

Príloha 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Vplyv času a typu potravinovej odmeny počas 24h cyklu na metabolizmus a reguláciu príjmu potravy potkana.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3178/14-221

Kľúčové slová v projekte: odmena, metabolizmus, hodinové gény, pečeň, mozog

Účel projektu: Základný výskum

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

V súčasnosti žije ľudská populácia v deregulovaných environmentálnych podmienkach, čo vytvára potenciál pre vznik a potenciáciu viacerých civilizačných ochorení vrátane metabolického syndrómu, obezity a hypertenzie. Následkom protichodne pôsobiacich environmentálnych podmienok dochádza k deregulácii biologických rytmov v organizme. Naša skupina sa dlhodobo zaoberá výskumom súčinnosti centrálného a periférnych oscilátorov v zabezpečovaní optimálnych vnútorných fázových vzťahov biologických rytmov v závislosti od environmentálnych podmienok. Existujúce synchronizačné protokoly nie sú vždy prakticky realizovateľné, lebo sú vnímané ako obmedzujúce, prípadne nie je možné vykonať ich kvôli vysokému veku, diagnóze, tehotenstvu, organizačným obštrukciám a pod. Preto sme sa zamerali na využitie potravinovej odmeny ako nástroja na synchronizáciu. Tento princíp je akceptovateľný pre každého jedinca, lebo je intuitívne spojený s benefitom a vhodne zvolená potravinová odmena môže byť motivačná aj pre pacientov s diabetom alebo akýmkoľvek inými metabolickými ochoreniami.

Cieľom projektu je identifikovať všetky klady a zápory využitia potravinovej odmeny na synchronizáciu s vonkajším prostredím.

Sumárny efekt podávania potravinovej odmeny je výsledkom vzájomných interakcií regulácie metabolizmu a energetickej bilancie, regulácie príjmu potravy, dopaminergného systému a cirkadiálneho systému (vrátane do teraz anatomicky neidentifikovaného „feeding entrainable“ oscilátora). V práci sa mienime zaoberať interakciami cirkadiálneho systému s uvedenými regulačnými okruhmi. Taktiež sa pokúsime zistiť ako pravidelné podávanie potravinovej odmeny spätne ovplyvňuje uvedené regulačné systémy.

Spomedzi oblastí zapojených v regulácii príjmu potravy, energetickej homeostázy a integračných mozgových štruktúr regulujúcich motorické správanie, identifikujeme tie, ktoré sa podieľajú na synchronizácii potravinovou odmenou. Posúdime možný vplyv potravinovej odmeny na tukový metabolizmus a afinitu k prijímaniu vysokotukovej potravy. Otestujeme vplyv sociálnej izolácie na kapacitu synchronizácie potravinovou odmenou a príjem vysokotukovej potravy. Testovanie vplyvu sociálnej izolácie je potrebné preto, lebo ľudia s narušenými biologickými rytmi sú často aktívni v inej fáze 24h cyklu, ako zvyšok okolia a trpia istou mierou sociálnej deprivácie, ktorá prispieva z zhoršeniu ich pohody. Je preto potrebné zistiť, či tento vplyv nepozmení účinok potravinovej odmeny a neovplyvní prírastok hmotnosti a metabolické procesy. Taktiež otestujeme, ktorá fáza 24h cyklu je na podávanie potravinovej odmeny najvhodnejšia, lebo predbežné výsledky prekvapujúco naznačujú, že to nemusí byť nevyhnutne fáza, ktorá sa z pohľadu subjektu považuje za aktívnu.

Počas prvej fázy pokusov otestujeme, ktorá potravinová odmena (polysacharidová vs. tuková) má najvýraznejšie účinky a tento typ odmeny potom bude monitorovaný počas 24h aj na základe biochemických a molekulárnych analýz.

Usmrtenie jedincov na konci pokusu je potrebné na odber vzoriek z tkanív gastrointestinálneho traktu, pečene, pankreasu, viscerálneho tuku, mozgových tkanív a ďalších tkanív v ktorých budú stanovované biochemické parametre v tkanivách a krvnej plazme (glykogén, triglyceridy, génová expresia).

a) používania zvierat vrátane ich pôvodu, odhadovaného počtu, druhov a štádií života

V pokusoch využijeme pohlavne dospelé potkany kmeňa Wistar, pohlavne dospelé samce, lebo výsledky z týchto jedincov sú najlepšie porovnateľné s už existujúcimi odbornými prácami ako aj našimi výsledkami.

b) postupov

Jedince budú chované za štandardných chovných podmienok v počte 3-4 v chovnej klietke s vhodnými rozmermi. V jednotlivých fázach 24h cyklu im bude podávaná potravinová odmena polysacharidovej alebo tukovej odmeny, bude monitorovaná pohybová aktivita počas 24h ako aj telesná hmotnosť. Budeme testovať, či sociálna izolácia (potkan bude umiestnený v chovnej klietke vhodnej veľkosti sám) ovplyvňuje jeho afinitu k potravinovej odmene a telesnú hmotnosť.

Chov zvierat a konkrétny postup

V pokuse bude použitých 50 samcov potkanov z línie kmeňa Wistar s hmotnosťami 180-200g. Po dovoze budú zvieratá označené (skupinovo záznamovou kartou aj individuálne značením na chvoste netoxickou farbou), umiestnené v skupinových plastových klietkach v počte 3-4 zvierat na klietku a aklimatizované po dobu dvoch týždňov. Po uplynutí doby aklimatizácie budú zvieratá náhodne rozdelené do skupín. Všetky skupiny budú chované naďalej v tej istej miestnosti za rovnakých podmienok. Potkany budú mať k dispozícii štandardné granulované krmivo (DOS 2b) *ad libitum* a budú mať voľný prístup k pitnej vode. Budú umiestnené v chovnom zariadení s kontrolovaným svetelným režimom (12 hod. svetla/12 hod. tmy) v prostredí so stabilnou kontrolovanou teplotou ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) a vlhkosťou (50–60%). Klietky budú čistené v rovnakú dennú dobu. Zdravotný stav a behaviorálna aktivita zvierat bude monitorovaný počas celého experimentu, hmotnosti zvierat budú zaznamenávané v pravidelných intervaloch.

Po uplynutí doby aklimatizácie budú zvieratá náhodne rozdelené do 7 skupín – 6 experimentálnych a 1 kontrolná. Potravinová odmena bude podávaná 6 časocho počas 24h cyklu počas 10 dní a zvieratá budú mať na jej nájdenie a konzumáciu čas 2 hodiny. Jednej skupine zvierat sa bude podávať potravinová odmena len raz denne, kontrolná skupina odmenu nebude dostávať. Podľa našich predbežných výsledkov im na nájdenie a konzumáciu odmeny štandardne stačí 10 minút, predĺžený čas dostupnosti je potrebný na začiatku pokusu, kedy sa zvieratá ešte len učia, v ktorej fáze dňa bude odmena podávaná. Budeme poskytovať polysacharidovú alebo tukovú potravu (max. 250mg). V oboch prípadoch budeme zisťovať, či má sociálna izolácia (3-5 dní) vplyv na afinitu ku potravinovej odmene a či ovplyvňuje prírastky hmotnosti a množstvo motorickej aktivity počas tmavej fázy (pre potkana aktívnej) a svetlej fázy 24h cyklu. Po tejto fáze pokusu sa uskutoční 7 dňová prestávka na vyhasnutie vplyvu odmeny, kedy žiadnej skupiny nebude podávaná potravinová odmena. Po uskutočnení testov vplyvu potravinovej odmeny na správanie (správanie bude monitorované web kamerou neinvazívne) bude experimentálna skupina (25 náhodne vybraných zvierat) vystavená režimu, kedy jej bude pravidelne podávaná potravinová odmena takým spôsobom, pri ktorom sme zaznamenali najvýraznejší vplyv na pohybovú aktivitu a telesnú hmotnosť v prvej časti pokusu. Vplyv potravinovej odmeny na denný rytmus aktivity bude monitorovaný v konštantných podmienkach (osvetlenie 10 luxov) počas dvoch 3-5 dní v domácich chovných podmienkach. Pohybová aktivita bude monitorovaná neinvazívne pomocou infračervenej web kamery (tento postup bol v minulosti v podmienkach nášho chovného zariadenia už viac krát úspešne uplatnený). Po odberoch budú prebiehať laboratórne analýzy biochemických parametrov a génovej expresie. Meraná bude génová expresia hodinových génov *per* a *cry* ako aj expresia vybraných metabolických génov v závislosti od typu potravinovej odmeny a ňou aktivovaného metabolizmu.

Experimentálnym zvieratám zabezpečíme počas karantény, ale aj počas celého obdobia testovania dostatočný welfare tak, aby mohli plne realizovať normálne správanie. Žiadny zásah počas pokusu nie je bolestivý ani neprináša zvieratám diskomfort. Zvieratá budú mať zabezpečený bezproblémový prístup k potrave a vode, vhodné prostredie pre život a zabezpečíme im tiež

podmienky vylučujúce mentálne strádanie. V pokusoch využijeme pohlavne dospelé samce kmeňa Wistar, lebo výsledky z týchto jedincov sú najlepšie porovnateľné s už existujúcimi odbornými prácami ako aj našimi výsledkami. Jedince budú chované za štandardných chovných podmienok v počte 4 v chovnej klietke s vhodnými rozmermi. V jednotlivých fázach 24h cyklu im bude podávaná potravinová odmena polysacharidovej alebo tukovej odmeny, bude monitorovaná pohybová aktivita počas 24h ako aj telesná hmotnosť. Budeme testovať, či sociálna izolácia (potkan bude umiestnený v chovnej klietke vhodnej veľkosti sám) ovplyvňuje jeho afinitu k potravinovej odmene a telesnú hmotnosť.

Všetky navrhované metodické postupy boli pripomienkované a odsúhlasené etickou komisiou PRIF UK v Bratislave.

Etapy riešenia

- privezenie zvierat;
- aklimatizácia a karanténa 14 dní;
- rozdelenie zvierat do 6 experimentálnych skupín + 1 kontrolná skupina;
- pôsobenie potravinovej odmeny na experimentálne skupiny zvierat;
- 7 dňová prestávka na vymiznutie vplyvu
- náhodné rozdelenie zvierat na dve skupiny zvierat, experimentálna skupina dostáva potravinovú odmenu, ktorá v prvej časti pokusu mala najväčší vplyv, monitorovanie vplyvu v konštantných podmienkach
- eutanázia, odber krvi a tkanív (mozog, pečeň, pankreas, viscerálny tuk, svalové tkanivo, srdce a obličky (*post mortem*);
- ukončenie pokusu;
- analýza odobratých vzoriek a štatistické spracovanie získaných dát.

Ukončenie pokusu

Pokus bude ukončený humánnym usmrtením zvierat dekapitáciou v celkovej anestéze vyvolanej inhaláciou CO₂.

Odbery budú prebiehať počas celého 24h cyklu, aby bolo možné popísať cirkadiánnu profil génovej expresie a biochemických parametrov v oboch skupinách – 6 časových bodov po 4 jedince. Dva jedince slúžia na posilnenie kľúčových odberov počas 24h cyklu, aby sa aspoň v jednom prípade dal použiť t-test (5 vs. 5 zvierat je hranične akceptovateľné, 4 vs. 4 zvieratá je príliš málo). Po rýchlej dekapitácii bude odobratá krv a vypreparované pečeň, pankreas, viscerálny tuk, svalové tkanivo, obličky, srdce a mozog a tkanivá sa okamžite zmrazia v tekutom dusíku a uskladnia pri – 80 °C do analýzy expresie génov.

Počet použitých zvierat:

kontrolná skupina: 25 samcov (odbery rozložené počas 24h)

potravinová odmena: 25 samcov (odbery rozložené počas 24h)

Termín pokusov:

máj 2015 - júl 2015

b) preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Počas pokusu zvieratá nebudú pociťovať žiadny diskomfort. Sociálna izolácia bude vykonaná až v dospelosti, čo v prípade trvania niekoľkých dní nemá žiadny závažný vplyv na zdravie jedinca. Po ukončení tejto fázy pokusu budú testované jedince opätovne zaradené so svojej pôvodnej chovnej klietky. Potravinová odmena bude kaloricky bezvýznamná, jej hmotnosť nepresiahne 250mg, podávaná bude len raz denne a jej konzumácia bude dobrovoľná. Za účelom odberu tkanív budú zvieratá bezbolestne usmrtené a množstvo jedincov je obmedzené na minimálnu možnú mieru, aby ešte bolo možné zo záverov generalizovať všeobecnejšie závery. Celková miera krutosti spadá do kategórie „slabá“. Pokus končí bez možnosti zotavenia.

Nahradenie/Replacement

Pri výskume nami prezentovaného charakteru nie je možné ani absolútne a ani čiastočné nahradenie zvolenej skupiny/druhu laboratórneho zvieratá. Nemožno ho realizovať ani na

bunkových kultúrach a ani za využitia počítačovej simulácie. Taktiež v ňom nemožno použiť iný, systematicky nižšie postavený druh zvierat'a.

Pri tomto druhu výskumu je (vzhľadom na fyziologické parametre) uvedený model najlepšou alternatívou náhrady humánneho modelu.

Obmedzenie/Reduction

Počty zvierat sú minimalizované na najmenšiu možnú hranicu tak, aby získané údaje mohli byť štatisticky spracované a mali serióznú výpovednú hodnotu.

Zjemnenie/ Refinement

Možné strádanie a utrpenie zvierat bude minimalizované dodržiavaním každej z piatich slobôd uvádzaných pri definícii welfare zvierat. Zvieratá počas samotného pokusu nebudú vystavené strádaniu a utrpeniu. Experimentálne zásahy (potravová odmena) nie sú nepríjemné ani bolestivé ani nespôsobujú stres.

Zvieratá budú po dovezení umiestnené v štandardných podmienkach. Budú mať zabezpečený voľný prístup k potrave a aj k vode, budú umiestnené po 3-4 v kliebkach požadovaných rozmerov s hoblinovou podstielkou. Blízkosť sociálnych partnerov zamedzí sociálnemu strádaniu a umožní realizovať taktiež všetky formy sociálneho správania počas väčšiny trvania pokusu.

Správania bude monitorované prostredníctvom web kamery umiestnenej priamo vo zverinci. Všetky biochemické a molekulárne analýzy budú realizované až po skončení pokusu, žiadne odbery nebudú robené počas pokusu. Pred samotným usmrtením dekapitáciou budú zvieratá pod narkózou, čím sa minimalizuje ich utrpenie na najmenšiu možnú mieru.

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

Počas priebehu pokusu neočakávame ujmu zvierat. Potravová odmena bude podávaná vo veľmi malom množstve a len jeden krát denne a jej konzumácia bude dobrovoľná, čiže zvieratá nebudú nútené prerušiť žiadnu aktivitu kvôli jej konzumácii ak si to nebudú priať. Menší negatívny dopad môže mať krátkodobá sociálna izolácia, ktorá bude testovaná na cca. 10 jedincoch, táto však bude trvať len 3-5 dní a ovplyvňované budú dospelé zvieratá s čuchovým a sluchovým kontaktom z zvyškom skupiny, čiže izolácia nebude absolútna a nebude mať vplyv na vývin. Predpokladáme, že konštantné podmienky prítmnia závažne neovplyvni zvieratá. Ukončenie pokusu dekapitáciou sa deje pod narkózou.

