pri hľadaní stratégií novej obnovy mozgu po poškodení.

Druhou nemenej dôležitou súčasťou tohoto projektu je spojenie sledovania regenerácie mozgu po poškodení prostredníctvom MRI a MRS spolu so sledovaním zmien v speve u toho istého jedinca. Je všeobecne známe, že technika in vivo zobrazovania magnetickej rezonancie MRI a MRS poskytuje veľmi cenné a kvalitné neurochemické, fyziologické, anatomické, štrukturálne a v posledných rokoch rozvojom funkčného zobrazovania fMRI aj funkčné informácie v živých systémoch. A práve posledne menovaná fMRI technika, nazývaná fMRI BOLD (Blood Oxygen Level Dependent) našla široké uplatnenie pri výskume sluchových regiónov v mozgu zebričky červenozobej. Táto rôznorodosť informácií, ktoré je možné získať pomocou magnetickej rezonancie, ju odlišuje a zároveň favorizuje medzi ostatnými, prevažne invazívnymi zobrazovacími metódami (RTG, PET). V závislosti od zvolených parametrov nastavených pri meraní dokáže MRI zviditeľniť rôzne vlastnosti meraného tkaniva, napríklad štruktúru orgánov, v našom prípade mozgu, na základe rôznych vlastností vody v ňom obsiahnutej (T1 a T2 vážené obrazy), perfúziu a difúziu tekutín (perfúzne a difúzne vážené obrazy – PWI a DWI), spojenie nervových dráh (traktografia) a mnohé iné. Ďalšou výhodou magnetickej rezonancie je jej nedeštruktívna povaha. To umožňuje opakované merania v čase na tom istom jedincovi, čo predstavuje novú dimenziu štúdia neurogenézy, ktorá sa vyvíja v dlhom časovom intervale. Veľký prínos predstavuje výskum magnetickej rezonancie in vivo na zvieracích modeloch, pretože umožňuje rôzne opakované merania, či už obrazové alebo spektroskopické, a tým dáva možnosť sledovať vývoj namodelovaného patologického stavu (v našom prípade lézie vytvorenej pomocou neurotoxínu) ako aj účinky zvolenej terapie. Už len samotná možnosť kontinuálnej kontroly obnovy mozgu predstavuje prínos z hľadiska technického (jednoznačné určenie polohy a veľkosti lézie od začiatku experimentu) aj etického (menšie množstvo použitých jedincov). Navyše v spojení s behaviorálnou analýzou umožnia tieto výsledky potvrdiť alebo vyvrátiť hypotézu o funkcii Area X pre načasovanie spevu, a tiež o funkcii nových neurónov v Area X spevavcov pre kontrolu plynulého vokálneho prejavu.

Dôležitý prínos predkladaného projektu vidíme v možnosti korelácie parametrov MRI a MRS a v možnosti kombinácie MRI a MRS pri jednom meraní, čo umožňuje sledovať súčasne anatomické aj neurochemické zmeny mozgu. Výhodou je aj trojdimenzionálne nahliadnutie do jednotlivých regiónov mozgu spevavcov, ktoré je možné kvantifikovať a porovnať s

histologickými technikami na bližšiu špecifikáciu doposiaľ dostatočne neobjasnených procesov pri neurogenéze spevavcov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

zebrička červenozobá (*Taeniopygia guttata*), 80 samcov a 15 samíc

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

Nepriaznivý vplyv na zvieratá by mohla mať operácia alebo umelý spánok počas MRI meraní, aj keď podľa našej skúsenosti sa zebričky po operácii zotavujú pomerne rýchlo a niektoré jedince začnú spievať už po pár hodinách od operácie, čo je prejavom ich komfortu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Operácie, podávanie farmák a MRI budú vykonávané v celkovej anestézii, po ktorej zviera nadobudne vedomie, a preto sa klasifikujú ako „slabé“. Transkardiálna perfúzia sa klasifikuje ako „bez možnosti zotavenia“.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Celý projekt je zameraný na nahradzovanie a obmedzenie počtu zvierat v experimentoch. Metóda MRI umožňuje kontinuálne sledovanie lézie alebo obnovy mozgu u toho istého zvieratá, a teda ich počet je v porovnaní s použitím len histologických metód značne redukovaný.

