

Názov projektu: Príprava subcelulárnych vakcín z oligomanozidových epitopov kvasinky *Candida albicans* a ich imunomodulačné vlastnosti (VEGA projekt 02/0026/13)
(Projekt je duševným vlastníctvom žiadateľa).

Ciele projektu vrátane predpokladanej újmy a prínosu, počte a typoch zvierat.
Podrobný opis cieľa pokusu a východisková situácia projektu.

Účelom projektu postupu podľa § 4 nariadenia vlády je základný výskum s cieľom prevencie a zabránenia poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka alebo ich účinkov na ľudí v záujme dosiahnutia ktoréhokoľvek z týchto cieľov pri vývoji a testovaní bezpečnosti liekov. Predkladaný projekt predstavuje komplexný prístup k charakterizácii imunomodulačných polysacharidových a peptidových antigénov bunkovej steny *Candida albicans*. Jedným z faktorov, ktoré v poslednej dobe prispievajú k vzostupu fungálnych ochorení je zvyšujúci sa nárast rezistencie, predovšetkým na azolové deriváty. Zvyšujúca sa incidencia mykotických ochorení predovšetkým u imunokompromitovaných jedincov, u primárnych resp. sekundárnych imunodeficitných stavov. Kandidové infekcie postihujú aj jedincov bez poruchy imunitného systému, až 75 % žien malo počas života diagnostikovanú aspoň jednu epizódou akútnej, resp. recidivujúcej chronickej vulvovaginitídy. Toto ochorenie predstavuje nielen medicínsky, ale aj sociálny a ekonomický problém. Pre tieto dôvody sa v súčasnosti stále viac výskumných tímov opäť venuje príprave účinnej antifungálnej vakcíny, s dôrazom na vývoju účinnej subcelulárnej vakcíny. Výskum je zameraný hlavne na mechanizmy protektívnej imunity na úrovni adaptívnej imunity. Subcelulárna vakcína na báze oligosacharid-peptidového konjugátu je jednou z možností antifungálnej intervencie. Detailné štúdium špecifik prípravy glykánovej subcelulárnej vakcíny a doteraz neobjasnenej imunitnej reakcie na bunkovej úrovni u modelového organizmu má aplikačné uplatnenie v inovatívnych diagnostických a kuratívnych metódach humánnej medicíny (postavenej na molekulovej úrovni). Jednou z dôležitých úloh vedeckého výskumu kandidových infekcií a anti-kandidovej imunity v súčasnej dobe je získať nové, hlbšie poznatky o patogénnych a virulentných vlastnostiach mikrorganizmu, a súčasne, a na základe originálnych experimentálnych výsledkov hľadať a testovať nové účinné formuly ochrany a prevencie. Originalita a inovatívnosť projektu je zaručená v tom, že takýto komplexný prístup k riešeniu antifungálnej intervencie nebol zatiaľ nikde prezentovaný.

Projekt je orientovaný na oblasť ľudského zdravia, na profylaxiu organizmu proti fungálnej infekcii, alebo na terapiu už infikovaného organizmu. Je zameraný na prípravu účinných oligosacharid-peptidových konjugátov na báze faktorov virulentnosti *C. albicans*, v ktorých ako sacharidové antigény bude manán *C. albicans* serotyp A CCY 29-3-100 a vybrané manooligoméry. Ako peptidový antigén v komplexnom imunogénnom konjugáte bude aplikovaný 16-mér (QGETEEALIQKRSYKK) mimikujúci parciálnu sekvenciu HWP1, faktoru virulentnosti *Candidy albicans*, exprimovaného hýfovou morfoformou s patognomickým charakterom. Hlavným cieľom projektu je príprava a imunobiologické štúdie subcelulárnych konjugovaných vakcín na báze faktorov virulentnosti *C. albicans*, schopných indukovať v organizme dlhodobú imunologickú pamäť a Th1/ Th17 polarizáciu imunitnej odpovede, žiadúcu v antikandidovej reaktivite hostiteľa. Projekt je originálny v tom, že do navrhovanej subcelulárnej vakcíny sa ako sacharidové antigény zabudujú vybrané manooligoméry s rôznymi počtami manopyranozylových jednotiek (di-, tetra-, hexa – a hepta-). Získané výsledky by mohli objasniť spôsob, ako takýto konjugát moduluje humorálnu a celulárnu imunitnú odpoveď hostiteľa. Tieto poznatky by mohli významnou

V snahe simulovať niektoré imunobiologické celulárne aktivity *in vitro* sme niektoré testy (test bunkovej proliferácie, stimulovaná expresia kostimulačných molekúl a i.) overili *ex vivo* na bunkových líniiach myšacích makrofágov :Lymphoid mouse macrophage P388.D1 (Clone 3124) a Raw 264.7. Bunkové línie ako *in vitro* modely pre toxikologické a skriningové liekové štúdie predstavujú vhodný systém (Allen DD, Caviedes R, Cardenas AM, Shimahara T, Segura Aquilar J, Caviedes PA. Cell lines as *in vitro* models for drug screening and toxicity studies. Drug Dev Ind Pharm. 2010;31: 757–68.), avšak extrapolácia výsledkov imunobiologických reaktivít získaných *in vitro* na *in vivo* reálny stav nie je reprezentatívna, nakoľko neposkytuje komplexnú informáciu o indukovaných zmenách na úrovni imunologicky dôležitých orgánov, endotelov a epitelov a imunokompetentných buniek z hľadiska dlhodobých účinkov vakcinácie (indukcia protektívnych protilátok, imunologická pamäť a pohotovosť reagovať na restimuláciu infekčným agens).

Požiadavka obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Po dôslednom zvážení a optimalizovaní imunizačných protokolov a metodických prístupov a zvážení očakávaného vakcinačného benefitu a taktiež na základe konzultácie so štatistikom a na základe návrhnutého použitia sofistikovaných štatistických programov testovania získaných imunologických a hematologických výsledkov sme minimalizovali počet zvierat v jednotlivých skupinách na 10ks. Tento počet predstavuje najmenšie množstvo vzhľadom k objemu plánovaných imunologických a hematologických analýz a k množstvu získaného biologického materiálu (plná venózna krv, slezina, lymfatické uzliny). Súčasne tento počet zaisťuje reprodukovateľnosť a validitu experimentu.

Požiadavka zjemnenia (refinement)

Prácu so zvieratmi budú vykonávať skúsení pracovníci (veterinárny lekár a ošetrovatel'ka), manipulácia bude šetrná a nevyvolávajúca stres. Zvieratá budú umiestnené po 10 jedincoch, tak, aby nedošlo obmedzeniu ich prirodzeného behaviorálneho správania. Jednotlivé podania vakcíny/imunizačnej dávky sa budú aplikované šetrne, budú sa používať 1mL Micro-Fine Plus inzulinové striekačky s ihlou (Becton-Dickinson) pre minimalizovanie bolesti.

Späť na posudzovanie - nie

§ 40 Netechnické zhrnutie projektu 1306/14-221

NÁZOV PROJEKTU

PROTEKCIA HYPERTENZNÉHO A ZLYHÁVAJÚCEHO SRDCA BLOKÁTOROM IF KANÁLU IVABRADÍNOM: POROVNANIE S ACE-INHIBÍCIOU A MELATONÍNOM

PREDKLADATEĽ PROJEKTU:

CIEĽ PROJEKTU

Cieľom projektu je zistiť účinok inhibítora kanálu IF v sino-atriálnom uzle ivabradínu na hemodynamicky preťažené a remodelované srdce (tzv. hypertenzné srdce) pri L-NAME indukovanej (NO deficitnej) hypertenzii. Spomalenie frekvencie hemodynamicky preťaženého srdca zlepšuje energetický metabolizmus myokardu, čo sa považuje za hlavný patomechanizmus protektívneho pôsobenia ivabradínu. Súčasne sú však indikácie z literatúry, že ivabradín zároveň znižuje odpor proti ktorému srdce pracuje, čím zvyšuje minútový objem. Je teda pravdepodobné, že nielen redukcia srdcovej frekvencie, ale aj efekt na intrakardiálnu a intravaskulárnu hemodynamiku by mohli byť spoluzodpovedné za benefit ivabradínu pri srdcovom zlyhaní. V súlade s predpokladaným pozitívnym efektom na moduláciu hemodynamiky je možné predpokladať, že ivabradín by mohol redukovať hypertrofickú a fibrotickú prestavbu hypertenzného srdca. Potenciálny antiremodelačný efekt ivabradínu a jeho porovnanie s inhibítorom tvorby angiotenzínu II kaptoprilu a pleiotropne pôsobiacim hormónom melatonínom by mohol prispieť nielen k objasneniu protektívneho účinku ivabradínu, ale aj k jeho využitiu v liečbe hypertenzie, hypertrofie ľavej komory a protekcie ostatných periférnych orgánov. Využitie ivabradínu z doteraz dokázanej indikácie srdcového zlyhávania by sa tým mohlo posunúť do oblasti prevencie srdcového zlyhania a prípadne liečby celej d'alšej plejády kardiovaskulárnych ochorení.

Bez možnosti zotavenia

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

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 predávkovaním thiopentalu – 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 a nevyžadujú použitie anestetika alebo analgézie.

OČAKÁVANÝ PRÍNOS

Potenciálny antiremodelačný efekt ivabradínu a jeho porovnanie s inhibítorom tvorby angiotenzínu II kaptoprilu a pleiotropne pôsobiacim hormónom melatonínom by mohol prispieť nielen k objasneniu protektívneho účinku ivabradínu, ale aj k jeho využitiu v liečbe hypertenzie, hypertrofie ľavej komory a protekcie ostatných periférnych orgánov.

POČET ZVIERAT

Potkany kmeň – WISTAR – samce 320 jedincov

Projekt nie je nutné späťne posudzovať a bol schválený v plnom rozsahu etickou komisiou.

Netechnické zhrnutie projektu:

Modulácia imunogenicity HA2 imunogénu ako potenciálneho kandidáta na prípravu krížovo-protektívnej chrípkovej vakcíny.

Vírusy chrípky typu A patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce patogény v ľudskej populácii spôsobujúce infekcie respiračného traktu. Súčasné vakcíny proti chrípke sú úzko špecifické voči vakcinačným kmeňom a ich antigénne príbuzným variantom. Za účelom rozšírenia účinku týchto vakcín sme sa zamerali na konzervatívnu časť hemagglutínínu, HA2 glykopolypeptidu ako potenciálneho kandidáta na prípravu chrípkovej vakcíny so širším spektrom účinku. Cieľom projektu je využitie streptavidínového systému (SA-konštrukty) ako nového nástroja na doručenie konzervatívnych antigénov bunkám imunitného systému a indukciu protektívnej imunity. Ďalším cieľom projektu je pripraviť delečné varianty HA s odstránenou variabilnou časťou HA a sledovať ich protektívny potenciál na myšacom modeli *in vivo*.

Predložený projekt pokusu je súčasťou riešenia 1 domáceho projektu a je zameraný na:

1. Testovať na Balb/c myšiach vplyv pasívne podaných HA2-špecifických monoklonálnych protilátok na priebeh chrípkovej infekcie u ľudí.
2. Testovať schopnosť pripravených SA-konštruktov indukovať u imunizovaných Balb/c myší špecifickú imunitnú odpoveď po doručení chrípkového antigénu do dendritových buniek *in vivo*.
3. Testovať schopnosť SA fúzných proteínov zvýšiť krížovo-protektívny účinok B-bunkových epitopov ich doplnením o konzervatívne CD8 T bunkové epitopy nukleoproteínu. Využitím kombinovanej imunizačnej schémy SA-HA2 + SA-NP; SA-eM2 + SA-NP budeme sledovať navodenie krížovo-protektívnej imunitnej odpovede so širším spektrom účinku.
4. Testovať či imunizácia s SA-fúznymi proteínmi prispieva k skoršej eliminácii vírusu z pľúc po infekcii myší vírusom chrípky.
5. Testovať schopnosť rôznych foriem delečných variantov HA vírusu chrípky indukovať protektívnu imunitnú odpoveď
6. Testovať sérum získané z krvi imunizovaných Balb/c myší na stanovenie hladiny HA2-špecifických protilátok indukovaných po jednotlivých imunizačných dávkach.

Odozva organizmu na infekciu vírusom chrípky najmä ak sa sleduje imunitná odpoveď, ako aj reakcia organizmu navodená po imunizácii s SA-konštruktami alebo HA delečnými variantmi myší je komplexný proces v ktorom je zapojených množstvo signálnych dráh a podieľa sa na ňom veľa faktorov. Práve preto sa v tomto prípade nedá *in vivo* nahradiť bunkovými kultúrami. Podľa zoznamu registra alternatívnych metód z European Centre for the Validation of Alternative Methods (ecvam.jrc.it/-2k; ecvam.jrc.it/publication/MAb_statement.pdf; ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/-2k; http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/conf_2006.htm), analýza či imunizácia nami navrhovanými konštruktami má protektívny potenciál ako aj sledovanie priebehu infekcie u imunizovaných myší oproti kontrolnej neimunizovanej skupine myší nie je možné bez modelového systému a je nevyhnutné použiť vhodný zvierací model. V tomto prípade je možné použiť myš. Vzhľadom na nevyhnutnosť použitia laboratórnych zvierat sa v projekte sleduje a uplatňuje najnovšia legislatíva v súvislosti so smernicami o použití zvierat na

vedecké účely, ktorú uzákonil Európsky parlament vo forme revidovanej smernice 2010/63/EU o zvieratách používaných na vedecké účely, ktorá nadobudla účinnosť 1. Januára 2013, ako aj Nariadenie Vlády Slovenskej republiky zo 14. novembra 2012, ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely (Zbierka zákonov č. 377/2012) a Vyhláška 436 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky zo 14. decembra 2012, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o požiadavkách na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely. Nové právne predpisy prísne dbajú na dodržiavania pravidiel troch Rs (replacement, reduction, refinement) (t.j. nahradenie, obmedzenie a zmiernenie testov na zvieratách), t.j. aby sa minimalizoval počet zvierat používaných na pokusy a aby sa vždy, keď je to možné, využívali alternatívne metódy, a aby sa v prípade keď nie je možné použiť alternatívne metódy, zlepšili a zjemnili metódy v postupoch pri ktorých sa odstráni alebo obmedzí na najnižšiu mieru bolesť, utrpenie, strach alebo trvalé poškodenie zvierat.

V projektoch sa ako modelový druh používa myš laboratórna. Maximálny počet zvierat, ktoré sa v pokusoch použijú za 4 roky je 1500 ks Balb/c.