Predpokladaná úroveň krutosti:

potravová odmena – slabá krutosť

3-5 dní trvajúca čiastočná sociálna izolácia – slabá krutosť

3-5 dní trvajúce prítmnie – slabá krutosť

Keďže zvieratám sa bude podávať raz denne malá potravová odmena, ktorá popri *ad libitum* prístupe k potrave nebude mať závažný vplyv na dietetiku a zvieratá si budú môcť vybrať, či ju skonzumujú alebo nie, sociálna izolácia v dospelosti potrvá len 3-5 dní a nebude absolútna (zvieratá budú mať čuchový a sluchový kontakt), konštantné prítmnie nie je stresujúci podnet a dekapitácia prebieha v narkóze celková miera krutosti spadá do kategórie „slabá“. Pokus končí bez možnosti zotavenia.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Príloha č. 2

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

3028/14-221a

Príprava hyperimúnných králičích sér

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

Cieľom projektu je príprava hyperimúnných králičích sér, ktoré sa používajú na serotypizáciu a identifikáciu izolovaných kmeňov, v mikroaglutinačných prípadne krížových absorpčných testoch, vo vysoko špecializovanej etiologickej diagnostike sledovaných prenosných ochorení ľudí (leptospiróz, legionelóz, tularémie) a zvierat a pri vyšetreniach v ohnisku nákazy.

Ide o štandardný postup prípravy diagnostík z krvi imunizovaných králikov. Na imunizáciu sa použijú zvieratá druhu králik domáci (*Oryctolagus cuniculus*) s hmotnosťou 1,5 – 2,5 kg, chované na pokusné účely a dodávané z akreditovaného zariadenia.

Králiky sa imunizujú podaním 3-5 dávok antigénu, bežne intravenózne do vena marginalis ušnice, resp. prvé dávky i. m. (legionely) po lokálnej dezinfekcii, spravidla v týždňových intervaloch. Následne sa vyšetrením vzorky krvi kontroluje protilátková odpoveď. Aplikácia antigénov i. v., resp. odber krvi z vena marginalis ušnice patrí k najbežnejšie používaným a najmenej invazívnym metódam, ktoré u králikov možno bez ujmy použiť opakovane. Pri dostatočnej hladine protilátok sa krv odoberie kardiálnou punkciou tak, že sa zvieratú podá i.v. resp. intrakardiálne thiopental a postup sa ukončí eutanáziou predávkovaním anestetika. Imunizované zvieratá nie je možné vzhľadom na podávané antigény použiť na iné experimentálne účely.

Na celé obdobie projektu (2014 – 2018) sa plánuje použiť 30 králikov. Používa sa vždy minimálny postačujúci počet zvierat, spravidla 2 – 3 králiky pri jednej imunizácii.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia.

Hyperimúnné králičie séra sa pripravujú v súlade so zásadami 3R.

Králik domáci predstavuje najnižší, pre daný účel vhodný druh laboratórnych zvierat.

Na imunizáciu sa použije vždy najnižší pre prípravu diagnostík postačujúci počet zvierat.

Využívajú sa zjemňujúce postupy. Aplikácia antigénov a odbery krvi na zistenie protilátkovej odpovede sú krátkodobým zákrokom. Na lokálnu dezinfekciu sa používajú dobre tolerované prípravky, prípadne i s mierne anestetizujúcim účinkom. Ohľaduplnou, bezpečnou manipuláciou a umiestnením zvierat v špeciálnej fixačnej kletke sa predchádza stresu a eliminuje sa riziko prípadného poranenia.

Po zákroku sa zvieratám venuje zvýšená pozornosť, v prípade potreby sa zabezpečí ošetrovanie. Pred a medzi odbermi sa králikom poskytuje bežne štandardná ošetrovateľská starostlivosť so zreteľom na maximálnu pohodu a dobrý zdravotný stav zvierat.

Pri odberoch kardiálnou punkciou sa traumatizácia zvierat redukuje na minimum kľudnou komunikáciou a jemnou fixáciou v polohe na chrbte, čím sa už pred podaním anestetika navodí určitý somnolentný a kataleptický stav. Zárok sa robí v anestézii a postup sa humánnym spôsobom ukončí predávkovaním anestetika tak, že zviera už nenadobudne vedomie.

Projekt nevyžaduje spätné posúdenie.

Získanie králičej krvi kardiálnou punkciou na prípravu kultivačných médií

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

Cieľom projektu je získavanie králičej krvi potrebnej na prípravu špeciálnych médií určených na kultiváciu bakteriálnych kmeňov vysoko náročných na kultivačné podmienky in vitro. Kultivačné médiá preto obligátne obsahujú králičie sérum, resp. defibrinovanú králičiu krv. Na získavanie krvi sa použijú zvieratá druhu králik domáci (*Oryctolagus cuniculus*) chované na pokusné účely a dodávané z akreditovaného zariadenia, v počte 2 – 6 králikov na jeden odber, 12 – 14 odberov ročne (Leptospirozy 4x6 zv, Tularémia 8x2 zv). Odber krvi sa vykoná s následným nahradením objemu, čo králiky bežne prežijú bez ujmy. Po dostatočnej regenerácii sa odber podľa potreby opakuje, spravidla v intervale 6 mesiacov.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia.

Králičia krv sa získava v súlade so zásadami 3R.

Zberkové kmene mikroorganizmov využívané na výskumné a diagnostické účely sú dlhodobo adaptované na médiá s králičou krvou a v postupe je potrebné zohľadniť aj minimálny potrebný objem. Králik domáci tak predstavuje najnižší, pre daný účel vhodný druh laboratórnych zvierat.

Pri odberoch sa použije vždy najnižší pre prípravu médií postačujúci počet zvierat. Tento je ďalej redukovaný aj opakovaním odberov po uplynutí intervalu stanoveného na regeneráciu u jedincov vo výbornom zdravotnom stave a kondícii.

Pri odberoch, ktoré sú krátkodobým zákrokom, sa využívajú zjemňujúce postupy, traumatizácia zvierat sa redukuje na minimum kľudnou komunikáciou, ohľaduplnou bezpečnou manipuláciou a jemnou fixáciou v polohe na chrbte, čím sa navodí u králika určitý somnolentný a kataleptický stav. Odber tak možno vykonať bez anestézie (spôsobuje nežiaduce ovplyvnenie vlastností špeciálnych kultivačných médií) a odberom stratený objem krvi sa ihneď následne nahradí podaním sterilného fyziologického roztoku. Po odbere sa zvieratám venuje zvýšená pozornosť, v prípade potreby sa zabezpečí ošetrovanie veterinárnym lekárom. Pred a medzi odbermi sa králikom poskytuje bežne štandardná ošetrovateľská starostlivosť so zreteľom na maximálnu pohodu a dobrý zdravotný stav zvierat..

Projekt nevyžaduje spätné posúdenie

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

Vplyv vybraných rastlinných antioxidantov na ischemicko-reperfúzne poškodenie tenkého čreva

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3004/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

Účel projektu * : Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

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

Navrhovaný projekt bude zameraný na hodnotenie vplyvu antioxidačne pôsobiacich vybraných rastlinných antioxidantov – flavonoidu/kvercetínu a ligustrazínu/teratrametylpyrazínu na histologické, biochemické a imunologické zmeny vznikajúce ako následok ischemicko-reperfúzneho (IR) poškodenia tenkého čreva. IR poškodenie tenkého čreva predstavuje v klinickom ako aj experimentálnom modeli závažný problém, na ktorý nadväzuje aktivácia zložitých patofyziologických mechanizmov vedúcich k poškodeniu tenkého čreva ako aj ďalších distálnych korešpondujúcich orgánov. V tomto procese nezastupiteľnú úlohu zohráva oxidačný stres a následná zápalová odpoveď tkanív. Oxidačný stres vznikajúci následkom reperfúzie má za následok morfológicko-funkčné zmeny jednotlivých orgánov. Ovplynvenie procesu tvorby oxidačného stresu môže veľmi výrazne ovplyvniť celkovú imunitnú a zápalovú odpoveď organizmu. Kvercetín je jeden z najrozšírenejších flavonoidov a zároveň aj antioxidačne pôsobiacich látok. Výrazné antioxidačné, antimikrobiálne a protizápalové účinky kvercetínu dávajú predpoklad na jeho pozitívny vplyv pri stavoch charakterizovaných tvorbou reaktívnych intermediátov kyslíka a dusíka a masívnej zápalovej odpovede akým je aj IR poškodenie. V literatúre sú odpublikované vedecké články o pozitívnom účinku ďalšieho rastlinného antioxidantu - extraktu z tradičnej čínskej huby *Ligusticum wallichii*. Táto huba obsahuje ligustrazín, biologicky aktívny alkaloid zložený z pyrazínového cyklu (tetrametylpyrazín). Bolo dokázané, že má vazodilatačný, antioxidačný, imunomodulačný a antiapoptotický účinok. Jeho účinky pri IR poškodení tenkého čreva rovnako neboli doteraz charakterizované.

Cieľom predkladaného experimentálneho projektu je popísať vplyv vybraných rastlinných antioxidantov na rozvoj oxidačného stresu a zápalovej odpovede po IR poškodení jejúna ako aj ďalších vybraných parenchymatóznych orgánoch.

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

IR poškodenie tenkého čreva je súčasťou mnohých patologických stavov ako aj chirurgických zákrokov. Tento proces môže závažne ovplyvňovať aj vzdialené životne dôležité orgány kde vzniká predpoklad pre ich morfológicko-funkčné poškodenie. Akákoľvek pozitívna intervencia v priebehu vzniku a rozvoja poškodenia po IR inzulte tenkého čreva môže mať za následok zmiernenie patológicko-funkčných stavov. Tento zložitý komplex zahŕňa aktiváciu patofyziologických mechanizmov od molekulovej úrovne až po úroveň bunkovú/tkanivovú. V tomto smere ovplyvnenie uvedených mechanizmov aplikáciou vybraných rastlinných antioxidantov – kvercetínu a ligustrazínu/terametylpyrazínu ako antioxidačne, protizápalovo pôsobiacich prvkov môže mať za následok výrazné zlepšenie biochemických ako aj morfológicko-funkčných parametrov jednotlivých orgánov. Cieľom pokusu je popísať vplyv vybraných rastlinných antioxidantov (kvercetínu, ligustrazínu) na biochemické, histologické a funkčné poškodenie jednotlivých orgánov ako následok IR tenkého čreva u laboratórneho potkana *in vivo*. Podľa prehľadu literárnych údajov v svetových odborných databázach zatiaľ detailný výskum aplikácie kvercetínu a ligustrazínu v komplexe intestinálnej IR nebol cytomorfológicky a cytobiochemicky sledovaný a charakterizovaný.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*), kmeň Wistar, samce, 92 kusov

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

Plánované antioxidanty (kvercetín, ligustrazín) v uvedenom množstve a spôsobe aplikácie by nemali mať negatívny vplyv na organizmus laboratórnych zvierat.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Stredná (2 st.)

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Vybrané stavy vyskytujúce sa v klinickej medicíne nie možné inak, ako s použitím experimentálnych zvierat verifikovať. Medzi takéto stavy patrí aj akútne ischemicko reperfúzne poškodenie tenkého čreva. Tento experimentálny model sa snaží do určitej miery simulovať zmeny, ktoré prebiehajú v tenkom čreve následkom jeho poškodenia. V súčasnosti nie je možné tento model inak verifikovať iba v experimentálnom modeli. Iné alternatívne modeli (bunkové kultúry) nie sú vhodné, pretože

nesimulujú priamo stav akými prebiehajú jednotlivé mechanizmy v živom organizme. Preto je použitie experimentálnych zvierat nevyhnutné na opísanie nových mechanizmov ichemicko-reperfúzneho poškodenia tenkého čreva ako aj potencionálne pozitívny vplyv antioxidačne pôsobiacich látok.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

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

3. Zjemnenie:

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

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

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

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Protektívny účinok NO a CO donorov pri experimentálnom infarkte myokardu s hypertenzívnymi komplikáciami.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: (registračné číslo projektu) 3037/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

infarkt myokardu, hypertenzia, oxid dusnatý, oxid uhoľnatý

Účel projektu: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

Cieľom projektu je experimentálne - ligáciou ľavej koronárnej artérie vyvolať infarkt myokardu u normotenzívnych a NG-nitro-L-arginínmetylester (L-NAME)-hypertenzívnych WKY potkanov za účelom posúdenia rozsahu patofyziologických zmien normotenzívneho a hypertenzívneho srdca v dôsledku infarktu myokardu. Druhým, nemenej významným cieľom projektu je porovnanie protektívneho účinku NO (LA-419) a CO (CORM-3) donora, podaného intravenózne v reperfúznej fáze a následne 2 hodiny po reperfúzii. Úloha oxidu dusnatého pri infarkte myokardu je stále kontroverzná. Použitie modelu L-NAME-indukovanej, tzv. NO-deficitnej hypertenzie pri súčasnej aplikácii NO donora tesne po infarkte myokardu dokáže prispieť k objasneniu účinku oxidu dusnatého ako i vhodnosti použitia NO donorov pri infarkte myokardu. Použitie CO donora odpovie na otázku alternatívnej možnosti protekcie myokardu. Infarkt myokardu a hemodynamika zvierat bude analyzovaná deň po operácii a po štrnástich dňoch a to v rámci jedného zvieratá ako i medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou. Patofyziologické zmeny posúdime na molekulovej, funkčnej a morfolologickej úrovni.

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

Model L-NAME-indukovanej hypertenzie predstavuje významný nástroj nielen na sledovanie experimentálneho infarktu myokardu, ale aj na posúdenie úlohy oxidu dusnatého pri infarkte myokardu, ktorá je stále kontroverzná. Pri použití uvedeného modelu dokážeme posúdiť jednak vplyv nedostatku NO a hypertenzie v dôsledku tejto deficitu na infarkt myokardu a jednak zistiť, či podanie NO donora v reperfúznej fáze má protektívny účinok na patofyziologické zmeny vznikajúce v dôsledku infarktu myokardu. Originalita projektu spočíva aj v podaní CO donora pri infarkte myokardu u L-NAME hypertenzívnych zvierat. CO donor, podľa literatúry i našich predbežných sledovaní, môže do istej miery nahradiť účinok NO. Tento fakt nadobudne na vážnosti práve v prípade, keď použitie NO donora vzhľadom na závažnosť a rozsah infarktu myokardu bude kontroverzné. Takto zostavený experiment môže objasniť účinok NO pri infarkte myokardu a zároveň odpovedať na otázku alternatívnej protekcie prostredníctvom CO donora. Uvedený postup umožní synergický prístup k liečbe MI pri hypertenzii s cieľom zvýšiť účinnosť klinickej liečby tohto závažného ochorenia.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: POTKAN LABORATÓRNY (rattus norvegicus) línia WKY 118 ks

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

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

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná krutosť

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Pre sledovanie nami vytýčených cieľov nie je možné použiť počítačový model zvierat a najvhodnejším modelom je laboratórny potkan. V projekte sme zvolili normotenzívny kmeň Wistar Kyoto potkanov, ktorý bude pochádzať z nášho chovného zariadenia.

2. Redukcia počtu zvierat:

V plánovanom experimente je zabezpečený čo najnižší počet experimentálnych zvierat tak, aby bol experiment štatisticky vyhodnotiteľný a závery všeobecne prijateľné. Keďže projekt je zameraný na experimentálne vyvolaný infarkt myokardu a literárne údaje o torakotómii uvádzajú 60% úspešnosť prežitia, plánovaný počet zvierat sme navýšili o dané percento. Pokiaľ je to možné, spájame vyhodnotenie parametrov so spolupracujúcimi laboratóriami, aby sme dosiahli čo najväčší počet výsledkov pre štatistickú analýzu pri čo najmenšom počte experimentálnych zvierat.