Keďže pokus je primárne zameraný na sledovanie obnovy striatálnej časti mozgu po poškodení s perspektívou výstupu na človeka, nie je možné realizovať pokus na bunkových kultúrach, pretože u týchto sa mozog nevyskytuje. Alternatívne nahradenie vtáčieho modelu nižšími stavovcami alebo cicavcami tiež nie je možné, nakoľko zvýšená miera neurogenézy a obnova striata u týchto modelov nebola doteraz pozorovaná.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počty zvierat sú minimalizované na najmenšiu možnú hranicu, aby mali získané údaje akceptovateľnú výpovednú hodnotu a bolo možné štatisticky ich vyhodnotiť.

3. Zjemnenie:

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

Zebrička červenožobá je výhodná pri štúdiu naučenej vokálnej komunikácie kvôli veľkosti, rýchlemu dospievaniu a rozmnožovaniu v zajatí, typu naučenej piesne, a tiež kvôli tomu, že sú u nej výborne popísané mozgové okruhy kontrolujúce spev. Jej použitie v experimentoch je preto jasnou výhodou v porovnaní s použitím iných druhov učiacich sa vokálne komunikovať, ako sú veľryby alebo papagáje (hlodavce túto schopnosť nemajú). Zvieratá počas samotného pokusu nebudú vystavené strádaniu a utrpeniu. Vodu a potravu budú mať k dispozícii ad libitum. Budú chované v štandardných podmienkach. Počas operácie budú uspaté zmesou ketamín/xylazín, prípadne kyslíka a izofluránu, ktorý umožňuje rýchlejšie prebudenie po operácii a aj lepšiu rekonvalescenciu než iné anestetiká. Pred transkardiálnou perfúziou bude zvieratám podaná letálna dávka zmesi ketamín/xylazín, čím sa minimalizuje ich utrpenie na najnižšiu možnú mieru.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Netechnické zhrnutie projektu 1374/14-221

Názov projektu:

Efekt endotelínových antagonistov na funkčné zmeny v modeli srdcového zlyhania navodeného chronickou beta adrenergickou stimuláciou

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom projektu je zistiť účasť endotelínu-1 na funkčných zmenách srdca po podávaní beta agonistu izoprenalínu.

Prínos z vykonaného projektu:

Endotelín-1 je telu vlastný vazokonstrikčný a prohypertrofický peptid, u ktorého sa predpokladá účasť na srdcovom zlyhávaní, no jeho presná úloha nie je dobre známa. Endotelínové antagonizmy nepriniesli v klinických štúdiách presvedčivé výsledky, hoci sa do nich vkladali veľké nádeje. Navrhované experimenty by pomohli objasniť vzťahy medzi nadmernou beta adrenergickou stimuláciou, ktorá je prítomná pri srdcovom zlyhávaní, endotelínom-1 a jeho účinkami na funkčné vlastnosti srdca. Hlavným prínosom by teda bol príspevok k objasneniu patofyziologickej úlohy endotelínu-1 pri srdcovom zlyhávaní.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty : Potkany, samce rodu Wistar 135

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

Ide o experimenty, kde sa hodnotí vplyv dlhodobej liečby na fyziologické parametre ako elektrická a mechanická funkcia srdca, a teda je potrebné vykonať experiment in vivo, teda na celom zvierati. V experimente sa plánuje intraperitoneálna a perorálna aplikácia aplikácia liečiv u bdelých zvierat. Zvieratá môžu pri nej pociťovať krátkodobú bolesť alebo nepohodu, ktoré by nemali 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 očakáva poškodenie srdca podávaní izoprenalínu, mierne zníženie fyzickej výkonnosti a telesnej hmotnosti. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu budú zvieratá humánne utratené.

