

Príloha 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: *Emócie, kognitívne procesy a welfare hydiny*

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3602/14-22A

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): hydina, emócie, kognitívne schopnosti, welfare

Účel projektu:

a) základný výskum,

b) aplikovaný výskum s cieľom

1. zabránenia, prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka, zvierat alebo rastlín alebo ich účinkov na ľudí, zvieratá alebo rastliny,

2. stanovovania, odhaľovania, usmerňovania alebo úpravy posúdenia, zistenia, regulácie alebo zmeny fyziologického stavu alebo fyziologických procesov ľudí, zvierat alebo rastlín,

3. dobrych životných podmienok zvierat a zlepšenia podmienok produkcie zvierat chovaných na poľnohospodárske účely,

Opísať ciele projektu:

Cieľom projektu je prehĺbenie poznania o emóciách a ich vzťahu ku kognitívnym procesom u hydiny, ako aj metód merania a monitorovania správania, resp. metód hodnotenia na zvieratách založených parametrov welfaru u hydiny.

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

Výsledky projektu budú prínosom pre poznanie, pre pochopenie evolúcie emócií u človeka a zvierat. Prínosom bude overenie použiteľnosti metód hodnotenia emócií na základe kognitívnych procesov a ich skreslenia vplyvom afektívnych stavov. Prínosom bude vývoj nových technológií merania správania a perspektívne monitorovania welfaru u hydiny (využitie zachytávania pohybu – motion capture, hĺbkových senzorov, termálnych kamier a pod.), t.j. v konečnom dôsledku možné zlepšenie životných podmienok zvierat.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

prepelica japonská (90 ks), kura domáca znáškového typu (180 ks)

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

Prevažná časť pokusov bude spočívať v testovaní správania, v testoch učenia. Manipulácia so zvieratami môže na ne pôsobiť do určitej miery ako stres, ale pravidelný handling a samotné testovanie, na druhej strane, môže pôsobiť ako (kognitívne) obohatenie prostredia.

Časti zvierat budú podávané farmaká (špecifické antagonisty a agonisty receptorov monoamínových neurotransmiterov – serotonín, dopamín, noradrenalín, resp. endogénnych opiátov), pre zistenie mechanizmov v pozadí procesov súvisiacich s kogníciou a emóciami, s učením, s rozhodovacími procesmi, so systémom odmeňovania v mozgu. Dávkovanie jednotlivých látok bude vychádzať z publikovaných prác. Našou snahou bude používať dávky, ktoré neovplyvňujú celkové správanie (t.j. nemajú sedatívne účinky, nespôsobujú nevoľnosť a pod.).

Malý počet zvierat bude usmrtený, na stanovenie niektorých neurochemických parametrov v mozgovom tkanive súvisiacich so sledovaným správaním (stanovenie distribúcie a hustoty receptorov, imunohistochemické stanovenie rôznych markerov atď).

Predpokladaná úroveň krutosti:

Sledovanie správania, absolvovanie tréningov učenia resp. navodenie rôznych emočných stavov prostredníctvom vizuálnych, zvukových resp. taktilných podnetov, ktorému bude vystavená väčšina zvierat v pokuse zodpovedá úrovni krutosti postupov „slabé“. Podobne systémové podávanie zmienených farmák (agonisty a antagonisty monoamínov resp. opiátov) môžeme klasifikovať ako „slabé“ postupy. Postupy týkajúce sa zvierat, u ktorých budeme sledovať *post mortem* na rezoch mozgového tkaniva neurobiologické parametre sú z hľadiska krutosti postupov klasifikované ako postupy „bez možnosti zotavenia“.

Uplatňovanie zásad 3R

Pre tento typ pokusu neexistuje alternatívna metóda. Uvedený počet zvierat je maximálny, a dá sa predpokladať, že reálne množstvo použitých zvierat bude nižšie.

Späťne posúdenie - nie

Príloha 2 :

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

Názov projektu: RIZIKOVÉ FAKTORY KARDIOVASKULÁRNYCH A CEREBROVASKULÁRNYCH OCHORENÍ A FARMAKOLOGICKÉ MOŽNOSTI ICH OVPLYVNENIA

Číslo konania rozhodnutia o schválení postupu: 3635/14-221
Evidenčné číslo postupu: VEGA 2/0054/15

Kľúčové slová: dyslipidémia, cholesterol, mozog, srdce, cievy, potkan

a) Ciele projektu

Postup je zameraný na štúdium mechanizmov etiopatogenézy metabolického syndrómu (MS) a metabolického kognitívneho syndrómu (MCS) s cieľom navrhnúť novú účinnú liečbu, ktorá ovplyvní vznik a vývoj rizikových faktorov kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych ochorení. Postupy budú vykonávané na genetickom modeli potkanov s hereditárnou hypertriglyceridémiou, kŕmených hyperlipidemickou diétou. Metabolické poruchy sa v klinickom obraze týchto potkanov prejavia hypertenziou, hypercholesterolémiou, hyperglykémiou, hypertriglyceridémiou, zápalovými reakciami a zvýšením hladín markerov oxidačného stresu. Po opakovanom podávaní pyridoinolu SMe1EC2, flavonoidu rutínu alebo štandardu atorvastatínu potkanom sa zistí účinok na rizikové faktory MS a MCS, lipidický profil, markery poškodenia na bunkovej a molekulárnej úrovni, stanovia sa funkčné, behaviorálne a histopatologické zmeny. Počas postupu sa bude so zvieratami zaobchádzať šertne v súlade so zásadami **3R** s minimálnou **ujmou** pri perorálnej aplikácii testovaných látok, odbere krvi a podaní anestézy na konci postupu (stupeň krutosti **stredný**). Predpokladaným očakávaným **prínosom** bude originálny poznatok, že jedna testovaná látka ovplyvní súčasne viaceré rizikové faktory kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych ochorení, v dôsledku čoho by sa mohlo u pacienta s MS a MCS znížiť množstvo prijímaných liekov pre jednotlivé patológie ako hypertenzia, vysoká hladina cholesterolu v krvi atď..

b) Súlad s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia (3R)

Nahradenie (replacement)

V súčasnej dobe neexistuje validovaná vedecky akceptovateľná alternatívna metóda na štúdium dyslipidémie, ktorá by nahradila klasický *in vivo* prístup na zvieratách. Potkan laboratórny je systematicky najnižšie postavený druh vhodný na takéto pokusy. Čiastočné nahradenie experimentov je možné pomocou využitia *in vitro* bunkových kultúr myších mikroglií, ktoré budú súčasťou projektu, avšak zhodnotenie funkčných porúch srdca, ciev a mozgu v dôsledku dyslipidémie nie je možné dosiahnuť bez použitia zvierat.

Obmedzenie (reduction)

Na dosiahnutie cieľov projektu sa plánuje použiť najnižší možný počet zvierat. Z dôvodu validity získaných výsledkov je potrebné v experimentoch použiť v jednotlivých skupinách 10 ks zvierat. Počas plánovaného obdobia sa za 4 roky predpokladá použitie 730 ks zvierat, z toho 350 ks kmeňa Wistar a 380 ks dedične hypertriglyceridemických potkanov. Výsledky jednotlivých častí štúdie budú priebežne vyhodnocované a v prípade zistenia nevhodných neočakávaných udalostí bude experiment ukončený.

Zjemnenie (refinement)

Starostlivosti o zvieratá ako i manipulácii s nimi sa bude venovať veľká pozornosť. Zvieratá budú ošetrované skúsenými pracovníkmi a budú pod neustálym dohľadom pracovníkov zodpovedných za projekt. Postupy používané pri aplikáciách a odberoch majú nízku úroveň z hľadiska spôsobenej bolesti a stresu a budú vykonávané skúseným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Vysokocholesterolová diéta počas 4 alebo 8 týždňov je pre potkany chuťovo prijateľná a nespôsobí výrazné klinické abnormality. Testované látky sú netoxické.

Nevyžaduje sa opätovné posúdenie projektu.

Názov projektu: „Sledovanie účinku včelej materskej kašičky a prípravku s obsahom včelieho defenzínu-1 na hojenie excíznych rán“

Kľúčové slová: včelia materská kašička, defenzín 1, hojenie excíznych rán

Účel projektu: základný výskum, translačný a aplikovaný výskum s cieľom liečby chorôb, vývoj a testovanie kvality a účinnosti liečiv

Ciele projektu:

Akútne i chronické rany predstavujú v klinickej praxi závažný problém. Tkanivo nehojacej sa rany, alebo dlhodobo sa hojacej rany je ideálnym prostredím na množenie mikroorganizmov, predlžovanie fázy zápalu hojenia rany a ďalšie procesy, ktoré oddiaľujú uzavretie rany a jej vyplnenie novým tkanivom, čo spôsobuje mnohokrát závažné zmeny v postihnutých tkanivách, mnohokrát ťažké postihnutie pacienta, stratu tkaniva ktorá je často spojená aj so stratou funkcie orgánu. Z týchto dôvodov je často vhodné proces hojenia rany čo najviac urýchliť, skrátiť dobu, po ktorú je rana otvorená a podporiť proces vyplnenia rany a reepitelizácie.

Včelí med a materská kašička ako prírodné produkty včely sú používané nielen ako výživové doplnky ale aj antimikrobiálne produkty, ktoré opäť získavajú popularitu a majú svoje uplatnenie pri procese hojenia chronických rán ako sú vredy predkolenia, dekubity a rôzne komplikovane sa hojace operačné a iné rany. Predpokladá sa, že za antibakteriálnym účinkom medu a materskej kašičky stojí antibakteriálny peptid defenzín-1, vysoký podiel cukornej zložky, nízke pH, tvorba peroxidu vodíka, polyfenolické látky a rôzne iné fytochemické látky. Hoci defenzín-1 bol prvý krát identifikovaný vo včelej materskej kašičke už v roku 1990, jeho prítomnosť vo včelom mede sa dokázala len nedávno. Ide o peptid patriaci do skupiny defenzínov, zložený z 51 aminokyselín s molekulovou hmotnosťou 5,52 kDa. Hmyzie defenzíny vykazujú antibakteriálne účinky. Proteínové sekvencie hmyzích defenzínov vykazujú iba obmedzenú podobnosť so sekvenciami cicavčích defenzínov, ale štrukturálne motívy majú rovnaké.

Defenzíny, podobne ako aj niektoré iné skupiny antimikrobiálnych peptidov pôsobia ako chemoatraktanty na rôzne druhy buniek ako sú monocyty, T-bunky a dendritické bunky. Bolo zistené, že beta-defenzíny stimulujú génovú expresiu a produkciu zápalových cytokínov a chemokínov z keratinocytov. Taktiež pozitívne stimulujú migráciu a proliferáciu keratinocytov. Tieto výsledky naznačujú, že defenzíny okrem svojej primárnej antibakteriálnej funkcie, môžu participovať v remodelačnej fáze procesu hojenia rán, čo však nie je možné dokázať *in vitro*.

Včelia materská kašička vykazuje okrem dobre popísaných antibakteriálnych vlastností aj imunomodulačné vlastnosti. Bolo identifikovaných niekoľko látok izolovaných z materskej kašičky, ktoré vplývali na aktiváciu a moduláciu imunitných a kožných buniek. Pomocou *in vitro* modelu re-epitelizácie u bunkovej línie keratinocytov bolo dokázané, že zložky materskej kašičky zvyšuje stupeň re-epitelizácie a podporuje migráciu buniek.

Naše nedávne experimenty *in vitro* ukázali, že včelí defenzín-1 stimuluje produkciu matrix metaloproteázy 9 (MMP-9) z kožných buniek a podporuje migráciu buniek. Preto predpokladáme, že defenzín-1 je jedným z faktorov, ktoré stoja za medom, resp. materskou kašičkou indukovaným procesom hojenia rán. Pomocou navrhovaného experimentu chceme *in vivo* sledovať vplyv prírodnej látky i čistého defenzínu na proces hojenia rany v celej jeho komplexnosti, čo dosiaľ nie je možné uskutočniť žiadnou alternatívnou *in vitro* metódou ani syntézou výsledkov kombinácie viacerých metód. Údaje z preklinickej štúdie o defenzínom-

1-indukovanej stimulácii produkcie regulačných látok v komplexnom procese hojenia rán a o jeho vplyve na rýchlosť hojenia rany sú nevyhnutné pre jeho prípadné humánne klinické testovanie pri liečbe neinfekčných chronických rán.