Po humánnom usmrtení zvierat sa odoberie maximálne množstvo vzoriek na sledovanie fyziologických, biochemických a morfológických parametrov. Je zabezpečená spolupráca medzi laboratóriami (ako v rámci ÚNPF SAV, tak aj s inými laboratóriami), aby sa v rámci

experimentov jednotlivých laboratórií dalo použiť čo najväčšie množstvo spoločných experimentálnych zvierat.

3. Zjemnenie:

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

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

Zvieratá budú usmrtené podaním letálnej dávky anestetika.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie



Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu —

Názov projektu pokusu: Antimykotoxické a protektívne účinky humínových kyselín vo výkrme hydiny, vplyv na zdravie zvierat, zvýšenie produkčných ukazovateľov a kvalitu produkovaného mäsa.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1/0595/15 - 3040/14-221

Kľúčové slová (max. 5 slov): výkrm kurčiat, mykotoxíny, humínové kyseliny, kvalita mäsa

Účel projektu: Základný výskum

Ciele projektu pokusu

1. Sledovať vplyv podávania humínových kyselín (prípravok Humac Natur) v koncentrácii 0,6 % na klinický stav a produkčné parametre hydiny.
2. Sledovať vplyv testovanej koncentrácie na imunitný systém hydiny.
3. Sledovať vplyv testovanej koncentrácie humínových kyselín na kvalitu produkovaného mäsa (chemické zloženie, straty vody, rozkladné zmeny tukov a antioxidačná aktivita) počas skladovania v mrazničke a chladničke.
4. Sledovať vplyv testovanej koncentrácie humínových kyselín na histologické a chemické zmeny v jednotlivých orgánoch a svalovine hydiny.
5. Vykonať analýzu mykotoxínov v produkovanom mäse.
6. Na základe získaných výsledkov vyhodnotiť vplyv humínových kyselín na zdravotný stav, produkčné ukazovatele hydiny a kvalitu produkovaného mäsa.

Prínos z vykonaného projektu pokusu

Predkladané experimenty sú zamerané na sledovania, ktorých výsledky a poznatky sa budú využívať v chovoch hydiny. Aplikácia humínových kyselín do krmiva za účelom potlačenia rastu toxínogénnych plesní, môže vyriešiť problém so stále vyšším výskytom mykotoxínov v krmive, problém nižších hmotnostných prírastkov a konverzie krmiva, čím sa zlepši ekonomika chovu, pričom zdravie zvierat a kvalita produkovaného mäsa nielen že ostanú zachované, dokonca predpokladáme zlepšenie v sledovaných parametroch.

Druhy použitých zvierat

V experimente budú použité jednodňové kurčatá brojlerového komerčného hybridu Cobb 500 samčieho aj samičieho pohlavia. V experimente bude použitých 80 kusov kurčiat rozdelených do dvoch skupín (2 x 40 ks).

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

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

Predpokladaná úroveň krutosti:

Na základe posudzovaných faktorov navrhujeme klasifikáciu krutosti postupu označiť ako „slabú“, bez možnosti zotavenia.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

2. Redukcia počtu zvierat:

V postupe bude použitých 80 kusov jednodňových brojlerových kurčiat, rozdelených do 2 skupín – 1 kontrolná a jedna pokusná po 40 kurčiat. V rámci každej skupiny sa uskutoční váženie kurčiat na 1., 14., 21., 28., 35., 42. deň výkrmu. U kurčiat sa bude sledovať celkový klinický stav zvierat, produkčné parametre hydiny vplyv na imunitný systém, na kvalitu produkovaného mäsa (chemické zloženie, straty vody, rozkladné zmeny tukov a antioxidačná aktivita) počas skladovania v mrazničke a chladničke, vplyv na histologické a chemické zmeny v jednotlivých orgánoch a svalovine. Taktiež bude vykonaná analýza mykotoxínov v produkovanom mäse. Počty kusov kurčiat v skupine (40 ks) považujeme za dolnú hranicu pri pozorovaniach tohto druhu, vrátane štatistického vyhodnotenia konvenčného experimentu, aby výsledky pozorovaní mohli byť doporučené aj pre použitie v praxi.

3. Zjemnenie:

V experimentoch budú použité jednodňové kurčatá samčieho aj samičieho pohlavia, ktoré sú z hľadiska štúdia požadovaných parametrov najideálnejším modelovým zvieratom a v plnej miere spĺňajú charakter pilotných štúdií pri sledovaní vplyvu humínových kyselín na produkčné ukazovatele a zdravotný stav kurčiat ako aj kvalitu produkovaného hydínového mäsa. Na zvieratách sa nebudú vykonávať zákroky, ktoré by boli bolestivé, alebo si vyžadujú anestéziu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: *Vekom podmienené zmeny vo funkcii endotelu v experimentálnej hypertenzii.*

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3095/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): endotel, hypertenzia, SHR, starnutie, WKY

Účel projektu: Základný výskum

Ciele projektu:

Cieľom predkladaného projektu je komplexné sledovanie zmien vo funkcii endotelu počas starnutia u samcov potkanov - normotenzných a dedične zaťažených hypertenziou. Projekt umožní zhodnotiť špecifické zmeny vo funkcii endotelu v dôsledku starnutia resp. v dôsledku hypertenzie a mal by odhaliť doteraz málo známe mechanizmy v endotelom sprostredkovanej regulácii kardiovaskulárneho systému počas biologického starnutia. Bunkové mechanizmy, podieľajúce sa na vývoji endotelovej dysfunkcie počas hypertenzie a starnutia, doteraz nie sú celkom známe a dostupné literárne údaje sú kontroverzné. Pri pokusoch ozrejmiť úlohu endotelu v regulácii tlaku krvi a vazorelaxácie v experimentálnej hypertenzii a najmä v procese starnutia boli pozorované rozmanité výsledky. Navyše, demografická situácia je celosvetovo charakterizovaná starnutím populácie, pričom sa predpokladá, že tento trend bude narastať aj v budúcich desaťročiach. Táto situácia má nielen medicínsky, ale aj sociálno-ekonomický význam. Starnutie organizmu je neodvratný fyziologický proces. Predstavuje komplex biologických, psychických a sociálnych zmien. Zmeny postihujú prakticky všetky systémy a orgány, v ktorých vznikajú špecifické degeneratívne, morfológické a funkčné zmeny. Na poruchách trofiky jednotlivých orgánov sa významne podieľa starnutie cievneho systému, najmä poruchy endotelu, aterosklerotické zmeny, zhrubnutie média a zvýšená rigidita ciev. Je všeobecne uznané, že „človek je taký starý, ako sú staré jeho cievy”. Navyše, artériová hypertenzia je jeden z najvýznamnejších rizikových faktorov pre vznik kardiovaskulárnych ochorení. Je známe, že so zvyšujúcim sa vekom narastá aj počet ľudí s vysokým krvným tlakom. Ako populácia starne, zvyšuje sa aj prevalencia hypertenzie. Pritom je známe, že u hypertenzných jedincov vaskulárne starnutie prebieha rýchlejšie a je spojené s fenoménom tzv. EVA syndrómu (early vascular aging). Uvedené skutočnosti determinujú aj naše ciele čo najkomplexnejšie zhodnotiť vekom podmienené zmeny funkcie endotelu, a to v závislosti od prítomnosti hypertenzie.

Prínos z vykonaného projektu:

Originalita predkladaného projektu je založená na komplexnom zhodnotení funkčných a biochemických zmien endotelu počas starnutia a v prítomnosti hypertenzie. Na základe známej heterogenity vlastností endotelu, ktoré sú závislé od veľkosti a typu ciev, v našom

projekte zhodnotíme rôzne typy ciev, čo nám umožní integrovaný pohľad na vekom podmienené zmeny v cievnom systéme. Takáto komplexná štúdia, hodnotiaca rôzne typy ciev z vysokotlakového a nízkotlakového systému, doteraz nebola uskutočnená. Získané poznatky by mali podporiť hypotézu, že endotel je cieľovou štruktúrou pre novú stratégiu ochrany kardiovaskulárneho systému už počas „fyziologického starnutia“ a prispieť novými poznatkami o mechanizmoch skorého vaskulárneho starnutia počas hypertenzie. Výsledky pokusov, najmä odhalenie možných mechanizmov prispievajúcich k vzniku endotelovej dysfunkcie, môžu byť dôležité pre ďalší rozvoj nových liečiv za účelom ochrany endotelu a zabráneniu tzv. skorému vaskulárnemu starnutiu (early vascular aging).

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: Potkan laboratórny, plemeno WKY a SHR, samce, 90 kusov

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu: Počas merania hemodynamických parametrov sa s potkanmi zaobchádza šetrne, avšak môže dochádzať k miernej nepohode a strachu. Počas celého trvania projektu nepredpokladáme nepriaznivý vplyv na zvieratá.

Predpokladaná úroveň krutosti: bez možnosti zotavenia

Uplatňovanie zásad 3R

1. Zásada nahradenia živých zvierat (*replacement*)

Funkčná, ako aj biochemická heterogenita vlastností endotelu (závislá od typu a veľkosti ciev v organizme) bohužiaľ neumožňuje v našom projekte nahradiť animálny model alternatívnymi metódami, ktoré by nahradili podmienky v *in vivo* modeloch. Pre sledovanie nami vytýčených cieľov nie je možné použiť počítačový model zvierat a najvhodnejším modelom je laboratórny potkan. Všetky základné princípy platné pre zvierací organizmus majú význam aj v humánnej fyziológii, lebo aj človek je tvor, ktorý sa utvoril v procese evolúcie a preto neobmedzene podlieha základným zákonom animálneho života. Vedeckým odôvodnením použitia potkanov na experiment je, že sú to živé organizmy poskytujúce dynamický systém a vďaka svojej podobnosti v základnej stavbe aj funkcii srdcovocievnej sústavy s človekom, sú vhodné na objasnenie príčin fyziologických a patofyziologických problémov humánnej medicíny. Spontánne hypertenzný potkan (SHR) je najvhodnejším a najčastejšie používaným laboratórnym modelom pre výskum ľudskej esenciálnej hypertenzie (EH). Patogenéza hypertenzie u SHR sa v mnohých aspektoch podobá EH u ľudí a preto je vhodným modelom pre jej fyziologické a biochemické štúdie. V projekte sme ako normotenznú kontrolu zvolili kmeň Wistar-Kyoto potkanov podľa literárnych údajov.

V medzinárodných databázach a databázach medzinárodných patentov (Alternatives to Animal Testing: ECVAM, CAAT, Altweb, ALTBIB; <http://www.google.sk/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, <http://www.patents.com/>, <http://www.epo.org/index.html>) sme hľadali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat.

2. Zásada obmedzenia počtu zvierat (*reduction*)

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

Projekt je zostavený tak, aby sme dosiahli čo najväčší počet výsledkov pre štatistickú analýzu pri čo najmenšom počte experimentálnych zvierat.

Po humánnom usmrtení zvierat sa okrem ciev odoberie maximálne množstvo vzoriek (krv, ďalšie tkanivá a orgány) na sledovanie funkčných, biochemických ako aj niektorých morfológických parametrov. Medzi jednotlivými laboratóriami ústavu, ako aj s inými laboratóriami bude zabezpečená spolupráca, aby sa v rámci experimentov dalo použiť čo najväčšie množstvo spoločných zvierat.

3. *Zásada zjemnenia (refinement)*

Zvieratá budú chované v modernom, schválenom chovnom zariadení s maximálnym komfortom. Zvieratá budú pod stálou kontrolou zmluvného veterinárneho lekára. Osoby, ktoré budú manipulovať so zvieratami, majú viacročné skúsenosti. Zvieratá budú umiestnené v stálych sociálnych skupinách až do konca pokusu. Potkany v priebehu pokusu prežívajú mierny stres, ktorý budeme minimalizovať šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia predmetmi na hru a ohryzovanie. Usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii. Zvieratá sa najskôr vystavia účinku oxidu uhličitého v uzavretej nádobe až do straty vedomia. V hlbokom bezvedomí budú následne dekapitované, odoberie sa im krv a po otvorení hrudnej a brušnej dutiny budú odobraté príslušné cievy a ďalšie tkanivá a orgány.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnického zhrnutia projektu

Názov projektu: Účinok stimulácie na funkčnú obnovu po poškodení miechy.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2/0187/13 - 3094/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): poranenie miechy, stimulácia, elektrofyziológia, regenerácia, potkan.

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)

Napriek intenzívnemu úsiliu experimentálnych a klinických pracovníkov sa zatiaľ nepodarilo nájsť účinnú terapiu pre obnovu nervového tkaniva po ischemickom alebo traumatickom poškodení. Ani jeden z mála klinicky schválených postupov nevedie k uspokojivým výsledkom. Cieľom navrhovaného projektu je zvýšiť účinnosť súčasných terapeutických postupov pomocou dlhodobej podprahovej elektrickej stimulácie poškodeného tkaniva, ktorá sama o sebe napomáha regenerácii axónov a usmerňuje ich rast. Počas dlhodobej stimulácie zvierat budeme testovať stupeň ich funkčnej obnovy snímaním miechových vyvolaných potenciálov a behaviorálnym testovaním (BBB, open field). Po ukončení experimentu bude miecha v oblasti lézie podrobená histologickej a imunohistochemickej analýze.

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 dlhodobej podprahovej elektrickej stimulácie. Implantácia miniatúrneho elektrického stimulátora po akútnom traumatickom poškodení miechy nám umožní podporiť rast poškodených axónov aplikáciou veľmi slabého usmerneného elektrického poľa. V prípade pozitívneho efektu je možné túto terapiu využiť na zvýšenie účinnosti ostatných spôsobov terapie poškodenej miechy (farmakologické, transplantácie, atď.). Správne nasmerovanie regenerujúcich axónov je pre správnu funkciu miechy kritické. Počas experimentu budú zvieratá testované elektrofyziológicky (vyvolané potenciály) a behaviorálne (open field, BBB skóre), po odbere tkaniva miechy bude hodnotený axonálny rast, počet regenerovaných axónov a smer ich rastu. Aj malý pokrok v terapii by znamenal obrovskú zmenu v kvalite života pacientov po úraze miechy.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch budú použité laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar, samice v počte 80 ks na celú dobu riešenia.

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

Kompresia alebo hemisekcia 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 hlavne závisiace na mnohých faktoroch. Z týchto dôvodov nie je možné uskutočniť dané experimenty alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat. Ďalším argumentom pre použitie zvierat je nenahradiťnosť fyziologického a behaviorálneho testovania pre konečné zhodnotenie účinkov terapie.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet 80 ks zvierat bolo stanovený ako kompromis medzi skutočnosťou, že v experimentoch predpokladáme veľkú individuálnu variabilitu výsledkov (z tohto dôvodu by bol optimálne počet zvierat v skupinách aspoň 10 kusov) a dostupnosťou stimulátorov, nakoľko každé zviera musí mať vlastný stimulátor. Nami stanovený počet zvierat je minimálny, podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný počet pre získanie štatisticky významných výsledkov.