Predpokladaná úroveň krutosti:

stredná

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie:

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa bude hodnotiť vplyv endotelínových antagonistov počas rozvoja hypertrofie myokardu na EKG a bazálnu a beta adrenergicky stimulovanú funkciu ľavej komory in situ, nie je možné pokus vykonať bez použitia zvierat a použiť alternatívnu metódu. Počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako kultúry buniek, na ktorých je nemožné relevantne posúdiť funkciu kardiomyocytov, a už vôbec nie ľavej komory ako celku.

2. Obmedzenie:

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie a zachovanie relevantnosti pokusu. Počet $n=15$ v izoprenalínových skupinách zahŕňa možnú mortalitu po podávaní izoprenalínu, ktorá z literatúry i našich skúseností predstavuje približne 30 percent, ako aj prípadnú perioperačnú mortalitu, spojenú s invazívnym zákrokom pri meraní ľavokomorovej funkcie. V skupinách s endotelínovými antagonistami je počet $n=20$ odôvodnený tým, že je možné, že antagonista by, napriek očakavanému pozitívnemu účinku, mohol spôsobiť zvýšenie mortality. Aj takýto výsledok by priniesol veľmi cenné informácie vysvetľujúce inak málo objasnený neutrálny efekt endotelínových antagonistov v klinických štúdiách u pacientov so srdcovým zlyhaním. Zvieratá z prvej fázy experimentu, ktoré budú použité na meranie ľavokomorovej funkcie nie je možné použiť na experimenty druhej fázy, vzhľadom na pôsobenie dobutamínu, a naopak, nie je možné aplikovať ETA antagonistu BQ-123 alebo ETB antagonistu BQ-788 v pokuse prvej fázy – boli by ovplyvnené hemodynamické merania.

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.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU:

Názov projektu pokusu 1359/14-221

Zistenie imunomodulačného účinku exkrementno-sekretných antigénov cestóda *Mesocostoides vogae*

Cieľ projektu pokusu, predpokladaná ujma a prínosy

Cieľom experimentu je overiť imunomodulačný účinok sekrečno/exkrečných (E/S) produktov lariev *Mesocostoides vogae*. Na základe modelu septického šoku sa stanoví vplyv sekretov lariev na zmiernenie excesívnych zápalových prejavov v súvislosti s vrodenu zložkou imunitného systému. Zistíme presné zloženie podtypov iniciátorov vrodenej odpovede - dendritických buniek a modulácie ich efektorových funkcií (ko-stimulácia T buniek, produkcia cytokínov). Zároveň sa zameriame na úzko spätú adaptívnu zložku imunitného systému, kde na základe tesnej časovej kinetiky pokusu bude možné presne odhadnúť dynamiku Th1, Th2, Th17 a Treg polarizácie a následne objasniť potencionálny mechanizmus regulácie systémovej odpovede. Postupy využívané pri infekcii/injekcii/odberu vzoriek sú aktuálne a berú do úvahy maximálne jemné zaobchádzanie a manipuláciu so zvieratami. Neočakáva sa riziko dlhodobej bolesti ani utrpenia. Zvieratám nebude zabránené štandardné umiestnenie, chov ani starostlivosť. V súvislosti s odberom vzoriek a následnou analýzou cytokínov a bunkových podtypov je nevyhnutné usmrtenie zvierat, ktoré bude vykonané po celkovej anestéze. V prípade zaznamenatej modulácie resp. zvrátenia priebehu septického šoku určitou frakciou (ktorú na základe testovania považujeme za potencionálne aktívnu) tak môžeme významne prispieť k pokusom o identifikovanie účinných molekúl.