Prínos z vykonaného projektu

Hlavným prínosom zrealizovanej štúdie bude overenie imunomodulačnej úlohy včelieho defenzínu-1 v procese hojenia rán *in vivo* a dokázať tak, že okrem antibakteriálnej aktivity, defenzín-1 je schopný regulovať produkciu cytokínov a matrixových molekúl z imunitných a kožných buniek *in vivo*. Údaje z preklinickej štúdie o defenzínom-1-indukovanej stimulácii produkcie regulačných látok v komplexnom procese hojenia rán a o jeho vplyve na rýchlosť hojenia rany sú nevyhnutné pre jeho prípadné humánne klinické testovanie pri liečbe neinfekčných chronických rán.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: potkan laboratórny, Wistar, samce, 20 ks

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

Na chrbte každého zvieraťa budú indukované 4 plnoprofilové rany, na ktoré budú aplikované testované látky vo forme gélu. S cieľom čo najväčšieho zmiernenia bolesti, indukcia rán, každodenné ošetrovanie, preväz, aplikácia testovanej látky a odber bioptického materiálu z rán prebehne v celkovom znecitlivení. Na zmiernenie pooperačnej bolesti bude ihneď po ukončení zákroku podaný tramadol i.p. Podľa potreby bude zvieratám medzi zákrokmi podávaný tramadol p.o. (pridávaný do vody). Pri prípadnom zhoršení zdravotného stavu alebo pri zistení neúčinnnej analgézie počas postupu, hlavne v prvom dni po chirurgickom výkone, sa zviera z pokusu vyradí, bude mu podaná injekčná celková anestéza a následne bude humánne usmrtené podaním letálnej dávky prípravku T61.

Predpokladaná úroveň krutosti:

injekčné podanie anestetík – mierna

injekčné podanie analgetík - mierna

indukcia rán v celkovom znecitlivení a následnou pooperačnou analgéziou – stredná

ošetrovanie, preväz a dokumentácia rán v celkovom znecitlivení – stredná

odber bioptických vzoriek v celkovom znecitlivení – stredná

Uplatňovanie zásad 3R

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

2. Redukcia počtu zvierat:

Počet zvierat použitých v projekte je obmedzený na minimum, nevyhnutné pre štatistické vyhodnotenie výsledkov. Experiment je navrhnutý tak, že každé zviera ako individuum slúži na testovanie štyroch rozličných substancií a po odbere bioptických vzoriek zo všetkých štyroch rán bude vyradené z experimentu a humánne usmrtené. Opätovné použitie zvierat nie je možné, keďže po zhojení rán a odbere bioptického materiálu už nie je dostupná na chrbte intaktná koža pre nasledujúci experiment.

3. Zjemnenie: Potkany budú počas celého pokusu držané za štandardných podmienok, vyžadovaných legislatívou, pričom sa budú rešpektovať základné etické princípy požadované pri zaobchádzaní s pokusnými zvieratami. Počas celého pokusu sa budú dodržiavať postupy maximálne zjemňujúce pokus. Zvieratám bude zabezpečená štandardná starostlivosť, ktorú bude vykonávať školený personál - pracovníci pokusného zariadenia. Denne sa bude vykonávať kontrola zdravotného stavu zvierat. Ani v jednom štádiu pokusu nebudú mať zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prístup potravy a vody. S cieľom čo najväčšieho zmiernenia bolesti, indukcia rán, každodenné ošetrovanie, preväz, aplikácia testovanej látky a odber bioptického materiálu z rán prebehne v celkovom znecitlivení. Na zmiernenie pooperačnej bolesti bude ihneď po ukončení zákroku podaný tramadol i.p. Podľa potreby bude zvieratám medzi zákrokmi podávaný tramadol p.o. (pridávaný do vody).

Príloha č. 1

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Nedospelé, indolamín 2,3-dioxygenázu exprimujúce dendritické bunky ako potenciálna terapia odmietnutia štepú po transplantácii (testovanie aktivácie T-lymfocytov *in vitro*)

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3464/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): dendritické bunky, indolamín 2,3-dioxygenáza, mixed lymphocyte reaction, tolerancia

Účel projektu*: Translačný alebo aplikovaný výskum

Opísať ciele projektu:

Cieľom tohto projektu je zistiť, či nedospelé dendritické bunky (DC) izolované z kostnej drene a exprimujúce indoleamín 2,3-dioxygenázu (IDO) dokážu inhibovať proliferáciu T lymfocytov izolovaných z lymfatických uzlín *in vitro* (mixed lymphocyte reaction) a či vykazujú tolerogénne vlastnosti.

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

Výsledky tejto práce by mohli byť užitočné pre pacientov podstupujúcich transplantáciu obličiek, keďže ako akútna, tak aj chronická reekcia renálneho štepú je stále obrovský problém na poli transplantácie orgánov. Nedospelé, IDO exprimujúce bunky by mohli vykazovať silný imunomodulačný potenciál a tak nahradiť terajšiu imunosupresívnu terapiu s vážnymi nežiadúcimi účinkami.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan (*Rattus norvegicus*), kmeň Brown Norway a Lewis, samce.

Počet na celú dobu trvania experimentu: 60 zvierat kmeňa Brown Norway, 30 zvierat kmeňa Lewis.

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

Zvieratám nebudú vykonávané žiadne intervencie, nebudu premedikované, ani merané. Do ich života sa nebude zasahovať až do usmrtenia, kedy budú izolované DC a T lymfocyty. Predpokladaný diskomfort je teda veľmi malý.

Predpokladaná úroveň krutosti: 0) bez možnosti zotavenia

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

I keď samotné experimenty budú realizované na bunkových kultúrach in vitro, nie je možné získať DC a T lymfocyty z iných zdrojov ako priamo z potkanov. Navyše, je nutné použiť model Brown Norway (donor DC) a Lewis (donor T lymfocytov – v prípade in vitro experimentov predstavujú „recipienta“). Ide o inbredné kmene s definovaným haplotypom, ktoré sú si navzájom opozitné, a teda predstavujú dobrý model pre rejekciu.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Na izoláciu DC a T lymfocytov sú potrebné tri skupiny zvierat:

1 – izolácia DC z kostnej drene 1 potkan kmeňa Brown Norway; 2 – izolácia T lymfocytov z lymfatických uzlín (allogénna kombinácia) 1 potkan kmeňa Lewis; 3 – izolácia T lymfocytov z lymfatických uzlín (izogénna kontrola) 1 potkan kmeňa Brown Norway.

Z našich predošlých experimentov vieme, že na jeden experiment sú potrebné 2 potkany Brown Norway a 1 potkan Lewis. Z tohto počtu dokážeme izolovať dostatočné množstvo buniek potrebných na jeden experiment s použitím jednej látky stimulujúcej IDO.

Uplatnenie 3R, redukciu počtu zvierat plánujeme už tým, že tieto experimenty budú vykonávané in vitro. Tým sa vyhneme náročným a často bolestivým experimentom testovania potenciálu DC in vivo, ktoré by vyžadovali podstatne väčší počet zvierat. Navyše týmito preliminárnymi experimentami vylúčime postupy, ktoré nedostatočne modulujú imunitnú funkciu DC.

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)

Chceme použiť model Brown Norway (donor DC) a Lewis (donor T lymfocytov – v prípade in vitro experimentov predstavujú „recipienta“). Ide o inbredné kmene s definovaným haplotypom, ktoré sú si navzájom opozitné, a teda predstavujú dobrý model pre rejekciu. Keďže diskomfort zvierat v tomto projekte je veľmi nízky (zvieratá budú utratené a použité na izolovanie buniek,

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: *Vplyv látok ovplyvňujúcich IDO na renálne poškodenie v ischemicko-reperfúznom modeli obličky u potkana.*

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

3769/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): IDO, IRI, AKI, oxidačný stres, apoptóza, fibróza, zápal

Účel projektu: Translačný alebo aplikovaný výskum

Opísať ciele projektu:

Ischemicko-reperfúzne poškodenie obličky (IRI) je častou príčinou akútneho poškodenia obličiek (AKI). IRI vyplýva z niekoľkých faktorov, ktoré ovplyvňujú ako renálny tubulárny epitel tak aj renálnu mikrocirkuláciu. Ischémia výrazne znižuje intracelulárne ATP spojenie a iniciuje poškodeniu buniek, ktoré je ešte zhoršené zvýšením oxidačného stresu, apoptózy a zápalu. IDO (indolamindioxigenáza) je enzým, ktorý metabolizuje tryptofán za vzniku štiepných produktov ako sú kynureníny. Úloha IDO v IRI nebola dosiaľ dostatočne popísaná - niektoré práce ukazujú, že IDO by mohlo byť v IRI prínosné a iné, ukazujú opak a navyše, úloha IDO v IRI u potkana nebola doteraz skúmaná. Preto je nutné preskúmať úlohu IDO v IRI, a to hlavne jeho vplyv na oxidačný stres, apoptózu, zápal a ďalšie parametre, ktoré sú pri IRI zmenené a prispievajú k AKI.

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

Výsledky tejto práce by mohli byť užitočné pre pacientov liečiacich sa na AKI, ako napríklad po transplantácii obličky, alebo inak spôsobenou AKI.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

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

Počet na celú dobu trvania experimentu: 200 zvierat

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

Jediná ujma bude úvod do anestézy, inak nebude s potkanmi nič vykonávané, takže ujma bude minimálna.

Predpokladaná úroveň krutosti:

a) **slabé** – potkan bude uvedený do anestézy, z ktorej sa neprebudí, ale v anestéze bude usmrtený exsanguináciou, takže jediný diskomfort bude úvod do anestézy.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

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

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

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Na skúmanie protektívneho účinku liečiv je potrebných 6 experimentálnych skupín:

1) kontrola (SHAM), 2) IRI + vehikulum, 3) IRI + NEC-1, 4) IRI + NEC-i, 5) IRI + 1-MT, 6) IRI + Kynurenín, 7) IRI + INF-gama, 8) IRI + 1-aminobenzotriazol,

Z našich predošlých experimentov vieme, že rozsah poškodenia obličiek po IRI je značne variabilný, preto je nutný väčší počet zvierat v jednotlivých skupinách, ako pri iných experimentoch. Aby bolo možné experiment následne štatisticky správne vyhodnotiť, navrhujeme 20 potkanov na skupinu – 10 na fixáciu formaldehydom a histológiu + 10 na cievne experimenty a ostatné orgány na metodiky molekulárnej biológie. To znamená 200 potkanov na celý experiment.

Uplatnenie 3R, redukciu počtu zvierat plánujeme avšak využiť tým, že v preliminárnych experimentoch na bunkových kultúrach stanovíme optimálne dávky liečiv a tým sa zníži počet zvierat (v nasledujúcich možných experimentoch), ak by dávky liečiv neboli dostatočné. Na bunkových kultúrach budeme ďalej sledovať bunkový mechanizmus poškodenia a efektu liečiv na jednotlivých bunkách ktoré tvoria cievny systém.

3. Zjemnenie:

Nie je nutné. Pretože jediná ujma bude úvod do anestézy, inak nebude s potkanmi nič iné vykonávané.

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

Chceme použiť samce kmeňa Wistar, ktoré sú najčastejšie používané na podobný výskum a možno teda porovnať naše experimenty z prácami iných autorov. Ďalší dôvod prečo chceme použiť potkany rodu Wistar, čo je outbred, ktorý má väčšiu genotypovú ako aj fenotypovú variabilitu ako inbred potkany, čo je viac podobné ľudskej populácii. Tento vedecký problém sa nedá riešiť alternatívne, preto chceme použiť potkany.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

nie

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Účinok stresu vyvolaného imunitnou reakciou počas gravidity potkanov na následnú starostlivosť o mláďatá a na neuronálnu excitabilitu mláďat.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3889/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

LPS, stres, elektrofyziológia, materinské správanie, primárne kultúry

Účel projektu:

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

Opísať ciele projektu:

- 1) Zistiť, aké zmeny v starostlivosti samíc potkana o mláďatá vyvolá prekonanie stresu spôsobeného imunitnou reakciou počas gravidity.
- 2) Zistiť, aké zmeny v hipokampálnej excitabilite mláďat potkana vyvolá, ak ich matka prekoná počas gravidity stres spôsobený imunitnou reakciou; pričom sa sústreďíme na zmeny existujúce bezprostredne po narodení a zmeny vo veku jeden mesiac.
- 3) Určiť, ktoré napäťovo závislé iónové kanály sa podieľajú na identifikovaných zmenách excitability hipokampálnych neurónov.

Prínos z vykonaného projektu:

Je známe, že stres matky počas tehotenstva zvyšuje u detí riziko ochorení ako sú depresia, schizofrénia alebo autizmus. Jedným z najbežnejších stresorov, ktorým môžu byť tehotné ženy vystavené, je akútne infekčné ochorenie. O jeho priamom vplyve na funkciu mozgu potomstva je len málo informácií. Výsledky našich experimentov prispievajú k porozumeniu mechanizmu vzniku patologických neuroendokrinných zmien a duševných porúch spôsobených stresom prekonaným matkou počas gravidity.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórne potkany *Rattus norvegicus*, gravidné samice kmeňa Wistar (Anlab, Praha Česká republika): 60 jedincov (cca 600 mlád'at)

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

Gravidným samiciam bude počas tehotenstva opakovane podaný LPS, čo u nich vyvolá imunitnú stresovú reakciu. Predpokladáme, že stres počas tehotenstva negatívne ovplyvní správanie matiek ako aj aktivitu neurónov a neuroendokrinné parametre mlád'at.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

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

- i.p. podávanie anestézie (chloralhydrát, pentobarbital)

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

- opakované i.p. podávanie LPS

Kategória bez možnosti zotavenia

- elektrofyzilogické meranie aktivity neurónov

Uplatňovanie zásad 3R:

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

V predloženom projekte budeme študovať správanie a aktivitu nervových buniek hipokampu, čo si vyžaduje využitie animálneho modelu s dostatočne vyvinutým centrálnym nervovým systémom. Keďže predpokladáme, že naše výsledky by mohli mať potenciálny klinický dopad, považujeme za primerané použitie malých laboratórnych zvierat potkanov, ktoré sú z hľadiska výskumu správania, či depresie najlepšie preskúmané a z hľadiska elektrofyzilogického merania veľkosti najvhodnejšie. Preto nie je možné navrhovaný experiment realizovať na systematicky nižšom druhu živočíchov a ani za využitia počítačovej simulácie. Experimenty v predloženom projekte vyžadujú použitie animálneho modelu potkana kmeňa Wistar, s ktorým máme bohaté skúsenosti.