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 zvierat, a, 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 - 3403/14-224

Názov projektu:

Úloha stresovej odpovede mezenchýmových stromálnych buniek v rezistencii ľudských nádorových buniek na liečbu

Kľúčové slová:

Karcinóm prsníka, karcinóm ovárií, mezenchýmové stromálne bunky, chemorezistencia

Účel projektu:

Základný výskum

Cieľ projektu:

Cieľom pokusu je analyzovať mechanizmus, akým môžu ľudské mezenchýmové stromálne bunky prispievať ku vzniku rezistencie na chemoterapiu v nádorových bunkách marmárneho karcinómu. Predkladaný projekt je súčasťou nášho dlhodobého výskumu, v ktorom sledujeme komplexné interakcie nádorového mikroprostredia na biologické vlastnosti nádoru so špecifickým zameraním na úlohu mezenchýmových stromálnych buniek.

Prínos projektu:

Popísanie mechanizmu interakcií medzi nádorovými bunkami a bunkami nádorovej strómy môže byť užitočné v prípadoch, kedy je potrebné podporiť účinok chemoterapie prostredníctvom ovplyvnenia stromálnej zložky nádoru.

Chemoterapia stále zostáva jedným z hlavných pilierov v liečbe nádorov. Mnoho cytotoxických liekov jednotlivo alebo v kombinácii dosahuje výraznú protinádorovú odpoveď. Nielen vnútorné (intrinsic) vlastnosti nádorových buniek, ale aj mnohé faktory v okolí buniek (extrinsic factors) ako sú zloženie mikroprostredia nádoru určujú odpoveď na konkrétnu kombináciu. Mezenchýmové stromálne bunky (MSC) v stróme nádorov menia biologické vlastnosti nádorov vrátane chemosenzitivity. Naším cieľom je určiť, ktoré terapeutické režimy pre prsníkové a ovariálne karcinómy sú ovplyvnené v prítomnosti stromálnych buniek. Výskum chceme zamerať na najčastejšie používané a klinicky významné chemoterapeutické látky ako sú cyklofosfamid, doxorubicín, 5-fluorouracil, cisplatina a paklitaxel. Tieto látky použijeme na ovplyvnenie nádorových buniek v prítomnosti ľudských MSC, ktoré reprezentujú nemalígne stromálne bunky. Bolo potvrdené, že MSC sa aktívne vychytávajú v nádore a inkorporujú do jeho strómy. Cieľom projektu je odhaliť, či je možné zlepšiť výsledok protinádorovej terapie látkou nasmerovanou proti stromálnej zložke nádoru.

Počet a druh použitých zvierat:

Mýš laboratórna 6-8 týždňov, samičky aj samce

- kmeň Balb/c Nu/Nu oboch pohlaví (navrhovaný počet 576 na štyri roky riešenia projektu).
- Kmeň SCID Beige (CD17 Cg-Prkdcid Lystbg/Crl) (navrhovaný počet 128 na štyri roky riešenia projektu).

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

Pri modeloch subkutánných xenotransplantátov neočakávame výrazný nepriaznivý vplyv na zdravotný stav zvierat. Všetky zvieratá, u ktorých nádor presiahne 1cm³ budú eutanazované podaním letálnej dávky tiopentalu i.p. s následnou dislokáciou miechy. Rovnako budeme postupovať pri zvieratách s výraznejšou stratou hmotnosti a zvieratách, u ktorých budú nádory vykazovať známky nekrózy.

U metastatických modelov očakávame zhoršenie zdravotného stavu, kachexiu a sťažené dýchanie. Tento stav nebude dlhodobý, zvieratá budú denne monitorované a zistení takéhoto stavu budú myši eutanazované podaním letálnej dávky tiopentalu i.p. s následnou dislokáciou miechy.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Stredná pri modeloch subkutánných xenotransplantátov

Krutá pri metastatických modeloch

Súladi s požiadavkami „3R“

Nahradenie

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov, experimentom na zvieratách predchádzajú štúdie v *in vitro podmienkach*.

Obmedzenie:

Na základe našich skúseností z predchádzajúcich projektov a na základe údajov z vedeckej literatúry sme schopní odhadnúť základné dávkovanie buniek aj chemoterapeutík. Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Ak získame štatisticky významné dáta z menšieho počtu zvierat, nebude potrebné použiť celkový plánovaný počet.

Zjemnenie:

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Prostredie kliebok bude obohatené o materiál umožňujúci úkryt a stavbu hniezd. Máme vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizáciu zvierat počas injekčných aplikácií buniek a chemoterapeutík. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratornými zvieratami. Zvieratá s vážne zhoršeným zdravotným stavom budú eutanazované.

Spätné posúdenie projektu:

Spätné posúdenie projektu vykonáme do štyroch mesiacov po ukončení projektu, do 30.4.2019.

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

Využitie bunkovej terapie pri rozsiahlych resekciách pečene.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3112/14-221

VEGA 1/0592/13

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

liver injury , rat, mesenchymal stem cell, hepatocytes, liver resection

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)

Predložený projekt je zameraný na sledovanie možností regenerácie pečene u potkanov po rozsiahlych 2/3 resekciách pečene a po poškodení pečene indukovanom dimetylnitróزامínom. Regenerácia pečene bude sledovaná v dvoch líniiach pomocou implantovaných dospelých hepatocytov a po implantovaní mezenchymálnych kmeňových buniek u potkanov.

Pripravované budú mezenchymálne stromálne bunky diferencované z kmeňových buniek kostnej drene potkanov. V predloženom projekte bude model poškodenej pečene predstavovať v prvej skupine potkany po 2/3 resekcii pečene , v druhej skupine potkany s poškodenou pečeňou dimetylnitróزامínom. V oboch skupinách budú potkany ešte rozdelené na tri podskupiny, kde bude sledovaná možnosť regenerácie pečene pomocou aplikovaných hepatocytov, pomocou implantovaných mezenchymálnych kmeňových buniek a kontrolná skupina potkanov po aplikácii placeba, fyziologického roztoku do zvyšného parenchýmu

pečene. V projekte bude sledovaná aj kontrolná skupina zdravých potkanov, ktoré nepodstúpia ani resekciu pečene ani jej poškodenie.

U potkanov bude aplikovaný dimetylnitrózaním intraperitoneálne v jednej dávke 40 mg/kg. Budú sledované biochemické parametre na vyhodnotenie hepatotoxického efektu dimetylnitrózamínu.

Bude vyhodnotené a zistené po akom časovom intervale sú schopné implantované dospelé hepatocyty a mezenchymálne stromálne bunky zlepšiť a upravovať pečenné funkcie.

Pooperačne na 28 deň budú zvieratá utratené dekapitáciou, následne budú vykonávané histologické vyšetrenia z pečene, bude sledovaná prítomnosť regenerovaných hepatocytov.

Takáto porovnávacie štúdia doposiaľ nebola vykonaná.

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

Z daného experimentu bude možné zistiť, ktorý model bunkovej terapie bude vhodný na regeneráciu poškodenej pečene, mezenchymové kmeňové bunky alebo dospelé hepatocyty. Pre vedu ľudstvo budú výsledky pokusu významné tým, že poskytnú novú informáciu a tom, ktorým smerom sa má výskum bunkovej terapie pri poškodení pečene uberať.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkany plemena Sprague-Dawley, samce

80

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

Počas experimentu zvieratá postúpia operačný výkon 2/3 resekciu pečene, budú im podávané lieky, anestetiká, analgetiká, intraperitoneálne podávaný DMN. Neskôr budú operované a budú im podávané mezenchymálne kmeňové bunky a hepatocyty.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Slabá – až stredná krutosť

Podávanie liekov, odber krvi slabá úroveň krutosti.

Operačný výkon stredná krutosť, pooperačne podávanie liekov – slabá krutosť

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Bez použitia zvierat sa nezistia možnosti regenerácia pomocou kmeňových buniek a hepatocytov. Nebude sa dať porovnať ich účinok na regeneráciu.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet zvierat je obmedzený na minimum , v každej skupine 10 zvierat.

Poškodená pečeň dimetylnitrózamínom – 30 zvierat – tri skupiny – liečené a) mezenchýmovými kmeňovými bunkami, b) hepatocytmi, c) kontrolná skupina

Poškodenie pečene resekciou - 30 zvierat poškodenie pečene - 2/3 resekcie pečene - tri skupiny – liečené a) mezenchýmovými kmeňovými bunkami, b) hepatocytmi, c) kontrolná skupina

10 zvierat : príprava buniek

Z toho 8 zvierat - odber kostnej drene – príprava kmeňových buniek

2 zvieratá odber pečene – hepatocyty

10 zvierat – kontrolná skupina – zdravé zvieratá bez poškodenia pečene

3. Zjemnenie:

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

Potkany SD – podávaná anestéza počas operácie, pooperačne analgetika. Šetrné zaobchádzanie so zvieratami zabezpečia pracovníci so skúsenosťami v práci s laboratórnymi zvieratami

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Názov projektu: Molekulárne mechanizmy adaptácie preimplantačného embrya (VEGA 2/0039/15)

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3155/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): Preimplantačné embryo, materský stres, poškodenie DNA, opravy DNA

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: Predložený projekt je zameraný na štúdium skorého embryonálneho vývinu vo vzťahu k stavu materského organizmu, najmä na pôsobenie materského stresu. V prvej časti projektu budú experimenty skúmajúce účinky materského stresu pôsobiaceho počas preimplantačnej vývinovej periódy na metabolický status a vývin embrya. Budeme analyzovať vplyv stresu pôsobiaceho v preimplantačnom období na kvalitu embryí, pričom bude zohľadnený metabolický status matky. Zameriame sa aj na dlhodobé účinky stresu pôsobiaceho v preimplantačnom období. V druhej časti projektu budú skúmané molekulárne mechanizmy, ktorými stresové mediátory pôsobia v bunkách preimplantačných embryí. V rámci in vitro experimentov sa zameriame na štúdium signálnych dráh aktivovaných stresovými induktormi po poškodení DNA.

Prínos z vykonaného projektu: Výsledky získané v rámci tohto projektu na experimentálnom modeli myši, poskytnú dôležité informácie potrebné pre štúdium vplyvu materského stresu (v kontexte metabolického stavu materského organizmu) na skorý embryonálny vývin u hospodárskych a domácich zvierat, ako aj u ľudí. Tieto poznatky budú priamo využiteľné v humánnej a veterinárnej medicíne pri zlepšovaní reprodukčného zdravia, zvyšovaní úspešnosti gravidity, prevencii skorých prenatalných strát, pri technikách asistovanej reprodukcie ako aj v regeneratívnej medicíne.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: Modelovým zvieratom pre všetky experimenty bude myš laboratórna (kmeň ICR). Pri zohľadnení všetkých potrieb vedeckého výskumu i predpisov stanovených v nariadení vlády 377/2012 Z.z. by maximálny počet použitých zvierat za celé obdobie trvania projektu (01/2015-12/2018) nemal prekročiť 3130 myší.

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu: Okrem krátkej imobilizácie, dietetických zmien u časti zvierat, neinvazívneho merania objemu tuku a

hormonálnej indukcie pohlavného cyklu u časti samíc nebude pokusným ani kontrolným zvieratám spôsobovaný žiaden ďalší diskomfort. Všetky invazívne zásahy (izolácia embryí a odber krvi) budú vykonané až po ich usmrtení.

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

2. Redukcia počtu zvierat:

Plánované experimenty sú zostavené tak, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov použitých čo najmenej zvierat a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého použitého pokusného zvieraťa. Počet použitých zvierat (3130) bol stanovený tak, aby bola zachovaná reprodukovateľnosť a validita pokusov pri minimálnom objeme vstupného materiálu. Odchov samíc bude prebiehať cyklicky a získavanie biologického materiálu sa ukončí v okamihu, kedy bude zabezpečená adekvátne kvantita vzoriek poskytujúca interpretovateľné a štatisticky preukazné výsledky. Usmrcovanie zvierat s následným zberom biologického materiálu je v postupe nastavené tak, aby mohlo byť vo vzorkách vyšetrených paralelne toľko parametrov, koľko bude technicky možné. V prípade vysokej kvality/kvantity získaných embryí môžu byť reálne počty použitých zvierat nižšie.

3. Zjemnenie:

Hlavným dôvodom výberu myši laboratórnej je vysoká reprodukčná schopnosť druhu (početnosť vo vrhu, rýchla generačná výmena, celoročný pohlavný cyklus myši), ktorá umožní získanie potrebného biologického materiálu v relatívne krátkom čase. Plánované experimenty sú zostavené tak, aby bola minimalizovaná bolesť alebo stres použitých pokusných zvierat a aby bol zabezpečený primeraný welfare od ich narodenia až po smrť. Zvieratá sú umiestnené vo vyhovujúcich zoohygienických podmienkach, je im poskytnuté obohatené prostredie. Zdravotný stav je priebežne sledovaný, eutanázia zvierat je zabezpečená cervikálnou dislokáciou. Všetci pracovníci, ktorí prichádzajú do styku so zvieratami sú príslušne poučení a budú dbať na humánny prístup k zvieratám a starať sa o to, aby neboli v žiadnej fáze pokusov vystavované zbytočnému stresu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

☒ áno

☐ nie

do 31.6.2019 zaslať
výsledky m SVPS SE

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

Z dôvodu vysokého počtu použitých zvierat v súlade s
§ 36 ods. 2 písm. f) nariadenia rady SK 347/2012 Z.z.

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU: 3184/14-221

Názov projektu: Modulačné účinky probiotických baktérií na imunitu hostiteľa pri parazitozoonóze vyvolanej *Trichinella spiralis*

Účel postupu:

základný výskum, overenie akosti, účinnosti a bezpečnosti probiotických baktérií a) na odstránenie, prevenciu a na liečbu chorôb (trichinelóza), poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka, zvierat b), usmerňovanie alebo úpravu fyziologického stavu alebo fyziologických procesov človeka, zvierat.

Cieľ projektu: Výstupom projektu bude kmeňovo-špecifická charakteristika imunogénnych vlastností 5 testovaných bakteriálnych kmeňov ako možných kandidátov na profylaktické alebo terapeutické ovplyvnenie imunitnej odpovede hostiteľa pri trichinelóze.

Prínos projektu: Rôzne probiotické kmene (napr. laktobacily, bifidobaktérie, enterokoky) sa vyznačujú zdraviu prospešnou aktivitou, chránia hostiteľa pred možnými patogénmi a ďalším mechanizmom ich pozitívneho účinku je modulácia imunitnej odpovede. Z imunologického hľadiska, probiotické kmene predstavujú novú stratégiu v boji a prevencii rôznych črevných infekcií, aj parazitárnych. Lepšie pochopenie molekulárnych mechanizmov súvisiacich priaznivým pôsobením probiotických baktérií na infekciu parazitom je dôležité pre overenie využitia probiotík v liečbe. Pre tento výskum je treba používať špecificky-definované protokoly (konkrétne probiotické baktérie a experimentálne modely).

Celkový počet zvierat v etapách I-V: 806 myši BALB/c (roky 2015-2017)

Dodržiavanie zásad 3 R

Zásada nahraditeľnosti zvierat: Pre experiment boli zvolené laboratórne myši inbredného kmeňa BALB/c, ktoré sú potrebné pre imunologické štúdie. Myš ako drobný cicavec je súčasťou životného cyklu parazita použitého v experimente. Imunitný systém myši je príbuzný imunitnému systému človeka. Pokus nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože predmetom štúdia je vzťah probiotický kmeň – hostiteľ – parazit.