Počet a druh pokusných zvierat

Samice myši (*Mus musculus*) kmeňa balb/c, 60 zvierat

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Nie sú známe alternatívne metódy vykonanie pokusu, ktoré boli overované v literatúre aj na internete. Stanovený počet predstavuje limit, ktorý berie do úvahy nutnú potrebu dostatočného počtu vzoriek vzhľadom na rýchlo sa meniacu kinetiku imunitnej odpovede v rámci hostiteľa a štatistické spracovanie a validitu výsledkov. *In vitro* štúdia poukazujú na silný imunomodulačný vplyv ES antigénov *M. vogae*. Pri overení systémoveho účinku je nutná cirkulácia (lymfatická, krvná), ktorá nemôže byť mimikovaná *in vitro*. *In vivo* pokus umožní analýzu komplexnej imunitnej odpovede hostiteľa, do ktorej spadá veľké množstvo rozmanitých buniek. Z tohto dôvodu nie je možné simulovať takéto interaktívne podmienky štúdia *in vitro*. So zvieratami budú zaobchádzať zaškolené osoby s dlhoročnými praktickými skúsenosťami.

Spätne posúdenie - nie

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU: 1359/14-221a

Názov projektu: Kontinuálne pasážovanie larválnych štádií *Echinococcus multilocularis* a *Echinococcus granulosus* na laboratórnych zvieratách pieskomil mongolský (*Meriones unguiculatus*).

Ciele projektu: Cieľom projektu je kultivácia izolátov *Echinococcus* spp. získaných od humánnych pacientov za účelom potvrdenia diagnózy v nejasných a sporných prípadoch (biologický pokus) a ich následné udržiavanie s cieľom získania dostatočného množstva larválnych štádií na prípravu špecifických antigénov potrebných na diagnostiku ochorenia u ľudí sérologickými metódami.

Nakoľko množstvo vzoriek získaných od pacientov pri chirurgickom zákroku alebo biopsii je často veľmi malé, kultivácia na pieskomiloch navyše umožní získanie dostatočného množstva materiálu z jednotlivých izolátov na ich ďalšie analýzy, genotypizáciu kmeňov cirkulujúcich na území Slovenska a ich porovnanie s genotypmi vyskytujúcimi sa v iných častiach sveta.

Druh pokusných zvierat, plánovaný počet použitých zvierat za obdobie trvania projektu: Pieskomil mongolský; max. 20/rok (podľa množstva získaného materiálu)

Relevantnosť a odôvodnenie používania zvierat: V projekte budú použité pieskomily mongolské, ktoré patria k laboratórnym zvieratám vnímavým na infekciu pásomnicami rodu *Echinococcus* a na ich pasážovanie sa bežne využívajú. Ročne bude použitých max. 20 jedincov rôzneho pohlavia, v dobrom zdravotnom stave, vo veku 3 a viac mesiacov. Na infekciu izolátmi *Echinococcus* spp. od ľudí budú použité vždy dva pieskomily, aby sa v prípade náhodného úhynu zvierat zabránilo strate pasážovaného kmeňa. Po cca troch až piatich mesiacoch, čo je optimálna doba pre získanie dostatočného množstva metacestódných štádií bez výrazného poškodenia zdravotného stavu a welfare, budú zvieratá humane usmrtené a získaným parazitárnym materiálom budú infikované ďalšie pieskomily.

Odôvodnenie postupov a prínosy: Echinokokóza je závažné ochorenie ľudí, ktorej včasná a správna diagnostika výrazne zlepšuje prognózu a možnosti terapie pacienta. Pasážovanie a kultivácia infekčných štádií pásomníc rodu *Echinococcus* umožní získanie dostatočného množstva materiálu na prípravu špecifických antigénov na diagnostiku ochorenia. Izoláty budú zároveň v rámci základného výskumu použité na ich charakterizáciu a genotypizáciu kmeňov cirkulujúcich na území Slovenska.