V údajoch o plánovaných počtoch zvierat je zahrnutý aj počet potrebný pre opakovanie niektorých pokusov. Zdanlivo veľký počet myši je plánovaný na 4 roky a bude sa robiť niekoľko rozličných experimentov s cieľom testovať rôzne vakcinačné prístupy naplánované v predkladanom projekte. Opakovania pokusov sa však obmedzia na nevyhnutné minimum a budú slúžiť výlučne pre overenie získaných výsledkov a objektívne štatistické vyhodnotenia experimentov.

Laboratórne zvieratá budú počas celého pokusu chované za štandardných podmienok podľa platnej normy EU, pričom sa budú rešpektovať základné etické princípy požadované pri zaobchádzaní s pokusnými zvieratami. V súlade s 3Rs zásadami sa počas celého pokusu budú dodržiavať postupy maximálne zjemňujúce pokus. Pre laboratórne myši budú počas pokusov vytvorené dobré životné podmienky, obmedzí sa ich bolesť, utrpenie, ako aj prípadná trvalá ujma na minimum.

Pri výskyte bolestivých stavov bude zvieratám podaný prípravok na zníženie bolesti. Ani v jednom štádiu pokusu nebudú mať zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prísun potravy a vody. Na konci experimentov budú zvieratá humánne usmrtené. Ich orgány budú vypreparované a poslúžia na potvrdenie infekcie vírusom chrípky a na stanovenie hladiny HA2-špecifických protilátok a špecifickej T bunkovej imunitnej odpovede. Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov postupy, ktoré sa budú vykonávať na zvieratách v plánovaných pokusoch, je možné zaradiť do kategórie „slabé“.

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

Literatura:

1. **Gocník M**, Fislová T, Sládková T, Mucha V, Kostolanský F, Varečková E (2007): Antibodies specific to the HA2 glycopolypeptide of influenza A virus haemagglutinin with fusion-inhibition activity contribute to the protection of mice against lethal infection. *J Gen Virol.* **88**, 951-955.
2. **Gocník M**, Fislová T, Mucha V, Sládková T, Russ G, Kostolanský F, Varečková E. (2008): Antibodies induced by the HA2 glycopolypeptide of influenza virus haemagglutinin improve recovery from influenza A virus infection. *J Gen Virol.* **89**, 958-967.
3. **Hefferon KL** (2014): Broadly neutralizing antibodies and the promise of **universal vaccines**: where are we now? *Immunotherapy.* 6(1):51-7. doi: 10.2217/imt.13.150.
4. **Janulíková J**, Staneková Z, Mucha V, Kostolanský F, Varečková E (2012): Two distinct regions of HA2 glycopolypeptide of influenza virus hemagglutinin elicit cross-protective immunity against influenza. *Acta Virol*, **56**, 169-76.
5. **Krammer F**, Palese P (2013): Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines. *Curr Opin Virol.* 5:521-30. doi: 10.1016/j.coviro.2013.07.007.
6. **Krammer F**, Palese P (2013): Universal influenza virus vaccines: need for clinical trials. *Nat Immunol.* 15(1):3-5. doi: 10.1038/ni.2761.
7. **Li CK**, Rappuoli R, Xu XN (2013): Correlates of protection against influenza infection in humans--on the path to a universal vaccine? *Curr Opin Immunol.* 25(4):470-6. doi: 10.1016/j.coi.2013.07.005.
8. **Sebo P**, Fayolle C, d'Andria O, Ladant D, Leclerc C, Ullmann A (1995): Cell-invasive activity of epitope-tagged adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* allows in vitro presentation of a foreign epitope to CD8+ cytotoxic T cells. *Infect Immun*, **63**, 3851-3857.
9. **Settembre EC**, Dormitzer PR, Rappuoli R (2013): Bringing influenza vaccines into the 21st century. *Hum Vaccin Immunother.* 10(3).
10. **Stanek O**, Linhartova I, Majlessi L, Leclerc C, Sebo P (2012): Complexes of streptavidin-fused antigens with biotinylated antibodies targeting receptors on dendritic cell surface: a novel tool for induction of specific T-cell immune responses. *Mol Biotechnol*, **51**, 221-232.
11. **Staneková, Z**, Vareckova, E (2010): Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Virology Journal.* 7: 351 doi: 10.1186/1743-422X-7-351.

Netechnické zhrnutie projektu 1292/14-221

Názov projektu:

Úloha hepatocytárneho rastového faktora (HGF) pri zlyhaní pravej komory u monokrotalínom indukovanej pľúcnej hypertenzie

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom pokusu je zistiť úlohu HGF/c-Met kaskády v rozvoji zlyhania pravej komory v experimentálnom modeli pľúcnej arteriálnej hypertenzie a vzťah medzi poškodenou funkciou PK a expresiou HGF a c-Met v tkanive pravej komory.

Prínos z vykonaného projektu:

Napriek veľkej pozornosti zdravotníckeho systému a neustálemu vývoju a dostupnosti nových liekov je liečba kardiovaskulárnych ochorení oblasťou, kde je naďalej potrebné hľadanie nových cieľov farmakologického zásahu, aby bolo možné implementovať do farmakoterapie účinnejšie a bezpečnejšie liečivá. Táto výzva je ešte naliehavejšie v prípade zriedkavých kardiovaskulárnych ochorení, ako je aj pľúcna artériová hypertenzia (PAH), ktoré sú často mimo výskumných stratégií súkromného sektora, keďže návratnosť vynaložených financií na výskum je veľmi otázna. V tomto projekte identifikujeme hepatocytárny rastový faktor (HGF) a jeho receptor c-Met ako potenciálnych kandidátov na budúce terapeutické ciele, keďže, ako je známe z patomechanizmov iných ochorení, táto signálna kaskáda ma silné regeneračné účinky.

Prínosom projektu bude získanie poznatkov o vzťahu medzi expresiou HGF a c-Met a zlyhaním pravej komory u experimentálneho modelu zlyhania pravej komory.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty : Potkany, samce rodu Wistar 50 ks

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

Ide o experimenty, kde sa hodnotí vplyv monokrotalínom-indukovanej PAH na funkciu pravej komory, preto je potrebné vykonať experiment *in vivo*, teda na celom zvierati. V experimente sa plánuje intraperitoneálna aplikácia anestetika (Avertin). Zvieratá môžu pri intraperitoneálnej aplikácii anestetika pociťovať krátkodobú bolesť, ktorá nebude významne narúšať pohodu, ani celkový stav zvierat. Samotné experimenty zamerané na zistenie funkcie srdca budú vykonávané v hlbokoj celkovej anestéze, po ktorej zvieratá nenadobudnú vedomie a budú humánne utratené. Celkovo sa očakáva výrazné poškodenie funkcie srdca, v zmysle zlyhania pravej komory a jeho prejavov ako

dýchavičnosť, zníženie telesnej hmotnosti a úmrtnosť na úrovni 20-30%. Použitý experimentálny model rozvíja zlyhanie pravej komory postupne v priebehu 4 týždňov. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu budú zvieratá humánne utratené. Z tohto dôvodu budú zvieratá denne sledované a pokiaľ začnú zvieratá prejavovať klinické symptómy poškodenia srdca (dýchavičnosť, zníženie telesnej hmotnosti) budú okamžite uvedené do anestézy, použité v experimente (bez ohľadu na dobu trvania experimentu) a utratené tak, aby bolo ich prípadné utrpenie čo najviac eliminované.

Predpokladaná úroveň krutosti:

stredná

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie:

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa bude hodnotiť vplyv PAH na rozvíjajúce sa zlyhanie srdca, 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 srdca ako celku s ňou súvisiace patomechanizmy a molekulárne pozadie.

2. Obmedzenie:

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie a zachovanie relevantnosti pokusu. Počet $n=15$ v skupinách MoCr zahŕňa možnú mortalitu po podávaní monokrotalínu, ktorá podľa literatúry predstavuje 25-30 percent, ako aj prípadnú perioperačnú mortalitu, spojenú s invazívnym zákrokom.

3. Zjemnenie:

Výsledky jednotlivých častí štúdie budú priebežne vyhodnocované a v prípade zistenia nevhodných neočakávaných udalostí bude experiment ukončený a následne predložený nový projekt tak, aby sa znížil počet používaných zvierat. Hemodynamické merania budú realizované u zvierat v celkovej anestéze, všetky zvieratá v prvej aj druhej fáze budú humánne utratené oxidom uhličitým.

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

Netechnické zhrnutie projektu 1291/14-221

Názov projektu:

Patomechanizmy dysfunkcie pravej komory srdca v podmienkach kombinácie fyzickej aktivity a podávania testosterónu u potkanov

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom pokusu je identifikovať zmeny funkcie pravej komory srdca v unikátnych podmienkach kombinácie suprafyziologickej aplikácie testosterónu a dobrovoľnej fyzickej aktivity a stanoviť ich súvis s génovou expresiou vápnik regulujúcich génov (Cacna1c, Atp2a2 a Ryr2) a izoforiem ťažkého reťazca myozínu (Myh6, Myh7 a Myh7b) v tkanive pravej komory.

Prínos z vykonaného projektu:

Do súčasnosti sa pozornosť klinického výskumu, v súvislosti s poškodením srdca pri zneužívaní anabolických steroidov u športovcov, sústreďovala primárne na štúdium ľavej komory. V poslednom období sa však dostáva do pozornosti funkcia pravej komory v podmienkach fyzickej aktivity, pretože tá, vďaka svojej anatomickej stavbe, je viac náchylná na zlyhanie a až náhlu srdcovú smrť počas nadmerného pracovného zaťaženia. Prínosom predkladaného projektu bude získanie poznatkov o vzťahu funkčných vlastností pravej komory a expresiou vápnik regulujúcich génov (Cacna1c, Atp2a2 a Ryr2) a izoforiem ťažkého reťazca myozínu (Myh6, Myh7 a Myh7b) v tkanive pravej komory.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty : Potkany, samce rodu Wistar 120 ks

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

Ide o experimenty, kde sa hodnotí vplyv kombinácie fyzického cvičenia a užívania testosterónu na funkciu pravej komory, preto je potrebné vykonať experiment *in vivo*, teda na celom zvierati. V experimente sa plánuje intraperitoneálna aplikácia anestetika (Avertin) a subkutánna aplikácia suspenzie testosterónu (jedenkrát týždenne). Zvieratá môžu pri intraperitoneálnej aplikácii anestetika a aj subkutánnej aplikácii testosterónu pociťovať krátkodobú bolesť, ktorá nebude významne narušovať pohodu, ani celkový stav zvierat. Samotné experimenty zamerané na zistenie funkcie srdca budú vykonávané v hlbokoj celkovej anestéze, po ktorej zvieratá nenadobudnú vedomie a budú humánne utratené. Celkovo sa neočakáva výrazné poškodenie funkcie srdca, v zmysle zlyhania srdca, ani prítomnosť žiadnych klinických symptómov. Napriek nízkemu riziku morbidity, v prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu budú zvieratá humánne utratené.

Predpokladaná úroveň krutosti:

slabá

Uplatňovanie zásad 3R**1. Nahradenie:**

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa bude hodnotiť vplyv kombinácie fyzickej aktivity a systémového podania testosterónu na funkciu srdca, 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 srdca ako celku a ani efekt fyzickej aktivity organizmu.

2. Obmedzenie:

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie a zachovanie relevantnosti pokusu (viď časť Zdôvodnenie počtu použitých zvierat v pokuse).

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: Experimentálna infekcia laboratórnych zvierat vírusmi chrípky deficientnými v posttranslačných modifikáciách (ubiquitinácia a sumoylácia) vybraných proteínov a respiračnými bakteriami *Streptococcus pneumoniae*

Vírusy chrípky typu A patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce patogény v ľudskej populácii. Častá zmena antigénnej štruktúry (antigénny drift) a vznik nových rekombinantných kmeňov pomocou reasortmentu medzi dvomi cirkulujúcimi vírusmi (antigénny shift) znemožňujú prípravu univerzálnej vakcíny a vhodných antivírusových látok. Preto sa vyvíjajú nové stratégie, ktoré by špecificky interagovali s replikáciou vírusov chrípky. Ako intracelulárny parazit využíva vírus biosyntetický aparát –bunky. Poznanie a pochopenie toho, ako vírus chrípky zneužíva vo svoj prospech uvedené mechanizmy, umožní určiť vhodné protivírusové ciele, čo zapadá do snahy o vývoj nových stratégií v boji proti tomuto ochoreniu. Nedávne výskumy naznačujú, že vzťah medzi primou vírusovou a sekundárnou bakteriálnou infekciou je oveľa zložitejší a dochádza k vzájomnej synergii infekcií. Preto odhalenie faktorov, ktoré napomáhajú tomuto biologickému fenoménu je mimoriadne dôležité.

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

1. Testovať na Balb/c myšiach zmeny v letalite vírusu chrípky ako dôsledok posttranslačných mutácií.
2. Testovať na Balb/c zmeny kinetiky infekcie vírusu chrípky ako dôsledok posttranslačných mutácií.
3. Testovať na Balb/c myšiach zmeny vo vzájomnom potencovaní vírusovej a bakteriálnej infekcie ako dôsledok posttranslačných mutácií vírusu chrípky.
4. Testovať na Balb/c myšiach zmenu v protilátkovej odpovedi po infekcií mutantnými vírusmi chrípky.
5. Testovať na Balb/c zmeny v cytokínovej odpovedi po infekcií mutantnými vírusmi chrípky.
6. Testovať na Balb/c myšiach vplyv inhibítorov ubiquitinácie a sumoylácie na vírusovú infekciu.
7. Testovať na C57B6 myšiach zmeny v bunkovej imunitnej odpovedi (cytotoxickej odpovedi) po infekcií vírusu chrípky vplyvom postranslačných mutácií.
8. Morčacie krvinky použiť na určenie prítomnosti vírusov v biologických vzorkách.