Zásada zjemnenia pokusu použitím anestézie a analgetík: Vzhľadom na to, že aplikácia probiotických kmeňov bude uskutočnená *per os* sondou a nespôsobuje zvieratám žiadne bolesti, nevyžaduje si žiadnu anestézu. Infekcia zvierat larvami parazita bude krátka a nebolestivá, larvy v pufrovacom roztoku budú aplikované sondou *per os*, čo si nevyžaduje podávať myšiam prípravky na zmiernenie bolesti. Priebeh parazitárnej infekcie a intoxikácie nespôsobí zvieratám bolesť. Pri odbere krvi budú myši v celkovej pentobarbitálovej anestéze a následne budú usmrtené cervikálnou dislokáciou, aby mohli byť odobraté orgány - slezina, pečeň, tenké črevo a svaly. Denne sa bude sledovať zdravotný stav myši a v prípade prítomnosti známok utrpenia, zhoršeného zdravotného stavu budú humánne usmrtené cervikálnou dislokáciou.

Zásada znižovania počtu zvierat: Počet zvierat žiadaných pre pokus je determinovaný počtom skupín, ktorým sa budú aplikované rôznu dobu probiotické kmene a budú infikované *T. spiralis*. Počet zvierat v jednotlivých skupinách si vyžaduje počet odberových dní a je minimálny pre štatistické vyhodnotenie výsledkov.

Klasifikácia krutosti postupov

1. Slabé: neinvazívne podávanie bakteriálnych kmeňov a larií parazita cez sondu bez použitia anestézy, v objeme limitovanom pre veľkosť a druh zvierat (100 – 150 µl) a intraperitoneálne podávanie anestetika (Pentobarbital Spofa, 50 mg/kg.ž.h.) pred odberom krvi, rýchle usmrtenie cervikálnou dislokáciou.

Späť na poslednú - nie

Príloha II**Netechnické zhrnutie projektu****Názov projektu:**

Úloha perivaskulárneho tukového tkaniva v regulácii cievneho tonusu u potkanov s kardiovaskulárnou dysfunkciou

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3106/14-221

2/0202/15 (Registračné číslo projektu)

Kľúčové slová:

Perivaskulárne tukové tkanivo, magistralne tepny, sympatikový nervový systém, hypertenzia, fruktóza

Účel projektu:

Základný výskum

Ciele projektu:

Hlavným cieľom tohto projektu je štúdium úlohy perivaskulárneho tukového tkaniva a jeho vplyvu na funkčné prejavy artérií za normálnych podmienok a pri patologických stavoch súvisiacich najmä so zvýšeným krvným tlakom a so zreteľnými zmenami v cievnej štruktúre a reaktivite.

Úlohou našich experimentov bude:

- zistiť koreláciu medzi výškou krvného tlaku a zmenami v modulačnom vplyve perivaskulárneho tukového tkaniva na funkciu ciev. Štúdia sa uskutoční na kmeňoch normo- a hypertenzných potkanov v rôznych vekových štádiách (resp. v rôznych fázach rozvoja hypertenzie);
- sledovať odchýlky v modulácii cievnej funkcie perivaskulárnym tukovým tkanivom počas dietetického zásahu vedúceho k zvýšeniu hladiny krvných lipidov i celkovej telesnej adipozity (napr. pri dlhodobom nadmernom príjme fruktózy u potkana), ktoré je súčasne sprevádzané zmožením perivaskulárneho tuku a tiež zmenami v cievnej reaktivite (endotelová dysfunkcia, zhoršenie kontraktílnych vlastností a pod.).

Pre detailnejšie poznanie mechanizmu pôsobenia perivaskulárneho tukového tkaniva na funkciu ciev budeme sledovať reaktivitu izolovaných magistralných artérií so zachovaným alebo odstráneným periarteriálnym tukom, pričom sa zameriame najmä na:

- vplyv perivaskulárneho tukového tkaniva na veľkosť cievnej relaxácie (závislej a nezávislej od endotelu) a kontrakcie (indukovanej viacerými konstriktorickými činidlami, napr. noradrenalín, serotonin, angiotenzín II, KCl), čím sa zistí, ktoré funkčné receptorové systémy sú najviac ovplyvnené prítomnosťou tejto štruktúry, resp. zmeny v ich vzájomných vzťahoch pri hypertenzii a iných patologických stavoch súvisiacich s poruchami v cievnej funkcii;
- vplyv perivaskulárneho tukového tkaniva na prejavy aktivity sympatikových nervov v artériách, keďže tieto štruktúry spolu anatomicky tesne súvisia a predpokladajú sa tiež ich významné funkčné interakcie.

Imunohistochemicky budeme lokalizovať cievne sympatikové nervové zakončenia vo vzťahu k perivaskulárnemu tukovému tkanivu.

Prínos z vykonaného projektu:

Získané poznatky o úlohe perivaskulárneho tukového tkaniva (PVTT) a jeho produktov prinesú nový pohľad na reguláciu cievneho tonusu, najmä na moduláciu neurogénnych kontraktálnych odpovedí ciev vyvolaných aktivitou sympatického nervového systému.

Napriek tomu, že sa ukazuje, že prítomnosť PVTT, ako aj jeho funkčné a morfológické zmeny pri hypertenzii a pri iných patologických stavoch môžu výrazne ovplyvňovať celkovú reaktivitu artérií, väčšina autorov pri *in vitro* experimentoch používa výlučne cievne preparáty s odstránenými perivaskulárnymi štruktúrami. Za týchto okolností sa namerané hodnoty cievnych reakcií v experimente môžu značne vzdialovať od reálnych odpovedí v integrovanom organizme. Preto je i z metodického hľadiska potrebné dôkladne študovať a zdôrazňovať význam PVTT pri regulácii cievnych funkcií za normálnych aj za patologických podmienok.

Keďže v PVTT sa tvoria a uvoľňujú prevažne dilatačne pôsobiace látky, ktoré v experimentálnych podmienkach spôsobujú redukciu cievnych kontraktálnych odpovedí (Soltis a Cassis, 1991; Löhn *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2007), očakávame, že význam zachovania intaktnej perivaskulárnej tukovej vrstvy sa zdôrazní aj v klinickej praxi, a to najmä pri prevencii vazospazmov, ku ktorým dochádza pri porušení alebo odstránení PVTT počas izolácie cievnych štepov pred ich chirurgickým použitím (Gao *et al.*, 2005; Loesch a Dashwood, 2009).

Ďalej predpokladáme, že výsledky riešenia tohto projektu objasňujúce mechanizmy uvoľňovania a pôsobenia dilatačných látok z PVTT na cievny hladký sval môžu poskytnúť tiež možnosti pre vypracovanie nových stratégií prevencie a terapie kardiovaskulárnych ochorení u človeka.

Literatúra:

1. Soltis EE, Cassis LA. *Clin Exp Hypertens* 1991; **275**: 681-692.
2. Löhn M, Dubrovská G, Lauterbach B, *et al.* *FASEB J* 2002; **16**: 1057-1063.
3. Gao YJ, Lu C, Su LY, *et al.* *Br J Pharmacol* 2007; **151**: 323-331.
4. Gao YJ, Zeng ZH, Teoh K, *et al.* *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; **130**: 1130-1136.
5. Loesch A, Dashwood MR. *Curr Vasc Pharmacol* 2009; **7**:58-67.

Počet a druh zvierat:

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*),

- ☐ potkan Wistar-Kyoto, samec – 20 ks
- ☐ spontánne hypertenzný potkan, samec – 20 ks
- ☐ hranične hypertenzný potkan (potomok kríženia spontánne hypertenznej matky a normotenzného Wistar-Kyoto otca), samec – 20 ks
- ☐ potkan Wistar, samec – 20 ks

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

Nepredpokladáme nepriaznivý vplyv na zvieratá pri vykonávaní projektu. So zvieratami sa zaobchádza šetrne, avšak počas merania hemodynamických parametrov môže dochádzať ku krátkodobej miernej nepohode a strachu, ktorý sa po opakovaných meraniach znižuje.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Slabé.

Uplatňovanie zásad 3R:**1. Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)**

Cieľom plánovaného pokusu je štúdium modulačného účinku perivaskulárneho tukového tkaniva (PVTT) na reaktivitu artérií a tiež jeho štruktúrno-funkčných interakcií s ostatnými zložkami cievnej steny. Hlavným prínosom našich experimentov by malo byť hodnotenie účasti vplyvu PVTT na zvyšovanie krvného tlaku pri genetickej hypertenzii a pri metabolických a kardiovaskulárnych zmenách vyvolaných nadmerným príjmom fruktózy. Preto plánujeme v našich pokusoch použiť rôzne genotypy potkanov, vyznačujúce sa odlišnou genetickou predispozíciou k hypertenzii (Wistar-Kyoto, spontánne hypertenzné a hranične hypertenzné potkany), a to v dvoch rôznych vekových štádiách (u hypertenzných jedincov pred a po vzostupe krvného tlaku). Okrem toho plánujeme použiť normotenzné Wistar potkany na vyvolanie metabolického syndrómu podávaním nadmerného množstva fruktózy, pri ktorom dochádza k zvýšeniu ich krvného tlaku a súčasne ku kvantitatívnym i kvalitatívnym zmenám PVTT. Na základe doterajších údajov z literatúry ako i z našich vlastných skúseností môžeme usúdiť, že uvedené typy potkanov predstavujú najvhodnejšie modely na sledovanie vyššie uvedených parametrov a na dosiahnutie nami vytýčených cieľov. Zatiaľ neexistuje žiadna alternatívna metóda, ktorá by dostatočne nahradila komplexné podmienky v *in vivo* modeloch. Dokumentuje to tiež Príloha IV. (Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznávaných alternatívnych metód).

2. Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

V plánovanom experimente sa zabezpečí čo najnižší počet experimentálnych zvierat tak, aby bol experiment štatisticky vyhodnotiteľný a závery všeobecne prijateľné. Zvieratám použitým na *in vitro* experiment sa odoberie maximálne množstvo vzoriek na sledovanie ďalších fyziologických, biochemických prípadne morfológických parametrov. Ak to bude možné, zabezpečí sa aj spolupráca medzi laboratóriami (ako v rámci ÚNPF SAV tak aj s ostatnými ústavmi), aby sa v rámci experimentov jednotlivých laboratórií dalo použiť čo najväčšie množstvo spoločných experimentálnych zvierat.

3. Zásada zjemnenia (refinement)

V experimente nebudú použité žiadne bolestivé invazívne metódy; potkany počas pokusu prežívajú iba mierny stres, ktorý budeme minimalizovať šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia predmetmi na hru a ohryzovanie. Po ukončení chronického experimentu, t.j. v piatom alebo v dvanástom týždni života, budú potkany humanne utratené. Usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii. Najskôr sa vystavia pôsobeniu oxidu uhličitého v uzavretej nádobe až do straty vedomia. V hlbokom bezvedomí budú následne dekapitované, nechajú sa vykrvácať a po otvorení hrudnej a brušnej dutiny budú odobraté príslušné cievy a orgány.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

Nie.

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Využitie nových alternatív chirurgickej terapie kožných defektov a zvýšenie ich efektivity aplikáciou podporných granulačných a epitelizačných prípravkov (aviárny model)

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3349/14-221

Kľúčové slová (max. 5 slov): kožný defekt, vtáky, terapia, manažment

Účel projektu*: Základný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Opísať ciele projektu:

Ciele projektu sú nasledovné:

1. Overenie a osvojenie si chirurgických postupov terapie kožných defektov s možnosťou uplatnenia nových metód terapie poškodenia kože využívaných v klinickej praxi cicavcov pre aviárny model zvierat
2. Experimentálne sledovanie účinnosti aplikácie komerčne dostupných epitelizačných a granulačných terapeutík vrátane bunkového koncentrátu a plazmy bohatej na trombocyty získaných z autológnej krvi experimentálnych zvierat, ako podpornej terapie, na proces hojenia rany v podmienkach *in vivo* na modelovom druhu zvierat (kura domáca /*Gallus domesticus*/).

3. Hodnotenie procesu hojenia rán a efektivity aplikácie vybraných prípravkov, resp. zvolenej metódy makroskopickým a histologickým vyšetrením sledovaných parametrov.
4. Overenie účinnosti výsledkov získaných experimentálnou štúdiou pri terapii kožných defektov u vtákov v klinickej praxi.

Prínos z vykonaného projektu:

Výstupom projektu bude vytvorenie nových moderných postupov chirurgického manažmentu terapie kožných defektov aplikovaných do klinickej praxe aviárnych pacientov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V jednotlivých experimentoch bude použitá hydina – kura domáca (*Gallus domesticus*) nosivého typu ISA Brown vo veku 1,5 roka samičieho pohlavia o priemernej hmotnosti 2 – 2,5 kg. Experimentálna štúdia bude vykonávaná na 60 kusoch zvierat rozdelených do 6 skupín v počte 10 kusov v každej skupine.

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

Počas sledovaného obdobia zvieratám nebude zabránené v prirodzenom správaní vrátane obmedzenia štandardov na umiestnenie, chov a starostlivosť a nebude im vo významnej miere narušaná pohoda ani celkový stav. Nepriaznivý vplyv na zdravotný stav zvierat sa môže prejavovať v krátkom období po vykonaní chirurgického zákroku v podobe bolestivosti chirurgicky ošetreného miesta, opuchu kožných a podkožných štruktúr, alebo neochoty zvierat'a tolerovať naloženie ochrannej bandáže. Avšak zosúladením jednotlivých krokov všetkých terapeutických postupov by mal byť nepriaznivý vplyv postupov na zdravotný stav zvierat minimálny. Na potlačenie bolestivosti budú zvieratám aplikované analgetiká podaním meloxicamu v dávke 0,2 – 0,3 mg/kg ž. hm. podaného i.m v časom intervale do troch dní od vykonania chirurgického zákroku.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Na základe posudzovaných faktorov navrhujeme výslednú klasifikáciu krutosti postupu označiť ako „strednú“ s ohľadom na chirurgický zákrok a zabezpečenie účinnej stabilizácie procesu hojenia rany.

Uplatňovanie zásad 3R:

1. Nahradenie zvierat:

Postup nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože ide o priame testovanie účinnosti komerčne dostupných podporných granulačných a epitelizačných prípravkov a bunkového koncentráту a plazmy bohatej na trombocyty získaných z autológnej krvi experimentálnych zvierat na proces hojenia rany a obnovu porušenej štruktúry a funkcie kože v živom organizme po vykonaní chirurgického zákroku. Ide o zložitý biologický proces, ktorý zahŕňa komplex interakcií hodnotených priamo makroskopicky a mikroskopicky v *in vitro* podmienkach.

2. Redukcia počtu zvierat:

V postupe bude použitých 60 kusov hydiny rozdelených do 5 pokusných skupín (5 x 10 sliepok) a jednej kontrolnej skupiny (1 x 10 sliepok). Uvedený počet zvierat rešpektuje požiadavku na minimálny počet zvierat v pokusnej skupine z dôvodu zabezpečenia reprodukovateľnosti výsledkov a štatistického vyhodnotenia výsledkov.