Počas projektu bude použitý bude humánný spôsob manipulácie so zvieratami. Infekcia sa bude vykonávať pri plnom vedomí zvierat, bez anestézie formou intraperitoneálnej aplikácie, ktorá je veľmi krátka a nespôsobuje zvieratám vážny stres a nepohodu. Znečitlivenie pri infikovaní by pre zviera predstavovalo väčší stres ako samotný zákrok a môže mať nežiaduce vedľajšie účinky. Po ukončení kultivácie budú zvieratá humane usmrtené cervikálnou dislokáciou, nakoľko odber larválnych štádií pásomníc z dutiny brušnej si vyžaduje usmrtenie zvierat.

Súlad s požiadavkami nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Zásada nahraditeľnosti zvierat: Zvieratá budú použité na *in vivo* kultiváciu vývinových štádií parazita v minimálnom počte. Tento vývoj vyžaduje hostiteľa. Zvolený druh pieskomil mongolský (*Meriones unguiculatus*), je vnímavý na infekciu, pričom ochorenie pomerne dlho prebieha bez väčších klinických príznakov. Hlavným príznakom dostatočného vyvinutia larválnych štádií pásomníc je zväčšenie dutiny brušnej, ktoré je ľahko rozpoznateľné, čo umožňuje ukončenie pasážovania aby zvieratá netrpeli.

Zásada zjemnenia pokusu použitím anestézie a analgetík: Počas kontinuálneho pasážovania kmeňa parazita sa so zvieratami manipuluje len jednorazovo, a to počas nakazenia, ktoré sa vykonáva intraperitoneálnou aplikáciou infekčného materiálu. Jedná sa o krátky a pomerne bezbolestný zákrok, ktorý si nevyžaduje anestéziu, ktorá by pre zviera mohla predstavovať väčší stres, ako injekcia samotná. V nasledujúcich týždňoch, počas ktorých sa u zvierat vyvíjajú infekčné štádiá parazita, sa so zvieratami manipuluje výlučne v rámci každodennej opatery a starostlivosti a nie sú vystavené bolesti, ani utrpeniu, nie je preto potrebné podávanie utišujúcich prostriedkov. Denne sa sleduje ich zdravotný stav a v prípade prítomnosti klinických príznakov ochorenia sú humánne usmrtené cervikálnou dislokáciou.

Zásada znižovania počtu zvierat: Počet zvierat žiadaných pre pasážovanie parazita je zvolený ako minimálny možný, vzhľadom na to, že súčasne plánujeme použiť na infekciu maximálne 20 jedincov ročne. Tento počet je nevyhnutný z dôvodu zabezpečenia dostatočného množstva parazitárneho materiálu na prípravu antigénov pre diagnostiku ochorenia, ktorá sa vykonáva na našom ústave. Menší počet zvierat by mohol znamenať, že v prípade, ak by bolo nutné niekoľko zvierat utrátiť pre zhoršenie zdravotného stavu, alebo v prípade ich úhynu skôr, ako dôjde v vývinu do fertilného štádia, by sme stratili kmeň, čo by viedlo k problémom s opätovným získaním takéhoto materiálu.

Spätné posúdenie - nie

§ 40 Netechnické zhrnutie projektu

1347/14-221

NÁZOV PROJEKTU

VPLYV ETABLOVANEJ A INOVATÍVNEJ INTERFERENCIE S RAAS A ICH KOMBINÁCIE NA ORGÁNOVÉ POŠKODENIE A EXPRESIU RAAS PEPTIDOV U HYPERTENZIE A SRDCOVÉHO ZLYHANIA.