Odozva organizmu na infekciu vírusom chrípky a jeho mutantov, najmä ak sa sleduje imunitná odpoveď, ako aj reakcia organizmu na inhibítory posttranslačných modifikácií je komplexný proces, na ktorom sa podieľa veľa faktorov a práve preto sa v tomto prípade nedá *in vivo* nahradiť bunkovými kultúrami. Morčatá domáce potrebujeme ako zdroj erytrocytov, pomocou ktorých sa stanovuje hemaglutinačný titer vírusu chrípky ako aj prítomnosť vírusu chrípky vo vzorke. Na hemaglutinačné titre je možné použiť kohútie erytrocyty, ale v súčasnosti nemáme na našom ústave podmienky pre chov kohúta. Podľa zoznamu registra alternatívnych metód z European Centre for the Validation of Alternative Methods (ecvam.jrc.it/-2k; ecvam.jrc.it/publication/MAB_statement.pdf; ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/-2k; http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/conf_2006.htm), analýza patogenézy infekcie spôsobenej testovanými vírusmi nie je možná bez modelového systému a je nevyhnutné použiť vhodný zvierací model. V tomto prípade je možné použiť myš. Vzhľadom na nevyhnutnosť použitia laboratórnych zvierat sa v projekte sleduje a uplatňuje

najnovšia legislatíva v súvislosti so smernicami o použití zvierat na vedecké účely, ktorú uzákonil Európsky parlament vo forme revidovanej smernice 2010/63/EU o zvieratách používaných na vedecké účely, ktorá nadobudla účinnosť 1. januára 2013, ako aj Nariadenie Vlády Slovenskej republiky zo 14. novembra 2012, ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely (Zbierka zákonov č. 377/2012) a Vyhláška 436 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky zo 14. decembra 2012, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o požiadavkách na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely. Nové právne predpisy prísne dbajú na dodržiavania pravidiel troch Rs (replacement, reduction, refinement) (t.j. nahradenie, obmedzenie a zmiernenie testov na zvieratách), t.j. aby sa minimalizoval počet zvierat používaných na pokusy a aby sa vždy, keď je to možné, využívali alternatívne metódy, a aby sa v prípade keď nie je možné použiť alternatívne metódy, zlepšili a zjemnili metódy v postupoch pri ktorých sa odstráni alebo obmedzí na najnižšiu mieru bolesť, utrpenie, strach alebo trvalé poškodenie zvierat.

V projektoch sa ako modelový druh používa myš laboratórna. Maximálny počet zvierat, ktoré sa v pokusoch použijú za 4 roky je 1500 ks Balb/c, 500 ks C57B6 myši (samičky) a 3ks morčiat domácich. Použitie dvoch kmeňov myši je zdôvodnený tým, že na identifikáciu cytotoxicity voči PB1-F2 sú C57B6 myši vzhľadom na svoj MHC haplotyp vhodnejším modelom ako Balb/c myši.

V údajoch o plánovaných počtoch zvierat je zahrnutý aj počet potrebný pre opakovanie niektorých pokusov. Zdanlivo veľký počet myši je plánovaný na 4 roky. Opakovania pokusov sa však obmedzia na nevyhnutné minimum a budú slúžiť výlučne pre overenie sporných výsledkov a objektívne štatistické vyhodnotenia experimentov.

Laboratórne zvieratá budú počas celého pokusu chované za štandardných podmienok podľa platnej normy EU, pričom sa budú rešpektovať základné etické princípy požadované pri zaobchádzaní s pokusnými zvieratami. V súlade s 3Rs zásadami sa počas celého pokusu budú dodržiavať postupy maximálne zjemňujúce pokus. Pre laboratórne myši budú počas pokusov vytvorené dobré životné podmienky, obmedzí sa ich bolesť, utrpenie, ako aj prípadná trvalá ujma na minimum. Nakoľko sa krv z morského prasiatka v narkóze získava odobratím zo srdca a odoberú sa 2 ml krvi, zviera prežíva a nejaví známky discomfortu.

Alymova, I. V., Samarasinghe, A., Vogel, P., Green, A. M., Weinlich, R., and McCullers, J. A. (2014). A Novel Cytotoxic Sequence Contributes to Influenza A Viral Protein PB1-F2 Pathogenicity and Predisposition to Secondary Bacterial Infection. *J Virol* **88**(1), 503-15.

Huber, V. C. (2012). Can surveillance of the influenza virus PB1-F2 gene be used to predict the severity of secondary bacterial infections? *Virulence* **3**(6), 523-4.

Kosik, I., Holly, J., and Russ, G. (2013). PB1-F2 expedition from the whole protein through the domain to aa residue function. *Acta Virol* **57**(2), 138-48.

Leymarie, O., Jouvion, G., Herve, P. L., Chevalier, C., Lorin, V., Lecardonnel, J., Da Costa, B., Delmas, B., Escriou, N., and Le Goffic, R. (2013). Kinetic characterization of PB1-F2-mediated immunopathology during highly pathogenic avian H5N1 influenza virus infection. *PLoS One* **8**(3), e57894.

McAuley, J. L., Hornung, F., Boyd, K. L., Smith, A. M., McKeon, R., Bennink, J., Yewdell, J. W., and McCullers, J. A. (2007). Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* **2**(4), 240-9.

- McAuley, J. L., Chipuk, J. E., Boyd, K. L., Van De Velde, N., Green, D. R., and McCullers, J. A. (2010). PB1-F2 proteins from H5N1 and 20 century pandemic influenza viruses cause immunopathology. *PLoS Pathog* **6**(7), e1001014.
- Pal, S., Santos, A., Rosas, J. M., Ortiz-Guzman, J., and Rosas-Acosta, G. (2011). Influenza A virus interacts extensively with the cellular SUMOylation system during infection. *Virus Res* **158**(1-2), 12-27.
- Santos, A., Pal, S., Chacon, J., Meraz, K., Gonzalez, J., Prieto, K., and Rosas-Acosta, G. (2013). SUMOylation affects the interferon blocking activity of the influenza A nonstructural protein NS1 without affecting its stability or cellular localization. *J Virol* **87**(10), 5602-20.
- Wu, C. Y., Jeng, K. S., and Lai, M. M. (2011). The SUMOylation of matrix protein M1 modulates the assembly and morphogenesis of influenza A virus. *J Virol* **85**(13), 6618-28.

Pri výskyte bolestivých stavov bude zvieratám podaný prípravok na zníženie bolesti. Ani v jednom štádiu pokusu nebudú mať zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prísun potravy a vody. Na konci experimentov budú zvieratá humanne usmrtené. Ich orgány budú vypreparované a poslúžia na potvrdenie infekcie vírusom chrípky a na stanovenie hladiny interferónov a ďalších sledovaných proteínov.

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

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

Späťne' posedenie - mē

Príloha č. 1

Vzor na vyplnenie netechnického zhrnutia projektu:

4136/14-221

Názov projektu: Mechanizmy účinku probiotických laktobacilov a potravinových substancií natúralneho pôvodu v prevencii ulceróznej kolitídy.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): dextran sulfátu sodného, kolitída, zápal, probiotikum, prebiotikum

Účel projektu : Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

Regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR Z/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)

Cieľ projektu: získať poznatky o preventívnom účinku *L. plantarum LS/07* a prebiotika inulínu obohateného o oligofruktózu na animálnom modeli chemicky indukovanej kolitídy (akútna aj chronická forma). Probiotický kmeň *Lactobacillus plantarum LS/07*, ktorý chceme v experimente aplikovať, ešte nebol použitý v animálnom experimente na modeli ulceróznej kolitídy. Suplementácia krmiva inulínom v predchádzajúcom experimente na našom pracovisku na modeli kolorektálneho karcinómu preukázala vhodnosť jeho využitia na moduláciu metabolikovej aktivity tráviaceho traktu, ako aj chemopreventívneho prostriedku. Pôsobením spomínaného prebiotika v krmive došlo k inhibícii prozápalových cytokínov a k stimulácii protizápalových cytokínov. Na základe uvedených skutočností chceme overiť účinnok inulínu aj v prevencii akútnej a chronickej kolitídy (na animálnom modeli).

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

Poznatky získané riešením projektu prispievajú k overeniu preventívneho účinku probiotického kmeňa a prebiotika pri ulceróznej kolitíde. Probiotický kmeň *L. plantarum LS/07* potom môže byť využitý pri vývoji nových a účinných preventívnych prípravkov tohto ochorenia, ktoré umožnia zvýšiť fyziologickú funkčnosť biologických bariér tráviaceho traktu a zvýšiť protektívne mechanizmy organizmu v prevencii chronickej zápalovej choroby čreva. V klinickej praxi môžu tieto prípravky napomôcť k dosiahnutiu remisie (zmiernenie príznakov ochorenia) a k udržaniu remisie, resp. zabráneniu opätovného relapsu ochorenia.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: laboratórny potkan, Sprague-Dawley, 56 kusov, samce

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

V projekte bude vyvolané kolitída prostredníctvom DSS (dextran sulfátu sodného); dôsledky podávania DSS: hnačka, krvácanie z rekta, krv v stolici, úbytok hmotnosti zvierat.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Na základe literárneho prehľadu identické experimenty metodicky zostavené a s nami vybranými látkami neboli realizované.

Existujú alternatívne metódy, ktoré však nie sú plnohodnotné a nemôžu nahradiť jedinečnosť a individualitu živého organizmu. Animálne modely sú nevyhnutné na potvrdenie výsledkov účinnosti prípravkov *in vitro* a pre potreby následnej aplikácie týchto prípravkov v klinickej praxi.

Využitie zvieracích modelov významne napomáha v pochopení účinku probiotík a naturálnych látok a tiež pri vývoji nových preventívnych a liečebných postupov a následnom využití u ľudí.

Animálny model DSS-indukovanej kolitídy najlepšie demonštruje podobnosť s ulceróznou kolitídou u ľudí.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Pri riešení a zostavení pokusov je venovaná maximálna pozornosť moderným trendom starostlivosti a ochrany zvierat, menovite 3R (reduction – minimalizácia, obmedzenie počtu zvierat optimálnym usporiadaním pokusov, refinement – minimalizácia, zjemnenie utrpenia zvierat, a replacement – nahradenie klasických metód alternatívnymi modelmi a modelmi *in vitro*).

Plánovaný počet zvierat zohľadňuje 1 zo zásad 3R. Počet zvierat zaradených do pokusu bol určený podľa vzťahu: $n \geq 2 (z \cdot s / d)^2$, kde s = rozptyl, d = žiadaná odchýlka (v %), z = 5% povolená hladina spoľahlivosti, n = počet zvierat.

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)

V experimente budú použité laboratórne potkany Sprague-Dawley pochádzajúce z vlastného chovu z laboratória výskumných biomodelov LF UPJŠ, ktoré má schválenie na chov len laboratórnych potkanov kmeňa Wistar a Sprague-Dawley.

Zvieratá budú umiestnené v transparentných vaniach z PVC, budú mať tak zabezpečený zrakový, ale aj zvukový kontakt, nebudú úplne izolované.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Netechnické zhrnutie projektu 1101/14-2216

Názov projektu:

Príprava nových transgénnych modelov pre Alzheimerovu chorobu a príbuzné tauopatie

Podrobný účel postupu:

Alzheimerova choroba, rovnako ako veľa ďalších neurodegeneračných ochorení, sa spája s akumuláciou abnormálnej formy proteínov v centrálnej nervovej sústave, ktorá spôsobuje degeneráciu a následnú dysfunkciu neurónov. Podľa súčasných štatistík trpí Alzheimerovou chorobou 24 miliónov ľudí a každý rok sa toto číslo zväčší o 4,5 milióna nových prípadov. Podľa predpokladov počet pacientov do roku 2040 stúpne celosvetovo v priemere o 200 percent. Súčasný liečebný postup spočíva najmä v symptomatickej a podpornej terapii avšak terapia kauzálna zatiaľ neexistuje. Čoraz častejšie sa pri hľadaní nových liečiv využívajú animálne modely. Sú súčasťou rozsiahleho predklinického testovania nových liečiv, pričom práve animálne modely prinášajú cenné poznatky týkajúce sa dávkovania, mechanizmu účinku či farmakokinetiky testovaného liečiva. Najviac používané modelové systémy sú geneticky modifikované zvieratá, ktoré zrkadlia znaky ľudského ochorenia.

Predložený projekt má ambície pripraviť nové relevantné animálne modely, ktoré by zohľadňovali základné črty Alzheimerovej choroby. S využitím vírusových nosičov budeme schopní aplikovať vybrané gény do citlivých oblastí mozgu. Všetky zvieratá budú testované v rôznych behaviorálnych testoch (Catwalk, Phenotyper, Morrisovo vodné bludisko), po ich ukončení budú uvedené do hlbkej anestézie, odoberie sa im mozgovo-miechová tekutina a krv a následne budú humánne usmrtené pomocou dekapitácie. Mozgové tkanivá a mozgovo-miechová tekutina budú použité pre proteomické a histopatologické analýzy. Animálne modely môžu perspektívne slúžiť na testovanie infekčnosti tau proteínu izolovaného z mozgu pacientov s DAT.

Projekt prebehne v niekoľkých čiastkových experimentoch:

- GFP/AAV konštrukt na overenie miesta podania.

Celkom 2x5 samcov, 2x5 samíc = 20 potkanov

- Skrátенý tau proteín typ A/AAV = kortex.

Celkom 4x5 samcov, 4x5 samíc = 40 potkanov

- Skrátенý tau proteín typ A /AAV = hipokampus.

Celkom 4x5 samcov, 4x5 samcov = 40 potkanov

- Skrátенý tau proteín typ B/AAV = kortex.

Celkom 4x5 samcov, 4x5 samíc = 40 potkanov

- Skrátенý tau proteín typ B /AAV = hipokampus.

Celkom 4x5 samcov, 4x5 samcov = 40 potkanov

- Skrátенý tau proteín typ C/AAV = kortex.

Celkom 4x5 samcov, 4x5 samíc = 40 potkanov

- Skrátенý tau proteín typ C /AAV = hipokampus.

Celkom 4x5 samcov, 4x5 samcov = 40 potkanov

Celkom bude použitých 130 transgénnych samíc a 130 transgénnych samcov vo veku približne 8 týždňov.

Vybrané gény kódujú skrátенé formy tau proteínu, ktoré boli identifikované v mozgu pacientov s DAT.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Animálne modely sú cenným zdrojom nových poznatkov pre štúdium patogenézy Alzheimerovej choroby. Často sa používajú na predklinické testovanie nových liečiv alebo na hľadanie nových

biologických markerov pre diagnostiku. Ako animálne modely sa najčastejšie používajú geneticky modifikované zvieratá. Pripravujú sa buď klasickým spôsobom mikroinjektáže alebo inými transgénnymi technológiami. Iný spôsob prípravy animálnych modelov je aplikácia génov lokálne do citlivých oblastí mozgu. Na rozdiel od klasických transgénnych zvierat je tento spôsob prípravy animálnych modelov ďaleko jednoduchší a šetrí celkový počet zvierat potrebných pre experiment (napr. donorky a recipientky nie sú potrebné pre produkciu modelov). Vďaka tomuto prístupu ušetríme pomerne veľké množstvo laboratórnych potkanov. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia anestetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Operačný zákrok v celkovej anestézii	Nastrihnutie kože na hlave (1cm rana), vyvrtanie malého otvoru do lebky (1mm), zošitie rany. Po-operačná bolesť bude utlmená analgetikami
Odber krvi z chvosta	Štandardná metóda. Zviera sa seduje s podaním polovičnej dávky anestetík na utlmenie bolesti. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť stredná. Trvanie 1 minútu.
Odber mozgovomíechovej tekutiny	Zviera sa uvedie do celkovej anestézie. Nastrihne sa koža v oblasti krčnej chrbtice. Zavedie sa ihla do cisterna magna a odoberie sa max. 100ul CSF. Následne sa zviera humanne usmrtí.
Behaviorálne testovanie (Morrisovo vodné bludisko, phenotzper, open field)	Zvieratá budú testované v rôznych bludiskách. Žiadne bolestivé úkony na nich nebudú vykonávané.

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie: Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné ŠPP. So zvieratami sa bude zaobchádzať humanne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám.

Redukcia: Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov.

Nahradenie: Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v ľudskom mozgu, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané z tkaniva animálnych modelov za tie, ktoré pochádzajú z in vitro experimentov.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

Pre hľadanie alternatívnej metódy sme použili nasledovné registre medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód (ECVAM, NC3Rs, AltTox), kde sme nenašli žiadnu alternatívnu

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

Utrpenie versus prínos

Príčina Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatii zostáva neznáma. Nadalej sa pátra po mechanizme ochorenia a po jednotlivých molekulových dráhach, ktoré by boli zapojené v patogenéze ochorenia. V tomto ohľade sa čoraz viac využívajú animálne modely, pretože ich variabilita je ďaleko menšia, ako to vidíme v ľudskej populácii. Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu, všetky odbery tkanív sa uskutočnia v hlbokoj anestézii, a po odbere budú zvieratá humanne usmrtené. Výsledky získané z plánovaného experimentu môžu významne napomôcť k pochopeniu molekulových zmien odohrávajúcich sa v mozgu pacientov s DAT.

Začiatok pokusu je plánovaný na 20.2.2014 a bude sa realizovať počas nasledujúcich troch rokov, do 31.12.2016.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu - 1101/14-2219**Názov projektu:**

Infekčné formy tau proteínu v ľudských tauopatiách.

Podrobný účel postupu:

Cieľom predkladaného projektu je identifikovať jednotlivé kmene infekčných foriem patologicky pozmeneného proteínu tau, ktoré sú zodpovedné za šírenie neurofibrilárnej patológie v mozgu pacientov postihnutých neurodegeneračnými tauopatiami. Keďže patologicky pozmenený proteín tau je tvorený stovkami rôznych kmeňov, z ktorých pravdepodobne len niektoré disponujú infekčnými vlastnosťami, je nevyhnutné identifikovať práve tie, ktoré sa dokážu šíriť v mozgu a v tomto procese navodzovať neurofibrilárne zmeny. Tieto poznatky je možné získať po vpravení presne ocharakterizovaných kmeňov proteínu tau do mozgu experimentálnych potkanov a sledovať šírenie jednotlivých kmeňov v animálnom modeli.

Patologicky modifikované formy tau proteínu budú vyizolované z mozgového kmeňa potkanov línie SHR72 (lína exprimujúca patologicky skrátený proteín tau so štyrmi opakujúcimi sa sekvenciami) a z mozgovej kôry potkanov línie SHR24 (lína exprimujúca patologicky skrátený proteín tau s tromi opakujúcimi sa sekvenciami). Vzorky mozgového tkaniva určeného pre izoláciu proteínu tau budú získané z jedincov, ktorí dosiahli terminálne štádium a boli vyradení z chovu. Odber sa uskutoční uvedením zvierat do hlbkej anestézie a následnou dekapitáciou. Pre účely projektu plánujeme ďalej použiť mozgové tkanivo pacientov postihnutých Alzheimerovou chorobou (AD) a ďalšími tauopatiami (Pickovou chorobou PiD a Progresívnou supranukleárnou obrnou PSP). Ľudské izoláty budú následne rozfrakcionované na niekoľko kmeňov na základe veľkosti. Takto pripravené formy proteínu tau budú vpravené do mozgovej kôry potkanov línií SHR72, SHR24 a SHR, keďže je silný predpoklad, že rôzne kmene majú v jednotlivých líniách rozdielny potenciál vyvolať šírenie neurofibrilárnej patológie. Aplikácie budú vykonané s použitím stereotaktického aparátu. Táto metóda je v našom laboratóriu zabehnutá a vykonáva ju zaškolený personál. Popis operácie: Pred operáciou budú zvieratá uvedené do hlbkej anestézie kombináciou anestetík Zoletyl 100mg/ml (Tiletamine, Zolazepam), 30mg/kg hmotnosti zvierat a Xylariem 20mg/ml (Xylazine), 10mg/kg hmotnosti zvierat v pomere 3:5, ktoré budú podané intraperitoneálne. Intraperitoneálne podanie anestetík je bežne používaná metóda, ktorá je u hlodavcov uprednostňovaná pred intravenóznym podaním kvôli ľahšej a rýchlejšej manipulácii so zvieratami a zároveň zabezpečuje rýchly nástup účinku. Po tom, čo sa uistíme, že je zviera v hlbkej anestézii, bude pripevnené do stereotaktického aparátu vďaka ktorému sme schopní presne určiť miesto podania. Počas celej operácie a po nej budú zvieratá udržiavané pri teplote 37°C, aby nedošlo k ich podchladeniu. Zvieratám najprv nastrihne kožu na hlave (1cm rana), aby sme odkryli lebku, potom podľa presne určených koordinátov vyvrtáme malý otvor do lebky (1mm). Samotná aplikácia patologicky pozmenených proteínov tau bude prebiehať čo najpomalšie, maximálne 0,5 µl/min. Podávať budeme 2 µl do jednej hemisféry, aby sme zabezpečili dostatočné množstvo podávanej látky a zároveň nebola jej koncentrácia príliš vysoká. Po aplikácii necháme ihlu v mozgu ešte ďalších 5 - 8 minút, aby sme zabránili vytečeniu podávaného materiálu von a potom ju pomaly a opatrne vytiahneme. Posledným krokom operácie je zošitie rany a jej dezinfekcia, aby sme zabránili nechcenej infekcii. Pooperačnú bolesť budeme tlmiť analgetikami. Zdravotný stav zvierat budeme sledovať každý deň.

Aplikácie prebehnú v niekoľkých kolách. V prvom budú približne 8 týždňové samice SHR72 rozdelené do troch skupín, prvej skupine bude podaný patologicky pozmenený proteín tau izolovaný z SHR72, druhej z SHR24 a tretia skupina bude kontrolná, samiciam bude podaný extrakt izolovaný z netransgénnej línie SHR. V druhom kole bude rovnakým spôsobom využitá línia SHR24. V ďalších experimentoch bude proteín tau pred aplikáciou do SHR72 inkubovaný s protilátkami DC8E8 a DC1G6, aby sme zistili, či je možné šíreniu takýmto spôsobom zabrániť.

Patologicky pozmenený proteín tau bude tiež podaný línii SHR, aby sme zistili, či je schopný vyvolať šírenie aj v netransgénnych potkanoch. V ďalších kolách sa zameriame na experimenty, pri ktorých budú približne 8 týždňovým samiciam SHR72 vpravené do mozgovej kôry rôzne kmene patologicky pozmeného proteínu tau, ktoré boli izolované z pacientov postihnutých tauopatiami.

V druhej časti projektu sa plánujeme zamerať na popisanie úlohy imunitného systému a úrovne neurozápalu v šírení neurofibrilárnej patológie v mozgu. Potkany SHR72 budú vystavené účinku lipopolysacharidu gram negatívnych baktérií (LPS), ktorý účinkuje ako induktor silnej imunitnej odpovede a má prozápalové účinky alebo naopak, prostredníctvom nesteroidných antiflogistík (NSAID) bude imunitná odpoveď zvierať potlačená. Týmto zvieraťám budú následne do mozgovej kôry vpravené infekčné formy proteínu tau izolované z SHR72 a jeden kmeň z mozgu pacientov s Alzheimerovou chorobou, u ktorého bola v predchádzajúcom experimente dokázaná najväčšia infekčnosť a schopnosť šíriť sa do ostatných častí mozgu.

Mozgové tkanivo experimentálnych zvierať bude určené pre histopatologické analýzy, prostredníctvom ktorých identifikujeme kmene s infekčnými vlastnosťami a potenciálom vyvolať šírenie neurofibrilárnej degenerácie v jednotlivých líniiach. Po dosiahnutí terminálneho alebo iného predom určeného veku, budú všetky zvieraťá usmrčované v celkovej anestézii, do ktorej budú uvedené kombináciou anestetík Zoletyl 100mg/ml (Tiletamine, Zolazepam), 30mg/kg hmotnosti zvieraťa a Xylariem 20mg/ml (Xylazine), 10mg/kg hmotnosti zvieraťa v pomere 3:5 a následne vykonáme perfúziu s roztokom PBS a so 4% paraformaldehydom. Popis perfúzie a odberu mozgu: Po uistení sa, že zvieraťá boli uvedené do hlbokéj anestézie, budú pripevnené na podložku. Zvieraťám otvoríme hrudnú dutinu, prestrihneme uško pravej predsene a priškrtneme brušnú aortu. Do ľavej komory okamžite zavedieme ihlu, ktorou bude do tela potkana prúdiť roztok PBS s heparínom (10 IU/ml) po dobu jednej minúty (10 ml roztoku). Po jednej minúte vymeníme roztok PBS za 4% paraformaldehyd, ktorý bude do tela prúdiť 7 minút. Perfúzia so 4% paraformaldehydom nám zabezpečí precíznu fixáciu tkaniva. Po prebehnutí perfúzie budú zvieraťá dekapitované a opatrne im vyberieme mozog. Odber mozgovo-miechovej tekutiny prebehne tiež v celkovej anestézii. Zvieraťá upevníme do stereotaktického aparátu a hlavu polohujeme do 45° uhla. Nastrihneme kožu a svaly v oblasti krčnej chrbtice a opatrne zavedieme ihlu do cisterna magna. Odoberať plánujeme maximálne 100 µl mozgovo-miechovej tekutiny. Po odbere všetky zvieraťá sperrfundujeme a usmrtníme.

Projekt prebehne v niekoľkých čiastkových experimentoch:

Kontrola na overenie miesta podania.

5 samíc SHR.

Izolát z línie SHR72

15 samíc SHR72, 10 samíc SHR24, 10 samíc SHR, 10 samíc SHR72 vystavených LPS, 10 samíc SHR72 vystavených NSAID = 55 potkanov

Izolát z línie SHR24

10 samíc SHR72, 20 samíc SHR24 = 30 potkanov

Kontrolný extrakt z línie SHR

15 samíc SHR72, 20 samíc SHR24, 10 samíc SHR = 45 potkanov

Izolát z línie SHR72 inkubovaný s protilátkami DC8E8 a DC1G6

25 samíc SHR72

Fluorescenčne značený izolát z línie SHR72

8 samíc SHR72

Izolát z pacientov s AD – tri rôzne frakcie

3 x 10 samíc SHR72, 10 samíc SHR72 vystavených LPS, 10 samíc SHR72 vystavených NSAID = 50 potkanov

Izolát z pacientov s PiD – tri rôzne frakcie

3 x 10 samíc SHR72 = 30 potkanov

Izolát z pacientov s PSP – tri rôzne frakcie

3 x 10 samíc SHR72 = 30 potkanov

Kontrolný izolát zo zdravých pacientov
 10 samíc SHR72 po vystavení zvierat LPS
 Kontrolný izolát zo zdravých pacientov
 10 samíc SHR72 po vystavení zvierat NSAID

Celkom bude použitých 298 potkanov, vo veku približne 8 týždňov. Z toho transgénnych 273 a netransgénnych 25. Všetky použité zvieratá budú samice.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Zámerom predkladaného projektu je identifikovať a charakterizovať infekčné formy proteínu tau v biologických systémoch. Patologicky pozmenený proteín tau je tvorený stovkami rôznych kmeňov, z ktorých sú pravdepodobne infekčné a schopné šírenia neurofibrilárnej patológie len niektoré, preto je nevyhnutné identifikovať práve tieto formy. Keďže progres neurodegeneračných zmien prebiehajúcich v mozgu pacientov postihnutých niektorou z tauopatií, ako aj získanie kompletnej imunitnej odpovede mozgu na podnet akým je prítomnosť infekčných foriem proteínu tau nie je možné simulovať v podmienkach in vitro, animálne modely pre nás ostávajú aj naďalej jedinou možnou variantou schopnou poskytnúť údaje, ktoré sa v čo najväčšej miere približujú procesom odohrávajúcim sa v mozgu pacientov. Jednotlivé formy proteínu tau budú ocharakterizované a vpravené do mozgovej kôry experimentálnych potkanov. Takýmto spôsobom identifikujeme kmene, ktoré sú schopné infikovať neuróny a šíriť sa v mozgu.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia anestetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Operačný zákrok v celkovej anestézii	Nastrihnutie kože na hlave (1cm rana), vyvrtanie malého otvoru do lebky (1mm), zošitie rany. Po-operačná bolesť bude utlmená analgetikami
Odber mozgovo-miechovej tekutiny	Zviera sa uvedie do celkovej anestézie. Nastrihne sa kože v oblasti krčnej chrčtice. Zavedie sa ihla do cisterna magna a odoberie sa max. 100ul CSF. Následne sa zviera humánne usmrtí.

Zjemenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné predpisy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a v najväčšej možnej miere sa budeme snažiť eliminovať stres, pretože stres nežiaduco ovplyvňuje experiment. Starostlivosť zabezpečí jedna osoba, na ktorú si zvieratá zvykli. Počet zvierat v nádobe zohľadňuje normy dané zákonom, potkany sú chované v počte 5 zvierat na chovnú nádobu, aby sme zabezpečili sociálne interakcie medzi zvieratami. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám. Operácia prebehne v celkovej anestéze, po jej ukončení budú zvieratám podávané analgetiká na tlíšenie bolesti, odber mozgovo-miechovej tekutiny, perfúzia s roztokom PBS a 4% paraformaldehydrom a dekapitácia prebehnú v celkovej anestéze.

Redukcia:

Navrhovaný počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov.

Nahradenie:

Súčasná úroveň vedeckého poznania nám neumožňuje sledovať šírenie infekčných foriem proteínu tau v in vitro podmienkach a zároveň získať relevantné výsledky v čo najväčšej miere odzrkadľujúce deje prebiehajúce v mozgu pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou alebo inou príbuznou tauopatiou. Animálny model je tiež nevyhnutný aj pre ďalšie pokusy, kde po aplikácii proteínu tau do mozgu budeme sledovať vplyv imunitného systému a úrovne neurozápalu na šírenia neurofibrilárnych zmien v mozgu, čo nie je možné v in vitro systémoch. Z legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať na humánných pacientoch.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

Pre hľadanie alternatívnej metódy sme použili nasledovné registre medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód (ECVAM, NC3Rs, AltTox), kde sme nenašli žiadnu alternatívnu metódu, ktorú by sme mohli použiť vo svojom projekte, aby sme nemuseli vykonávať experimenty na zvieratách.

Utrpenie versus prínos

Príčina Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatií zostáva neznáma. Na pochopenie kompletnej patogenézy týchto neurodegeneračných ochorení je nevyhnutné pochopiť kompletnú kaskádu dejov a ich spúšťačov. Je známe, že neurofibrilárna patológia sa šíri v mozgu pacientov v časovo a anatomicky definovaných sekvenciách, avšak konkrétne kmene patologicky pozmeneného proteínu tau zodpovedné za infekčné vlastnosti a schopnosti šírenia neboli doposiaľ identifikované a charakterizované. Predpokladaný prínos projektu zahŕňa identifikáciu kmeňov s infekčnými vlastnosťami a schopnosťou šírenia v mozgu pacientov s Alzheimerovou chorobou a niektorou z príbuzných tauopatií (Pickova choroba a progresívna supranukleárna obrna) a tiež popísanie vplyvu úrovne neurozápalu na šírenie neurofibrilárnej patológie. Počas všetkých úkonov eliminujeme stres a utrpenie zvierat, t.z. všetky úkony na zvieratách, ako odber mozgovomíechovej tekutiny, intracerebrálna injekcia a perfúzia, budú prebiehať v úplnej anestézii a po prebratí z anestézie im budú podávané anestetiká, preto prínos tohoto projektu ďaleko prevyšuje mieru utrpenia experimentálnych zvierat.

Začiatok pokusu je plánovaný na 20.2.2014 a bude sa realizovať počas nasledujúcich troch rokov, do 31.12.2016.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu 1101/14-221

Názov projektu:

Testovanie účinnosti protilátok na animálnych modeloch pre Alzheimerovu chorobu

Podrobný účel postupu:

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

Predložený projekt má za úlohu testovať účinnosť protilátok v podmienkach in vivo. Zvieratám budú aplikované intraperitoneálne protilátky s cieľom potlačiť neurodegeneračné zmeny v centrálnej nervovej sústave. Po ukončení experimentu, zvieratám odoberieme krv z očného splavu, humánne usmrtime a odoberieme vzorky mozgu na biochemické a imunohistochemické vyšetrenie. Preštudovali sme všetky dostupné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili nahradiť zvieratá za bunkové systémy. Komplexnosť sledovaných molekulárnych procesov si však vyžaduje použiť cicavčí model. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Testovanie schopnosti protilátok terapeuticky ovplyvniť neurodegeneračné zmeny v centrálnej nervovej sústave animálnych modelov pre Alzheimerovu chorobu nie je možné vykonať na bunkových kultúrach, keďže in vitro systémy nie sú schopné vytvoriť plnú formu neurodegeneračných zmien. Vzhľadom na skutočnosť, že v súčasnosti nie je dovolené tieto metódy skúmať na ľudských pacientoch bez predchádzajúceho otestovania na zvieratách, je použitie animálnych modelov nevyhnutné.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia (1x v za týždeň)	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 1 minútu.
Odber krvi (retroorbitálny plexus)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Podá sa polovičná dávka anestetík na utlmenie bolesti. V okamihu ako je zviera sedované sa sklenená kapilára jemne zasunie pod očnú guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť stredná. Trvanie 1 minútu.

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné ŠPP. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám.

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov. Stanovený počet zvierat sa opiera o naše predchádzajúce experimenty na potkanoch. Ukázalo sa, že počet zvierat v skupine menší ako 15 nie je dostatočne štatisticky relevantný, keďže aj u transgénnych zvierat sa vyskytuje variabilita daná mierou expresie transgénneho proteínu.

Nahradenie:

Súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje testovať protilátky v in vitro podmienkach. Z legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať priamo na humánnych pacientoch, bez predchádzajúceho otestovania na laboratórnych zvieratách.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

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

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu, všetky odbery tkanív sa uskutočnia v hlbkej anestézii, a po odbere budú zvieratá humánne usmrtené. Odber, krvi trvá len pár sekúnd a vykonáva sa na sedovaných zvieratách. Intraperitoneálna aplikácia trvá niekoľko sekúnd. Zvieratá dostávajú nízke dávky netoxických protilátok, ktoré nespôsobujú žiadnu nebezpečnú imunitnú odpoveď, ktorá by viedla k poškodeniu organizmu. Získané informácie z predkladaného experimentu významne napomôžu pochopiť mechanizmus šírenia neurofibrilárnej degenerácie a jej prípadného zastavenia prostredníctvom imunitnej odpovede.

Začiatok pokusu je plánovaný na 20.2.2014 a bude sa realizovať počas nasledujúcich troch rokov, do 31.12.2016.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu**Názov projektu:** 1101/14-221c

Budovanie mozgovej banky tkanív transgénnych modelov pre Alzheimerovu chorobu

Podrobný účel postupu:

Alzheimerova choroba, rovnako ako veľa ďalších neurodegeneračných ochorení, sa spája s akumuláciou abnormálnej formy proteínov v centrálnej nervovej sústave, ktorá spôsobuje degeneráciu a následnú dysfunkciu neurónov. Podľa súčasných štatistík trpí Alzheimerovou chorobou 24 miliónov ľudí a každý rok sa toto číslo zväčší o 4,5 milióna nových prípadov. Podľa predpokladov počet pacientov do roku 2040 stúpne celosvetovo v priemere o 200 percent. Súčasné liečebné postupy spočívajú najmä v symptomatickej a podpornej terapii avšak terapia kauzálna zatiaľ neexistuje. Aj preto sa v ostatnom čase hľadajú nové terapeutické ciele, ktoré sú zapojené v patogenéze ochorenia. Zdrojom nových poznatkov sú predovšetkým mozgové tkanivá z ľudského mozgu ako aj z mozgu animálnych modelov.

Predložený projekt si kladie za svoj cieľ zbierať mozgové tkanivá zo všetkých transgénnych a kontrolných zvierat, ktoré boli súčasťou iných experimentov, alebo boli vyradené z chovu. Zvieratá budú testované v rôznych behaviorálnych testoch (Catwalk, Phenotyper), po ich ukončení budú uvedené do hlbkej anestézie, odoberie sa im mozgovo-miechová tekutina a krv a následne budú humane usmrtené pomocou dekapitácie, alebo pomocou perfúzie. Mozgové tkanivá a mozgovo-miechová tekutina budú slúžiť pre proteomické, metabolomické a transkriptomické analýzy. Výsledky týchto analýz môžu viesť k identifikácii nových terapeutických cieľov a biologických markerov.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Informácie získané z ľudského mozgového tkaniva majú často obmedzenú výpovednú hodnotu vzhľadom na veľmi vysokú heterogenitu ľudskej populácie. Aj preto sa čoraz viac využívajú animálne modely, kde je heterogenita významne redukovaná, čo zvyšuje pravdepodobnosť objavenia nových členov kaskády chorobných zmien. Pre tieto účely budeme využívať všetky zvieratá, ktoré sú určené na vyradenie z chovu, alebo tie, ktoré boli súčasťou iného experimentu, ktorý nevyužíval mozgové tkanivo pre ďalšie analýzy. Vďaka tomuto prístupu ušetríme pomerne veľké množstvo laboratórnych potkanov. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia anestetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie: Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné ŠPP. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám.

Redukcia: V danom experimente budeme využívať zvieratá vyradené z chovu, čím redukuje množstvo experimentálnych zvierat, ktoré by bolo potrebné pre účely experimentu zvlášť odchováť.

Nahradenie: Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v ľudskom mozgu, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané z tkaniva animálnych modeloch za tie, ktoré pochádzajú z in vitro experimentov.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

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

Utrpenie versus prínos

Príčina Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatií zostáva neznáma. Nadalej sa pátra po mechanizme ochorenia a po jednotlivých molekulových dráhach, ktoré by boli zapojené v patogenéze ochorenia. V tomto ohľade sa čoraz viac využívajú animálne modely, pretože ich variabilita je ďaleko menšia, ako to vidíme v ľudskej populácii. Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu, všetky odbery tkanív sa uskutočnia v hlboké anestézii, a po odbere budú zvieratá humánne usmrtené.

Začiatok pokusu je plánovaný na 20.2.2014 a bude sa realizovať počas nasledujúcich dvoch rokov, do 31.12.2016.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Príloha č. 1 ~ 1099/14-221

Metodické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Úloha črevnej mikroflóry v patogeneze aterosklerózy a kolorektálneho karcinómu a možnosti jej modulácie v ich prevencii

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

črevná mikroflóra, patogeneza, ateroskleróza, kolorektálny karcinóm, probiotiká

Účel projektu : Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum s cieľom štúdia úlohy črevnej mikroflóry v patogeneze aterosklerózy a kolorektálneho karcinómu a možnosti jej modulácie probiotickými mikroorganizmami Lactobacillus plantarum LS/07

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo wellfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónii geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Opísať ciele projektu:

Hlavným cieľom predloženého projektu je získanie nových poznatkov o úlohe črevnej mikroflóry v regulácii protektívnych mechanizmov organizmu a jej vplyvu na bunkové a molekulové mechanizmy v patogeneze aterosklerózy a kolorektálneho karcinómu a možnosti jej modulácie v prevencii oboch chorôb využitím probiotického kmeňa Lactobacillus plantarum LS/07.

Získané poznatky prispedia k zefektívneniu prevencie a terapie nádorových a srdcovo-cievnych chorôb a môžu významne napomôcť pri znížení zdravotných rizík v dôsledku chronických chorôb.

Prínos z vykonaného projektu

Získanie nových poznatkov o úlohe črevnej mikroflóry v regulácii protektívnych mechanizmov organizmu a jej vplyvu na bunkové a molekulové mechanizmy v patogeneze aterosklerózy a kolorektálneho karcinómu a možnosti jej modulácie v prevencii oboch chorôb.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórny potkan, plemeno Sprague-Dawley, samce 120 kusov

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

Použitie zvieratá v experimente budú usmrtené v hlbokej anestéze a biologický materiál – trus, krv budú použité na stanovenie parametrov metabolického profilu.

Tkanivo a orgány budú použité pre prípravu histologických preparátov za účelom presnejšej diagnostiky ochorenia resp. poškodenia orgánov.

Predpokladaná úroveň krutosti:

slabá

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Na dosiahnutie vytyčených cieľov je nutný experiment „in vivo“, keďže ide o úlohu črevnej mikroflóry v patogeneze aterosklerózy a kolorektálneho karcinómu, alternatívne metódy na riešenie tohto komplexného problému nie sú vhodné. Je možné len uvažovať o dizajne štúdie, prípadne použití iných experimentálnych zvierat.

2. Redukcia počtu zvierat:

Počet zvierat sme výrazne znížili až na 120 kusov aj s potenciálnym rizikom nenaplnenie všetkých cieľov projektu pre malé množstvo biologického materiálu. Máme len jednu kontrolnú skupinu ku trom chorobným jednotkám, ktoré skúmame : dysbióza, ateroskleróza a kolorektálny karcinóm a ďalšie skupiny, ktoré sledujú ich vzájomné ovplyvňovanie, ako aj preventívnu úlohu probiotika

3. Zjemnenie:

Laboratórny potkan je vhodný na takýto typ experimentu, lebo nie sú problémy s jeho reprodukciou, na základe literárnych údajov vieme, že plemeno Sprague – Dawley je vhodnejšie na sledovanie lipidového metabolizmu. Pri realizácii experimentov sme minimalizovali stres zvolením vhodných postupov a zabezpečením pohody pre zvieratá v súlade s prevádzkovým poriadkom akreditovaného pracoviska, kde sa experiment realizuje.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

PRÍLOHA č. 2 1098/14-221
Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Posúdenia novej povrchovej úpravy štepov určených na použitie pri fistulách na renálnu dialýzu

Podrobný opis cieľa pokusu a východisková situácia projektu:

Opakované pichanie vény vedie k jazveniu a neskôr môže spôsobiť nenapraviteľné poškodenie cievy takého stupňa, že ju nie je možné ďalej na tento účel používať. Postupom času sa každý cievny prístup takýmto spôsobom znehodnotí.

Aby bolo možné predĺžiť životnosť dialyzačného prístupu, je možné umiestniť syntetický PTFE „loop“ štep na (obvykle) predlaktie pacienta so zlyhanými obličkami. Komplikácie spojené s vpichovaním do takýchto štepov sú spojené najmä s tým, že PTFE štepy nemajú schopnosť uzavrieť miesto vpichu úplne a dostatočne rýchlo, čo vedie k tvorbe hematómu okolo štepu, čo následne podnecuje infekciu, môže viesť k zlyhaniu cievneho prístupu a zhoršuje celkovú morbiditu pacienta. V minulosti bolo publikovaných viacero pokusov o vytvorenie cievneho štepu, ktorý by sa sám uzatváral po vpichu, avšak s nedostatočným úspechom.

Základný materiál je per-fluoro-elastomér, ktorý dokážeme vyrobiť buď do pevného, alebo mikro-pór / mikro – celulárneho formátu pomocou patentovaných techník spracovania v závislosti od zamýšľaného spôsobu aplikácie. Dokážeme náš materiál aplikovať ako non-delaminačný povlak na akýkoľvek PTFE substrát.

Per - fluór - elastoméry sú triedou materiálov, ktoré sú úplne fluórované a preto majú chemický / biochemický profil reaktivity nerozoznateľný od PTFE , alebo ePTFE . Jediný podstatný rozdiel sa týka ich elastomérových fyzikálnych vlastností. Pre "samo – uzatvárací" (samo-tesniaci) povlak používame mikro – celulárny formát navrhnutý špeciálne tak, aby sa znížilo krvácanie z operačného rezu a najmä po-vpichové krvácanie. Počiatočné fyzikálne testovanie preukázalo zníženie úniku tekutiny z miesta po vpichu o viac ako 80 % (pri 120 mm Hg hydrostatickom tlaku).

Tým, že sme našu novú povrchovú úpravu aplikovali na najčastejšie používaný a bežne dostupný ePTFE , vytvorili sme zariadenie, kde povrch v kontakte s krvou je materiál schválený a bežne používaný na tento účel a zároveň, vďaka novej povrchovej úprave, signifikantne znižujeme čas krvácania po vpichu ihly, ktoré býva spojené s komplikáciami ako hematóm, pseudoaneuryzma, predčasná trombóza, atď. a ktoré by inak vyžadovali riešenie prostredníctvom chirurgického zákroku."

Špecifické ciele projektu:

- 1) Hlavným cieľom projektu je dokázať, že vďaka novej povrchovej úprave sa čas krvácania po vpichu do umelého PTFE cievneho štepu významne skráti v porovnaní so štepom bez tejto úpravy. Všetky ostatné informácie o komplikáciách (najmä krvácanie) spomínam preto, aby bolo zjavné, prečo je tak dôležité minimalizovať čas krvácania.
- 2) predĺžiť životnosť dialyzačného prístupu
- 3) zabrániť tvorbe hematómu okolo štepu, čo následne podnecuje infekciu, môže viesť k zlyhaniu cievneho prístupu a zhoršuje celkovú morbiditu pacienta.

Počet a typ zvierat, ktoré sa v projekte použijú:

Prasa domáce 7 ks hmot. 30-35 kg

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Redukcia počtu zvierat:

Minimálny počet zvierat, ktoré sú v projekte použité zodpovedá najnižšiemu počtu zvierat potrebných aby sa dal uvedený projekt vyhodnotiť a jeho výsledky použiť v humánnej medicíne

Vylepšenie a zjemnenie podmienok pokusu:

V záujme vylepšiť a zjemniť podmienky zvierat v pokuse budeme zvieratá pred operačným zákrokom premedikovať a počas operačného zákroku držať v celkovej anestéze, po skončení budú zvieratá pod lekárske dozorom, v prípade potreby bude podávaný inj. Tramal. Po skončení projektu budú zvieratá humánne utratené predávkovaním anestetika

Náhrada:

Alternatívny test, ktorý by nahradil test na zvierati nie je možný, nakoľko pre správnu funkciu nového testovaného materiálu je potrebné zachovanie všetkých fyziologických procesov v živom organizme.

Klasifikácia krutosti:

Opis vzniknutej ujmy na zvieratách (doplnenie netechnického zhrnutia projektu)

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

- f) Per os a i.m. opádavanie liekov acilpirín , heparín, **slabé postupy**
- g) i.m. podávanie pemedikácie Stresnil, diazepam : **slabé postupy**
- h) i.m. podávanie anestézie ketamín xylazín: **slabé postupy**
- i) operačný zákrok: **stredné postupy**
- j) post operačné podávanie ATB, a analgetík i.m. : **slabé postupy**

Spätne' posúdenie - nie

Netechnické zhrnutie projektu: Experimentálna infekcia BALB/c myši delečnými mutantami myšacieho herpetického vírusu MHV-68, ktoré majú deléciu vírus-špecifických génov M1-M4

Myšací herpetický vírus (MHV) sa celosvetovo používa ako model pre štúdium humánnych onkogénnych vírusov – vírusu Epsteina a Barrovej (EBV) a vírusu asociovaného s Kaposiho sarkómom (KSHV), nakoľko priame použitie týchto vírusov *in vitro* a *in vivo* experimentoch je limitované vzhľadom na ich špecifiká, ako aj obmedzený počet hostiteľov. Detailné poznanie mechanizmov navodzovania a udržiavania latencie vírusu v hostiteľskom organizme, ako aj mechanizmov podieľajúcich sa na transformačnom procese, pomôže priblížiť sa k vývoju účinnej vakcíny voči vyššie spomenutým ľudským vírusom.

Predložený projekt pokusu je súčasťou riešenia domáceho výskumného projektu (VEGA) a je zameraný na:

1/ zisťovanie vplyvu delécií jednotlivých vírus-špecifických génov u MHV (ktoré sú lokalizovanej v tej časti genómu, kde sa u EBV a KSHV vyskytujú gény zodpovedné za navodenie a udržanie latencie a za onkogénny potenciál daných vírusov) – vplyv na priebeh akútnej a chronickej fázy infekcie, navodzovanie latencie, vznik nádorov;

2/ zisťovanie diseminácie vírusu v priebehu akútnej aj chronickej fázy infekcie do jednotlivých orgánov hostiteľa metódou *in vivo imagingu* – čo bude umožnené prítomnosťou luciferázovej kazety v genóme mutantných vírusov.

Sledovanie vplyvu jednotlivých vírus-špecifických génov na imunologické a patogenetické charakteristiky infekcie nie je možné na *in vitro* systémoch. Aby bolo možné zistiť, ako delécia určitého génu ovplyvní priebeh infekcie, imunitnú odpoveď hostiteľa a prípadný vznik nádorov, musíme zvoliť sledovanie na *in vivo* modeloch – v tomto prípade laboratórnych myšiach.

Vzhľadom na nevyhnutnosť použitia laboratórnych zvierat sa v projekte sleduje a uplatňuje najnovšia legislatíva v súvislosti so smernicami o použití zvierat na vedecké účely, ktorú uzákonil Európsky parlament vo forme revidovanej smernice 2010/63/EU o zvieratách používaných na vedecké účely, ktorá nadobudla účinnosť 1. januára 2013, ako aj Nariadenie Vlády Slovenskej republiky č. 377/2012 Z. z. zo 14. novembra 2012, ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely a Vyhláška č. 436/2012 Z. z. Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky zo 14. decembra 2012, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o požiadavkách na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely. Nové právne predpisy prísne dbajú na dodržiavania pravidiel troch Rs (replacement, reduction, refinement) (t.j. nahradenie, obmedzenie a zjemnenie/zmiernenie testov na zvieratách), t.j. aby sa minimalizoval počet zvierat používaných na pokusy a aby sa vždy, keď je to možné, využívali alternatívne metódy, a aby sa v prípade keď nie je možné použiť alternatívne metódy, zlepšili a zjemnili metódy v postupoch, pri ktorých sa odstráni alebo obmedzí na najnižšiu mieru bolesť, utrpenie, strach alebo trvalé poškodenie zvierat.

V projekte sa ako modelový druh používa myš laboratórna. Maximálny počet zvierat, ktoré sa v pokusoch použijú za 18 mesiacov, je 250 ks Balb/c myši (samičky). Tento kmeň myši sa vybral na základe predchádzajúcich experimentov realizovaných na našom pracovisku, ako aj na základe pokusov vykonaných na mnohých zahraničných pracoviskách (ide o inbreďnú líniu, ktorej použitie zabezpečuje štandardizované výsledky, je dobre vnímavá

na infekciu, avšak s minimálnou alebo žiadnou mortalitou a myš ako taká je veľmi príbuzná prirodzeným hostiteľom MHV – *Myodes glareolus* a *Apodemus flavicollis*).

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

Laboratórne zvieratá budú počas celého pokusu chované za štandardných podmienok podľa platnej normy EÚ, pričom sa budú rešpektovať základné etické princípy požadované pri zaobchádzaní s pokusnými zvieratami. V súlade s 3Rs zásadami sa počas celého pokusu budú dodržiavať postupy maximálne zjemňujúce pokus. Pre laboratórne myši budú počas pokusov vytvorené dobré životné podmienky, obmedzí sa ich bolesť, utrpenie, ako aj prípadná trvalá ujma na minimum. Na základe predchádzajúcich *in vivo* experimentov, ako aj informácií z dostupnej domácej i zahraničnej literatúry, infekcia myšacím herpetickým vírusom nebude pre myši výrazne zaťažujúca a očakávaná mortalita v dôsledku infekcie bude minimálna, príp. žiadna.

Pri výskyte bolestivých stavov bude zvieratám podaný prípravok na zníženie bolesti (buprenorfin alebo ketoprofen podľa odporúčaného dávkovania na základe hmotnosti zvieratá). Počas celého trvania experimentov budú mať zvieratá možnosť pohybu, dostatok potravy a vody. Na konci čiastkových experimentov (ako aj celého pokusu) budú zvieratá humanne usmrtené. Ich orgány budú vypreparované a budú vyšetrované na prítomnosť/neprítomnosť infekčného vírusu a vírusovej DNA, čo nám pomôže rozšíriť poznatky o vplyve jednotlivých vírus-špecifických génov na disemináciu vírusu v hostiteľskom organizme a navodenie a udržiavanie latencie v jednotlivých orgánoch.

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov, postupy, ktoré sa budú vykonávať na zvieratách v plánovaných pokusoch, je možné zaradiť do kategórie „slabé“ až „stredné“. Tu sme vychádzali z Prílohy 4 Nariadenia vlády č. 377/2012 Z. z., kde v príkladoch rôznych druhov postupov zaradených do jednotlivých kategórií sú v kategóriách „slabé“ a „stredné“ popísané rovnaké, príp. podobné postupy, ktoré budeme vykonávať aj my. Príkladom: oddiel III, 1. a, c, f, g; 2. d. Na základe predchádzajúcich experimentov, ako aj vedomostí o vlastnostiach myšacieho herpetického vírusu nepredpokladáme vznik nádorov, ktorý je popísaný v časti 3. e. V prípade vzniku nádorov budú zvieratá okamžite humanne usmrtené.

Bežnú, každodennú starostlivosť o zvieratá v experimentoch bude vykonávať školený personál, tzn. pracovníci pokusného zariadenia.

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

Netechnické zhrnutie projektu 999/14-221

Názov projektu:

Vytvorenie a validácia nového HDM modelu alergického zápalu dýchacích ciest

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: EK 1427/2013

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

Roztoče, HDM, alergická rinitída, astma

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

Ciele projektu:

Ciele projektu sú stanovené nasledovne:

- Cieľ 1: Vytvorenie HDM modelu alergického zápalu; verifikácia požadovaných zmien v organizme morčiat po podaní HDM
 - stanovením koncentrácie interleukínu 5 a 13 (IL-5 a IL-13) a cytokínu CCL20 v periférnej krvi, bronchoalveolárnej laváži, nazálnej laváži a homogenizáte tkaniva
 - odberom tkaniva na histologické (eozinofilný zápal) a imunohistochemické (proteíny tight junctions – occludin a claudin-1) vyšetrenie
- Cieľ 2: Následná validácia novovytvoreného modelu sledovaním odpovede morčiat v
 - skin prick testoch s HDM
 - reaktivite dýchacích ciest *in vivo* podľa Pennocka
 - nazálnych provokačných testoch
 - vyšetrení kašľovej reaktivity

Prínos z vykonaného projektu

Výskum fyziológie respiračného systému a ochorení dýchacích ciest a pľúc prispieva k lepšiemu pochopeniu patomechanizmu ochorení a je zdrojom nových údajov s potencionálnou klinickou aplikáciou. Väčšina nových poznatkov v oblasti výskumu obranných reflexov dýchacích ciest bola získaná pomocou modelu u morčiat, nakoľko neurofyziológia a neurofarmakológia kašľového reflexu sprostredkovaná výlučne blúdivým nervom má veľmi podobné vlastnosti ako u morčiat tak aj u ľudí je možná potenciálne úspešná translácia výsledkov výskumu na morčati na fyziológiu a farmakológiu kašľa u ľudí.

Modely použité na štúdium patologických procesov v dýchacích cestách – a konkrétne moduláciu kašľa v patologických podmienkach - používajú pasívnu senzibilizáciu ovalbumínom – proteínom vaječného bielka, ktorý v určitých aspektoch nekopíruje dostatočne mechanizmus, priebeh a dôsledky senzibilizácie dýchacieho systému u ľudí. .

Roztoče (angl. house dust mites, HDM), najmä druhy *Dermatophagoides pteronyssius* a *Dermatophagoides farinae* predstavujú jeden z najčastejších respiračných celoročných alergénov u ľudí, avšak modely využívajúce HDM sú používané v oveľa menšej miere ako modely s využitím ovalbumínu pravdepodobne z dôvodu jednoduchšej interpretácie výsledkov pri monovalentnej senzibilizácii ovalbumínom. HDM a jeho súčasti – štrukturálne proteíny roztočov, ich fekálne pelety, chitín, endotoxín, huby a ich antigény – predstavujú polyvalentnú a komplexnú senzibilizáciu imunitného systému na rôznych líniách imunitnej odpovede organizmu s rozvojom symptómov a znakov predovšetkým v dýchacom systéme.

Cieľom projektu je vytvoriť a validovať model alergického zápalu dýchacích ciest s použitím HDM a následné štúdium mechanizmov periférnej plasticity kašľového reflexu v HDM navodenej hypersenzitivite dýchacích ciest. Predpokladáme, že senzibilizáciou dosiahneme poškodenie tight junctions medzi epitelovými bunkami – nakoľko HDM častice sú známe svojou proteázovou aktivitou – a získame možnosť vyvolávať kašeľ nižšími koncentráciami tusigénov, než je tomu v modeli, ktorý momentálne používame. Predpokladáme, že tento model bude relevantnejší pre vystihnutie konceptu „hypersenzitivity“ dýchacích ciest. Hlavnou úlohou validácie takto vytvoreného modelu je vyššia aplikovateľnosť výsledkov získaných pomocou tohto modelu vo výskume kašľového reflexu u ľudí.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Na celú dobu trvania projektu a na dosiahnutie stanovených cieľov projektu je celkový plánovaný počet zvierat **96** jedincov, samcov, Dunkin Hartley.

In vitro: tieto metodické postupy sú spoločné tak pre kvantitatívne stanovenie jednotlivých cytokínov v periférnej krvi, v bronchoalveolárnej a nosovej laváži ako pre histologické, resp. imunohistochemické vyšetrenie tkaniva

Etické aspekty: Zvieratá budú usmrtené predávkovaním anestetika (uretanu) intraperitoneálne, a tkanivá, ktoré sa budú odoberať na jednotlivé vyšetrenia budú odobrané z ich tiel post mortem.

In vivo: tieto metodické postupy sa budú vykonávať u bdelých morčiat – senzibilizácia, skin prick test, nazálne provokačné testy a kašľové testy (popísané nižšie).

Etické aspekty: pokusy na bdelých zvieratách nespôsobujú zvieratám dyskomfort, prípadne stres, nakoľko zvieratá sú na experimentálne podmienky vopred adaptované.

Senzibilizácia zvierat

Zvieratá budú senzibilizované inhaláciou aerosólu antigénov roztočov s určenou koncentráciou po dobu 5 minút denne v priebehu 14 dní. Pred začiatkom senzibilizácie budú zvieratá adaptované na laboratórne podmienky, personál a priebeh senzibilizácie inhaláciou sterilného pufrovaného fyziologického roztoku po dobu 5 minút – táto adaptácia prebehne minimálne dvakrát.

Skin prick test

Skin prick test bude slúžiť na overenie úspešnosti senzibilizácie. Kvapka roztoku alergénu roztočov (15 $\mu\text{mol/mL}$) sa kvapne na kožu zvierťa a v mieste aplikácie sa vykoná vpich hlboký 1 až 2 mm do kože pomocou lancety – pozitívna reakcia sa prejaví začervenaním a opuchom miesta vpichu.

Nazálne provokačné testy

Kvapka antigénu roztočov (15 $\mu\text{mol/mL}$) sa aplikuje zvieratú intranazálne – v prípade senzibilizovaného zvierťa vyvolá príznaky alergického zápalu – rinokonjunktivitídy – sekréciu (z nosa a spojoviek), zvukové fenomény, svrbenie a predovšetkým opuch sliznice horných dýchacích ciest, ktorý spôsobí obmedzenie prietoku.

Príznaky alergického zápalu sa objavia takmer ihneď po aplikácii – príznaky sú hodnotené na stupnici od 0 do 6 podľa nasledovnej tabuľky, ktorá bola vyvinutá a validovaná na našom pracovisku:

	0	1	2
Spojovky	Bez zmeny	Zasľzené oči	Viditeľné slzenie
Nosová sekrécia	Bez sekrécie	Mierna sekrécia	Odkvapkávanie sekrétu
Nosové zvukové fenomény	Bez zvukových prejavov	Fenomény počuteľné	Fenomény počuteľné z diaľky

Vyšetrenie kašľovej reaktivity

Bdelé zvieratá sú jednotlivito umiestňované do pletyzmografu (typ 855, Hugo Sachs Electronic, Nemecko), ktorý pozostáva z dvoch komôr – hlavová a telová komora. Otvor medzi komorami je vybavený gumovým tesnením, ktoré zabraňuje komunikácii medzi komorami – veľkosť tesnenia je volená podľa veľkosti zvierťa tak, aby mu nestláčala krk. Na hlavovú komoru je pripojený nebulizér (Pari Provokation Test I, Menzel, Nemecko s výrobcom udávanými

špecifikáciami – výkon 5 L/min a mediánom častíc 1,2 µm) a odsávacie zariadenie s konštantným výkonom 5 L/min, ktoré zabezpečujú konštantný prietok aerosólu.

Zmeny respiračných parametrov, najmä prietoku, sú merané pneumotachograficky (Godart, Nemecko) s Fleischovou hlavickou pripojenej k hlavovej komore. Údaje sú zaznamenávané pomocou systému ACQ Knowledge (Biopack, Santa Barbara, CA, USA). Zvukové fenomény sú nahrávané mikrofónom umiestneným v strope hlavovej komory, ktorý je pripojený cez predzosilňovač k MP3 rekordéru. Pneumotachografické údaje a zvukový záznam sú simultánne nahrávané pre neskoršiu analýzu.

Vyšetrenie kašľovej reaktivity sa vykonáva pomocou 0,4 M kyseliny citrónovej (Fischer, Slovenská republika) po dobu 10min. V našom projekte by sme chceli dosiahnuť vznik takej hypersenzitivity dýchacích ciest, pri ktorej by kašľový prah zvierat bol posunutý k nižším hodnotám.

Kašeľ je definovaný ako expiračný fenomén, ktorý narušuje bazálny dychový vzor a je sprevádzaný zvukovým fenoménom – pneumotachografické a zvukové údaje sú posudzované dvoma nezávislými, školenými pozorovateľmi.

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

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

Ďalšie postupy sa vykonávajú v celkovej hlbokjej anestézii, kedy už vedomie nenadobudnú.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

- a) Postupy bez možnosti zotavenia – ide o postupy, ktoré sa celé vykonávajú v celkovej anestézii, po ktorej už zvieratá nenadobudnú vedomie
 - a. Odber tkanív a buniek po ich predchádzajúcom značení na ďalšie skúmanie – biochemické, imunohistochemické a histologické vyšetrenie
- b) Slabé
 - a. Vyvolanie alergickej rinitídy a Skin prick test
 - b. Vyvolanie kašľa inhaláciou tusigénneho aerosólu

Alergická rinitída sa vyvoláva podaním kvapky suspenzie alergénu do nosových otvorov morčata (nosové kvapky). Skin prick test sa realizuje vpichom suspenzie antigénu do

podkožia. Alergická rinitída môže spôsobiť krátkodobé narušenie pohody a zdravotného stavu morčiat a skin prick test môže spôsobiť slabú bolesť pri vpichu.

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Refinement

Pokus je minimálne traumatizujúci pre zvieratá. Pri vyšetrení kašľa v bdelom stave sú zvieratá umiestnené v dvojkomorovom pletyzmografe, kde inhalujú aerosól k. citrónovej. Tento postup zvieratá znášajú pokojne, hlavne po predchádzajúcej adaptácii na túto situáciu (na začiatku pokusu sa zvieratá minimálne 2 krát exponujú aerosólu fyziologického roztoku, aby si zvykli na pobyt v pletyzmografe. Inhalácia aerosólu HDM a pobyt v pletyzmografe nespôsobujú zvieratám bolesť. Druhá časť pokusu sa vykonáva v celkovej anestézii uretanom a po ukončení tejto časti pokusu sú zvieratá humanne usmrtené predávkovaním anestetika. Počas experimentov je zabezpečený welfare zvieratá.

2. Reduction

Jednotlivé pokusy či už na bdelých, alebo anestézovaných zvieratách budú vykonané na najnižšom počte jedincov tak, aby bol výsledok pokusu štatisticky hodnotiteľný a dáta získané z pokusu relevantné. Maximálny počet zvierat použitých v celom projekte bude $n = 96$ jedincov.

3. Replacement

Pokus nie je možné vykonať bez použitia morčiat. Morča domáce je jeden z najrelevantnejších modelov aferentnej inervácie dýchacích ciest a pľúc vo vzťahu ku kašľu. Neurofyziologické a neurofarmakologické parametre u morčiat sú ideálne pre vykonanie translačných štúdií s validáciou dát priamo u človeka. Pri tomto plánovanom pokuse neexistujú alternatívne metódy, pretože na pokus nie je možné použiť nižší druh laboratórnych zvierat (myš, potkan, pretože nemajú vyvinutý kašľový reflex (prehľadne spracované v Coughsensors, I. HandbExpPharmacol, 2009, (187),:23-47). Prieskum databáz ukázal, že vzhľadom na komplexnosť centrálnej nervovej regulácie kašľa nie je možné použiť modelovanie ani jednoduchšie systémy (bunkové kultúry a pod).

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

nie

Príloha 5 :

Netechnické zhrnutie projektu

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

872/44-221

28 – dlhová znášanlivosť očných kvapiek u kráľikov

a) Ciele projektu

Produkty, u ktorých sa plánuje dlhodobé opakované podávanie pri liečbe ľudí, sa musia otestovať na lokálnu znášanlivosť, v tomto prípade na znášanlivosť očí. Ako najvhodnejší druh pre testovanie opakovanej lokálnej znášanlivosti sa uvádza albinotický laboratórny králik.

V postupe sa použijú kráľici vo veku 15 – 16 týždňov, s telesnou hmotnosťou v rozsahu 2500 – 3500 g, ktoré už majú dobre vyvinutý imunitný systém. Počet 20 kusov zvierat (10 samcov a 10 samic) postačuje pre stanovenie očnej znášanlivosti prípravku, popis všetkých vedľajších účinkov na zvieratá a porovnanie s originálnym liekom.

Postup vychádza z predpokladaného spôsobu užívania prípravku, t.j. opakovaného očného podávania. Preto sa zvolilo opakované očné podanie v objeme a koncentrácii, aké sa budú používať u ľudí. Doba podávania je 28 dní, čo je optimálna doba pre opakovanú lokálnu znášanlivosť.

b) Súlad s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemenia

Nahradenie (replacement)

V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatíva metóda testovania opakovanej lokálnej znášanlivosti medicínskych produktov. Preto sa používa klasická *in vivo* metóda. Králik domáci je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre posúdenie vedľajších účinkov medicínskeho produktu v mieste jeho podania.

Obmedzenie (reduction)

Aby výsledky sledovania opakovanej lokálnej znášanlivosti mali určitú výpovednú hodnotu, musí sa použiť dostatočný počet zvierat. Desať zvierat (na 1 látku) je optimálny počet potrebný pre odhalenie prípadných nepriaznivých účinkov očnej inštalácie a nemôže byť redukovaný. Použijú sa samci aj samice, aby sa mohli prejavíť medzypohlavné rozdiely, ak existujú.

Zjemenie (refinement)

Nakoľko pri testovaní opakovanej očnej znášanlivosti sa jedná o dlhší postup, v ktorom dobrý zdravotný stav a dobrá kondícia zvierat hrajú veľmi dôležitú rolu, starostlivosť o zvieratá ako i manipuláciu s nimi sa bude venovať veľká pozornosť. Zvieratá budú ošetrované skúsenými pracovníkmi a budú pod neustálym dohľadom veterinárneho lekára. Postupy používané pri aplikáciách a vyšetreniach majú nízku úroveň z hľadiska spôsobenej bolesti a stresu a budú tiež vykonávané skúseným pracovníkom s dlhoročnou praxou.

Nevyžaduje sa opätovné posúdenie projektu.

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Plán projektu:

Využitie BGs (Bacterial Ghosts) ako protinádorového liečiva v experimentoch in vivo.

Úvod

Využitie BGs (Bacterial Ghosts) ako protinádorového liečiva predstavuje nové možnosti v liečbe nádorových ochorení u ľudí. Ako BGs budú použité dve línie baktérii E. Coli NM522 a E.Coli Nissle 1917. BGs predstavujú prirodzený adjuvans, ktorý má schopnosť sa naviazať na imunokompetentné bunky a vďaka PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern) aj na nádorové bunky. Väzba BGs na povrch tumorových buniek môže zvýšiť imunitnú odpoveď voči nádoru pomocou zvýšenej aktivity antigén prezentujúcich buniek. BGs môže byť aplikované vo forme roztoku a dostane sa priamo do cytozolu nádorovej bunky.

Výraznou výhodou použitia BGs je možnosť lokálnej aplikácie do blízkosti nádoru čo minimalizuje množstvo podaného liečiva a tým aj vedľajšie účinky.

Projekt bude vykonaný na základe objednávky sponzora a bude súčasťou vývoja nového terapeutického postupu na určité druhy nádorového ochorenia.

Cieľ projektu

Úlohou tohto projektu je potvrdiť výsledky in vivo úspešných in vitro pokusov, kde sa po použití BGs ukázalo, že proliferatívna aktivita nádorových buniek bola významne nižšia, ako po použití liečiva.

Experimentálny postup

Projekt sa bude skladať s troch častí:

1. Zavedenie modelu

Cieľom prvej časti je optimalizácia počtu inokula a rastu nádora bunkovej línie B16-F10 (melanóm).

Vzhľadom na to, že protinádorové látky neboli na tomto modeli v našej firme ešte testované, je potrebné si overiť určité postupy a spôsoby hodnotenia pokusu.

V prvom rade je to optimalizácia počtu nádorových buniek (inokula), počet buniek musí byť taký, aby nádor nerástol ani veľmi rýchlo (možnosť terapie nádoru je minimálna) ani veľmi pomaly (nie je možné pozorovať vplyv BGs). Je potrebné nájsť optimálne množstvo buniek, ktoré umožní sledovať a ovplyvňovať rast nádoru a veľkosť nádoru (nesmie byť viac ako 1cm^2).

Postup:

Myšiam budú aplikované nádorové bunky na chrbte v oblasti lopatky. Bunky budú podané s.c. inj. striekačkou (inzulínka) v maximálnom objeme 0,1 ml. Úspešnosť nárastu tumoru sa predpokladá okolo 70%.

Klinické pozorovania budú robené v pravidelných intervaloch a rast nádoru bude zaznamenávaný. Ak počas pokusu nádor narastie viac ako 1cm^2 , zviera bude z etického dôvodu humánne utratené (cervikálna dislokácia).

Budú použité 3 koncentrácie nádorových buniek (30 myši v skupine).

Príloha 3

Celkový počet zvierat v modelovom pokuse bude 100 ks.

2. Hodnotenie účinnosti po BGs imunizácii.

Všetkým zvieratám bude s.c. aplikovaná v oblasti lopatky nádorová bunková línia B16-F10 jednorázovo. Po aplikácii budú zvieratá pravidelne klinicky pozorované a približne na 4 deň, kedy nádor bude hmatateľný bude sa aplikovať BGs v troch koncentráciách. Kontrolnej skupine bude podaný fyziologický roztok. BGs ako aj fyziologický roztok sa bude aplikovať v troch miestach: miesto aplikácie, do nádoru a do okraja nádoru. Vyvolané nádory budú odobraté deň po aplikácii fyziologického roztoku (D0), 24 hodín (D1) a 48 hodín (D2) po aplikácii BGs.

Druhá časť experimentu bude zameraná na stimuláciu B7 molekulovými inhibítormi po aplikácii BGs, kde sa bude stanovovať prietokovou cytometriou koncentrácia B7-H4, PD-1, PD-L1, PD-L2. Počet zvierat v skupinách je 15. Vzhľadom na 70% úspešnosť vývoja nádoru bude celkový počet zvierat v druhej časti projektu 365 kusov. Druhá časť projektu je schematicky znázornená v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Cell lines	BGs	# of BGs Injection site	# of BGs Intratumoral	# of BGs Peritumoral	Analysis timepoints	Mice number per group
B16-F10	no BGs	0	0	0	D0	5
B16-F10	no BGs	0	0	0	D1	5
B16-F10	no BGs	0	0	0	D2	5
B16-F10	<i>E. coli</i> NM522	1×10^7	1×10^7	1×10^7	D1	5 + 5 + 5
		1×10^8	1×10^8	1×10^8	D1	5 + 5 + 5
		1×10^9	1×10^9	1×10^9	D1	5 + 5 + 5
		Saline	Saline	Saline	D1	5 + 5 + 5
B16-F10	<i>E. coli</i> NM522	1×10^7	1×10^7	1×10^7	D2	5 + 5 + 5
		1×10^8	1×10^8	1×10^8	D2	5 + 5 + 5
		1×10^9	1×10^9	1×10^9	D2	5 + 5 + 5
		Saline	Saline	Saline	D2	5 + 5 + 5
B16-F10	<i>E. coli</i> Nissle 1917	1×10^7	1×10^7	1×10^7	D1	5 + 5 + 5
		1×10^8	1×10^8	1×10^8	D1	5 + 5 + 5
		1×10^9	1×10^9	1×10^9	D1	5 + 5 + 5
		Saline	Saline	Saline	D1	5 + 5 + 5
B16-F10	<i>E. coli</i> Nissle 1917	1×10^7	1×10^7	1×10^7	D2	5 + 5 + 5
		1×10^8	1×10^8	1×10^8	D2	5 + 5 + 5
		1×10^9	1×10^9	1×10^9	D2	5 + 5 + 5
		Saline	Saline	Saline	D2	5 + 5 + 5
						15+60+60+60+60
SUB-TOTAL						255 mice
TOTAL	If the 70% tumor take rate calculated					365

Príloha 3

3. Hodnotenie účinku BGs u prežívajúcich nádorových zvierat.

Tretia časť štúdie bude zameraná na prežívajúce zvieratá. Všetkým zvieratám bude s.c. aplikovaná v oblasti lopatky nádorová bunková línia B16-F10 jednorazovo. Keď nádor bude hmatateľný (približne 4 deň po aplikácii), v oblasti okraja nádoru sa bude inoculovať BGs v troch koncentráciách a v dvoch formách:

- resuspendovanej lyofilizovanej vo fyziologickom roztoku
- v roztoku pripravenom na použitie (ready to use)

Veľkosť tumoru sa bude merať denne. Počet zvierat v skupinách je 10. Vzhľadom na 70% úspešnosť vývoja nádoru bude celkový počet zvierat v tretej časti projektu 185 kusov. Tretia časť projektu je schematicky znázornená v tabuľke 2.

Tabuľka 2

Cell lines	Adjuvant	# of BGs			Analysis / timepoints	Mice number (10 per group)
B16-F10	<i>E. coli</i> NM522 (FD)	1×10^7	1×10^7	1×10^7	survival/daily	10 + 10 + 10
B16-F10	<i>E. coli</i> NM522 (RS)	1×10^7	1×10^7	1×10^7	survival/daily	10 + 10 + 10
B16-F10	<i>E. coli</i> Nissle 1917 (FD)	1×10^7	1×10^7	1×10^7	survival/daily	10 + 10 + 10
B16-F10	<i>E. coli</i> Nissle 1917 (RS)	1×10^7	1×10^7	1×10^7	survival/daily	10 + 10 + 10
B16-F10	Saline	0	0	0	survival/daily	10
SUB-TOTAL						130
TOTAL	If the 70% tumor take rate calculated					185

FD- resuspendovanej lyofilizovanej vo fyziologickom roztoku

RS- v roztoku pripravenom na použitie (ready to use)

Testované látky

BGs (*E. coli* NM522)

BGs (*E. coli* Nissle 1917)

BGs (*E. coli* NM522, *E. coli* Nissle 1917) - resuspendovanej lyofilizovanej vo fyziologickom roztoku

BGs (*E. coli* NM522, *E. coli* Nissle 1917) - v roztoku pripravenom na použitie (ready to use)

Testované zvieratá

C57BL6 myš, vek: 6-9 týždňov

Dodávateľ: Akreditované pracovisko firma Velaz Praha (č. schválenia cz 21760118)

Celkový počet: 650 samíc

Príloha 3

Vzhľadom na 70% úspešnosť vývoja nádoru bude celkový počet zvierat v celom projekte 640 kusov. Po ukončení projektu nepoužité zvieratá utratíme (cervikálna dislokácia).

Ustajnenie

Zvieratá budú počas karantény a pokusu ustajnené v experimentálnom zverinci a umiestnené v umelohmotných vaniciach s individuálnou ventiláciou, na pilinovej podstielke (maximálny počet 10 zvierat/vanica, v pokuse bude počet zvierat 5/vanica). Zvieratá budú mať voľný prístup k vode a štandardnej potrave. Počas experimentu budú zvieratá označené na chvostoch nezmazateľnou farbou. V miestnosti bude automaticky monitorovaná teplota a relatívna vlhkosť vzduchu a svetelný režim nastavený na 12-hodinový cyklus.

Starostlivosť o zvieratá počas ustajnenia a pokusu sa bude riadiť platnými štandardnými postupmi Oddelenia exp. zverinca pre daný druh laboratórneho zvieratá a Nariadením vlády č.377/2012.

Preukázanie súladu s požiadavkami nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Posúdenie pokusu z hľadiska 3R

- Refinement – vzhľadom na to, že v pokuse nebudú vykonané žiadne bolestivé zákroky, nie je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť
- Reduction – počty zvierat v pokuse sú primerané, redukované v maximálnej miere; ich ďalšie zníženie by mohlo ovplyvniť reprodukovateľnosť a validitu pokusu
- Replacement – po preskúmaní databáz ECVAM (<http://ecvam.jrc.it>), ICCVAM (<http://iccvam.niehs.nih.com>) a FRAME (<http://www.frame.org.uk>) sme nenašli zodpovedajúcu alternatívnu metódu

Hodnotenie z hľadiska krutosti

Zvieratá prejavujúce bolesť budú humánne utratené. Z hľadiska prežívajúcich nádorových zvierat je pokus hodnotený ako stredne krutý až krutý a bude spätne posúdený etickou komisiou. Do 3 mesiacov od ukončenia pokusu bude spätné posúdenie zaslané na ŠVPS.

Netechnického zhrnutia projektu

Názov projektu: Potlačenie sekundárneho poškodenia traumou poškodenej miechy prostredníctvom lokálnej hypotermie kombinovanej s perfúziou neuroprotektívnych látok.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2/0191/13

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): traumatické poškodenie miechy, sekundárne poškodenie, hypotermia.

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)

Traumatické poškodenie miechy predstavuje vážny medicínsky problém, ktorý výrazne ovplyvňuje kvalitu života postihnutých jednotlivcov. Intenzívny výskum mechanizmov poškodenia miechy priniesol v posledných rokoch množstvo sľubných terapií, ale výsledky klinických skúšok boli prevažne negatívne a žiadna z nich nebola úplne akceptovaná pre ich uplatnenie v klinickej praxi. Rozsah sekundárneho poškodenia je pre mnohých pacientov limitujúcim faktorom, ktorý ovplyvňuje funkčnú obnovu. Naša stratégia v liečbe traumou poškodenej miechy spočíva na potlačení sekundárneho poškodenia prostredníctvom lokálnej hypotermie, kombinovanej s aplikáciou vybraných neuroprotektívnych látok.

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

Naša stratégia v liečbe traumou poškodenej miechy je založená na kombinácii predchádzajúcich experimentálne sľubných terapií a ich lokálnej aplikácii. Implantácia miechovej perfúzne komôrky po akútnom traumatickom poškodení miechy nám umožní použiť simultánne lokálnu hypotermiu a intratekálnu aplikáciu neuroprotektívnych látok ako sú rastové faktory, imunosupresívum a antioxodanty. Potlačenie sekundárneho poškodenia poskytne lepšie podmienky pre následnú obnovu nervového tkaniva a tým funkcie miechy. V experimentoch budú merané indikátory axonálneho rastu, angiogenézy, pro-zápalové markery, aktivácia mikrogliie a astrocytov, infiltrácia makrofágov, a kvantifikácia demyelinizácie, myelinizovaných a nemyelinizovaných axónov, rostro-kaudálna dĺžka a

objem poškodenia, množstvo zachovaného tkaniva, a tieto výsledky budú korelované s funkčnou obnovou miechy. Aj malý pokrok v terapii by posunul modernú traumatológiu o veľký krok dopredu.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch budú použité laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar, samice v počte 160ks na celú dobu riešenia.

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

Kompresia miechy bude uskutočnená z jej dorzálnej strany, ale tlak na miechu vyvolá poškodenie, ktoré sa rozšíri aj do okolia. Tým sa porušia základné motorické reflexy, ktoré zabezpečujú stálu adaptáciu dĺžky svalu na pohyb, ďalej polysynaptické reflexy, ktoré ukončujú kontrakcie vyvolané napínavým reflexom a exteroceptívne reflexy, ktoré vznikajú dráždením receptorov uložených predovšetkým v koži. Tieto reflexy budú po traumatickom poškodení miechy zachované iba čiastočne.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Poranenie miechy ako aj následná regenerácia sú procesy dynamické, ťažko predvídateľné a závisiace na mnohých faktoroch. Z týchto dôvodov nie je možné uskutočniť dané experimenty alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat. Okrem toho, pokus nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet 160 ks zvierat bolo stanovené vzhľadom k tomu, že (1) predpokladáme veľkú individuálnu variabilitu výsledkov, z tohto dôvodu plánovaný počet 10 kusov zvierat v skupine je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný počet pre získanie štatisticky významných výsledkov; (2) experimentálne skupiny uvedené v prílohe č. 1 sú potrebné na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie poškodenia miechy a určenie protektívneho vplyvu, či už samotnej hypotermie ako aj v kombinácii s jednotlivými neuroprotektívnymi látkami; (3)

traumou poškodená miecha nemôže byť použitá zároveň na biochemické ako aj histologické a imunohistochemické analýzy.

3. Zjemnenie:

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

(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)

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Laboratórny chov kliešťov (Acari, Ixodidae) s použitím králikov a príprava extraktov slinných žliaz kliešťov

Kľúčové slová: kliešte, Ixodidae, slinné žľazy, bioaktívne látky

Účel projektu: Základný výskum

Ciele projektu:

Kliešte majú celosvetový význam ako rezervoáre a prenášače rôznych patogénnych mikroorganizmov, ktoré vyvolávajú závažné ochorenia ľudí a zvierat. Štúdium cirkulácie kliešťami prenášaných patogénov medzi kliešťami a hostiteľmi je možné jedine na *in vivo* systémoch a zahrňuje aj sledovanie nákazy kliešťov patogénmi v rôznych vývinových štádiách, ako aj ich transštádiálneho prenosu v samotných kliešťoch. K sledovaniu cirkulácie patogénov je potrebné mať k dispozícii kliešte v rôznych vývinových štádiách (larvy, nymfy, dospelé) z laboratórneho chovu, ktoré neobsahujú patogénne mikroorganizmy. V súvislosti s ektoparazitickým spôsobom života ktorého neoddeliteľnou súčasťou je cicanie krvi teplokrvných živočíchov, počas ktorého kliešte modifikujú fyziologické procesy v koži svojich hostiteľov tak, aby sa úspešne nacicali krvi a aby nedošlo k ich predčasnému odvrhnutiu hostiteľmi, kliešte vylučujú do hostiteľov prostredníctvom slín nielen patogénne mikroorganizmy, ale aj rôzne biologicky aktívne látky (antikoagulanty, látky potlačajúce zápal, imunomodulačné a imunosupresívne látky). Tieto látky po ich izolácii a identifikácii môžu mať perspektívne využitie pri vývoji liečiv s použitím v humánnej a veterinárnej medicíne.

Vyplývajúc z ektoparazitického spôsobu života a biológie kliešťov čeľade Ixodidae sa doteraz nikde vo svete nepodarilo zaviesť metódu ich kontinuálneho chovu na umelom substráte. K úspešnému vývinu kliešťov je potrebná prítomnosť teplokrvných živočíchov a ich krvi ako zdroja potravy. V závislosti od vývinového štádia, druhu kliešťa a ich počtu je v laboratóriu pre ich kŕmenie možné použiť rôzne laboratórne zvieratá. Nakoľko chov kliešťov a kŕmenie väčšieho počtu, starších vývinových štádií, resp. niektorých druhov kliešťov nie je možné bez použitia králikov, predložený projekt je dopĺňujúci k už schválenému projektu laboratórneho chovu kliešťov, v ktorom sa používajú laboratórne myši a morčatá.

Základným cieľom predloženého projektu pokusu je laboratórny chov kliešťov pre použitie vo vedeckých projektoch (národných aj medzinárodných), ktoré sú zamerané na sledovanie interakcií kliešť – hostiteľ - kliešťami prenášané mikroorganizmy, na prípravu extraktov slinných žliaz kliešťov za účelom izolácie bioaktívnych zložiek a na sledovanie expresie génov v slinných žľazách kliešťov počas cicania a nákazy mikroorganizmami.

Prínos z vykonaného projektu

Použitie laboratórne dochovaných kliešťov je nevyhnutné pre plnenie cieľov vedeckých projektov, ktorých riešenie bolo schválené a je financované národnými vedeckými agentúrami a európskou komisiou, a v ktorých sa sleduje: 1. mechanizmus prenosu patogénnych mikroorganizmov kliešťami na úrovniach kliešť - patogén – hostiteľ; 2. modulácia obranných mechanizmov hostiteľov (hemokoagulácia, imunitná odpoveď, zápal, hojenie rán) prostredníctvom bioaktívnych zložiek v slinných žľazách kliešťov; 3. expresia génov v slinných žľazách kliešťov počas cicania a nákazy mikroorganizmami; 4. identifikácia

antigénov v slinných žľazách kliešťov, ktoré môžu slúžiť ako kandidáti pre prípravu vakcín proti kliešťom a vakcín ktoré blokujú prenos patogénov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: Králik domáci, 200 ks

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

Manipulácia s králikmi počas chovu kliešťov nevyžaduje anestéziu, celkovú ani lokálnu. Svrbenie kože a zápalová reakcia sa dostavujú až po odpadnutí nacicovaných kliešťov, pretože kliešte do miesta vpichu v koži vpúšťajú protizápalové a imunomodulačné latky, ktoré im umožňujú nerušený príjem potravy a zotrvanie na hostiteľoch. Nepredpokladá sa nutnosť aplikácie prípravkov na tlmenie bolesti a ak sa predsa spozoruje zmena správania, ktorá by mohla súvisieť s bolesťou/svrbením kože, zvieratám sa podá prípravok na tlmenie bolesti/spray na potlačenie svrbenia v dávke predpísanej príslušným výrobcom.

Predpokladaná úroveň krutosti: Stredne silná

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat: Pre plánované pokusy neexistujú alternatívne metódy. V projekte sa však sleduje a uplatňuje najnovšia legislatíva v súvislosti so smernicami o použití zvierat na vedecké účely, ktorú uzákonil Európsky parlament (smernica 2010/63/EU) a Nariadenie Vlády SR (Zbierka zákonov č. 377/2012) a Vyhláška 436 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR.

2. Redukcia počtu zvierat: Plánovaný počet zvierat je maximálny a je v ňom zahrnutý počet potrebný pre pokrytie požiadaviek riešiteľov vedeckých projektov, v ktorých je plánované použitie rôznych druhov a vývinových štádií kliešťov. Použitie zvierat sa obmedzí na nevyhnutné minimum. Opätovné použitie zvierat nie je možné, pretože zvieratá, na ktorých cicajú kliešte, vytvárajú protilátky proti slinným antigénom kliešťov, čo vyvoláva pri cicaní ďalších kliešťov hypersenzitívnu reakciu a následne nedostatočné cicanie až úhyn kliešťov. Takéto kliešte už nie je možné použiť ani pre ďalší chov, ani pre odber slinných žliaz za účelom sledovania dynamiky produkcie biologicky účinných látok v ich slinných žľazách s cieľovou purifikáciou účinných látok, či sledovanie expresie vybraných génov.

3. Zjemnenie: Chov kliešťov a kŕmenie väčšieho počtu, starších vývinových štádií, resp. niektorých druhov kliešťov nie je možné bez použitia králikov. Králiky budú počas celého pokusu držané za štandardných podmienok podľa platnej normy EU, pričom sa budú rešpektovať základné etické princípy požadované pri zaobchádzaní s pokusnými zvieratami. Počas celého pokusu sa budú dodržiavať postupy maximálne zjemňujúce pokus. Zvieratám bude zabezpečená štandardná starostlivosť, ktorú bude vykonávať školený personál - pracovníci pokusného zariadenia. Denne sa bude vykonávať kontrola zdravotného stavu zvierat. Ani v jednom štádiu pokusu nebudú mať zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prístup potravy a vody.

Projekt nebude podliehať opätovnému schvaľovaniu