3. Zjemnenie:

V experimentoch budú použitá hydina - kura domáca (*Gallus domesticus*) nosivého typu ISA Brown vo veku 1,5 roka samičieho pohlavia, ktorá je pre realizáciu cieľov projektu najvhodnejším modelovým zvierat'om. Chirurgické zákroky budú vykonané v celkovej anestézii použitím šetrného inhalačného anestetika zabezpečujúceho rýchlejší nástup anestézie a prebúdzania sa pacienta a minimalizáciu nežiaducich účinkov. Počas trvania jednotlivých experimentov nebudú zvieratá vystavované nadbytočnému stresu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

Výskum ovplyvnenia zápalu, chronickej autoimunitnej reakcie a redoxnej regulácie organizmu v experimentálnej artritíde použitím nových látok pre adjuvantnú terapiu reumatoidnej artritídy

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3424/14-221
evidenčné číslo projektu VEGA 2/0044/15

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

adjuvantná artritída, transkripčné faktory, cytokíny, oxidačný stres, antireumatiká

Účel projektu:

Na úrovni základného výskumu odhaliť nepoznané mechanizmy etiopatogenézy reumatoidnej artritídy (RA) na úrovni exprese dôležitých génov Nrf2 a NF-kappa B zapojených do regulácie zápalu a redoxnej rovnováhy organizmu. Pre tento cieľ použijeme experimentálny model RA, a to adjuvantnú artritídu (AA) vyvolanú u potkanov kmeňa Lewis. Rozvoj AA budeme charakterizovať parametrami opisujúcimi imunologické, oxidačné a zápalové procesy. V kombinácii s akútnym modelom (karagenínom indukovaný zápal) budeme tiež hodnotiť antireumatický a protizápalový účinok látok, ktoré doteraz neboli študované pre terapiu RA.

V projekte hodnotené látky sú rozdelené do štyroch skupín:

I. Nízkomolekulové antioxidanty-imunomodulátory: astaxantín, kanolol, derivát karnozínu a trolox-karnozín

II. Phytochemikálie a extrakty: extrakt z plodov Rosa canina L. a jeho frakcie (najmä feruloylaldehyd), extrakt zo zeleného čaju a Annona sp. (polyfenolová frakcia)

III. Mastné kyseliny: Omega-3 mastné kyseliny a kyselina puniková

IV. Probiotiká: kmeň Lactobacillus plantarum LS/07 zbierkové číslo CCM 7766

Najúčinnejšie z látok jednotlivých skupín sa potom vyberú do kombinácie s bazálnym antireumatikom – metotrexátom.

Opísať ciele projektu:

- Na modeli karagenínom indukovanom zápale u potkanov študovať v monoterapii efekt hodnotených látok v troch rôznych dávkach na veľkosť opuchu kĺbov.
- U potkanov s adjuvantnou artritídou (AA) študovať účinnosť vybraných látok s imunomodulačnými a antioxidantnými vlastnosťami v monoterapii a v kombinácii s metotrexátom.
- Komplexne analyzovať túto účinnosť pomocou biochemických (ukazovatele zápalu a oxidačného stresu) a imunologických parametrov na systémovej a lokálnej úrovni.
- V modeli AA porovnať preventívne-terapeutické podanie s terapeutickým podaním pre vybrané látky.
- Na úrovni exprese dôležitých transkripčných faktorov zapojených do regulácie zápalu (NF-kappa B) a redoxnej rovnováhy (Nrf2) objasniť ich vzájomné prepojenie v regulácii patogenézy chronických zápalových ochorení, akým je aj RA. Použiť kvantitatívnu RT-PCR, ktorá nám umožní kvantifikovať expresiu mRNA génov Nrf2, NF-kappa B, ako aj dôležitých zápalových mediátorov - TNF-alfa, IL-1beta a indukovateľnej NO syntázy (iNOS).
- Na molekulárnej úrovni sledovať expresiu spomenutých transkripčných faktorov vo vybraných tkanivách a meraním biochemických markerov oxidačného stresu rozlíšiť, či je pôsobenie vybraných látok priamo antioxidantné (oxidačno-redukčné reakcie) alebo

nepriamo antioxidantné (zvýšenie antioxidantnej ochrany prostredníctvom Nrf2 alebo znížením expresie NF-kappa B), prípadne je ich kombináciou.

- Študovať dysbalanciu metabolizmu lipidov meraním expresie a aktivity butyrylcholínesterázy a expresie PPARG transkripčných faktorov v bielom tukovom tkanive a v pečeni potkanov s AA a jej farmakologické ovplyvnenie testovanými látkami.
- Pre probiotiká (kmeň *Lactobacillus plantarum* LS/07 zbierkové číslo CCM 7766) študovať vzťah artritídy a zmien v počte laktobacilov a pH ich kolónií v hrubom čreve potkanov.

Prínos z vykonaného projektu:

Očakávaným prínosom projektu je:

- ♦ objasnenie regulácie mechanizmov oxidačného stresu v RA,
- ♦ preskúmanie nových látok s protizápalovým, antioxidantným a imunomodulačným účinkom v liečbe RA,
- ♦ originálny príspevok v hodnotení nových terapeutických kombinácií klasickej imunosupresívnej liečby s imunomodulátormi a s látkami ovplyvňujúcimi redoxnú rovnováhu pre terapiu RA,
- ♦ zvýšenie účinnosti metotrexátu bez zvýšenia rizika výskytu nežiaducich účinkov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V postupe sa použije 1 040 kusov laboratórnych potkanov kmeňa Lewis, samcov 5-6 týždňových o hmotnosti 120-150 g.

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

Minimálny stres zvieratá utrpia počas aplikácie látok perorálne sondou a pri podaní samotnej anestézy subkutánne. Zvieratá môžu pociťovať mierny diskomfort pri čiastočnej fixácii pri aplikácii testovaných látok sondou *per os* a pri podaní anestetika. Tieto zákroky nemajú na zvieratá žiadne nepriaznivé trvalé účinky.

Použité zvieratá budú na konci experimentu usmrtené v anestéze a biologický materiál – krv, tkanivá a orgány budú použité na stanovenie parametrov opisujúcich imunologické, oxidačné a zápalové procesy.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná

Podľa prílohy č.4 nariadenia vlády č. 377/2012 Z. z. sa postupy používané v našich experimentoch zaraďujú do kategórií krutosti takto:

Model akútneho zápalu:

1. aplikácia anestézy - kategória slabá
2. aplikácia karagenínu za účelom vyvolania akútneho zápalu v anestéze - kategória slabá
3. prežívanie akútneho zápalu - kategória stredná
4. manipulácia so zvieratami s potlačeným akútnym zápalom (meranie opuchu kĺbov) - kategória slabá
5. manipulácia so zvieratami s nepotlačeným akútnym zápalom (meranie opuchu kĺbov) - kategória stredná

Model adjuvantnej artritídy:

1. manipulácia s kontrolnými zvieratami (výmena podstielky, váženie zvierat, meranie klinických parametrov) - kategória slabá
2. aplikácia anestézy - kategória slabá
3. aplikácia *Mycobacteria butyrica* za účelom vyvolania AA v anestéze - kategória slabá,
4. podávanie látok sondou *per os* - kategória slabá

5. prežívanie AA - kategória stredná
6. manipulácia s artritickými zvieratami (výmena podstielky, váženie zvierat, meranie klinických parametrov) - kategória stredná,
7. odber krvi v 14.dni pokusu v anestéze - kategória slabá

Uplatňovanie zásad 3R:

1. Nahradenie zvierat:

Na dosiahnutie vytýčených cieľov je nutný experiment „in vivo“ , alternatívne metódy na riešenie tohto komplexného problému nie sú vhodné.

2. Redukcia počtu zvierat:

Počet zvierat sme upravili tak, aby sme mali dostatočné množstvo biologického materiálu pre získanie seriózných reprodukovateľných a štatisticky zhodnotiteľných výsledkov.

3. Ziernenie:

Laboratórny potkan kmeňa Lewis je vhodný na takýto typ experimentu, lebo nie sú problémy s jeho reprodukciou, je vhodný na sledovanie imunologických, oxidačných a zápalových procesov. Pri realizácii experimentov sme stres minimalizovali voľbou vhodných postupov a zabezpečením pohody pre zvieratá v súlade s prevádzkovým poriadkom pracoviska, kde sa experiment realizuje.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

Použitie autotransplantácie kmeňových buniek kostnej drene pri liečení kožných rán u potkanov

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3448/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): mezenchymálne kmeňové bunky, hojenie rán, diabetes mellitus

Účel projektu:

Translačný alebo aplikovaný výskum 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,

Opísať ciele projektu:

Je len malý počet štúdií sledujúcich hojenie excíznych rán na použitom modeli u diabetických potkanov. Snahou je zistiť schopnosť migrácie kmeňových buniek, ich inkorporácie do spodiny rany a stimulácie hojenia rany pomocou histomorfologického vyšetrenia a imunohistochemie.

1. Analýza migrácie kmeňových buniek z miesta implantácia do rany a inkorporácia do dermis
2. Sledovanie proliferačných a diferenciačných zmien aplikovaných kmeňových buniek pomocou histologických a imunohistochemických analýz
3. Sledovanie formovania kolaterálnych ciev a zápalových procesov
4. Sledovanie tvorby nových keratinocytov pomocou aplikácie kmeňových buniek
5. Sledovanie množstva syntetizovaného kolagénu, prítomnosti fibroblastového rastového faktora a vaskulárneho endoteliálneho faktora pomocou Elisa metódy
6. Stanoviť minimálnu koncentráciu kmeňových buniek, ktorá by bola efektívna v urýchlení hojenia rany
7. Porovnať dve experimentálne skupiny zvierat: zdravé a diabetické potkany, za účelom zistenie, či biologický efekt by bol aplikovateľný aj u diabetických zvierat, ktoré majú oveľa ťažší a komplikovanejší priebeh hojenia rán
8. Zvolenie najoptimálnejšieho média na injikovanie kmeňových buniek
9. Porovnať dva rôzne spôsoby aplikácie kmeňových buniek: a) injekčnej alebo b) sprejovej formy, vyhodnotiť najefektívnejšiu aplikáciu
10. Sledovať dobu prežívania aplikovaných kmeňových buniek v rane

Prínos z vykonaného projektu:

Prínos projektu spočíva v určení efektivity použitia autológnych mezenchymálnych kmeňových buniek pri liečbe diabetických sekundárnych rán, určenie možných rizík, ideálneho množstva, spôsobu podania MKB do rany a porovnanie ich účinku voči kontrole u diabetických a zdravých potkanov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Sprague –Dawley , samice 60 ks

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

Zvieratá z pokusu budú všetky na konci pokusu usmrčované v celkovej anestéze z dôvodu odberu vzoriek tkanív. Podľa prílohy č. 2 k nariadeniu vlády č.377/2012 Z. z.: (nadmerná dávka anestetika, dislokácia krčných stavcov).

Predpokladaná úroveň krutosti:

Postupy použité v pokuse budú spadať do kategórie slabé (aplikácia intramuskulárnych a intraperitoneálnych injekcií, aplikácia anestetík, analgetík, odber glykémie) a stredné (operácie v celkovej anestéze s primeranou analgézou).

Krutosti postupov podľa prílohy č.4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

V projekte sa sleduje sekundárne hojenie u potkanov so streptozotocínom indukovaným diabetes mellitus. Sleduje sa vplyv autológnych mezenchymálnych buniek na hojenie rán v závislosti od času. Dané javy a procesy nie je možné sledovať in vitro.

2. Redukcia počtu zvierat:

Počet zvierat je zredukovaný na minimálne množstvá potrebné na správne štatistické vyhodnotenie projektu. Ohľad sa berie aj na možnosť úmrtia pokusných zvierat počas indukcie diabetes mellitus, pri anestéze a pre prípad nedostatočnej kultivácie mezenchymálnych kmeňových buniek odobratých z femurov.

3. Zjemnenie:

Potkany rodu Sprague- Dawley budú použité pre ich rýchlu regeneračnú schopnosť, známu účinnosť streptozotocínu na vyvolanie diabetes mellitus, jednoduchú manipuláciu, možnosť sledovať hojenie rany in vivo na modeloch opakovane popísaných u zdravých potkanov. V pokuse bude venovaná maximálna pozornosť realizácii dodržania podmienok 3R najmä v zjemnení invazivity intervenčných prístupov a šetrnej manipulácii s pokusnými zvieratami. Splnenie týchto atribútov sme zabezpečili výberom experimentálneho tímu pri zohľadnení ich profesionality a dlhoročné skúsenosti pri pokusoch na laboratórnych zvieratách. Stres bude minimalizovaný šetrným zaobchádzaním s pokusnými zvieratami, pokusy budú vykonávané v inej miestnosti ako budú uložené ostatné potkany, pri postupoch vyvolávajúcich bolesť bude použitá dostatočná analgéza. Zvieratá budú usmrčované s najmenšou mierou bolesti, utrpenia a strachu, podľa prílohy č.2 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

Štúdium mechanizmov indukovanej reaktívacie ľudských onkogénnych herpesvírusov na modeli latentne infikovanej myši s Myším gamaherpesvírusom

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3494/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

Myší gamaherpesvírus, MHV, epigenetická regulácia, latencia, reaktívacia

Účel projektu * : Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

zvierat
Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo

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

Ciele projektu a prínos z vykonaného projektu:

Myší gamaherpesvírus (MHV) je modelový vírus využívaný pre štúdium ľudských gamaherpesvírusov, vírusu Epstein-Barrovej a vírusu asociovaného s Kapošího sarkómom, poskytujúc odpovede na aktuálne otázky vírusovej infekcie a reaktívacie z latencie, vrátane prípravy vhodných vakcín proti chronickej infekcii spájanej s lymfoproliferatívnymi ochoreniami a onkogenézou. Spolu bolo, v bývalom Československu, izolovaných osem myších gamaherpesvírusov, pomenovaných MHV -60, -68, -72, -76, -78, -4556, -5682 a -Šumava (reviewed by Mistríková et al., 2000). MHV-68, označovaný aj ako MuHV-4, je najlepšie charakterizovaný, známa je jeho kompletná sekvencia genómu (Virgin et al., 1997) a slúži ako referenčný kmeň (reviewed by Kúdelová and Rajčáni, 2007). Doterajšie patogenetické štúdie potvrdili, že kmeň MHV-72 je *in vitro* veľmi podobný MHV-68, ale *in vivo* sa vyznačuje niektorými odlišnosťami (Rašlová et al., 1999, 2001; Mačáková et al., 2003; Valovičová et al., 2006; Belvončíková et al., 2008). Chronická infekcia s MHV-72, na rozdiel od MHV-68, vedie k vysokému výskytu lymfómov pečene, pľúc a nadobličiek. Ten sa dokonca zvýšil, najmenej trikrát, u myší liečených imunopresívami (Mistríková et al., 1999, 1996). Navyše bola popísaná replikácia MHV-72 v mliečnych žľazách a dokázaný prenos vírusu materským mliekom z infikovanej matky na potomstvo (Rašlová et al. 2001). V prvotných štúdiách boli popísané aj restričná mapa genómu MHV-72, sekvencie vybraných génov (tymidín kináza, M3 proteín, MK3 proteín, gp150). MHV-72, ale i ďalší kmeň MHV-4556, majú rôznu patogenitu a líšia sa minimálne v indukcií splenomegálie (Mistríková et al., 1996; Oda et al., 2005; Kúdelová et al., 2012; Halášová et al., 2011). Naše nedávne štúdie ukázali, že MHV-72 a MHV-4556 majú, oproti MHV-68, zníženú schopnosť navodiť latenciu a *ex vivo* reaktíváciu indukovanú trichostatínom A (TSA) v slezine, pľúcach a týmuse laboratórnych myší latentne infikovaných MHV-72 alebo MHV-4556 (Halášová et al., 2014). Kľúčovú úlohu

v týchto procesoch zohrávajú jednak vlastnosti vírusu kódované jeho genómom, ale aj hostiteľské faktory. Jedným z faktorov, ktoré majú rozhodujúci vplyv v regulácii latencie a reaktívácie vírusov, je chromatinizácia vírusového genómu a modifikácie histónov - epigenetická regulácia expresie vírusu (Yang et al., 2009).