KEĽÚČOVÉ SLOVÁ V PROJEKTE : RAAS, hypertenzia, srdcové zlyhanie

CIEĽ PROJEKTU

Zámerom projektu je zistiť vplyv etablovanej a inovatívnej interferencie s RAAS a ich kombinácie na orgánové poškodenie a expresiu RAAS peptidov u hypertenzie a srdcového zlyhania u potkana. Etablovaná inhibícia RAAS bude realizovaná inhibíciou aktivity renínu (aliskirén), inhibíciou ACE (captopril) a blokádou AT1 receptora pre angiotenzín II (olmesartan). Inovatívna interferencia bude zahŕňať stimuláciu AT2 receptorov (Compound 21) a permissívne pôsobenie na Ang 1-7 (ATQ). Vzhľadom na etablovanú kardioprotektívnu liečbu interferujúcu s RAAS, je pre klinickú relevanciu výsledkov nevyhnutne nutné preukázať dodatočný kardioprotektívny potenciál po pridaní k etablovanej liečbe. Preto navrhujeme sledovať aj možnosti kombinácie inovatívnych spôsobov interferencie s RAAS s už etablovanými terapeutickými intervenciami. Nakoniec využijeme novú možnosť stanovenia koncentrácie RAAS peptidov prostredníctvom mapy RAAS, ktoré umožní posúdiť spätnoväzobné mechanizmy pri modulácii RAAS a tak poukázať na možné mechanizmy jednotlivých spôsobov modulácie RAAS a ich kombinácie. Tieto údaje môžu byť zaujímavé s ohľadom na interpretáciu výsledkov klinických štúdií, ktoré s rôznym výstupom sledovali možnosti kombinovanej inhibície RAAS.

Komplexné porovnanie inovatívnej ako aj etablovanej interferencie s RAAS samostatne ako aj v kombinácii môže naznačiť možnosť doplnenia terapeutického potenciálu liečby pri závažných kardiovaskulárnych (hypertenzia, hypertrofia ľavej komory, srdcové zlyhávanie) indikáciách.

OČAKÁVANÝ PRÍNOS

Hoci sa jedná o prácu základného výskumu, ktorej cieľom je objasniť úlohu AT2 receptorov a Mas receptora v ovplyvnení hypertenzie a zlyhávajúceho myokardu, projekt môže mať aj aplikovaný prínos v naznačení možných indikačných oblastí pre liečivá v predklinickej fáze výskumu. Vlastný vedecký prínos spočíva v ukázaní ovplyvnenia procesu reparatívnej fibrózy a funkčnej adaptácie myokardu po ischemickom infarkte. Hypertrofia srdca, napriek tomu, že sa jedná o chronický kompenzačný mechanizmus zvýšeného hemodynamického nákladu, prináša celý rad zmien v biochemickej štruktúre myokardu (predovšetkým alteráciu kvality a kvantity kolagénneho tkaniva), ktoré vedú k poruche elektrickej, diastolickej a neskôr aj systolickej funkcie srdca a nakoniec až k náhlej smrti alebo srdcovému zlyhaniu. Uvedený projekt by bol prvou prácou, ktorá skúma túto otázku prostredníctvom selektívneho agonistu AT2 receptorov alebo Mas receptora. Doteraz tiež nie je úplne objasnené, do akej miery sa ovplyvnenie rozvoja štrukturálnych zmien prejaví v ovplyvnení funkčných vlastností srdca. V našom projekte budeme sledovať nielen viaceré štrukturálne aspekty remodelácie myokardu, ale aj ich funkčné dôsledky (kontraktilita a poddajnosť myokardu). Preto je možným prínosom aj objasnenie úlohy jednotlivých mechanizmov na ovplyvnení konkrétneho procesu. Prenesene takéto poznatky umožnia uvažovať o kombináčnej liečbe, ktorá pomôže zachovať štrukturálnu homogenitu a architektúru myokardu pri zachovaní najlepších funkčných parametrov. Compound 21 a ATQ sú perorálne dostupné látky nachádzajúce sa v predklinickej fáze vývoja, keď sa uvažuje o možných indikačných oblastiach. Prenesene môže náš projekt naznačiť, či je vhodné pokračovať v aplikovanom výskume a klinickom testovaní tejto látky (samotnej alebo v kombinácii) v oblasti srdcového zlyhania.

POČET ZVIERAT

Potkany – samce kmeňa Wistar Kyoto – 12 jedincov

Potkany – samce kmeňa SHR – 156 jedincov

Potkany – samce kmeňa Wistar Han – 144 jedincov

KLASIFIKÁCIA KRUTOSTI POSTUPOV

Slabé

Postupy vykonávané na zvieratách pri ktorých je pravdepodobné, že v ich dôsledku budú zvieratá pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach, a postupy, ktoré vo významnej miere nenarušujú pohodu ani celkový stav zvierat.

Predpokladané procedúry – váženie, manipulácia, podávanie liečby, ukončenie experimentu eutanáziou – spadajú do kategórie C podľa IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee, <http://iacuc.ucsd.edu/policies/Policy26.01.pdf>) klasifikácie. Sú to procedúry nespôsobujúce žiadnu bolesť či napätie alebo ich spôsobujú iba krátkodobo

Bez možnosti zotavenia

Zviera nenadobudne vedomie po postupe, ktoré sa vykonávajú v celkovej anestézii.

Predpokladané procedúry – katetrizácia a. carotis communis a a.femoralis a ľavej komory v terminálnej anestézii pred ukončením experimentu.

PRI PRÁCI SO ZVIERATAMI BUDÚ DODRŽANÉ VŠETKY PREDPÍSANÉ PREDPISY PRE CHOV A ZAOBCHÁDZANIE S LABORATÓRNymi ZVIERATAMI PODĽA ZÁSAD 3R.

REPLACEMENT – NAHRADENIE ZVIERAT

Pretože v plánovaných experimentoch sa budú hodnotiť alterácie funkcie a štruktúry orgánov a následky terapeutických intervencií, je nevyhnutné, aby sa experiment vykonal „*in vivo*“ na celom zvierati. Využitie bunkových kultúr alebo počítačových simulácií neprichádzajú pri tomto type experimentu do úvahy ako alternatívny spôsob výskumného prístupu.

REDUCTION - REDUKCIA POČTU ZVIERAT

V experimentoch bude použitý minimálny možný počet experimentálnych zvierat, ktorý je potrebný na zabezpečenie 80% štatistickej sily na úrovni významnosti 0.05, pri redukcii počtu porovnaní medzi vybranými skupinami pre štatistické vyhodnotenie použitím

ANOVA testu a Studentovho t-testu pre analýzy zamerané na vyhodnotenie vhodnosti zvolenej terapie a sledovania rozdielov v jednotlivých skupinách zvierat vo vzťahu ku zvolenej liečbe. V experimente bude použitý minimálny počet kontrolných zvierat. Zvieratá budú objednávané v jednotnom časovom intervale, aby sa predišlo sezónnym zmenám a potrebe experiment opakovať.

REFINEMENT - ZJEMNENIE

Predkladaná schéma pokusu založená na dôkladnom preskúmaní odbornej literatúry zodpovedá tzv. vedenému alebo plánovanému výskumu, pri ktorom je možné použiť menší počet zvierat ako pri tzv. náhodnom pokuse s prístupom pokus/ omyl. Ďalším stupňom je použitie homogénnej skupiny zvierat, čím môžeme znížiť interindividuálnu variabilitu a súčasne i počet zvierat. Posledným stupňom je samotné zvolenie počtu zvierat podľa štatistických metód stanovujúcich minimálny počet zvierat podľa počtu skúmaných skupín. Zvieratá budú počas pokusov kontinuálne sledované a výsledky priebežne vyhodnocované a v prípade zistenia nevhodných prípadne neočakávaných udalostí bude experiment ukončený a následne predložený nový projekt tak, aby sa znížil počet používaných zvierat.

**PROJEKT NIE JE NUTNÉ SPÄTNE POSUDZOVAŤ A BOL SCHVÁLENÝ
V PLNOM ROZSAHU ETICKOU KOMISIOU.**

Netechnické zhrnutie projektu 1341/14-221

Názov projektu:

Využitie ľudských mezenchýmových stromálnych buniek izolovaných zo zubnej drene na cieleňú génovou terapiu gliómov

Kľúčové slová:

Glioblastóm, génová terapia, kmeňové bunky

Účel projektu:

Základný výskum

Cieľ projektu:

Cieľom pokusu je využitie ľudských mezenchýmových stromálnych buniek izolovaných zo zubnej drene na cieleňú génovou terapiu gliómov (na princípe použitia samovražedného enzýmu cytozín deaminázy a predliečiva 5-fluorocytosínu). Predkladaný projekt je súčasťou nášho dlhodobého výskumu, v ktorom sledujeme možnosť využitia dospelých kmeňových buniek ako nosičov terapeutických génov na neinvazívnu a cieleňú terapiu nádorového ochorenia.

Prínos projektu:

Možnosti liečby gliómov, najčastejšie sa vyskytujúcich primárnych mozgových nádorov sú veľmi limitované predovšetkým kvôli invazívnej a agresívnej povahe týchto nádorov a tiež ich schopnosti odolať chemoterapii či rádioterapii. Glioblastóm je spomedzi gliómov najagresívnejší a nesie najvyšší stupeň malignity (stupeň IV podľa WHO). Štandardný postup liečby začína maximálnym možným chirurgickým odstránením nádoru, po ktorom nasleduje rádioterapia spolu s konkomitantnou a adjuvantnou chemoterapiou. Napriek nemalým pokrokom vo všetkých troch oblastiach liečby, prognóza pre pacientov ostáva naďalej nepriaznivá a skoro vždy dochádza k relapsu ochorenia. Medián prežívania sa pohybuje okolo 14 mesiacov. Na Slovensku sa ročne diagnostikuje okolo 200 nových prípadov glioblastómu. Projekt, ktorého súčasťou je práca so zvieratami je orientovaný na výskum rakoviny a liečbu nádorového ochorenia. Riešenie projektu priblíži tento inovatívny terapeutický prístup k pacientom.

Počet a druh použitých zvierat:

Potkan laboratórny kmeň Sprague Dawley, 140 jedincov, samičky aj samce

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

Počas všetkých chirurgických zákrokov budú zvieratá v celkovej anestézii, po zákroku môžu pociťovať krátkodobú strednú bolesť. Na základe skúseností z predchádzajúcich projektov predpokladáme, že priebeh ochorenia bude rýchly, zvieratá s náhlým zhoršením stavu budú eutanazované, aby sme zabránili utrpeniu, potkany s progredujúcim ochorením nebudú ponechané na dožitie.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Stredná

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

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov, projektu predchádzali štúdie *in vitro*.

Obmedzenie:

Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Projekt nadväzuje na predchádzajúce schválené projekty, sme schopní predvídať terapeutickú účinnosť na základe experimentov s mezenchýmovými kmeňovými bunkami izolovanými z tukového tkaniva ako aj priebeh ochorenia u kontrolných skupín, čo nám umožňuje počet zvierat v určitých experimentálnych skupinách redukovať. V prípade nízkeho rozptylu hodnotených kritérií (klinických príznakov, prežívania) v jednotlivých skupinách bude na štatisticky významné vyhodnotenie výsledkov postačujúci nižší počet zvierat.

Zjemnenie:

Pokiaľ to zdravotný stav zvierat umožní, budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. Zvieratá s vážne zhoršeným zdravotným stavom nebudú ponechané na dožitie, ale budú eutanazované.

Spätné posúdenie projektu:

Postupy klasifikujeme ako „stredné“, preto nie je potrebné vykonať spätné posúdenie projektu.

Spätné posúdenie - nie