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

Počet použitých zvierat je minimalizovaný na najnižšiu možnú mieru. Tento počet je úplné minimum preto, aby sme získali dostatok materiálu na prípravu primárnych kultúr hipokampálnych neurónov a aby *in vivo* elektrofyzilogické merania mali ešte štatisticky výpovednú hodnotu. Elektrofyzilogické meranie aktivity

neurónov je časovo náročné a medzi jednotlivými experimentmi môže byť dlhý časový rozstup. Pokiaľ to však personálne a technické kapacity umožnia, bude možné použiť spoločné kontroly a tým pádom znížiť počet zvierat v jednotlivých experimentoch.

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

Utrpenie zvierat bude minimalizované dodržiavaním každej z piatich zásad uvádzaných pri definícii welfare zvierat. Testy budú uskutočňované tak, aby zvieratá čo najmenej strádali. Gravidné samice budú pred pôrodom chované v samostatných klietkach s prístupom ku peletovanej strave a vode *ad libitum*. Gravidným samiciam bude od 15. do 19. dňa gravidity podávaný LPS na vyvolanie zápalovej stresovej reakcie. Po pôrode bude časť zvierat oddelených od matiek a usmrtených (príprava primárnych kultúr) a časť ostane s matkami počas jedného mesiaca za účelom pozorovania zmien materinského správania. Zdravotný stav zvierat bude denne monitorovaný.

Po ukončení experimentov budú zvieratá usmrtené predávkovaním anestetikom (pentobarbital). Zvieratá, u ktorých sa v priebehu plánovaných pokusov prejaví zhoršenie zdravotného stavu, budú z experimentu vyradené a v prípade pretrvávania zdravotných komplikácií po konzultácii s veterinárom MVDr. Jozefom Olexom humánne usmrtené.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno nie

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

3942/14-221

Názov projektu:

ŠTÚDIUM DÔSLEDKOV MATERSKEJ DEPRESIE A PODÁVANIA ANTIDEPRESÍVA VENLAFAXÍNU NA FUNKČNÝ VÝVIN MOZGU A SPRÁVANIE POTOMSTVA POTKANOV (VEGA 2/0168/15)

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

V lekárskech kruhoch dodnes nie je jednoznačne zodpovedaná otázka, či liečiť, alebo neliečiť tehotnú a dojčiacu matku antidepresívami. Neliečená materská depresia ale aj používanie antidepresív môže nepriaznivo ovplyvniť vývin plodu a novorodenca. Antidepresíva sú lieky, ktoré harmonizujú nerovnováhu monoamínov v mozgu. Akékoľvek zmeny na úrovni monoamínov počas vývinu môžu viesť k funkčným poruchám mozgu s následnými neurobehaviorálnymi dysfunkciami v neskoršom postnatálnom období. Cieľom projektu bude pokračovať v experimentálnom výskume účinku antidepresívneho lieku venlafaxínu podávaného krátko pred pôrodom a počas laktácie samotne, ako aj v kombinácii s materskou depresiou, na funkčný vývin mozgu a správanie potomstva potkanov. Tento výskum je dôležitý aj pre klinickú prax, pre ktorú výsledky riešenia projektu môžu znamenať prehodnotenie používania venlafaxínu počas tehotenstva a dojčenia. Prínosom projektu budú originálne poznatky o vplyve liečenej a neliečenej depresie v skorých štádiách vývinu mozgu, ktoré by prispeli k poznatkom pri prevencii a liečbe depresie počas tehotenstva a laktácie. V postupoch použijeme 60 dospelých laboratórnych samíc, 20 dospelých samcov a následne ich potomstvo s počtom 384 potkanov, kmeňa Wistar/DV v 1. časti štúdie (Jar 2015) a rovnaký počet zvierat aj počas 2. časti štúdie (Jar 2017).

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Replacement (nahraditeľnosť zvierat)

V uvedenom pokuse je potrebné získať komplexné informácie o možných nepriaznivých účinkoch testovanej látky hodnotením behaviorálneho, neuroendokrinného a neurochemického statusu potomstva potkanov. Pokus nie je možné realizovať v podmienkach *in vitro*, je potrebné ho uskutočniť *in vivo*. Rovnako nie je možné pokus vykonať na systematicky nižšom druhu živočíchov. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.6300 Developmental Neurotoxicity Study (EPA, 1998) a OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Draft Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study (OECD, 1995) odporúčajú štúdie vývinovej neurotoxicity vykonávať na laboratórnych potkanoch.

Ref.:

EPA (1998), *Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.6300, Developmental Neurotoxicity Study, EPA 712-C-98-239.*

OECD (1995), *Guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for a new guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study.*

Reduction (znižovanie počtu zvierat)

Reprodukovateľné výsledky je možné získať len pri spracovaní dostatočného počtu zvierat. K zvieratám ovplyvnených depresiou ako aj VENN je nutné priradiť kontrolnú skupinu zvierat, teda zdravých zvierat neliečených za účelom zistenia možného negatívneho pôsobenia depresie ako aj liečiva. V štúdiu celkovo použijeme 120 samic a 40 samcov potkanov Wistar. Maximálny počet mláďat vo vrhu s matkami bude 768, počet zvierat po odstave od matky spolu 320 zvierat oboch pohlaví. Ide o najnižší možný počet zvierat v jednotlivých skupinách, ktorý môže byť štatisticky hodnotiteľný (10-12 na skupinu).

Refinement (zjemnenie pokusu)

S cieľom minimalizovať stres u zvierat, budú pri experimente prítomné len osoby nevyhnutné na vykonanie samotného pokusu, ktoré budú k zvieratám pristupovať veľmi šetrne. Počas celého priebehu experimentu bude o zvieratá náležité postarané, budú ošetrované odbornými pracovníkmi experimentálneho zverinca ÚEFT SAV a pravidelne kontrolované vedúcim experimentu. Pri ošetrovaní experimentálnych zvierat bude dodržiavaná každá z piatich slobôd uvádzaných pri definícii welfare zvierat. Dospelé gravidné a laktujúce zvieratá budú umiestnené individuálne. Mláďatá do obdobia odstavy na 21. deň veku budú umiestnené s matkou, po odstave v skupine po 3-4 zvieratá v jednej chovnej kletke. Zdravotný stav zvierat bude denne monitorovaný. Zvieratá budú pri použitých testoch minimálne vystavené stresu a bolesti.

Spätne posúdiť - nie

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Antihypertenzívna aktivita nových kombinovaných α/β sympatolytík

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

4237/14 - 221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): hypertenzia, SHR, alfablokátory, betablokátory

Účel projektu: Translačný alebo aplikovaný výskum

Opísať ciele projektu:

Účel pokusu a jeho zdôvodnenie

V predkladanom projekte plánujeme zistiť, či originálne naprojektované a na Farmaceutickej fakulte UK pripravené deriváty aryloxyaminopropanolov, ktoré v predchádzajúcich experimentoch in vitro potvrdili kombinovanú α/β adrenolytickú aktivitu budú antihypertenzívne účinné in vivo. V rámci liečby hypertenzie sa v prípade nedostatočnej úpravy TK pacienta monoterapiou často pristupuje ku kombinácii liečiv s rôznymi mechanizmami účinku. Hybridné liečivá s účinkom na kardiovaskulárny systém zahŕňajú viacero fragmentov spojených v jednej molekule, ktoré majú rozličný farmakologický účinok. Výhodou týchto liečiv je možnosť ovplyvniť viacero funkcií súčasne v jednej terapeutickej dávke (Christiaans a Timmerman 1996). Skúmané látky obsahujú kombináciu dvoch farmakofórov, α - aj β -sympatolytický účinok bol potvrdený pokusmi in vitro. V predkladanom projekte plánujeme overiť antihypertenzívnu aktivitu skúmaných látok in vivo na živých pokusných zvieratách.

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

Výsledky tejto práce by mohli priniesť nové liečivá užitočné pre pacientov liečiacich sa na hypertenziu.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

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

Počet na celú dobu trvania experimentu: 132 zvierat

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

Zvieratám bude meraný tlak metódou tail cuff, pri čom sú fixované vo valci. Na túto procedúru budú zvieratá trénované, aby voľne vošli do valca a ostanú pokojne počas celého merania. Potkany budú umiestnené raz za dva týždne do metabolických klietok, individuálne ubytované, s jedlom a vodou, na dobu 24 hodín za účelom zbierania 24 hodinového moču (na stanovenie metabolitov skúmaných látok), čo priniesie zvieratám ľahký diskomfort. Po uplynutí 7 týždňov budú zvieratá usmrtené v anestézii exsanguináciou – bez spôsobenia ujmy pred uspatím.

Predpokladaná úroveň krutosti:

a) slabé

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Nahradenie zvierat nie je možné, keďže hypertenzia u ľudí/potkanov má komplexný charakter. Jedná sa o zistenie účasti možných regulačných proteínov a preto v tomto type projektu nie je možné použiť ani počítačové simulácie a ani nie je možné skúmať tento efekt *in vitro*. Regulácia krvného tlaku zahŕňa viacero aspektov, ktoré plánujeme analyzovať – a to z orgánov odobratých po utratení, ako napríklad plánujeme stanoviť endotelovú funkciu aorty (kde vieme, že pri hypertenzii je narušená) a skúmané látky by mohli túto funkciu obnoviť. Ďalej plánujeme skúmať účasť regulačných proteínov pomocou metód molekulárnej biológie, či histológie z orgánov odobratých pri utratení.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Na skúmanie protektívneho účinku liečiv je potrebných 11 experimentálnych skupín:

1 – kontrola, 2 – naftopidil/10, 3 – experimentálna látka A2/10, 4 – experimentálna látka A3/10, 5- experimentálna látka A4/10, 6- karvedilol/10, 7 – naftopidil/30, 8 – experimentálna látka A2/30, 9 – experimentálna látka A3/30, 10- experimentálna látka A4/30, 11- karvedilol/30

Z našich predošlých experimentov vieme, že rozsah hypertenzie je pri SHR značne variabilný, preto je nutný väčší počet zvierat v jednotlivých skupinách, ako pri iných experimentoch. Aby bolo možné experiment následne štatisticky správne vyhodnotiť, navrhujeme 12 potkanov na skupinu. To znamená 132 potkanov na celý experiment.

Uplatnenie 3R, redukcii počtu zvierat plánujeme využiť tým, že v preliminárnych experimentoch sme stanovili optimálne dávky liečiv a tým sa znížil počet zvierat, ak by dávky liečiv neboli dostatočné.

3. Zjemnenie:

Chceme použiť metódu tail cuff na stanovenie krvného tlaku. Pri tejto metóde potkany môžu byť v strese a preto budú na tento proces trénované. Bude im dovolené voľne sa pohybovať vo valci a budú trénované aby pokojne ostal vo valci počas merania, čo značne zníži stres zvierat z tejto metodiky.

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

Chceme použiť samce kmeňa SHR, ktoré sú najčastejšie používané na podobný výskum a možno teda porovnať naše experimenty s prácami iných autorov. Tento vedecký problém sa nedá riešiť alternatívne, preto chceme použiť potkany.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

nie

Netechnické zhrnutie projektu č. 8 4251/14-221

Štúdia realizovateľnosti a optimalizácia merania telesnej teploty u králikov za použitia rektálnych sond a bezkontaktného teplomera s vylúčením vplyvu cirkadiánnych rytmov a pohlavnej príslušnosti s následnou aplikáciou vyvíjanej očkovacej látky a monitorovaním telesnej teploty po podaní vyvíjanej celobunkovej absorbovanej vakcíny proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu.

Cieľ projektu pokusu, predpokladaná ujma a prínosy:

Králik domáci je najvhodnejší zvierací model na testovanie pyrogénnych látok v celobunkovej vakcíne proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu (Bordetella Pertussis). Udáva sa, že králik domáci je porovnateľne citlivý na podanie očkovacej látky ako dieťa. Aktuálne vakcinačné programy vo vyspelých krajinách zahŕňajú prevažne vakcináciu polyvalentnou DTPaP vakcínou, ktorá zahŕňa aj vakcínu proti toxínu Bordetella Pertussis. V minulosti bolo používanie celobunečnej vakcíny proti čiernemu kašľu vytlačené aktuálne používanou acelulárnou vakcínou, z dôvodu častého výskytu nežiadúcich účinkom ako horúčka a fibrilné šoky a následnej silnej antivakcinačnej lobby. Vyvíjaná celobunková vakcína proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu, ktorá bude aplikovaná v tomto projekte, bude obsahovať geneticky detoxifikované a chemicky usmrtené bunky baktérie Bordetella Pertussis a je formulovaná pomocou aluminium hydroxid nosiča tak, aby poskytovala maximálnu imunogenicitu a minimalizovala nežiaduce účinky typu zvýšenie teploty.

Účelom skúšky v 1. fáze projektu je určiť optimálne podmienky merania telesnej teploty u králikov za použitia rektálnych sond a bezkontaktného teplomera s vylúčením vplyvu cirkadiánnych rytmov a pohlavnej príslušnosti. Na základe výsledkov z 1. fázy (výber prístroja na meranie telesnej teploty, výber pohlavia) by sme zrealizovali 2. fázu, v ktorej budeme aplikovať vyvíjanú očkovaciu látku. Ako očkovacia látka sa bude používať RALDITEPERA vyvíjaná spoločnosťou Revabiotech SE, Praha.

Pre porovnanie s vyvíjanou očkovacou látkou budeme pri skúškach používať 3 skupiny kontrolných zvierat: zvieratá očkované nemodifikovanou celobunečnou vakcínou proti DTP (3ks) a zvieratá očkované adjuvansom, teda aluminium hydroxidom, v koncentrácii 0,7 mg/ml, objem 0,5 ml i.m. (3ks) a zvieratá očkované fyziologickým roztokom (1ks). Očkovacia látka sa pri skúške v 2. fáze podá 3ks zvierat v koncentrácii X, objem Y i.m. (3ks).

Cieľom projektu je sledovať u králikov zvyšovanie sa telesnej teploty nami určeným presnejším prístrojom po podaní očkovacej látky. Telesnú teplotu budeme monitorovať najskôr o 5 hodín po aplikácii. Pri návrhu skúšky vychádzame z dostupných publikácií, ktoré pojednávajú o použití králikov pri teste celobunečnej vakcíny proti Bordetella Pertussis na

pyrogény (Verwer *et al.*, Reducing variation in a rabbit vaccine safety study with particular emphasis on housing conditions and handling, Lab. Anim. 2009, 43: 155, Kaaik *et al.*, Nonclinical vaccine safety evaluation: advantages of continuous temperature monitoring using abdominally implanted data loggers, J. Appl. Toxicol. 2013; 33: 521–526; Dias *et al.*, An improved whole pertussis vaccine with reduced content of endotoxin, Human vaccines and immunotherapeutics, 9:2, 339 – 348, February 2012). Podľa týchto publikovaných štúdií, nárast teplôt u králikov bol pozorovaný v rozmedzí 5-12 hodín po podaní celulárnej vakcíny s najvyšším nárastom teplôt pri 8 hodinách od podania. Z týchto publikácií zároveň vyplýva, že vzostup teplôt je pomerne nízky v rozmedzí cca 0,5-1°C. Dôležitú úlohu pri celom teste hrá jemná manipulácia so zvieratami a návyk králikov na personál a procedúry, ktoré sú na nich počas skúšky vykonávané. Nevhodné zaobchádzanie, či nové stimuly totiž môžu navodiť stresový stav a navodiť vzostup telesnej teploty králikov, čo povedie k skresleniu výsledkov skúšky. Cieľom 1. fázy projektu je preto aj návyk králikov na manipuláciu a personál ako aj na ujasnenie, ktoré z meracích zariadení podáva spoľahlivejšie merania a minimalizuje navodenie stresu u testovaných zvierat.

Počas skúšky a počas podávania látok sa zabezpečí jemné zaobchádzanie a manipulácia so zvieratami s konštantným personálom, ktorý bude od začiatku 1. fázy projektu až po koniec 2. fázy projektu so zvieratami manipulovať. Neočakáva sa riziko dlhodobej bolesti ani utrpenia. Zvieratá budú mať štandardné umiestnenie, potravu a starostlivosť. Králikom sa nebude odoberať žiadny biologický materiál. Po ukončení postupu budú všetky zvieratá usmrtené podľa NV č. 377/2012, § 5, Príloha č.2, Králiky – Nadmerná dávka anestetík (podáva zmluvný veterinárny lekár) a následná dislokácia krčných stavcov, Náráz/úder do hlavy.

Počet a druh pokusných zvierat

Králik domáci kmeňa HILL, bez rozdielu pohlavia, 10 ks zvierat pre testovanie každej vyrobenej šarže RALDITEPERY.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Stanovený počet zvierat predstavuje limit, ktorý je nevyhnutný pre získanie dostatočného počtu vzoriek pre validné vyhodnotenie výsledkov zmien v vzostupe telesnej teploty u králikov po podaní očkovacej látky. Nie je možné nahradiť postup na zvieratách *in vitro* testami na bunkových líniiach. So zvieratami budú zaobchádzať zaškolené osoby s dlhoročnými praktickými skúsenosťami.

Správa o posúdení projektu projektu č. 8: Štúdia realizovateľnosti a optimalizácia merania telesnej teploty u králikov za použitia rektálnych sond a bezkontaktného teplomera s vylúčením vplyvu cirkadiánnych rytmov a pohlavnej príslušnosti s následnou aplikáciou očkovacej látky a monitorovaním telesnej teploty po podaní vyvíjanej celobunkovej absorbovanej vakcíny proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu.

K predkladanému projektu zaujala etická komisia toto stanovisko:

Etická komisia prehodnotila predložený projekt z hľadiska týchto kritérií:

- Odôvodnenosť projektu z vedeckého hľadiska
- Odôvodnenosť použitia zvierat a ich počtu
- Či je projekt navrhnutý tak, aby umožnil vykonávanie postupov najhumánnejším spôsobom
- Hodnotenie cieľov projektu
- Posúdenie súladu projektu s požiadavkou 3R
- Priradenie a posúdenie klasifikácie krutosti
- Analýza projektu z pohľadu prínos kontra ujma spôsobená zvieratám

Cieľom postupu skúšky uvedeného v projekte je 1. fáze určiť optimalizáciu merania telesnej teploty u králikov za použitia rektálnych sond a bezkontaktného teplomera s vylúčením vplyvu cirkadiánnych rytmov a pohlavnej príslušnosti. Na základe výsledkov z 1. fázy (výber prístroja na meranie telesnej teploty, výber pohlavia) by sme zrealizovali 2. fázu, v ktorej budeme aplikovať vyvíjanú očkovaciu látku. Postup skúšky nie je uvedený v Ph. Eur. Účel postupu bol dostatočne zdôvodnený a vychádza plne zo štátnou autoritou (ŠÚKL/ SUKL) schválenej registračnej dokumentácie. Používanie zvierat je potrebné z hľadiska poznania reakcie živého organizmu

Spätné posúdenie - d'no do 31.3.2016

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 4274/14-221a

Príprava monoklonových protilátok špecifických k patologickým formám tau proteínu

Podrobný účel postupu:

Alzheimerova choroba je charakteristická akumuláciou patologicky modifikovaných foriem tau proteínov v centrálnej nervovej sústave, ktorá spôsobuje degeneráciu a následnú dysfunkciu neurónov. V súčasnosti trpí týmto ochorením viac ako 20 miliónov ľudí a štatistiky zaznamenávajú 4 až 5 miliónov nových prípadov ročne. Súčasné liečebné postupy spočívajú najmä v symptomatickej a podpornej terapii avšak terapia kauzálna zatiaľ neexistuje.

Cieľom projektu je príprava monoklonových protilátok (MP) namierených voči patologicky modifikovaným formám tau proteínu. Patologická fosforylácia tau proteínu je jedným z hlavných znakov neurodegeneračného procesu pri Alzheimerovej chorobe. Pretože patologická fosforylácia tau proteínu zohráva kľúčovú úlohu pri vývoji a progresii ochorenia, záujem vedeckej verejnosti sa zameriava na identifikáciu fosforylačných miest zapojených do formovania patologických štruktúr typických pre toto ochorenie. Príprava MP voči fosfoepitopom zodpovedným za patologické procesy nám umožní determinovať funkčný význam takýchto epitopov a poukázať na možný vzťah k vývoju neurodegenerácie. Navyše, pomocou získaných protilátok bude možné identifikovať štatisticky významné antigénne determinanty (epitopy) ako potenciálne terapeutické ciele.

Ako pokusné zvieratá budú slúžiť myši BALB/c (samičky). Imunizácia patologickými formami tau proteínu navodí u týchto myší imunitnú odpoveď. Slezinové bunky myši budú použité na prípravu hybridómov produkujúcich monoklonové protilátky. Pokusy na myšiach sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Celkom bude použitých 70 myší Balb/c (samice) vo veku približne 6 týždňov.

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

- Každý myš v experimente sa aplikuje testovaný antigén (rôzne formy patologického tau proteínu) subkutánnou a intraperitoneálnou injekciou v dávke v 200ul fyziologického roztoku s kompletným a inkompletným Freundovým adjuvantom. Zvieratá dostanú 3-5 dávok antigénu v mesačných intervaloch s cieľom získať dostatočnú imunitnú odpoveď.
- 10-14 dní po poslednej imunizačnej dávke sa zvieratám odoberie krv z retroorbitálneho plexu v objeme asi 100-150 ul s cieľom stanoviť titer imunizáciou indukovaných protilátok v sérach zvierat. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieraťa neprekračuje stanovené normy.
- Zvieratá budú následne v rôznych časových intervaloch od poslednej dávky (3,6,9,12 mesiacov) postupne humanne usmrtené v súlade so zákonom: anestézia a dislokácia krčných stavcov.
- Rozhodnutie o usmrtení je nevyhnutné pre získanie sleziny ako zdroj plazmatických buniek na prípravu hybridómov produkujúcich monoklonové protilátky. V tomto prípade nie je možné zachovať život zvieraťa.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Cieľom projektu je príprava monoklonových protilátok namierených voči patologicky modifikovaným formám proteínu tau, ktoré nám umožnia determinovať funkčný význam epitopov zodpovedných za patologické zmeny a poukázať na možný vzťah k vývoju neurodegenerácie. Zároveň bude možné identifikovať strategicky významné antigénne determinanty (epitopy) ako potenciálne terapeutické ciele. Vzhľadom na fakt, že daný experiment sa v súčasnosti nedá vykonať v podmienkach *in vitro*, keďže špecifické protilátky vznikajú po imunizácii zvierat, ani na ľuďoch, je použitie animálnych modelov nevyhnutné.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia, subkutánna a intraperitoneálna injekcia	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 1 minútu.
Odber krvi (retroorbitálny plexus)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Podá sa polovičná dávka anestetík na utlmenie bolesti. V okamihu ako je zviera sedované sa sklenená kapilára jemne zasunie pod očné guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť stredná. Trvanie 1 minútu.
Usmrtenie v anestéze dislokáciou krčných stavcov	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Intraperitoneálne sa podá anestetikum v dávke 100µl. Cervikálna dislokácia sa vykoná v anestézii. Bolesť žiadna. Trvanie 30 sekúnd

Zohľadnenie 3R**Zjemnenie:**

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

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere. V jednotlivých skupinách bude maximálne 5 zvierat. Počet zvierat zohľadňuje variabilitu imunitnej odpovede.

Nahradenie:

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

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

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

Utrpenie versus prínos

Cieľom projektu je príprava monoklonových protilátok, ktoré sú namierené voči patologicky modifikovaným (fosforylovaným) formám proteínu tau. Monoklonové protilátky namierené voči fosfoepitopom zodpovedným za patologické zmeny v mozgu pacientov postihnutých Alzheimerovou chorobou umožnia určiť funkčný význam týchto epitopov s následným potenciálne terapeutickým využitím. Keďže proteín tau je prirodzene neusporiadaný proteín, ktorý nemá stabilnú štruktúru, neexistuje iná možnosť mapovanie jeho patologických zmien, ako používať špecifické protilátky, ktoré vznikajú po imunizácii. Imunizované zvieratá v experimente nebudú vystavené utrpeniu. Intraperitoneálna a subkutánna aplikácia imunogénu trvá niekoľko sekúnd. Odber krvi trvá maximálne jednu minútu a vykonáva sa na sedovaných zvieratách. Experiment sa ukončí odobratím sleziny imunizovaného zvieratá v celkovej anestézii za účelom získania plazmatických buniek na prípravu hybridómov produkujúcich monoklonové protilátky najmenej tri týždne od poslednej dávky a najviac rok po poslednej dávke. Pre tieto dôvody prínos experimentov výrazne prevyšuje mieru utrpenia zvierat.

Začiatok pokusu je plánovaný na 7.1.2015 a bude sa realizovať v priebehu necelých dvoch rokov, do 31.12.2016.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

4296/221-14

NÁZOV PROJEKTU

VPLYV RÔZNYCH DRUHOV DNA NA ROZVOJ PRÍZNAKOV PREEKLAMPSIE U TEHOTNÝCH MYŠÍ

KĽÚČOVÉ SLOVÁ

preeklampsia, myši, fetálna DNA, imunitná reakcia

CIEĽ PROJEKTU

Cieľom projektu je zistiť účinok rôznych druhov DNA na rozvoj príznakov preeklampsie u tehotných samíc myši. Preeklampsia je závažné ochorenie, ktoré postihuje 5 – 8% tehotných žien a je hlavnou príčinou mortality tehotných žien a novorodencov. Toto ochorenie je charakteristické intrauterinným obmedzením rastu plodu, ischémiou placenty a predčasným pôrodom. Klinicky sa prejavuje arteriálnou hypertenziou, proteinúriou a edémami. Etiológia preeklampsie zatiaľ nie je úplne objasnená, preto je dôležité zostaviť taký model preeklampsie, ktorý by bol čo najviac podobný skutočnému ochoreniu. V publikovaných modeloch preeklampsie sa používa látka L-NAME (L-NG-nitroarginín metylester), ktorou sa indukuje zvýšenie krvného tlaku a látka LPS (lipopolysacharid), ktorá spôsobí zmeny v glomerulárnych kapilárach deštrukciou endoteliálnych buniek, čo zložitým procesom vedie k tvorbe mikrovaskulárnych lézií. Viacero vedeckých článkov doposiaľ potvrdilo, že počas preeklampsie je v cirkulácii tehotných žien zvýšené množstvo fetálnej DNA. Táto fetálna DNA pochádza z nadmerne sa rozpadávajúcich buniek placenty. Napriek týmto poznatkom nie je známe, či je fetálna DNA príčina alebo dôsledok preeklampsie. Pomocou vyššie uvedených modelov nie je možné danú otázku zodpovedať, pretože látky L-NAME a LPS nespôsobujú zvýšený výskyt fetálnej DNA alebo inej cudzorodej DNA v krvnej plazme matky. Z tohto dôvodu je potrebné zaviesť a overiť aj model fetálnej DNA. V prípade predkladaného návrhu ide o podávanie komerčne dostupných DNA rôznych druhov a tiež účinky látok CpG, syntetický agonista TLR9 (toll-like receptoru 9), a polyI:C (polyinosilic-polycytidylic acid) na rozvoj príznakov preeklampsie. Zavedenie vhodných modelov preeklampsie by mohlo prispieť k odhaleniu etiológie preeklampsie a tým rozšíriť možnosti prevencie aj prípadnej terapie tohto závažného ochorenia.

OČAKÁVANÝ PRÍNOS

Vhodne zvolený model preeklampsie u tehotných myši a odhalenie úlohy fetálnej DNA v patogenéze tohto ochorenia by mohli prispieť k poznatkom etiológie preeklampsie, k voľbe vhodnej liečby, či zisteniu možností prevencie preeklampsie.

NAHRADENIE ZVIERAT

Pretože v plánovaných experimentoch sa budú hodnotiť účinky jednotlivých látok na rozvoj príznakov preeklampsie, prípadne príznakov iných ochorení spojených s tehotenstvom, je nevyhnutné, aby sa experiment vykonal „in vivo“ na celom zvierati. Pri tomto type experimentu nie je možné využitie bunkových kultúr alebo počítačových simulácií ako alternatívny spôsob výskumného prístupu.

REDUKCIA POČTU ZVIERAT

V experimentoch bude použitý minimálny možný počet experimentálnych zvierat, ktorý je potrebný pre štatistické vyhodnotenie použitím ANOVA testu a Studentovho t-testu pre analýzy zamerané na vyhodnotenie efektu aplikovaných látok, vhodnosti zvoleného modelu a sledovania rozdielov v jednotlivých skupinách zvierat vo vzťahu ku zvoleným látkam. Zvieratá budú objednávané v jednotnom časovom intervale, aby sa predišlo sezónnym zmenám a potrebe experiment opakovať. V experimentoch sa použijú geneticky homogénne rovnaké skupiny zvierat.

ZJEMNENIE

Zvieratá budú počas pokusov kontinuálne sledované a výsledky priebežne vyhodnocované a v prípade zistenia nevhodných prípadne neočakávaných udalostí bude experiment ukončený a následne predložený nový projekt tak, aby sa znížil počet používaných zvierat.

PROJEKT BUDE PODLIEHAŤ OPÄTOVNÉMU SCHVAĽOVANIU nie

PREDPOKLADANÁ ÚROVEŇ KRUTOSTI

Na základe posudzovaných faktorov navrhujeme klasifikáciu krutosti postupov označiť ako slabú.

POČET ZVIERAT

Myši – black 6 – samice, 80 jedincov

Myši – black 6 – samce, maximálne 80 jedincov

pôvod - AnLab, s.r.o., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

štádium života – 12 týždňov (skorá dospelosť)

Netechnické zhrnutie projektu

4244/14-2216

Názov projektu:

Etiopatogenéza neurodegeneratívnych ochorení: význam posttranskripčnej úpravy RNA pre vznik a progresiu sporadických tauopátií a Alzheimerovej choroby

Podrobný účel postupu:

Cieľom predkladaného projektu je pochopiť etiopatogenézu tauopátií so zreteľom na identifikáciu molekulárnych mechanizmov regulácie expresie *MAPT* génu v patologických procesoch. Tieto poznatky je možné získať systematickou analýzou 3' konca tau transkriptu, predovšetkým určením vplyvu 3' neprekladanej oblasti na vnútrobunkovú lokalizáciu a stabilitu mRNA a štruktúrnou analýzou variabilného C-konca tau proteínu ako dôsledku alternatívneho zostrihu RNA. Okrem toho sa projekt zameria na objasnenie úlohy izoforiem tau proteínu v diferencovaných neurónoch a stanovenie expresie regulačných miRNA v potkaňom modeli tauopatie.

Projekt bude rozdelený na dva čiastkové experimenty. V prvom sa zameriame na identifikáciu dysregulovaných génov a mikro RNA v potkaňom modeli tauopátií vo vzťahu k neurodegeneratívne fenotypu indukovaného expresiou patologicky skráteného proteínu tau. Jeho súčasťou bude transkriptomická analýza signálnych dráh a identifikácia molekulárnych markerov neurodegenerácie indukovanej patologickou formou tau proteínu, ktorá bude vykonaná na dvoch úrovniach: 1. analýza mozgového tkaniva z kontrolných a transgénnych zvierat v rôznom veku (2, 4 a 6 mesiacov); 2. analýza periférálnych tekutín, ako napr. krv, sérum, plazma a/alebo cerebrospinálna tekutina ako potenciálnych zdrojov génových a miRNA biomarkerov, ktoré budú slúžiť na monitorovanie neurodegeneračných procesov. Na uskutočnenie transkriptomickej analýzy bude extrahovaná celková RNA, skontrolovaná jej integrita, reverzne prepísaná do cDNA a analyzovaná kvantitatívnou PCR v reálnom čase. Na porovnanie génovej a miRNA expresie medzi jednotlivými vzorkami budú použité komerčne dostupné a vlastné navrhnuté špecifické génové sondy a sady primerov s využitím technológie „SYBR Green“ a „TaqMan“. Jednotlivé dysregulované signálne dráhy budú identifikované pomocou „PCR arrays“ so zameraním na konkrétne molekulárne deje a ich regulačné miRNA molekuly. Transkriptomické dáta budú validované na úrovni proteínov pomocou biochemických metód a na úrovni bunkovej lokalizácie prostredníctvom imunohistochemie. Jednotlivé identifikované markery budeme vzájomne korelovať s ohľadom na stupeň neurodegenerácie.

V druhom kole experimentov sa zameriame na inhibíciu expresie tau proteínu a prípravu tau - deficientných neurónov pomocou interferujúcich RNA (siRNA) v dospelých resp. diferencovaných primárnych neurónoch za účelom identifikovania nových doposiaľ nepoznaných funkcií tau proteínu. Za účelom vnesenia siRNA do cieľových buniek plánujeme použiť rekombinantné adeno-asociované vírusy (rAAV - systém bez použitia "helperových" vírusov). Táto stratégia je v súčasnosti jedným z najmodernejších prístupov svojho druhu, ktorý bol podrobne testovaný na mnohých typoch mitoticky aktívnych ako aj nedeliacich sa buniek, ale aj v rôznych typoch tkanív *in vivo* vrátane špecifických mozgových oblastí. Génové vektory

	sa zvierá humánne usmrtí.
Odber embryí v 18. dni embryonálneho vývinu.	Štandardná metóda. Samica v 18. dni gravidity sa uvedie do celkovej anestézie prostredníctvom intraperitoneálnej injekcie. Po vybratí embryí z brušnej dutiny sa tieto ukladajú do ľadového PBS a priamo sa vyberá mozog z lebky. Samica je ešte v totálnej anestézii humánne usmrtená cervikálnou dislokáciou.

Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné ŠPP. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Starostlivosť zabezpečí jedna osoba, na ktorú si zvieratá zvykli. Pred začiatkom experimentu budú pokusné zvieratá handlované; t.j. navyknuté na manipuláciu s nimi. Handlovanie sa bude vykonávať pravidelne každý deň a bude pozostávať z hladenia a dotýkania sa a uchopovania zvierat. Tým sa zníži efekt stresu, ktorý môže byť spôsobený manipuláciou s nimi. Počet zvierat v nádobe zohľadňuje normy dané zákonom, potkany sú chované v počte 5 zvierat na chovnú nádobu, aby sme zabezpečili sociálne interakcie medzi zvieratami. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám.

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov. Stanovený počet zvierat sa opiera o naše predchádzajúce experimenty na potkanoch. Ukázalo sa, že počet zvierat v skupine menší ako 10 nie je dostatočne štatisticky relevantný, keďže aj u transgénnych zvierat sa vyskytuje variabilita daná mierou expresie transgénneho proteínu.

Nahradenie:

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

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

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

Utrpenie versus prínos

Príčina Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatií zostáva neznáma. Na pochopenie kompletnej patogenézy týchto neurodegeneračných ochorení je nevyhnutné pochopiť kompletnú kaskádu dejov a ich spúšťačov. Prínosom projektu budú odhalenie nových mechanizmov v etiopatogenéze sporadických tauopatií a Alzheimerovej choroby, definovanie úlohy tau proteínu v diferencovaných

neurónoch exprimujúcich patologickú formu tau a analýza expresie miRNA v potkaňom modeli tauopátie smerujúce k vývoju diagnostických biomarkerov. Počas všetkých úkonov na zvieratách vyvynieme maximálne úsilie na elimináciu ich stresu a utrpenia, t.z. všetky úkony na zvieratách, ako odber embryí a mozgového tkaniva, budú prebiehať v úplnej anestézii, a preto prínos tohoto projektu ďaleko prevyšuje mieru utrpenia experimentálnych zvierat.

Začiatok pokusu je plánovaný na 26.január 2015 a bude sa realizovať počas nasledujúcich dvoch rokov, do 31.12.2017.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Názov projektu:

Vývoj nového peptidového systému pre transport liečiv do mozgu.

Podrobný účel postupu:

Hematoencefalická bariéra (HEB) je selektívna bariéra tvorená endotelovými bunkami, ktoré lemujú mozgové mikrokapiláry. HEB predstavuje veľkú prekážku vo vývoji nových terapeutík pre centrálny nervový systém. Niektoré zdroje uvádzajú že až 100% liečiv s veľkou molekulovou hmotnosťou, ako sú peptidy, rekombinantné proteíny, monoklonálne protilátky, liečivá na báze RNA, či liečivá génovej terapie a až 98% liečiv s malou molekulovou hmotnosťou nie je schopné prechádzať cez HEB do mozgu. Tento fakt výrazne limituje možnosti farmakoterapie mozgu a vedie k intenzívnemu výskumu v danej oblasti.

Predložený projekt má ambície pripraviť nové systémy na báze peptidov použiteľné na transport terapeutík do mozgu. Zvieratá budú použité na testovanie prechodu týchto látok do mozgu a stanovenia základných farmakokinetických parametrov testovaných látok (mozog/plazma) ako sú napr. pomer koncentrácie plazma/mozgové tkanivo, plocha pod krivkou koncentrácie, plazmatický polčas, distribučný objem a iné. Na základe týchto parametrov bude možné vyselektovať látky, ktoré môžu byť v budúcnosti použité ako terapeutické systémy pre transport liečiv do mozgu.. Zvieratá budú uvedené do hlbokkej anestézie, budú im jednorázovo intravenózne podané testované látky a v rôznych časových intervaloch sa im odoberie krv, a následne budú humane usmrtené pomocou dekapitácie. Mozgové tkanivá a plazma budú použité na analýzu koncentrácie látok pomocou moderných analytických techník ako LC-MS/MS.

Celkom bude použitých 120 samcov vo veku približne 16 týždňov.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v organizme, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané z farmakokinetických štúdií na zvieratách za tie, ktoré pochádzajú z in vitro experimentov.

V jednotlivých skupinách pre individuálne látky bude 36 zvierat. Počet zvierat zohľadňuje biologickú variabilitu a potrebu viacerých časových bodov pre stanovenie základných farmakokinetických parametrov.

Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia anestetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Intravenózne podanie látok do femorálnej vény	Štandardná metóda. Zvieraťu sa v celkovej anestéze nastrihne a odpreparuje koža na vnútornej strane zadnej končatiny. Sledovaná látka sa pomaly podá pomocou injekčnej striekačky do femorálnej vény.

Katetrizácia a odber krvi z femorálnej artérie	Štandardná metóda. Zvieratú sa v celkovej anestéze nastrihne a odpreparuje koža na vnútornej strane zadnej končatiny a nakanyluje sa femorálna artéria. V stanovených časových intervaloch (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min) sa zvieratám odoberie stanovený objem krvi a doplní sa rovnakým objemom fyziologického roztoku. Na konci experimentu sa zviera humánne usmrť dekapitáciou. Experimentálne zvieratá budú počas celého experimentu v anestézii. V prípade, že sa experimentálne zviera prebudí z anestézy skôr ako je plánovaný posledný odber krvi (30 min) a dekapitácia bude experimentálne zviera humánne usmrtené dekapitáciou.
---	--

Zohľadnenie 3R

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

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

Nahradenie: Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v organizme, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané z farmakokinetických štúdií na zvieratách za tie, ktoré pochádzajú z in vitro experimentov

Zásada nahraditeľnosti zvierat

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

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu, všetky odbery tkanív sa uskutočnia v hlbokoj anestézii, a po odbere budú zvieratá humánne usmrtené. Výsledky získané z plánovaného experimentu môžu významne napomôcť pri vývoji nových terapeutických systémov pre transport liečiv do mozgu.

Začiatok pokusu je plánovaný na rok 2016 (jún-júl) a bude sa realizovať počas nasledujúceho roka, do júna-júla 2017.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Funkčná architektúra mozgu hlodavcov pri Alzheimerovej chorobe - 4274/14-221c

Podrobný účel postupu:

Alzheimerova choroba, rovnako ako veľa ďalších neurodegeneratívnych ochorení, sa spája s akumuláciou abnormálnej formy proteínov v centrálnej nervovej sústave, čo spôsobuje degeneráciu a následnú dysfunkciu neurónov, ktorá následne vedie k charakteristickým kognitívnym zmenám. Podľa súčasných štatistík trpí Alzheimerovou chorobou 24 miliónov ľudí a každý rok sa toto číslo zväčší o 4,5 milióna nových prípadov. Podľa predpokladov počet pacientov do roku 2040 stúpne celosvetovo v priemere o 200 percent.

Akým spôsobom molekulárne a morfológické zmeny ovplyvňujú neuronálnu aktivitu a spracovávanie informácií v mozgu a vedú ku kognitívnym zmenám pri Alzheimerovej chorobe je neznáme. Rozpoznanie a presná charakterizácia zmien aktivity a funkcie neurónov a neuronálnych sietí je však mimoriadne dôležitá pre poznanie patogenézy neurodegenerácie a prípadnú identifikáciu nových diagnostických a liečebných postupov.

Predložený projekt si kladie za svoj cieľ zmapovať funkčnú architektúru mozgových štruktúr postihnutých neurodegeneráciou pomocou kombinácie elektrofyziológických, zobrazovacích, optogenetických a behaviorálnych techník. Podrobná charakterizácia funkčnej architektúry mozgovej kôry umožní porozumenie transformácie molekulárnej patológie do kognitívnych zmien.

Po ukončení pokusov budú zvieratá uvedené do hlbkej anestézie a po intrakardiálnej perfúzii sa im odoberie mozog. Mozgové tkanivo budú slúžiť pre kontrolu expresie fluorescenčných proteínov a presnú lokalizáciu použitých elektród. Výsledky navrhnutých experimentov môžu viesť k presnej charakterizácii patogenézy neurodegeneratívnych ochorení a následnej identifikácii nových terapeutických, príp. liečebných cieľov.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Informácie získané z ľudského mozgového tkaniva majú často obmedzenú výpovednú hodnotu vzhľadom na veľmi vysokú heterogenitu ľudskej populácie. Aj preto sa čoraz viac využívajú animálne modely, kde je heterogenita významne redukovaná a presne definované typy neurónov, neuronálnych spojov a sietí môžu byť označené, čo umožňuje detailné štúdium aktivity a predovšetkým funkcie mozgových štruktúr počas patogenézy Alzheimerovej choroby. Pre tieto účely budú podľa potreby krížením vytvorené špecifické transgénne hlodavce určené pre konkrétne experimenty. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia anestetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Operačný zákrok	Štandardná metóda. Operácia vykonaná v celkovej inhalačnej anestézii. Bolesť žiadna. Trvanie 20-60 minút.
Zaznamenávanie	Štandardná metóda. Zvieratá sú počas akútnych pokusov v celkovej

elektrofyzilogickej aktivity neurónov in-vivo	inhalačnej anestézii. Bolest' žiadna. Trvanie 1-8 hod. Chronické pokusy budú vykonávané štandardnými metódami určenými pre prácu s imobilizovanými hlodavcami. Bolest' žiadna. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a cca 20s imobilizáciou pri pripájaní aparatury. Trvanie 1-2 hod.
Behaviorálne pokusy	Štandardná metóda. Bolest' žiadna. Trvanie 1-2 hodiny.
Zaznamenávanie neuronálnej aktivity počas behaviorálnych pokusov	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a cca 20s imobilizáciou pri pripájaní aparatury. Bolest' žiadna. Trvanie 1-2 hodiny.

Zohl'adnenie 3R

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

Redukcia: V navrhovaných experimentoch budeme využívať zvieratá z vlastného chovu tak, aby sa minimalizoval počet pokusných zvierat. Transgénne myši a potkany budú krížené iba v počtoch nevyhnutných pre získanie potrebného množstva údajov. Navrhované počty zvierat sú nevyhnutné pre spoľahlivé štatistické vyhodnotenie výsledkov.

Nahradenie: Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v ľudskom mozgu, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané zo živého mozgového tkaniva animálnych modeloch za tie, ktoré pochádzajú z in vitro experimentov. Detailný výskum mechanizmov spracovania a šírenia informácií v neurónoch a neurónových sieťach mozgu, predovšetkým s využitím moderných postupov elektrofyziológie, molekulárnej biológie a genetiky, ktoré vyžadujú priamu manipuláciu s aktivitou alebo genetickou výbavou neurónov, je však možné uskutočňovať iba na pokusných zvieratách.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

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

Utrpenie versus prínos

Príčina Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatií zostáva neznáma. Nad'alej sa pátra po mechanizme ochorenia a po špecifických elektrofyziologických zmenách spojených s patogenézou ochorenia. V tomto ohľade sa čoraz viac využívajú animálne modely, pretože ich variabilita je ďaleko menšia než v ľudskej populácii. Animálne modely tiež poskytujú možnosť použitia najmodernejších postupov molekulárnej biológie pri označovaní a manipulácii aktivity definovaných skupín neurónov, čo nie je možné u ľudí. Vzhľadom k tomu, že mechanizmy spracovania informácií v mozgu sú podobné u väčšiny cicavcov, je možné údaje zistené u laboratórnych zvierat aplikovať na človeka a využiť ich pri vývoji nových diagnostických a terapeutických techník.

Zvieratá v navrhovaných experimentoch nebudú vystavené utrpeniu, všetky operačné zákroky sa uskutočnia v hlbkej anestézii a po ukončení pokusov budú zvieratá humánne usmrtené.

Začiatok pokusu je plánovaný na 08.01.2015 a bude sa realizovať počas nasledujúcich dvoch rokov, do 30.06.2018.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Príloha č. 1

Netechnické zhrnutie projektu: 4441/14-221

Názov projektu:

SLEDOVANIE VPLYVU REDUKUJÚCICH CUKROV A DĹŽKY SKLADOVANIA BIELKOVINOVÝCH PRODUKTOV NA STRÁVITEĽNOSŤ AMINOKYSELÍN A RETENCIU DUSÍKA V TRÁVIACOM TRAKTE OŠÍPANÝCH AKO MODELOVÝCH ZVIERAT PRE HUMÁNNU VÝŽIVU

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): bielkoviny, aminokyseliny, redukujúce cukry, ošípané

Účel projektu * : Aplikovaný výskum

Ciele projektu:

Využitelnosť bielkovín obsiahnutých v potravinách je výrazne závislá na ich tepelnej úprave. Prakticky všetky látky obsahujúce voľnú aminoskupinu môžu byť poškodené tzv. Maillardovou reakciou, ktorá predstavuje rozsiahly komplex zmien a mnohé z nich nie sú ešte dostatočne preskúmané. Podmienkou prvej fázy tejto reakcie je prítomnosť redukujúcich cukrov, ktoré sú bežnou súčasťou receptúr využívajúcich sa pri výrobe potravinových produktov. Redukujúce cukry sa ireverzibilne naviažu na voľné aminoskupiny aminokyselín a tak vzniknú ich deriváty, ktoré sa na prvý pohľad neodlišujú od pôvodných bielkovín a nedajú sa identifikovať ani bežnými analytickými postupmi ako je napríklad klasická analýza aminokyselín, ale sú pre monogastre, ku ktorým patrí aj človek, nevyužiteľné a tým výrazne znižujú kvalitu bielkovinového produktu. K hlavným faktorom, ktoré túto reakciu ovplyvňujú patrí okrem teploty, dĺžky tepelného spracovania, obsahu vody, pH aj dĺžka skladovania.

Cieľom projektu je stanoviť vplyv komplexu zmien počas tepelného spracovania a dĺžky skladovania na využitelnosť bielkovín a ileálnu stráviteľnosť aminokyselín.

Prínos z vykonaného projektu:

Predkladaná práca prinesie nové a jedinečné poznatky z oblasti využiteľnosti aminokyselín z bielkovinových zdrojov s obsahom redukujúcich cukrov, ktoré prešli procesom tepelného

spracovania a ich vplyvu na metabolické a chemické ukazovatele v tráviacom trakte. Overíme či vplyvom obsahu redukujúcich cukrov a dlhodobého skladovania produktov s ich obsahom sa znižuje využiteľnosť aminokyselín v organizme, ako dôsledok tvorby Maillardovej reakcie. Prínos bude aj vo vytvorení odporúčaní vhodných technologických postupov počas spracovania takýchto produktov vo výžive ľudí, tak aby nedošlo k zníženiu využiteľnosti aminokyselín v organizme. Výsledky stanovenej ileálnej stráviteľnosti aminokyselín z bielkovinových zdrojov s obsahom redukujúcich cukrov budú jedinečné.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimente využijeme 7 prasničiek (Biela ušľachtilá x Landras) s priemernou počiatočnou živou hmotnosťou 15-20 kg. Zvieratá budú mať voperovanú T-kanylu v terminálnej časti tenkého čreva.

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

Zvieratá sa zaradia do experimentov po dosiahnutí štandardných hmotnostných parametrov. Na začiatku projektu bude zvieratám chirurgicky vpravená ileálna T-kanyla skúseným kolektívom ktorý operácie úspešne realizuje už niekoľko rokov. Operácie budú robené v celkovej anestézii (tiletamin+ zolazepam /xylazin) spolu s lokálnou anestéziou (mezokaín) na premedikáciu bude použitý atropin. Na zabránenie pociťovania bolesti po operácii budú zvieratám počas piatich dní podávané denne analgetiká (Novasul). So všetkými ošípanými sa bude manipulovať tak, aby sa im nespôsobila zbytočná bolesť, strach a utrpenie. Vyškolený personál má dlhoročné skúsenosti s ošetrovaním kanylovaných zvierat. Počas riešenia projektu bude zvieratám poskytovaná štandardná starostlivosť, ktorú tieto zvieratá vyžadujú (kŕmenie, napájanie, ošetrovanie okolia kanyly – denné čistenie, prevázovanie, natieranie ochranným krémom). V prípade výskytu ochorenia alebo zhoršenia zdravotného stavu ošípaných v projekte budú choré jedince vyradené z postupu a presunuté do karantény experimentálneho chovu kde zmluvný veterinárny lekár rozhodne o ďalšom postupe.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Postup sa vykoná u prasničiek v celkovej a lokálnej anestézii jednorázovo s primeranou analgéziou počas pooperačného obdobia a s adekvátnou pooperačnou starostlivosťou. Navrhovaná klasifikácia krutosti postupu je slabá.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

V dostupných databázach neboli zistené nezvieracie techniky, ktoré by ukazovali na možnosť náhrady zvierat požadovaného druhu v projekte. Ošípaná je najvhodnejšie modelové zviera pre sledovanie ukazovateľov pre humánnu výživu. Podľa doterajších poznatkov neexistuje adekvátna náhrada alternatívnymi metódami na stanovenie sledovaných parametrov.

2. Redukcia počtu zvierat:

V experimente využijeme celkovo 7 ks zvierat s priemernou počiatočnou živou hmotnosťou 15-20 kg. Využitie 7 ks zvierat predstavuje minimálne množstvo, ktoré je vhodné na vykonanie a následné štatistické vyhodnotenie experimentu.

3. Zjemnenie:

Operácie budú vykonávané v celkovej a lokálnej anestézii s následným podávaním analgetík v pooperačnom období. Zvieratá sa zaradia do experimentov po dosiahnutí štandardných hmotnostných parametrov.

Na začiatku projektu bude zvieratám chirurgicky vpravená ileálna T-kanyla skúseným kolektívom, ktorý operácie úspešne realizuje už niekoľko rokov. Operácie budú robené v celkovej anestézii (Zoletil v dávke 4,4 mg/kg /xylazin v dávke 2,2mg/kg) spolu s lokálnou anestéziou (mezokaín v dávke cca 12-20 ml). Na zabránenie pociťovania bolesti po operácii budú zvieratám počas piatich dní podávané denne analgetiká (Novasul). So všetkými ošípanými sa bude manipulovať tak, aby sa im nespôsobila zbytočná bolesť, strach a utrpenie. Zvieratá budú po operácii umiestnené v experimentálnych boxoch kde bude na podlahe umiestnená vyhrievacia podložka. Samotná manipulácia so zvieratami počas experimentu nie

je bolestivá a ani stresujúca. Po ukončení projektu budú zvieratá humánne usmrtené na experimentálnom bitúnku bezprostredne susediacom s laboratóriom.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnického zhrnutia projektu

Názov projektu: Krv ako médium sprostredkujúce toleranciu mozgu po globálnom a fokálnom ischemickom zásahu.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2/0012/15 – 4451/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): ischemia mozgu, kondicionovanie, ischemická tolerancia, krv

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)

Ischemia mozgu predstavuje vážny spoločenský a medicínsky problém, ktorý je na popredných priečkach dôvodu úmrtnosti vekovo staršej populácie a výrazne ovplyvňuje kvalitu života preživších. Aj napriek intenzívnemu výskumu tejto problematiky neexistuje žiadna efektívna terapia vedúca ku zlepšeniu stavu postihnutého. Z dôvodu progresívneho zvyšovania percenta vekovo starších jedincov vrámci populácie sa experimentálny výskum stratégií eliminácie ischemického poškodenia nervového tkaniva stáva vysoko aktuálnym.

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

V prípade experimentálneho potvrdenia našej teórie na dvoch najčastejších modeloch mozgovej ischemie veríme, že rôznorodosť laboratórnych prístupov nám pomôže identifikovať signál zodpovedný za navodenie ischemickej tolerancie. Rovnako predpokladáme, že sa nám podarí spoznať cestu, akou je tento signál prenášaný až na úroveň nervového tkaniva. Táto informácia predstavuje kľúčový bod pre ďalší klinicko-experimentálny výskum. Iba rozlúštenie presného mechanizmu prenosu a akcie faktora navodzujúceho toleranciu umožní aj identifikáciu možných rizík a následné priblíženie konceptu ischemického kondicionovania do klinickej praxe. Výsledky predkladaného projektu by mohli mať nadväznosť na biomedicínsky výskum vo viacerých smeroch. Medzi

najatraktívnejšie by mohli patriť: 1. Použitie kondicionovania ako priamej intervencie u pacientov postihnutých mozgovou príhodou; 2. Krvná transfúzia „tolerantnej“ krvi pacientovi, ktorému nie je možné aplikovať kondicionovanie, prípadne transfúziou zvýšiť či urýchliť efekt kondicionovania u postihnutého; 3. Medikamentózne podanie „signálu“ za účelom aktivácie ischemickej tolerancie; 4. Kondicionovanie v rôznych formách (aj krvná transfúzia) ako nástroj prevencie u ľudí so zvýšeným rizikom výskytu mozgovej príhody; a mnohé iné.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch budú použité laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar, samce v počte 390ks na celú dobu riešenia.

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

Z hľadiska bolestivosti predpokladáme minimálny nepriaznivý vplyv na zvieratá. Operačné procedúry, ktoré budú vykonané skúsenými operatérmi, nevyžadujú hrubý zásah do organizmu a dlhodobú rekonvalescenciu. Z hľadiska prejavov operačných postupov na zvieratách je možné predpokladať krátkodobý vplyv na pamäťové a motorické funkcie.

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)

Ischémia mozgu a postischemická regenerácia sú procesy dynamické, ťažko predvídateľné a závisiace na mnohých faktoroch. Ischemické poškodenie ovplyvňuje organizmus celosystémovo a naopak, ischémiou narušená homeostáza organizmu spätne vplyva na procesy neurodegenerácie v mozgu. Neexistuje žiaden model ischemického poškodenia nervového tkaniva, ktorý by bol schopný zohľadniť celkový pytofyziologický aspekt a ktorý by bol klinicky relevantnejší. Z týchto dôvodov nie je možné uskutočniť dané experimenty alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet 390 ks zvierat bolo stanovené vzhľadom k tomu, že (1) predpokladáme veľkú individuálnu variabilitu výsledkov, z tohto dôvodu plánovaný počet zvierat v skupine je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný pre získanie štatisticky významných výsledkov; (2) experimentálne skupiny uvedené v prílohe č. 1 sú potrebné na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie poškodenia mozgu a krvných parametrov, určenie protektívneho vplyvu kondicionovania a definovanie spôsobu prenosu a identity faktora nesúceho ischemickú toleranciu v organizme; (3) ischémiou poškodené nervové tkanivo nemôže byť použité zároveň na biochemické ako aj histologické a imunohistochemické analýzy.

3. Zjemnenie:

V projekte budú použité samce potkana kmeňa Wistar, čo je štandardný model pre výskum tohto typu. Všetky zákroky, ktoré budú na zvieratách uskutočnené, budú vykonávané skúseným personálom pod celkovou anestézou, t. j. nebudú pre zvieratá bolestivé. Zvieratám po operácii budú podané analgetiká, v prípade potreby aj počas doby prežívania. Zvieratá budú umiestnené v klietke po dvoch jedincoch tak, aby nedošlo k narušeniu ich prirodzeného správania. Po ukončení pokusu budú jedince humanne usmrtené.

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

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Príloha č. 2
Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Odpoveď ischemicky poškodeného mozgového tkaniva na aplikáciu postkondicionéra: štúdium mechanizmov získania ischemickej tolerancie MALDI bottom up proteomickým prístupom.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4452/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): ischemia, reperfúzia, postkondicioning, proteomika, MALDI

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

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

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

Cieľom projektu je proteomická analýza rôzne citlivých bunkových populácií mozgu na ischemicko-reperfúzne poškodenie a po použití rôznych stresorov (kondicionérov) s následnou cieľenou evaluáciou identifikovaných proteínov s prihliadnutím na ich biologické funkcie v bunkách, najmä v rozdielne exprimovaných po ischemii a po podaní postkondicionéra. Unikátna expresia proteínov po aplikácii postkondicionéra bude východiskom pre možnú terapeutickú intervenciu v oneskorenej smrti neurónov po ischemicko-reperfúznom poškodení.

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

Ischemia mozgu spolu s poruchami jeho krvného zásobovania sú na tretej pozícii v príčinách smrti alebo trvalej indispozície a výskum v oblasti mechanizmov neuroprotektie rieši vysoko aktuálnu problematiku z medicínskeho aj socio-ekonomického hľadiska. Ochrana najcitlivejších buniek mozgu voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu prostredníctvom získania ischemickej tolerancie predstavuje v súčasnosti najsilnejšiu známu procedúru pre prevenciu alebo reverzibilizáciu neurodegenerácie. Koncepcia oneskoreného postkondicionovania otvára využitie 2-dňového terapeutického okna medzi ischemickým

atakom a nástupom oneskorenej smrti neurónov v najcitlivejších regiónoch mozgu. Tento pôvodný objav z nášho laboratória však doposiaľ čaká na objasnenie mechanizmov účinku. Poznatky o efekte zachovania a obnovy intracelulárnej proteosyntézy po ischemicko-reperfúznom poškodení a súčasne aj o pôsobení aplikácie postkondicionérov sú zatiaľ limitované a dôkladná proteomická analýza by mohla významným spôsobom prispieť k objasneniu molekulárnych vzťahov. Ischemická tolerancia spôsobuje v poškodených bunkách remodeláciu génovej expresie, a tým je ovplyvňovaná aj následná proteosyntéza, ktorá sa naštartuje pre syntézu špecifických ochranných proteínov. Mapovanie expresie proteínov v mozgu po ischemii a sledovanie zmien po aplikácii rôznych stresorov ako postkondicionérov môže priniesť nové originálne poznatky o mechanizme obnovy resp. zachovaní účinnosti proteosyntetického aparátu, a tým prispieť k identifikácii nielen kritických proteínov, zahrnutých vo vulnerabilite CNS, ale aj k identifikácii protektívnych substancií.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch budú použité laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar, samce v počte 268ks na celú dobu riešenia.

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

Navodenie ischemického poškodenia mozgu podľa štandardného modelu 4-cievneho podvazu sa uskutočňuje chirurgickým zákrokom v celkovej inhalačnej anestéze v prvej fáze na dorzálnnej strane prvého krčného stavca, kde sa cez foramina alares kauterizujú obidve vertebrálne artérie, čo však nespôsobí úplné zastavenie prívodu krvi do mozgu a zvieratá spravidla bez problémov prežívajú. V druhej fáze navodenia ischemie sa uzavrujú na prechodný čas krčnice a zviera upadne do ischemickej kómy. Po uvoľnení sa obe krčnice opäť spriechodnia a zviera sa po čase zotaví bez vonkajších viditeľných známkov poškodenia. Model spôsobí neurodegeneratívne zmeny v najcitlivejších bunkových populáciách v neokortexe, striate a hipokampe, ktoré sa navonok odrazia v správaní zvierat a prejavujú sa ako znížená schopnosť učenia sa ako aj zhoršenie priestorovej pamäti. Injekčná aplikácia tzv. postkondicionérov, čo sú vlastne biologicky aktívne látky normálne sa vyskytujúce v organizme avšak v nižších koncentráciách, spôsobí krátkodobý stres počas podávania a počas prvých hodín po podaní môžu zvieratá prejavovať apatiu resp. zvýšenú citlivosť. Turniketový model postkondicionovania je neinvazívny, zvieratám nespôsobuje bolesť ani poranenie a na zamedzenie stresu sa vykonáva v celkovej inhalačnej anestézii.

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)

Ischemické poškodenie mozgu s následnou reperfúziou a fenomén ischemickej tolerancie sú procesy dynamické, ťažko predvídateľné a závisiace na mnohých faktoroch. Z týchto dôvodov nie je možné uskutočniť dané experimenty alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat. Okrem toho, pokus nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet 268 ks zvierat bol stanovený vzhľadom k tomu, že predpokladáme veľkú individuálnu variabilitu výsledkov, z tohto dôvodu plánovaný počet 10 kusov zvierat v experimentálnych skupinách je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný počet pre získanie štatisticky významných výsledkov s prihliadnutím na úspešnosť modelu, ktorú jeho autori odhadujú ako 50-75%-nú. Skupiny zvierat v postupoch, uvedených v prílohe č. 1 sú nevyhnutné na získanie relevantných výsledkov ako stavu poškodenia, tak aj neuroprotektívnych účinkov podávania postkondicioningu a vývoja ischemickej tolerancie v komplexnom pohľade na mechanizmus účinku. Ischemicky poškodený mozog nemôže byť použitý na biochemicko-proteomické analýzy a zároveň aj na histologické a imunohistochemické analýzy.

3. Zjemnenie:

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

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

§ 40 Netechnické zhrnutie projektu -4453/14-221

Hodnotenie základných farmakodynamických účinkov novosyntetizovaných potenciálnych beta - blokátorov zo skupiny fenyلكarbamátových zlúčenín s inkorporovaným N-fanylpiperazínom

Cieľ postupu

Hlavným cieľom tohto postupu je doplniť účinok štyroch originálnych fenyلكarbamátových zlúčenín s inkorporovaným N-fenylnpiperazínom na izolovanú tracheu, čím sa potvrdí alebo vyvráti ich potenciálny účinok na β_2 - receptory. Jednotlivé látky boli zosyntetizovaných na Katedre farmaceutickej chémie Farmaceutickej fakulty UK.

Očakávaný prínos a ujma

V prípade priaznivých výsledkov na β_2 - receptory by mohli byť tieto látky zaradené do ďalšej fázy štúdií smerujúcich k ich využitiu v humánnej medicíne v terapii hypertenzie a hypertrofi ľavej komory.

Postupy na Wistar zvieratách budú vykonávané v hlbkej anestetéze, pri ktorej zvieratá nebudú pociťovať žiadnu bolesť spojenú s vykonávaním pokusu. Za dostatočnú anestézu, budeme považovať stav, keď po stlačení zadnej labky ("toe pinch") nedôjde k jej reflexnému stiahnutiu. Po skončení postupu, zviera nenadobudne vedomie.

Počet a typ zvierat

Potkany, samce rodu Wistar 40 ks

V predkladanom postupe sa preukázala požiadavka súladu zásad 3R Replacement

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

Reduction

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

Refinement

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

Predkladaný postup nepodlieha spätnému posúdeniu.

Spôsob spoločného využívania orgánov a tkanív z usmrtených zvierat tohto programu

Po usmrtení zvierat sa ich tkanivá a orgány, ktoré nebudú potrebné na účely predkladaného postupu, v prípade záujmu ponúknu pracovníkom katedry Farmakológie a toxikológie UK, za vedeckým prípadne edukačným účelom.

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

Interakcie neurónových štruktúr riadiacich respiračné a kardiomotorické deje u experimentálnych zvierat

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 44 54 / 14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

Kašeľ, Aferentácia, Arytmia, Mikroinjikovanie, Chladová blokáda

Účel projektu * : Základný výskum

Opísať ciele projektu:

Cieľom projektu je objasniť vplyv periférnej stimulácie a centrálnych štruktúr mozgového kmeňa na motorické funkcie kardiovaskulárneho systému a tvorbu/moduláciu respiračných motorických dejov so zameraním na ich interakciu a integráciu. Stimulácia aferentných dráh a vyvolanie reflexných odpovedí alebo ich modulácia (napr. chladovým blokom) prispeje k objasneniu centrálnych mechanizmov riadenia a koordinácie kardiorespiračných motorických dejov. Mikroinjikovaním neuromediátorov, neuromodulátorov príp. centrálnych antitusík budú ovplyvnené vybrané štruktúry mozgového kmeňa a zistí sa význam týchto štruktúr pri vzniku, modulácii a koordinácii respiračných reflexných dejov a ich koordinácia s kardiovaskulárnymi funkciami. Elektrofyziológické experimenty budú vykonané najmä na modeloch anestézovaných spontánne dýchajúcich experimentálnych zvieratách (*mačka 70 jedincov oboch pohlaví a králik 100 jedincov oboch pohlaví*). Počas experimentu budú monitorované a zaznamenané: elektrofyziológické a respiračné parametre, EKG a intenzitné charakteristiky EMG signálov.

Ciele:

Pre relevantné splnenie stanovených cieľov v projekte plánujeme použiť obidva živočíšne druhy (mačka aj králik), nakoľko každý živočíšny druh poskytuje inú vyvolateľnosť sledovaných reflexov v celkovej anestézii.

- 1) Preštudovať vplyv spazmodických reflexných dejov respiračného systému predovšetkým aspiračného reflexu vyvolaného mechanickou stimuláciou nasofaryngu, na experimentálne vyvolanú arytmiu a overiť tak možnosť spazmodických úsilí pri normalizácii vitálnych funkcií a parametre ako sú tlak krvi a frekvencia srdca a iné u anestézovanej mačky a u anestézovaného králika.
- 2) Preštudovať vplyv periférnej modulácie primárne redukovaním vedenia vzruchu (napr. chladením n. vagus a n. laryngeus superior) na kardiorespiračné deje so zameraním na motorické a reflexné deje respiračného systému (eupnea, kašeľ, kýchanie, prehĺtanie) u anestézovanej mačky a u anestézovaného králika.
- 3) Odhaliť vplyv lokálnych zmien v neurónových sieťach regulujúcich kardiorespiračné deje (napr. mikroinjikovaním centrálnych antitusík alebo agonistov a antagonistov neurotransmiterov) vo vybraných oblastiach mozgového kmeňa (primárne pontínna

respiračná skupina) na parametre úsilných respiračných motorických dejov a ich koordináciu so srdcovocievnyim systémom u anestézovanej mačky a u anestézovaného králika.

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

Projekt plynule nadväzuje na naše bohaté a dlhoročné skúsenosti zo štúdia fungovania neurónových sietí mozgového kmeňa pri generovaní respiračných reflexov. V našich predchádzajúcich publikáciách sme ukázali, že spazmodický reflexný dej predovšetkým aspiračný reflex môže resuscitovať mačku z agonálneho štádia keď už vymizli aj lapavé dychy. Preto je predpoklad, že mechanická stimulácia nazofaryngu, ktorá u mačky vyvolá aspiračný reflex, môže normalizovať vitálne funkcie a parametre ako sú tlak krvi a frekvencia srdca. Aspiračný reflex môže resuscitovať mačky, z klinickej smrti zapríčinennej zástavou činnosti srdca na viac ako 3 minúty, čo sa ukazuje ako veľmi efektívny spôsob resuscitácie nakoľko resuscitácia externým defibrilátorom za 3 minúty je nemožná. Mimoriadnu závažnosť ukazuje stav, že zástava činnosti srdca sa vyskytuje až u 300.000 prípadov ročne v USA a EU, z toho prežije len 7 až 10 percent.

Periférna modulácia vedenia vzruchu v n. vagus a n. laryngeus superior chladom, predstavuje vhodný model patologickej aferentácie, čo môže zapríčiniť neadekvátnu tvorbu reflexu a tým aj limitovať obranu a ochranu dýchacích ciest.

Centrálne štruktúry autonómneho riadenia kardiorespiračných dejov sa prekrývajú, resp. výrazne ovplyvňujú pri realizácii reflexných dejov. Zmena bazálnych aktivít zúčastnených neurónov ovplyvňuje integráciu tak periférnych ako aj centrálnych vstupov a tým moduluje tvorbu reflexu. Mikroinjikovanie opioidov potvrdilo ich lokálnu antitusickú aktivitu v NTS a v cVRG, avšak priame pôsobenie centrálnych antitusík na jednotlivé neurónové populácie ostáva nejasné. V projekte

Predpokladané prínosy :

Náš projekt plynule nadväzuje na poznatky získané počas riešenia predchádzajúcich ako aj súčasných grantov. V literatúre je limitovaný počet prác, ktoré sa zaoberajú kvantitatívnou a kvalitatívnou analýzou vplyvov stimulácie nazofaryngu na kardiálne dysrhythmie. Preto sa v projekte zameriame na:

- preštudovanie vplyvu dráždenia aferentných nervových zakončení nazopharyngu u mačiek na experimentálne vyvolané kardiálne dysrhythmie. Keďže u králika je aspiračný reflex slabý a obtiažne vyvolateľný, v projekte sa zameriame na štúdium prípadných efektov stimulácie nazofaryngu bez prítomnosti tohto reflexu resp. bez výraznej motorickej odpovede na stimuláciu na činnosť srdca a experimentálne vyvolanú dysrhythmiu u anestézovaných králikov.

- preštudovanie možného revitalizačného potenciálu aspiračného reflexu, príp. iných motorických dejov u anestézovanej mačky a anestézovaného králika.
- spresnenie mechanizmov vzniku a koordinácie a aplikáciu reflexov dýchacích ciest (predovšetkým aspiračného reflexu) pri modulácii vitálnych funkcií u anestézovanej mačky a anestézovaného králika.

Keďže vplyvy chladovej blokády nervových vlákien na vyvolateľnosť respiračných a nerespiračných reflexov neboli zatiaľ systematicky študované, v projekte sa zameriame na:

- vplyv unilaterálnej a bilaterálnej chladovej blokády n. vagus na kvalitatívne a kvantitatívne parametre reflexu kašľa príp. iných kardiorespiračných dejov u anestézovanej mačky a anestézovaného králika
- vplyv unilaterálnej a bilaterálnej chladovej blokády n. laryngeus superior na kvalitatívne a kvantitatívne parametre reflexu prehĺtania, príp. iných kardiorespiračných dejov u anestézovanej mačky a anestézovaného králika
- v projekte porovnáme rozdiely v modulácii reflexných odpovedí u mačky a králika najmä pri reflexe kýchania, ktorý je u mačky výrazne tlmený anestéziou a reflexoch kašľa a prehĺtania.

Pontínna respiračná skupina sa pravdepodobne podieľa na supresii dýchania prostredníctvom opioidných mechanizmov a pravdepodobne významne participuje na tvorbe kašľa a aspiračnom reflexe. V našom projekte:

- získame poznatky o účinkoch modulácie neurónov Varolovho mosta neuroaktívnymi látkami (napr. kodeínom) ich mikroinjikovaním do pontínnej respiračnej skupiny na kašeľ, prípadne iné respiračné reflexy (expiračný reflex, reflex prehĺtania, zvracania a pod.)
- kvalitatívne a kvantitatívne analyzujeme koordináciu respiračných a kardiovaskulárnych odpovedí po modulácii neurónových okruhov v pontínnej respiračnej skupine.
- v projekte porovnáme rozdiely v modulácii reflexných odpovedí u mačky a králika najmä pri reflexe kýchania, ktorý je u mačky výrazne tlmený anestéziou a reflexoch kašľa a prehĺtania.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Králik domáci – 100 ks

Mačka domáca – 70 ks

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

Uvedené postupy budú vykonané v celkovej anestézií, pričom budú monitorované všetky parametre (teplota zvierťaťa, počet dychov, tlak krvi, saturácia krvi kyslíkom) pre minimalizovanie nepriaznivých vplyvov počas projektu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Anestézované jedince – bez možnosti zotavenia

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Projekt nie je možné vykonať bez použitia zvierat. Uvedený projekt nie je možné nahradiť simulačným systémom, pretože zatiaľ vhodný simulačný systém nahradzujúci variabilitu a jedinečnosť živého systému neexistuje.

Komplexné neurónové funkcie a odpovede organizmu sa dajú v súčasnosti študovať len na živom jedincovi alebo obmedzene s použitím modelových a simulačných techník. Počítačové modelovanie je však závislé od experimentálnych dát. Obidve tieto metódy budú použité v našom projekte. Pre komplexné reflexné odpovede z respiračného traktu (prakticky je zapojený celý organizmus) nie sú metódy práce s izolovaným orgánom, tkanivom, či jednotlivou bunkou bez zahrnutia celého individua aplikovateľné.

Mačka domáca a králik domáci sú vhodné laboratórne zvieratá, ktoré sa využívajú v experimentálnych štúdiách obranných reflexov dýchacích ciest. Predovšetkým behaviorálne a centrálné mechanizmy týchto dejov sú najlepšie preskúmané u uvedených druhov a predstavujú najlepšiu variantu pre transláciu výsledkov na človeka. Veľkosť mačky a králika umožňuje také experimentálne postupy, ktoré nie je možné spoľahlivo v našich podmienkach vykonávať u morčiat.

Počítačové modelovanie bude uplatnené tak pri plánovaní pokusov (predikcia), ako aj pri interpretácii a uplatnení získaných výsledkov (validácia a spresnenie modelov).

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Na získanie platných výsledkov použijeme namiesto 30-40 zvierat len 23/rok, pretože sa predpokladá že na každom zvierati uskutočníme viac ako jeden projektový protokol. Takýto počet je nutný pre existujúcu biologickú variabilitu, ktorá by v prípade použitia nižšieho počtu pokusných zvierat mohla viesť k nereprodukovateľným výsledkom. Uvedená metodika redukuje počet pokusných zvierat. Jednotlivé projekty na anestézovaných zvieratách budú vykonané na najnižšom počte jedincov tak, aby bol výsledok pokusu štatisticky hodnotiteľný a dáta získané z pokusu relevantné. Naše dlhoročné skúsenosti potvrdzujú minimálny počet jedincov v jednej sérii 6 až 8 jedincov. Zvýšenú efektívnosť ako aj minimalizovanie nutného počtu jedincov v projekte dosiahneme: 1) vykonaním viacerých schválených protokolov na jednom zvierati, v poradí od najjednoduchšieho (najmenej invazívneho) po najzložitejší, 2) využitím počítačového modelovania v postupoch a v plánovaní, kde je to aplikovateľné.

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)

Mačka je druh mnoho desaťročí využívaný v neurologickom výskume, odolný, dobre monitorovateľný. Je dostupné značné množstvo dát o neurónových funkciách pri dýchaní, adaptačných respiračných odpovediach, ale aj pri kašli, kýchaní, prehĺtaní atď. Všetky predpokladané skúmané deje sú u mačky vyvolateľné a dobre opísané.

Králik je druh v porovnaní s mačkou menej odolný a ťažšie monitorovateľný. Taktiež je dostupné množstvo dát potrebných pre predmet nášho výskumu, najmä o neurónových funkciách pri dýchaní a kašli. Všetky skúmané deje sú vyvolateľné, najmä reflex kýchania. Existujú rozdiely v centrálnej regulácii voči mačke. Pre jedince použité v terminálnom pokuse sa minimalizuje stres ich sedáciou a enestézovaním priamo vo zverinci. Pred podaním anestetika sa zvierať premedikujú podaním diazepamu, rovnako ako pacienti pred operáciou, čo zabezpečí hladší priebeh úvodu do anestézy a minimalizuje stres, ku ktorému by mohlo dochádzať počas podávania anestetika intraperitoneálne. Uplatňujú sa všetky postupy na optimálny monitoring funkcií a parametrov jedinca. Po ukončení tejto časti pokusu sú zvieraťá humánne usmrtené predávkovaním anestetika.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno nie