Doteraz, boli základné mechanizmy epigenetickej regulácie študované prevažne na transformovaných bunkových líniiach, ktoré však neposkytujú reálny a komplexný obraz všetkých interakcií vírus-hostiteľ. Okrem toho, pre štúdium latencie a reaktívácie nie je v súčasnosti dostupná vhodná bunková línia. Doteraz je používaná len nádorová bunková línia S11E, ktorá však vykazuje vysokú frekvenciu spontánnej reaktívácie MHV-68 (Usherwood et al., 1996; Yang et al., 2009). Relatívne nová bunková línia, nazvaná NB-78, derivovaná z cervikálneho lymfómu myši infikovanej s MHV-78 (Mistríková et al., 2006), síce neprodukuje infekčný vírus, ale latentne infikovaných je iba 1-2% jej buniek.

Pre detailné štúdium mechanizmov epigenetickej regulácie latencie a reaktívácie myšieho gamaherpesvírusu (MHV) v kontexte vplyvu imunitného systému na tieto udalosti je nevyhnutné navodiť latenciu u myši. Plánujeme použiť tri kmene MHV, MHV-68 – referenčný kmeň, MHV-72 a MHV-4556, ktoré sa od seba odlišujú mierou navodenia latencie a schopnosťou reaktívácie (ako bolo spomenuté vyššie). Predpokladáme, a predbežné *in vitro* testy nám to potvrdili, že rozdiely medzi týmito MHV kmeňmi v schopnosti navodiť latenciu a reaktíváciu sú spôsobené tkanivovo špecifickou epigenetickou reguláciou vírusového genómu. Okrem toho, miera reaktívácie a s ňou asociované interakcie vírusu s imunitným systémom, konkrétne s interferónmi a nimi aktivovanými signálnymi dráhami, sú kmeňovo špecifické (Benkóczka et al., 2014).

V posledných piatich rokoch sa štúdiu epigenetickej regulácie expresie venuje veľká pozornosť. V odbornej literatúre je možné nájsť stovky citácií na podobnú tému. Jedinečnosť našich experimentov spočíva v tom, že máme k dispozícii dva unikátne kmene myšieho gamaherpesvírusu, MHV-72 a MHV-4556, ktoré, ako vyplynulo z našich doterajších štúdií, sa od prototypového kmeňa MHV-68 odlišujú v mnohých interakciách vírus-hostiteľ. Výsledky štúdií realizovaných v rámci projektu preto môžu napomôcť odhaleniu nových smerov v liečbe herpesvírusovej reaktívácie alebo eliminácii nádorov asociovaných s herpetickou chronickou infekciou.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Myš laboratórna Balb/c, inbred, samice 500 ks

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

Plánované experimenty: navodenie latentnej infekcie a indukcia reaktívácie vírusov *in vivo* zaradíme do kategórie krutosti postupov „slabé“, keďže myši budú infikované takou dávkou vírusu, ktorá im nespôsobí žiadne závažné zdravotné komplikácie a všetky aplikácie (intranazálna infekcia a subkutánne aplikovanie TSA) budú robené v anestéze, pričom podaná „látka“, TSA, by nemala výrazne ovplyvňovať zdravotný stav zvierat.

Ani v jednom štádiu pokusu nebudú mať zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prístup potravy a vody. Zvieratá budú umiestnené v klietkach (max. 5 ks v jednej klietke) s vlastnou ventiláciou a označované budú skupinovými záznamovými kartami. Na konci experimentov budú zvieratá humánne usmrtené.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov, postupy ktoré budeme vykonávať na zvieratách v plánovaných pokusoch zaradujeme do kategórie „slabé“.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Odozva organizmu na latentnú infekciu Myším gamaherpesvírusom (MHV), najmä ak sa sleduje reakcia organizmu na reaktiváciu vírusu, je komplexný proces, na ktorom sa podieľa veľa hostiteľských faktorov a práve preto sa v tomto prípade nedá „*in vivo*“ nahradiť bunkovými kultúrami. To dokazuje aj fakt, že hoci existujú dve latentne infikované bunkové línie, S11 a NB-78, tie, vzhľadom na svoje vlastnosti a ako už bolo potvrdené v odbornej literatúre, nie sú univerzálne vhodným modelom pre štúdium latencie a reaktivácie MHV. Okrem toho štúdium latencie a reaktivácie na bunkových kultúrach nezohľadňuje významný činiteľ ovplyvňujúci tieto procesy, a to je imunitný systém hostiteľa.

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; ecvbm.jrc.ec.europa.eu/-2k; http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/conf_2006.htm; <http://tsar.jrc.ec.europa.eu/>; http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/publication/epaa_workshop_wg3.pdf;

analýza patogenézy latentnej infekcie spôsobenej myším gamaherpesvírusom **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 č.436/2012 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 R (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 bolesti, utrpenie, strach alebo trvalé poškodenie zvierat.

2. Redukcia počtu zvierat:

Pre štatistickú reprodukovateľnosť výsledkov a na základe našich dlhoročných skúseností je potrebné, aby každá vyšetrovaná skupina obsahovala minimálne 4, ideálne 5 ks myší. Plánovaný počet zvierat (500 ks) je konečný a zahŕňa všetky variácie postupov a ich opakovania (ak budú potrebné). Opakovania postupov obmedzíme na nevyhnutné minimum a budú sa vykonávať len v prípade potreby overenia sporných výsledkov. Samozrejme, našou

snahou je použiť čo najmenší možný počet pokusných zvierat a preto je možné, že naplánovaný maximálny počet zvierat nebude potrebné naplniť.

Základný (minimálny) dizajn postupov: Budeme mať štyri základné skupiny myši: myši infikované prototypovým kmeňom MHV-68, myši infikované MHV-72, myši infikované MHV-4556 a skupinu kontrolných, neinfikovaných myši. Každá z týchto skupín bude ďalej rozdelená na dve podskupiny – myši, ktorým bude aplikovaný induktor reaktívácie TSA a myši, ktorým TSA podávané nebude. Tieto podskupiny budú ďalej rozdelené do menších skupín, presný počet ktorých budeme vedieť po dokončení práve prebiehajúcich *in vitro* testov, minimálne však 3 skupiny.

3. Zjemnenie:

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

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov, postupy ktoré budeme vykonávať na zvieratách v plánovaných pokusoch zaradíme do kategórie „slabé“:

Myši budú infikované intranazálne v ľahkej inhalačnej anestéze a takou dávkou vírusu, ktorá im nespôsobí žiadne závažné zdravotné komplikácie. Jediné invazívne zákroky, ktoré zvieratá podstúpia sú intraperitoneálne podanie anestézy a následné subkutánne podanie TSA, pričom podaná „látka“ by nemala žiadnym spôsobom ovplyvňovať zdravotný stav zvierat.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

*Žiadateľ predložil projekt na spätné posúdenie
do 27. 10. 2018*

Netechnické zhrnutie projektu 3504/14-221

Skúška účinnosti Immodinu.

Cieľ projektu pokusu, predpokladaná ujma a prínosy:

Správne fungovanie jednotlivých zložiek imunitného systému u ľudí je predpokladom väčšej odolnosti voči onkologickým, infekčným, alergickým a ďalším ochoreniam, ktorých počet narastá. Imunitný systém je tvorený bunkovou zložkou a veľkým počtom bunkami produkovaných mediátorov, ktoré regulujú imunitné reakcie pri každom zo spomínaných skupín ochorení špecificky. Pri poškodení niektorej zložky je narušená celková homeostáza imunitného systému, pričom táto imunologická supresia môže viesť k vzniku vážnych ochorení. Podávanie vhodného imunomodulačného prípravku môže preto významne pozitívne ovplyvniť celkový výsledok liečby pacientov u ktorých je zistená znížená funkcia imunitného systému. Jedným z takýchto prípravkov je Immodin, vyrábaný firmou SevaPharma, CZ. Immodin je dialyzovaný homogenát leukocytov (DHL) periférnej krvi zdravých jedincov, ktorý obsahuje nízkomolekulové látky s veľkosťou do 10kDa.

Azathioprin je chemická látka (purínový analóg) používaná na antigénovo-nešpecifickú imunosupresiu u ľudí a to hlavne pri ochoreniach ako sú autoimúnne ochorenia a transplantácie orgánov. Jeho mechanizmus účinku na všetky proliferujúce bunky, teda aj imunitné bunky, (napr. T a B lymfocyty) je inhibícia enzýmu, ktorý je potrebný pre syntézu DNA.

Cieľom projektu je stanoviť rozsah imunostimulačného účinku Immodinu u myší po supresii vyvolanej látkou Azathioprin. Účinok sa bude sledovať pomocou zmien v počte a zastúpení lymfocytov, monocytov a granulocytov krvi pomocou prietokovej cytometrie. Špecifickým cieľom bude zistiť stimulačný účinok Immodinu na proliferáciu T a B lymfocytov a na zastúpenie sub-populácií T lymfocytov (CD4+ a CD8+). Zmeny v zastúpení lymfocytov, monocytov a granulocytov sa budú vyhodnocovať aj pomocou svetelnej mikroskopie na bunkových náteroch.

Počas experimentu a počas podávania látok sa zabezpečí jemné zaobchádzanie a manipulácia so zvieratami. Neočakáva sa riziko dlhodobej bolesti ani utrpenia. Zvieratá budú mať štandardné umiestnenie, potrava a starostlivosť. V súvislosti s odberom vzoriek nezrazenej krvi z veľkých ciev pečene a srdca je nevyhnutné rýchle usmrtenie zvierat, ktoré bude vykonané cervikálnou dislokáciou bez anestézy. Tento spôsob je navrhnutý kvôli tomu, že počas doby zahrňujúcej anestézu, následné usmrtenie a pitvu zvierat'a by mohlo dôjsť k

postupnému zrážaniu krvi. Podmienkou postupu farbenia povrchových CD markerov buniek krvi pre meranie prietokovou cytometriou je nezrazená heparinizovaná krv, v ktorej sa erytrocyty lyzujú špeciálnym činidlom po farbení.

Počet a druh pokusných zvierat

Samce myší (*Mus musculus*) kmeňa Balb/c, 18ks zvierat pre testovanie účinnosti každej vyrobenej šarže Immodinu.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Stanovený počet zvierat predstavuje limit, ktorý je nevyhnutný pre získanie dostatočného počtu vzoriek pre validné štatistické vyhodnotenie výsledkov o zmenách v zastúpení sledovaných bunkových populácii v krvi myší. V projekte sa nahrádza pôvodná rozetová metóda a pokusné zvieratá - morčatá za modernejšiu imunologickú metódu - prietokovú cytometriu, pomocou ktorej sa získa oveľa presnejší a komplexnejší obraz o imunomodulačnom účinku prípravku Immodin pri zvolenom modelovom imunosupresívnom ochorení. Tento prípravok je určený pre pacientov s rôznymi druhmi imunodeficientných ochorení, u ktorých sa očakáva imunorešauračný účinok a normalizácia imunitnej odpovede. Pri overení komplexného účinku prípravku je nutná cirkulácia (lymfatická, krvná) a interakcie s mnohými zložkami imunity, čo sa nedá simulovať v podmienkach *in vitro*. Z tohto dôvodu nie je možné nahradiť pokus na zvieratách *in vitro* testami na bunkových líniiach. So zvieratami budú zaobchádzať zaškolené osoby s dlhoročnými praktickými skúsenosťami.

Spätné posúdenie - nie

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu - 3514/14-221

Názov projektu:

Vývoj diadickej vápnikovej signalizácie v priebehu postnatálneho vývoja ventrikulárnych myocytov.

Kľúčové slová v projekte:

Myokard, ontogenéza, vápniková signalizácia, väzba excitácie s kontrakciou, konfokálna mikroskopia, elektrofyziológia.

1. Účel projektu:

Objasniť mechanizmus vývoja vápnikovej signalizácie počas väzby excitácie s kontrakciou v srdcových myocytoch.

2. Ciele projektu:

Srdcový sval novonarodených jedincov sa rozvíja v súlade s rozvojom pohybovej aktivity. V kardiomyocytoch dochádza k nárastu objemu kontraktilných myofibríl, vnútorného membránového systému a mitochondrií. Cirkulácia vápnika v priebehu kontrakčno - relaxačného cyklu sa postupne internalizuje a vyvíja sa diadický systém zabezpečujúci väzbu excitácie s kontrakciou prostredníctvom vápnikovej signalizácie. Cieľom projektu je detailne charakterizovať vývoj uvoľňovania vápnika a vývoj ultraštruktúry diád počas postnatálneho vývoja myokardu potkana. Originálne údaje o vývoji vápnikovej signalizácie získame na izolovaných kardiomyocytoch pomocou laserovej skenovacej konfokálnej mikroskopie v súčinnosti s metódou patch-clamp a budeme ich korelovať s údajmi o vývoji ultraštruktúry diád získanými pomocou elektrónovej mikroskopie.

3. Prínos z vykonaného projektu:

Prínosom bude základné poznanie v oblasti vývoja štruktúry a funkcie diád, ktoré umožní lepšie porozumieť špecifikám funkcie vyvíjajúceho sa myokardu novorodencov a farmakoterapie detí. Výsledky budú publikované v medzinárodných recenzovaných vedeckých časopisoch. Pri riešení projektu budú vychovávaní 2 doktorandi a viacerí študenti 1. a 2. stupňa VŠ.

4. Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Plánovaný počet gravidných samic laboratórneho potkana, kmeň WISTAR, na celé obdobie riešenia projektu je 25 ks (1 samica/8-10 novorodencov), počet samcov potkana laboratórneho, kmeň WISTAR, vo veku 4 týždne – 6 mesiacov (hmotnosť: 50 - 300g) je plánovaný 90 ks na celé obdobie trvania projektu. Bude použitý minimálny počet zvierat potrebný na dosiahnutie štatisticky významných výsledkov.

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

V rámci vykonávania projektu nepredpokladáme nepriaznivý vplyv na experimentálne zvieratá.

6. Predpokladaná úroveň krutosti:

Podľa prílohy č.4 nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 377/2012 Z.z. klasifikujeme krutosť plánovaných experimentov na úrovni „bez možnosti zotavenia“.

7. Uplatňovanie zásad 3R

požiadavka nahradenia

Elektrofyzilogické experimenty na akútne izolovaných kardiomyocytoch sú jediným experimentálnym postupom, ktorým je možné získať údaje o elektrických vlastnostiach membrán a funkčnosti diád kardiomyocytov. Srdcové myocyty predstavujú jemný a zložitý systém, ktorý mimo organizmu rýchlo podlieha degradácii. Pokusy o ich izoláciu zo srdcového svalu hospodárskych zvierat získavaného z bitútku boli neúspešné a z technických dôvodov pravdepodobne ani nebudú vyriešené.

požiadavka obmedzenia

Projekt bol optimalizovaný z hľadiska minimalizácie počtu použitých zvierat, pričom bude použitý minimálny počet zvierat potrebný na dosiahnutie štatisticky významných výsledkov, u ktorých je možná jednoznačná interpretácia, s prihliadnutím na úspešnosť izolácie myocytov a úspešnosť získavania dát kombinovanými elektrofyziologickými a mikroskopickými metodikami.

požiadavka zjemnenia

Ako zdroj srdcových myocytov sme zvolili menších cicavcov – laboratórne potkany, ktorých hrudný kôš sa dá rýchlo otvoriť čo umožňuje rýchlu excíziu srdca a zníženie rizika degradácie srdcových buniek.

Na minimalizáciu bolesti zvierat pri aplikácii anestetika používame tenké, sterilné ihly s rozmermi 0,4x 20mm (priemer x dĺžka). Excízia srdca sa vykonáva až po navodení celkovej hlbkej anestézie ktorá je kontrolovaná testovaním utlmenia sluchového a očného reflexu.

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

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

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu -3528/14-221

Názov projektu:

Vplyv chronického podávania sulodexidu na parametre oxidatívnej fosforylácie u potkanov, hodnotenie jeho účinku na endotelovú dysfunkciu a jeho pleiotropných účinkov

Kľúčové slová v projekte:

endotel, streptozotocin, sulodexid, myograf

Účel projektu:

základný výskum

Ciele projektu:

Cieľom predloženého projektu je zistiť na streptozotocínom vyvolanom modeli diabetes mellitus u potkanov možné zmeny reaktivity cievnych preparátov a zmeny parametrov oxidatívnej fosforylácie a ďalších ukazovateľov a ich očakávané ovplyvnenie liečbou sulodexidom, pomocou ktorých plánujeme hodnotiť predpokladané priaznivé účinky takejto liečby. Na tento účel využijeme nasledujúcu zostavu meraní:

Hodnotenie reaktivity ciev:

- kontrakčné odpovede *a. femoralis* na noradrenalín
- relaxačné odpovede na acetylcholín
- kontraktilita preparátov *a. renalis* meraná perfúznou metódou

Hodnotenie metabolických parametrov:

- parametre oxidatívnej fosforylácie v mitochondriách
- hodnoty cholesterolémie a triacylglycerolémie
- hodnoty koenzýmu Q

Prínos z vykonaného projektu:

Predpokladané pozitívne potvrdenie našich hypotéz by znamenalo prínos pre základný biologický výskum a rozšírenie exaktných poznatkov o poznanie nových mechanizmov vplyvu sulodexidu na vaskulárny systém. To časom môže vyústiť aj do zdokonalenia postupov klinickej medicíny, konkrétne do budúceho rozšírenia a spresnenia indikácií pre terapeutické využitie sulodexidu.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Rattus norvegicus (potkan laboratórny)
Wistar, samce, 50 jedincov

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

Zvieratá budú podrobené iba nevyhnutným a veľmi krátkodobým nepriaznivým vnemom. Zvieratá budú počas experimentu znášať len mierny dyskomfort, a nebudú podstupovať žiadne kruté zaobchádzanie. Všetky invazívne postupy na zvieratách budú prebiehať s najvyššou ohľaduplnosťou a pri dôslednom zmiernovaní bolestivých vnemov. Počas života budú mať zvieratá prístup k vode a štandardnej strave v peletách *ad libitum*, prostredie budú mať obohatené o predmety na hranie a ohryzovanie, pre dosiahnutie čo najuspokojivejšieho welfare zvierat.

Predpokladaná úroveň krutosti

Na usmrtenie zvierat použijeme celkové anestetikum tiopental (50 mg/kg), v súlade s Nariadením, § 13, ods. 1. Invazívne postupy vykonávané na živých zvieratách budú prebiehať ohľaduplne a šetrne, za účelom minimalizovania utrpenia experimentálnych zvierat.

Krutosť postupu podľa prílohy č. 4 Nariadenia:

Všetky invazívne aj neinvazívne úkony spadajú do kategórie „slabé“, t.j. „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 nenarúšajú pohodu ani celkový stav zvierat“. Medzi ne patrí váženie, odoberanie krvi z chvostovej žily, aplikácia streptozotocínu na vyvolanie diabetu intravenózne a aplikácie sulodexidu, respektíve placebo intraperitoneálne. Pri aplikácii látok budú použité tenké atraumatické ihly na zmiernenie dyskomfortu zvierat.

Invazívne postupy, spadajúce do kategórie „bez možnosti zotavenia“ budú vykonávané výlučne v celkovej anestézii, po ktorej zviera nenadobudne vedomie. Medzi ne patrí odobratie ciev a ďalších tkanív a orgánov.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahraditeľnosť (replacement) zvierat

Predpokladáme značné interindividuálne variácie v reaktivite preparátov ciev, parametroch oxidatívnej fosforylácie a glykémie najmä v skupinách diabetických zvierat, napriek tomu sa pridržame minimálneho počtu zvierat v skupinách nutného na zostavenie štatisticky relevantných súborov. Na skúmanie zložitých vzťahov zasahujúcich do regulácií metabolických parametrov v podmienkach diabetu a vývoja rôznych typov diabetických angiopatií je nevyhnutné využiť model, v ktorom sa tieto regulácie uplatňujú *in vivo*, podobne ako u človeka. Systém regulácií tohto typu je nemožné simulovať akýmkoľvek typom bunkových kultúr, preto je nevyhnutné využitie živých pokusných zvierat. Toto tvrdenie dokladáme nasledujúcim zoznamom odkazov na **hľadanie alternatívnych metód** k predkladanému projektu experimentu:

1. Altweb: Alternatives to Animal Testing

výsledky: 9 odkazov nepoužiteľných pre našu problematiku
(<http://altweb.jhsph.edu/>)

2. ALTBIB – Bibliography on Alternatives to Animal Testing

výsledky: žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku (<http://toxnet.nlm.nih.gov/altbib.html>)

3. CFHS: Alternatives to Animal Testing

výsledky: žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku
(http://cfhs.ca/research/alternatives_to_animal_testing/)

4. New Technologies as Alternatives to Animal Testing

výsledky: 3 odkazy nepoužiteľné pre našu problematiku
(<http://www.aboutanimaltesting.co.uk/search.html>)

5. Alternatives to Animal Testing / Britannica Blog

výsledky: žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku
(<http://www.britannica.com/blogs/2007/12/scientific-alternatives-to-animal-testing/>)

6. EUSAAT – European Society for Alternatives to Animal Testing

výsledky: žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku
(<http://www.eusaat.org/>)

7. ECVAM

Výsledky: 6 odkazov nepoužiteľných pre našu problematiku
(<http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/search>)

2. Zjemnenie (refinement) pokusu:

Stres prežívaný potkanmi v priebehu pokusu sa minimalizuje šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia predmetmi na hru a ohryzovanie s plným využitím dostupných zjemňovacích techník. Stres prežívaný v deň pokusu počas vyvolania celkovej anestézie sa obmedzí na nevyhnutné minimum používaním striekačiek s tenkými atraumatickými ihlami a ohľaduplným zaobchádzaním. Záverečné usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v hlbokkej celkovej anestézii.

3. Znižovanie počtu (reduction) zvierat:

V experimente bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat v jednotlivých skupinách, ktorý ešte umožňuje korektné štatistické vyhodnotenie použitím ANOVA testu a Studentovho t-testu pre fyziologické analýzy. Plánovaný počet je navrhnutý pre zabezpečenie reprodukovateľnosti a validity pokusu pri zachovaní minimálneho počtu zvierat.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu 3530/14-221

Názov projektu:

Vplyv chronického podávania hesperidínu na cievnu reaktivitu, krvný tlak, oxidačné parametre, hladiny NO syntázy a oxidačné parametre normotenzných a hypertenzných potkanov

Kľúčové slová v projekte:

endothel, spontánne hypertenzné potkany (SHR), hesperidín, draslíkový kanál

Účel projektu:

základný výskum

Ciele projektu:

Cieľom predloženého projektu je zistiť možnosti farmakologického, prípadne dietologického ovplyvnenia hypertenzie a endotelovej dysfunkcie hesperidínom. Hesperidín je flavonónový glykozid, vyskytujúci sa prevažne v citrusoch, u ktorého boli na krátkodobých, ale aj dlhodobých modeloch dokázané viaceré priaznivé účinky na cievy, ktoré pripomínajú časť už popísaných pleiotropných účinkov vyvolaných lepšie preskúmanými farmakami.

Preto plánujeme na experimentálnom modeli hypertenzie u potkanov (SHR) overiť vplyv chronického podávania hesperidínu na:

- tlak krvi
- cievnu reaktivitu závislú aj nezávislú od endotelu
- ovplyvnenie draslíkových kanálov, vápnikových kanálov, cyklooxygenázy
- hladiny TBARS, aktivity NO-syntázy

Prínos z vykonaného projektu:

Predpokladané pozitívne potvrdenie našich hypotéz by znamenalo rozšírenie poznatkov základného biologického výskumu o nové detaily molekulárnych účinkov, ktorými hesperidín môže vplývať na vaskulárny systém. Hesperidín obsahujú v mnohé potraviny a polykomponentné lieky, preto by nové poznatky o mechanizmoch účinku mohli viesť k budúcemu benefitu aj pre klinickú medicínu.

Hlavný prínos plánovanej štúdie spočíva v očakávanom obohatení poznatkov o molekulárnych mechanizmoch porúch cievnej steny, ktoré vedú k dysregulácii tlaku krvi a jeho patologickom nastavení na hypertenzné hodnoty a vplyvu hesperidínu na tieto

patologické procesy. Prípadné priaznivé ovplyvnenie týchto mechanizmov môže viesť k zmierneniu a spomaleniu, prípadne zastaveniu vývoja hypertenzie a s ňou spojených komplikácií (endotelová dysfunkcia, ateroskleróza) a asociovaných ochorení a syndrémov (ischemická choroba srdca, infarkt myokardu, zlyhanie srdca, náhle cievne mozgové príhody). Molekulové mechanizmy pôsobenia flavonoidov sú doteraz prebádané len sčasti, preto náš experiment môže prispieť k rozšíreniu poznatkov v tejto téme výskumu.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Rattus norvegicus (potkan laboratórny)

linie Wistar (20 zvierat) a SHR (30 zvierat), samce, spolu 50 zvierat

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

Zvieratá budú podrobené iba nevyhnutným a veľmi krátkodobým nepriaznivým vnemom. Zvieratá budú počas experimentu znášať len mierny dyskomfort, a nebudú podstupovať žiadne kruté zaobchádzanie. Všetky invazívne postupy na zvieratách budú prebiehať s najvyššou ohľaduplnosťou a pri dôslednom zmiernovaní bolestivých vnemov.

Počas života budú mať zvieratá prístup k vode a štandardnej strave v peletách *ad libitum*, prostredie budú mať obohatené o predmety na hranie a ohryzovanie, pre dosiahnutie čo najuspokojivejšieho welfare zvierat.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Na usmrtenie zvierat použijeme celkové anestetikum tiopental (50 mg/kg), v súlade s Nariadením, § 13, ods. 1. Invazívne postupy vykonávané na živých zvieratách budú prebiehať ohľaduplne a šetrne, za účelom minimalizovania utrpenia experimentálnych zvierat.

Krutosť postupu podľa prílohy č. 4 Nariadenia:

Všetky invazívne aj neinvazívne úkony spadajú do kategórie „slabé“, t.j. „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 nenarúšajú pohodu ani celkový stav zvierat“. Medzi ne patrí váženie, meranie tlaku krvi metódou „tail cuff“ a intraperitoneálne aplikácie hesperidínu, respektíve placebo. Pri aplikácii látok budú použité injekcie s tenkými atraumatickými ihlami na zmiernenie dyskomfortu zvierat.

Invazívne postupy, spadajúce do kategórie „bez možnosti zotavenia“ budú vykonávané výlučne v celkovej anestézii, po ktorej zviera nenadobudne vedomie. Medzi ne patrí odobratie ciev a ďalších tkanív a orgánov.

Výkony a manipulácie na živých zvieratách počas pokusu a príslušný stupeň klasifikácie krutosti postupov podľa prílohy č.4 Nariadenia:

Invazívne výkony: injekčná intraperitoneálna aplikácia hesperidínu, resp. fyziologického roztoku – stupeň „slabý“

Neinvazívne výkony: váženie zvierat – stupeň „slabý“
meranie tlaku krvi na chvoste metódou „tail cuff“ – stupeň „slabý“

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahraditeľnosť (replacement) zvierat

Predpokladáme značné interindividuálne variácie v hodnotách tlaku krvi a kontrakčných odpovediach ciev najmä v skupinách spontánne hypertenzných zvierat, napriek tomu sa pridržame minimálneho počtu zvierat v skupinách nutného na zostavenie štatisticky relevantných súborov. Na skúmanie zložitých vzťahov zasahujúcich do regulácií tlaku krvi je nevyhnutné využiť model, v ktorom sa tieto regulácie uplatňujú *in vivo*, podobne ako u človeka. Systém regulácií tohto typu je nemožné simulovať akýmkoľvek typom bunkových kultúr, preto je nevyhnutné využitie živých pokusných zvierat. Toto tvrdenie dokladáme nasledujúcim zoznamom odkazov na hľadanie alternatívnych metód k predkladanému projektu experimentu:

1. Altweb: Alternatives to Animal Testing

výsledky: 8 odkazov nepoužiteľných pre našu problematiku
(<http://altweb.jhsph.edu/>)

2. ALTBIB – Bibliography on Alternatives to Animal Testing

výsledky: 3 odkazy nepoužiteľné pre našu problematiku
(<http://toxnet.nlm.nih.gov/>)

3. Alternatives to Animal Testing / Britannica Blog

výsledky: 5 odkazov nepoužiteľných pre našu problematiku
(<http://www.britannica.com/blogs/2007/12/scientific-alternatives-to-animal-testing/>)

4. Alternatives to Animal Testing: Or, Alternatives to the Use of Animals in Research

výsledky: žiaden odkaz použiteľný pre našu problematiku
(<http://www.geari.org/alternatives-to-animal-testing.htm>)

5. EUSAAT – European Society for Alternatives to Animal Testing

výsledky: žiaden odkaz použiteľný pre našu problematiku
(<http://www.eusaat.org/>)

6. CFHS: Alternatives to Animal Testing

výsledky: žiaden odkaz použiteľný pre našu problematiku
(http://cfhs.ca/research/alternatives_to_animal_testing/)

7. New Technologies as Alternatives to Animal Testing

výsledky: 3 odkazy nepoužiteľné pre našu problematiku
(<http://www.aboutanimaltesting.co.uk/search.htm>)

2. Zjemnenie (refinement) pokusu:

Stres prežívaný potkanmi v priebehu pokusu sa minimalizuje šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia predmetmi na hru a ohryzovanie s plným využitím dostupných zjemňovacích techník. Stres prežívaný v deň pokusu počas vyvolania celkovej anestézie sa obmedzí na nevyhnutné minimum používaním striekačiek s tenkými atraumatickými ihlami a ohľaduplným zaobchádzaním. Záverečné usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v hlbkej celkovej anestézii.

3. Znižovanie počtu (reduction) zvierat:

V experimente bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat v jednotlivých skupinách, ktorý ešte umožňuje korektné štatistické vyhodnotenie použitím testu ANOVA a Studentovho t-testu pre fyziologické analýzy. Plánovaný počet je navrhnutý pre zabezpečenie reprodukovateľnosti a validity pokusu pri zachovaní minimálneho počtu zvierat.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie