

## Netechnické zhrnutie projektu:

**Názov projektu:** Ovplyvnenie funkcie ovariálneho štetu po autotransplantácii

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 982/15-221

**Kľúčové slová v projekte ( max 5 slov):** ovariálny graft, autotransplantácia, neoangiogenéza

**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:

Myšlienka transplantácie ovariálneho tkaniva nie je nová, popísaná bola už v roku 1906. Ale až súčasné možnosti kryoprezervácie ovariálneho tkaniva a vývoj nových metodík ortotopickej aj heterotopickej transplantácie rozmrazeného ovariálneho tkaniva, priniesli nové možnosti na tomto poli medicíny. Banky ovariálneho tkaniva sa stávajú samozrejmosťou v štátoch s dobre fungujúcimi centrami reprodukčnej medicíny. Do súčasnosti bolo vykonaných asi 30 autotransplantácií ovariálneho tkaniva, ktoré viedli k narodeniu ôsmich zdravých novorodencov, čo sú veľmi povzbudivé údaje.

Napriek týmto pokrokom, stále zostáva veľa nevyriešených otázok. Experimentálne štúdie dokázali významný pokles počtu primordiálnych folikulov v ovariálnom transplantáte, čo je pravdepodobne spôsobené hypoxiou vo fáze, pokiaľ nedôjde ku revaskularizácii kortikálneho tkaniva. Táto strata primordiálnych folikulov podľa niektorých autorov dosahuje 50 – 65% celkového počtu, podľa iných autorov až 90% folikulov. Stále zostávajú otvorené možnosti zlepšenia techník transplantácie ovariálneho tkaniva. Predovšetkým sú potrebné štúdie sledujúce revaskularizáciu

transplantovaného tkaniva, s cieľom znížiť počet folikulov, ktoré odumierajú počas prvých hodín po transplantácii v dôsledku ischémie.

Ku revaskularizácii graftu prispieva tak angiogenéza zo strany hostiteľa, ako aj angiogenéza graftu, a práve jej ovplyvnenie by mohlo zlepšiť perfúziu graftu s cieľom skrátenia avaskulárneho obdobia. Terapeutická indukcia angiogenézy sa tak stáva možným miestom zásahu na zlepšenie funkcie ovariálneho transplantátu.

Van Eyck et al. nedávno publikovali štúdiu sledujúcu tkanivové pO<sub>2</sub> v ľudskom ovariálnom xenografe s použitím elektrónovej paramagnetickej rezonančnej oxymetrie, ktorá dovoľuje senzitívne, neinvazívne a opakované meranie pO<sub>2</sub> v tkanive in vivo. Pred 5. dňom od transplantácie bol transplantát vystavený hypoxii, od 5. do 10. dňa došlo ku progresívnej reoxygénácii, čo podporovalo fázu intenzívnej revaskularizácie graftu. Od 5. dňa bola reperfúzia zabezpečovaná angiogenézou príjemcu, prenikaním novovznikajúcich ciev z periférie. 10. deň po transplantácii už k revaskularizácii transplantátu prispievali aj novovznikajúce cievy graftu vyrastajúce z centra transplantátu.

Nízky pO<sub>2</sub> v tkanive po transplantácii pravdepodobne indukuje angiogenézu up-reguláciou angiogénneho VEGF, ktorý je jedným z najdôležitejších faktorov v rámci transplantácie ovariálneho tkaniva, jeho krvného zásobenia a tým aj prežívania folikulov. Regulácia ovariálnej angiogenézy je však komplexným procesom, do ktorého je zapojených množstvo vazoaktívnych a angiogénnych mediátorov, zahŕňajúcich aj VEGF, FGF a angiopoetín. Experimentálne štúdie sledujúce expresiu VEGF dokázali, že rozvoj aktívnej angiogenézy v zmrazenom/rozmrazenom ovariálnom tkanive po transplantácii môže zabezpečiť podobnú prežívateľnosť transplantátu ako v prípade čerstvého graftu.

V posledných rokoch sa stále viac dostávajú do pozornosti ne-antikoagulačné účinky heparínu a ďalších glykozaminoglykánov. Štrukturálne rozdiely medzi jednotlivými nízkomolekulárnymi heparínmi (LMWH) vedú aj k rozdielom v ich farmakologickom a biologickom profile, v závislosti od procesu ich výroby. Objavili sa tak významné účinky heparínu a LMWH nielen na proces trombózy, ale aj na zápalové procesy a angiogenézu, a tieto ich vplyvy sa v súčasnosti podrobne sledujú. Angiogenéza je modifikovaná a ovplyvňovaná viacerými rastovými faktormi, pričom heparín ovplyvňuje väčšinu z nich. Väčšina účinných endogénnych pro- a antiangiogénnych rastových faktorov sú heparín-viažúce proteíny, ktoré môžu byť ovplyvnené systémovou aplikáciou heparínu. Heparín, ako aj ďalšie proteoglykány, hrajú významnú rolu vo funkcii vaskulárnych endotelových buniek, a rovnako sú aj schopné modulovať aktivitu angiogénnych rastových faktorov podporovaním interakcie s ich receptorom a receptorovou aktiváciou.

## **Prínos z vykonaného projektu**

Na Slovensku ešte nebola vykonaná tkanivová transplantácia ovariálneho graftu. Vzhľadom na odsúvanie tehotenstiev do vyšších vekových skupín, ako aj stále lepšiu prežívateľnosť pacientov po onkologických ochoreniach však pribúda skupina pacientov, u ktorých neexistuje iná možnosť zachovania fertility okrem transplantácie ovariálneho štepu. Prvotná ischemizácia štepu však zničí veľkú časť folikulov transplantátu. Zlepšenie prežívateľnosti štepu, ako aj lepšie využitie ovariálneho transplantátu pre klinické účely by reálne mohli týmto pacientom umožniť zachovať si svoju reprodukčnú funkciu aj po agresívnej onkologickej liečbe.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:** v experimente budú použité samice potkana druhu Sprague-Dawley v počte kusov 126. V každej skupine bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat – 7 ks. Celkovo bude vytvorených 18 skupín, ktoré budú porovnávané vzájomne medzi sebou.

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

Počas sledovaného obdobia nebude bránené zvieratám v prirodzenom správaní. Budú dodržané štandardy chovu, umiestnenia a starostlivosti. U zvierat bude realizovaný operačný zákrok v celkovej inhalačnej anestézii s adekvátnou analgéziou. Po výkone budú zvieratá vyrušované len z dôvodu aplikovania liekov. Dôsledne bude monitorovaný zdravotný stav zvierat.

**Predpokladaná úroveň krutosti:** Vzhľadom na to, že perioperačne budú zvieratá pociťovať len krátkodobú strednú bolesť predpokladáme strednú úroveň krutosti.

## **Uplatňovanie zásad 3R**

### **1. Nahradenie zvierat:**

Samotná myšlienka transplantácie a autotransplantácie nutne vyžaduje využitie experimentálneho animálneho modelu. Jedine na živom animálnom modeli možno hodnotiť neovaskularizáciu ovariálneho štepu po autotransplantácii. Použitie zvierat je na takýto typ výskumu nutné.

### **2. Redukcia počtu zvierat:**

Vzhľadom na rozloženie experimentálnych skupín bude použitý minimálny počet zvierat v každej skupine –  $n=7$ , ktorý ešte stačí pre štatistické vyhodnotenie.

### **3. Zjemnenie:**

Výber druhu laboratórneho zvieratá sa opiera o mnohé vedecké práce z odboru experimentálnej chirurgie, ktorý detailne aplikuje poznatky o rozvoji a patogenéze zmien prebiehajúcich pri jednotlivých chorobných stavoch. Aplikácia a translácia stavov z klinickej medicíny do

experimentálnych podmienok predstavuje základnú jednotku výskumu v tejto oblasti. Redukcia stresu, utrpenia a bolesti bude zabezpečená na podklade aplikácie anestetík a analgetík v perioperačnom období ako aj pooperačnom období, aby bol čo v najvyššej možnej miere eliminovaný distress zvierat.

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

## Netechnické zhrnutie projektu:

### Názov projektu:

*Vplyv očnej roztokovej instilácie "JODID DRASELNÝ A SODNÝ 2 % UNIMED PHARMA" na rekurentné infekcie predného segmentu oka vyvolané Herpes simplex vírusom typ 1 v králičom okulárnom modeli.*

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 985/15-221

### Kľúčové slová v projekte ( max 5 slov):

Herpes simplex vírus-1, HSV-1, herpetická keratitída, králiky, antivírusový účinok

**Účel projektu** \* : v záujme dosiahnutia ktoréhokoľvek z cieľov uvedených v písmene b) pri vývoji, výrobe alebo testovaní kvality, účinnosti a bezpečnosti liekov, potravín, krmív a iných látok alebo výrobkov,

### Ciele projektu a prínos z vykonaného projektu:

Herpes simplex vírus-1 (HSV-1) je jedným z najrozšírenejších vírusov v ľudskej populácii, čo je výsledkom jeho schopnosti navodenia latentnej infekcie v senzorických neurónoch, následnej reaktivácie vírusu z latencie vedúcej k rekurentnej infekcii a prenosu na nového hostiteľa (Thompson *et al.*, 2013). HSV-1 vyvoláva rôzne ochorenia, od menej závažného herpes labialis, gingivostomatitídy a genitálneho herpesu, až po epiteliálnu a stromálnu keratitídu, často vedúcu k infekčnej slepote, a život ohrozujúcu encefalitídu. Zatiaľ nie je dostupná žiadna účinná vakcína, ktorú by bolo možné používať v klinickej praxi (Al-Dujaili *et al.*, 2011).

Primárna infekcia HSV-1, prejavujúca sa typickými orofaryngeálnymi pľuzgierikmi, sa najčastejšie vyskytuje v detskom veku (avšak zriedka pred 6-tým mesiacom života) a v skorej adolescencii. Vírus sa prenáša po kontakte s infekčnými léziami a/alebo slinami (Tullo, 2003). Po primárnej replikácii nasleduje fáza latentnej infekcie s prípadnými fázami reaktivácie vírusu. Reaktivácia vírusu nemusí byť sprevádzaná typickými klinickými manifestáciami a ochorením. Najčastejším ochorením, ktoré vzniká pri lytickej infekcii HSV-1, je herpes labialis, pri ktorom sa vírus replikuje v mukóznom tkanive orofaciálnej oblasti. Infekcia mozgu vedie k herpetickej encefalitíde, ochoreniu, ktoré môže spôsobiť doživotné neurologické poškodenie a je charakteristické vysokou mortalitou (Al-Dujaili *et al.*, 2011).

Okrem encefalopatií a orofaciálnych infekcií, HSV-1 spôsobuje tiež očné infekcie, kedy sa replikuje v oblasti viečok (ochorenie sa nazýva blefaritída), spojiviek (konjunktivitída), cievovky (uveitída, ktorá je často asociovaná s keratitídou), sietnice (retinitída), rohovky (keratitída) a okolitej kože (dermatitída) (Rowe *et al.*, 2013; Al-Dujaili *et al.*, 2011). Replikácia vírusu v okulárnom tkanive

môže tiež vyvolať diskretný zápal predného oka (trabekulitídu), zápal očného bielka (skleritídu) a zelený zákal (glaukóm) (Bodh *et al.*, 2011).

HSV-1 sa replikuje v epiteliálnych bunkách rohovky omnoho účinnejšie a rýchlejšie než v keratinocytoch a v endoteliálnych bunkách. Primárna infekcia keratinocytov strómy rohovky je pomalý proces, zatiaľ čo rekurentná infekcia má zvyčajne omnoho vážnejší priebeh a je charakteristická dlhodobou prítomnosťou zápalového infiltrátu. Až 98% primárnych okulárnych infekcií vyvolaných HSV-1 nie je identifikovaných z dôvodu subklinických príznakov, alebo sú tieto bez zvýšenej pozornosti diagnostikované ako mierna konjunktivitída. Okulárny herpes je unilaterálny, len vo vzácných prípadoch je rekurentná infekcia bilaterálna. Skoré vyvinutie bilaterálneho rekurentného očného herpesu je vysoko pravdepodobné v prípade, že primárna infekcia oka sa prejavuje výraznými klinickými manifestáciami. Primárna bilaterálna herpetická keratitída sa môže plne vyvinúť u pacientov so systémovými ochoreniami, ako je atopické ochorenie, malignancie alebo u pacientov liečených imunosupresívami (Tabbara a Al Balushi, 2010).

Očné infekcie vyvolané HSV-1 sú najčastejšie výsledkom reaktívácie vírusu, ktorý navodil latenciu v trigeminálnom gangliu (taktiež nazývané Gasserovo ganglion) (Rowe *et al.*, 2013). Vírus môže navodiť latenciu aj v rohovke (Sundmacher, 2009). Medzi rizikové faktory aktivujúce reaktíváciu vírusu patrí stres, UV žiarenie, menštruácia, vysoká horúčka, užívanie kortikosteroidov a traumatické ochorenie.

Dostupná antivírusová liečba je zameraná len na lytickú replikáciu vírusu a nezabráni vírusu navodiť latentnú infekciu. Z toho dôvodu nie je zatiaľ možné predísť reaktívácii vírusu a jeho následnej replikácii (Sundmacher, 2009). Orofaciálne lézie môžu byť liečené topikálnym krémom obsahujúcim liečivo penciklovir alebo acyklovir (ACV). Encefalitída je liečená ACV a pre liečbu herpetickej keratitídy sa podávajú očné kvapky s obsahom trifluorotymidínu (trifluridín, TFT) (Elbadawy *et al.*, 2012). Pokiaľ je infikované len jedno oko, väčšinou sa podáva Zovirax® (ACV). Pre bilaterálne infekcie sa aplikuje krém Virgan® (ganciklovir). Na Slovensku je jediným schváleným liečivom používaným na liečbu herpetickej keratitídy očná masť s 3% obsahom ACV. Liečivami druhej a tretej voľby sú prednizolon acetát a fluorometolon (Kozub a Šimaljaková, 2008).

Užívanie týchto antivirov môže mať aj nežiaduce účinky, najmä u pacientov s precitlivosťou na aktívnu látku. Liečba Virgan® gélom by preto nemala byť dlhšia ako 21 dní a neodporúča sa používať toto liečivo u detí. Rovnako Zovirax® masť by nemala byť podávaná dlhšie ako 10 dní. Ak sa obe liečivá užívajú dlhšie, môžu mať toxické účinky na epiteliálne bunky, okrem toho je vysoké riziko vzniku vírusovej rezistencie na liečivo. Navyše Zovirax® masť môže ovplyvniť aj vizuálnu schopnosť liečených pacientov.

Aj keď sú dostupné antivirové liečivá používané v liečbe HSV-1 infekcií účinné, je nevyhnutné študovať ďalšie dostupné možnosti liečby, a to najmä v prípade závažných rekurentných ochorení. Navyše, v Európe nie je v klinickej praxi používané žiadne liečivo v podobe očných kvapiek, ktoré sú pre pacientov prijateľnejšou formou z hľadiska aplikácie a znášania.

Keďže nie je dostupná žiadna vhodná bunková línia, ktorá by poskytovala reálny a komplexný obraz všetkých imunitných interakcií medzi vírusom a hostiteľom v procese reaktívácie a vyvolania ochorenia, je nevyhnutné v našich experimentoch použiť zvierací model. Najčastejšie používanými zvieracími modelmi pre štúdium latencie, reaktívácie z trigeminálneho ganglia a rekurentnej infekcie HSV-1 je novozélandský králik (NZW) (*Oryctolagus cuniculus*) (Al Dujaili *et al.*, 2011). U králikov sú časté spontánne reaktívácie (~35%), prípadne tieto môžu byť indukované chemickým poškodením (epinefrin) alebo mechanickým poškriabaním rohovky injekčnou ihlou (Rowe *et al.*, 2013). Lézie na rohovke, ktoré vznikajú replikáciou vírusu, sú u králikov ľahko vizualizovateľné a počítateľné. Ďalšou

výhodou je, že z králikov možno získať väčší počet vzoriek tkaniva a slznej tekutiny (Webre *et al.*, 2012). Príznaky epiteliálnej keratitídy perzistujú dlhšie v králikoch než v myšiach, čo je vhodné pre štúdium terapeutického účinku rôznych antivírusových látok (Rowe *et al.*, 2013). Králiky sa často používajú ako modelový organizmus pre štúdium herpetickej keratitídy z dôvodu, že (i) existuje veľa podobností medzi králičím a ľudským imunitným systémom v mukóznom tkanive oka a v lymfoidnom tkanive asociovanom so spojivkou, (ii) a priebeh a príznaky rekurentnej herpetickej stromálnej keratitídy a herpetickej keratokonjunktivitídy je podobný ako u ľudí (Dasgupta a BenMohamed, 2011).

V predchádzajúcich experimentoch sme detegovali antivírusový účinok prípravku “JODID DRASELNÝ A SODNÝ 2 % PF na replikáciu HSV-1 *in vitro* (testovali sme mierne patogénny kmeň K17 a vysokopatogénny kmeň ANGpath). Antivírusový účinok látky sme pozorovali nezávisle od spôsobu podania látky a od času podania (bunky boli liečené v čase infekcie vírusom a/alebo 2 hodiny po infekcii). V prípade kmeňa K17 sme detegovali zníženie titra vírusu o 3 logaritmy, v prípade kmeňa ANGpath až o 4 logaritmy. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že “JODID DRASELNÝ A SODNÝ 2 % UNIMED PHARMA®” je vhodným kandidátom pre klinické využitie ako profylaktické liečivo s adjuvanými účinkami v liečbe očných infekcií spôsobených HSV-1, akútnej a chronickej nehnisajúcej konjunktivitídy, blefaritídy a nehnisajúcej keratitídy.

Cieľom tejto predklinickej štúdie je otestovať terapeutický a preventívny antivírusový účinok očných kvapiek “JODID DRASELNÝ A SODNÝ 2 % UNIMED PHARMA®” v liečbe rekurentnej epiteliálnej keratitídy vyvolanej HSV-1 *in vivo* na zvieracom modeli králika.

Z týchto dôvodov má projekt vysoký potenciál prínosu výsledkov pre medicínsku prax.

#### **Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

Králik, hybrid NZB, samec, 2,5-3kg, 20 ks

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

Plánované experimenty: navodenie latentnej infekcie zaradíme do kategórie krutosti postupov „slabé“, keďže králiky budú infikované nakvapkaním malého množstva vírusovej suspenzie na rohovku v ľahkej anestézii a dávka vírusu nespôsobí zvieratám, okrem slabej keratitídy, žiadne závažnejšie zdravotné komplikácie. Aplikácia skúšaného liečiva patrí tiež do kategórie „slabé“ krutosti postupov, keďže bude aplikovaná iba dvakrát denne po jednej kvapke (30 µl) do spojivkového vaku. Intramuskulárne podanie anestézie je tiež neinvazívny zásah do organizmu. Jediný invazívnejší zákrok, ktorý zvieratá podstúpia je podráždenie rohovky jemným poškrabaním za účelom vyvolania reaktívacie latentného vírusu, avšak tento úkon by nemal žiadnym závažným spôsobom zhoršiť zdravotný stav zvierat a preto je klasifikovaný do kategórie krutosti postupov „slabé“.

Ani v jednom štádiu pokusu nebudú mať zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prísun potravy a vody. Zvieratá budú umiestnené v klietkach (1 ks v jednej klietke) s vlastnou ventiláciou a označované budú individuálnymi záznamovými kartami. Na konci experimentov budú zvieratá humánne usmrtené.

## Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Podľa Prílohy č. 4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z., Oddiel III, v rámci tejto štúdie podávame jedinou testovanú látku (bod 1b) povrchovo – aplikáciou do spojivkového vaku v množstve 30 mikrolitrov (bod 1d a f). Infekcia do rohovky a vyvolanie reaktivácie vírusu podráždením rohovky tiež patrí medzi „slabé“ úrovne krutosti – zodpovedá bodu 1d. Odber vzoriek – výtery z oka sú minimálnym zásahom do komfortu zvierat, vykonávajú sa dvakrát denne pred podaním testovanej látky pomocou sterilnej výterovej sady.

## Uplatňovanie zásad 3R

### 1. Nahradenie zvierat:

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

Odozva organizmu na latentnú infekciu a reaktiváciu HSV-1, najmä ak sa sleduje reakcia organizmu na herpetickú keratitídu, je komplexný proces, na ktorom sa podieľa veľa hostiteľských faktorov a práve preto sa v tomto prípade nedá „*in vivo*“ nahradiť bunkovými kultúrami. Okrem toho štúdium reaktivácie, vyvolania herpetickej keratitídy a následného antivírusového účinku študovanej látky na bunkových kultúrach nezohľadňuje významný činiteľ ovplyvňujúci tieto procesy, a to je imunitný systém hostiteľa.

### ***Podľa zoznamu registra alternatívnych metód z European Centre for the Validation of Alternative Methods:***

[ecvam.jrc.it/-2k](http://ecvam.jrc.it/-2k); [ecvam.jrc.it/publication/MAB\\_statement.pdf](http://ecvam.jrc.it/publication/MAB_statement.pdf);

[ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/-2k](http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/-2k); [http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/conf\\_2006.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/conf_2006.htm);

<http://tsar.jrc.ec.europa.eu/>;

[http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/publication/epaa\\_workshop\\_wg3.pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/publication/epaa_workshop_wg3.pdf);

analýza patogenézy latentnej infekcie spôsobenej herpes simplex vírusom-1 ***nie je možná*** bez modelového systému a je nevyhnutné použiť vhodný zvierací model. V tomto prípade je možné použiť králik.

Vzhľadom na nevyhnutnosť použitia laboratórnych zvierat sa v projekte sleduje a uplatňuje najnovšia legislatíva v súvislosti so smernicami o použití zvierat na vedecké účely, ktorú uzákonil Európsky parlament vo forme revidovanej smernice 2010/63/EU o zvieratách používaných na vedecké účely, ktorá nadobudla účinnosť 1. januára 2013, ako aj Nariadenie Vlády Slovenskej republiky zo 14. novembra 2012, ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely (Zbierka zákonov č. 377/2012) a Vyhláška č.436/2012 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky zo 14. decembra 2012, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o požiadavkách na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely.

Nové právne predpisy prísne dbajú na dodržiavania pravidiel troch R (replacement, reduction, refinement) (t.j. nahradenie, obmedzenie a zmiernenie testov na zvieratách), t.j. aby sa minimalizoval počet zvierat používaných na pokusy a aby sa vždy, keď je to možné,

využívali alternatívne metódy, a aby sa v prípade, keď nie je možné použiť alternatívne metódy, zlepšili a zjemnili metódy v postupoch, pri ktorých sa odstráni alebo obmedzí na najnižšiu mieru bolesti, utrpenie, strach alebo trvalé poškodenie zvierat.

## 2. Redukcia počtu zvierat:

Pre štatistickú reprodukovateľnosť výsledkov a na základe našich dlhoročných skúseností je potrebné, aby každá vyšetrovaná skupina obsahovala 5 ks králikov. Plánovaný počet zvierat (20 ks) je konečný a zahŕňa všetky variácie postupov. Samozrejme, našou snahou je použiť čo najmenší možný počet pokusných zvierat, čo sa aj odrazilo v minimalizovaní počtu kontrolných skupín (1).

Základný (minimálny) dizajn postupov: Budeme mať štyri základné skupiny králikov: 1) králiky infikované HSV-1, 2) králiky infikované HSV-1 a profylakticky liečené ešte pred nástupom rekurentnej infekcie, 3) králiky infikované HSV-1 a terapeuticky liečené po vypuknutí rekurentnej infekcie, a 4) skupinu kontrolných, neinfikovaných králikov. Každá skupina bude zložená z 5 králikov.

## 3. Zjemnenie:

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

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

Navodenie latentnej infekcie zaradíme do kategórie krutosti postupov „slabé“, keďže králiky budú infikované nakvapkaním malého množstva vírusovej suspenzie na rohovku v ľahkej anestézii a dávka vírusu nespôsobí zvieratám, okrem slabej keratitídy, žiadne závažnejšie zdravotné komplikácie. Aplikácia skúšaného liečiva patrí tiež do kategórie „slabé“ krutosti postupov, keďže bude aplikovaná iba dvakrát denne po jednej kvapke (30 µl) do spojivkového vaku. Intramuskulárne podanie anestézie je tiež neinvazívny zásah do organizmu. Jediný invazívnejší zákrok, ktorý zvieratá podstúpia je podráždenie rohovky jemným poškrabaním za účelom vyvolania reaktívacie latentného vírusu, avšak tento úkon bude vykonaný v ľahkej anestézii a nemal by žiadnym závažným spôsobom zhoršiť zdravotný stav zvierat a preto je klasifikovaný do kategórie krutosti postupov „slabé“.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:                      áno    nie

## **Netechnické zhrnutie projektu**

### **Názov projektu:**

Prepojenie medzi  $\text{Ca}^{2+}$  dysreguláciou a oxidačným stresom s dopadom na odumieranie kardiomyocytov nekroptózou.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1034/15-221

**Účel projektu:** základný výskum

### **Cieľ projektu**

Cieľom projektu je sledovať mieru odumierania kardiomyocytov regulovanou nekrózou so zameraním na signálnu dráhu zahrňujúcu  $\text{Ca}^{2+}$  overload a nadmiernu produkciu reaktívnych foriem kyslíka.

### **Prínos z vykonaného projektu:**

Mechanizmy novo-popísanej bunkovej smrti v srdcovom tkanive sú kompletne neznáme. Nie je jasné akým spôsobom je táto bunková smrť iniciovaná, a tiež nie je objasnené, ktoré deje sú zodpovedné za jej exekúciu. Literárne zdroje pojednávajúce o tejto oblasti v nekardiálnom tkanive naznačili úlohu mitochondriami generovaných reaktívnych foriem kyslíka a poruchu iónovej homeostázy. V našich navrhovaných experimentoch sa chceme zamerať na konkrétne  $\text{Ca}^{2+}$  proteíny regulujúce  $\text{Ca}^{2+}$  hladinu v kardiomyocytoch a oxidačný stres, ktoré vedú k aktivácii CaMKII, a následne môžu sprostredkovať regulovanú nekrózu. Týmto by sme chceli i) objasniť relevanciu parciálnych mechanizmov –  $\text{Ca}^{2+}$  overloadu a oxidačného stresu, ako aj ich prepojenie vzhľadom na aktiváciu CaMKII a tiež ii) zistiť, či použitím farmakologických modulátorov je možné mieru odumierania kardiomyocytov limitovať. Prínos navrhovaného projektu je na úrovni patologickej a farmakologickej; môže priniesť originálne poznatky pre experimentálnu kardiológiu.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty :** Potkany, samce rodu Wistar, počet 100

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

So zvieratami sa bude humánne manipulovať; pred podaním celkovej anestézy sa oboznámia s prostredím, kde im bude aplikovaná i.p. anestéza. Samotné podanie anestézy budú vykonávať školení pracovníci, ktorí majú skúsenosti s aplikáciou látok rôznymi aplikačnými cestami. Keďže budeme aplikovať anestézu s ultrarýchlym nástupom účinku a v dostatočnej koncentrácii, zvieratá upadnú do rýchleho ireverzibilného bezvedomia.

### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

bez možnosti zotavenia

## Uplatňovanie zásad 3R

### 1. Nahradenie:

V tomto type experimentov nie je odporúčané použiť bunkovú líniu neonatálnych buniek h9c2 z dôvodu diferenciálnej expresie proteínov v porovnaní s primárnymi izolovanými kardiomyocytmi, čo môže mať vplyv na  $\text{Ca}^{2+}$  reguláciu a priebeh experimentov. Rovnako fakt delenia buniek h9c2 by mohol ovplyvniť hodnotenie životaschopnosti. Práve takáto negatívna interferencia by mohla spôsobiť nesprávne interpretovanie patologických dejov a tiež účinkov použitých farmakologických modulátorov. Jedná sa o originálne experimenty, ktorých interpretácia a výstup pre experimentálnu patológiu/farmakológiu si vyžaduje čerstvé natívne bunky izolované zo srdca laboratórnych potkanov. Počítačové simulácie nemôžu byť tiež použité ako alternatíva.

### 2. Obmedzenie:

Počet zvierat bude zvolený tak, aby sme mohli výsledky štatisticky vyhodnotiť a súčasne aby sme zabránili ich zbytočnému plytvaniu. Vezmeme do úvahy vplyv cirkadiálnych rytmov, sezónnych zmien, tak aby sa predišlo nehomogenite výsledkov a potrebe ďalších opakovaní. Z jednej úspešnej izolácie je možné bunky rozdeliť na priemerne 3 vzorky za účelom ďalšieho spracovania v závislosti od veľkosti srdca a efektivity izolácie. Toto rozdelenie bude urobené systematicky s ohľadom na špecifiká následných metodík. Keďže je plánovaných 6 skupín za bazálnych podmienok a 6 skupín po ischémii a reperfúzii, spolu 12 skupín, a do každej skupiny za predpokladu úspešnej izolácie je nutné použiť 5 zvierat, maximálny počet zvierat by bol  $12 \times 5$ , t.j. 60. Na zavedenie metodiky počítame s max. 20 potkanov. Keďže úspešnosť izolácie kardiomyocytov je vysoko citlivá na podmienky experimentov je treba tiež zobrať do úvahy, že aj napriek zvládnutiu metodiky môže dôjsť k zlyhaniu izolácie. Preto budeme počítat s rezervou 20-tich potkanov. Celkový predpokladaný počet zvierat teda bude  $60 + 20 + 20 = 100$ .

### 3. Zjemnenie:

Výsledky budú priebežne hodnotené a ciele prehodnocované. V prípade, že nastane situácia, ktorá by naznačila, že nemá zmysel ďalej vedecky pokračovať v ďalších plánovaných experimentoch, práce sa ukončia; ďalšie zvieratá sa nebudú používať.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:   áno   nie

## Príloha č.2

### Netechnické zhrnutie projektu

#### Názov projektu:

"Vznik a patogenéza obezity vo vzťahu k netradičným rizikovým faktorom obezity".

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1054/15-221

**Kľúčové slová v projekte ( max 5 slov):** Adenovírus 36, obezita, patogenéza, probiotiká, myši C57BL/6

#### Účel projektu:

Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

#### Opísať ciele projektu:

Obezita bola Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO) klasifikovaná ako jedna z ôsmich významných príčin spôsobujúcich chronické ochorenia. Príčiny vzniku obezity sú multifaktoriálne a zahŕňajú endokrinné, farmakologické, nutričné, environmentálne a genetické agensy. Posledné roky je výskum zameraný aj na sledovanie vzniku obezity pôsobením rôznych patogénov akými sú canine distemper vírus, Rousassociated vírus-7, Borna disease vírus, SMAM-1 (vtáčí adenovírus), adenovírus 5 (Ad5), a Ad37 u zvierat a adenovírus 36 u ľudí. Adenovírusy patria medzi vírusy, ktoré vyvolávajú ochorenia s miernymi príznakmi postihujúce horný a dolný respiračný trakt, gastrointestinálny trakt, alebo spôsobujú konjunktivitídy. Významnou vlastnosťou upriamujúcou pozornosť na adenovírus 36 je jeho vzťah k vzniku a rozvoju obezity.

Cieľom postupu je štúdium mechanizmu adenovírusovej infekcie u myší línie C57BL/6 (Black 6) vo vzťahu k imunitnému systému, dĺžke trvania a kvantite virémie, a jej ovplyvnenia probiotickou kultúrou laktobacilov. Pri infekcii myší AD-36 budú sledované virologické, imunologické, mikrobiologické, klinické a patologicko-anatomické parametre.

## **Prínos z vykonaného projektu:**

Predpokladaný prínos bude spočívať v dosiahnutí nových poznatkov týkajúcich sa patogenetického účinku Ad-36 vo vzťahu k imunitnému systému a dĺžke trvania a kvantite virémie, a jej ovplyvnenia probiotickou kultúrou s priamym dosahom na vznik obezity.

## **Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

V postupe budú použité 4 týždňové myši inbrédneho kmeňa C57BL/6 (Black 6) samičieho pohlavia. Bude použitých (max. 350 ks myší), rozdelených do 8 skupín (6 x 55 a 2 x 10 myší).

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

Počas sledovaného obdobia zvieratám nebude zabránené v prirodzenom správaní, vrátane obmedzenia štandardov na umiestnenie, chov a starostlivosť a nebude im vo významnej miere narušaná pohoda ani celkový stav. Vyrušovanie bude obmedzené iba na aplikáciu probiotického kmeňa a jednorazovú infekciu adenovírusom, dôsledne bude monitorovaný zdravotný stav zvierat. V priebehu postupu sa neplánuje použitie analgézie, nakoľko v prípade aplikácie probiotického kmeňa *Lactobacillus reuteri* 26 je použitá prospešná kultúra a adenovírus Ad-36 je klinicky na myši málo invazívny. Infekciou myši vírusom Ad-36 bol preukázateľne dokázaný nárast telesnej hmotnosti akumuláciou tukového tkaniva.

## **Predpokladaná úroveň krutosti:**

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

## **Uplatňovanie zásad 3R**

### **1. Nahradenie zvierat:**

Postup nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože sa jedná o štúdium patogenetického mechanizmu ľudského adenovírusu 36, jeho interakciu s imunitným systémom a virémiu, jej dĺžku a kvantitatívnu úroveň. Súčasne sa jedná o štúdium vplyvu probiotík na vírusovú infekciu z hľadiska virologických, klinických, imunologických a patologicko-anatomických parametrov a ich vplyv na vírusom indukovanú obezitu. Jedná sa o interakciu organizmu, vírusu a probiotických bakteriálnych kmeňov, čo nie je možné uskutočniť v *in vitro* podmienkach.

## 2. Redukcia počtu zvierat:

Z hľadiska experimentálneho výskumu je nutné zabezpečiť dostatočný počet experimentálnych zvierat so snahou o redukcii chýb v priebehu spracovania výsledkov, ako aj na zabezpečenie štatisticky spracovateľných výsledkov. V postupe bude použitých maximálne 350 ks myší, rozdelených do skupín (6 x 55 a 2 x 10 myší). V rámci každej skupiny (6 x 55) sa uskutoční odber vzoriek na 0., 3., 7., 14., 21., 28., 42., 56., 70., 100. a 130. deň od infekcie, s minimálnym zastúpením zvierat v jednej skupine na odber po (5 ks). Navrhnutý počet zvierat bol ustanovený na základe súčasných metód v experimentálnom výskume, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov použitých čo najmenej zvierat, a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého zvieraťa použitého v postupe.

## 3. Zjemnenie:

V postupe budú použité 4 týždňové myši inbrédneho kmeňa C57BL/6 (Black 6) samičieho pohlavia, ktoré sú z hľadiska štúdia požadovaných parametrov najideálnejším modelovým zvieraťom, a v plnej miere spĺňajú charakter štúdií pri sledovaní obezity indukovanej adenovírusovou infekciou. Počas sledovaného obdobia zvieratám nebude zabránené v prirodzenom správaní, vrátane obmedzenia štandardov na umiestnenie, chov a starostlivosť, a nebude im vo významnej miere narušaná pohoda ani celkový stav. Vyrušovanie bude obmedzené iba na aplikáciu probiotického kmeňa a jednorazovú infekciu adenovírusom. V postupe bude použitá jednoduchá anestézia (zmes Ketamín/Xylazín), zabezpečujúca dôkladnú nehybnosť zvierat, ktorá je potrebná pre bezpečnú aplikáciu intranazálnej infekcie.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno

nie

**Názov projektu:**

Inverzná zmena svetelného režimu a jej dôsledky na fyziologické, neuroendokrinné a behaviorálne parametre potkana laboratórneho

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1086/15-221

**Kľúčové slová v projekte ( max 5 slov):**

inverzné posuny svetla a tmy, potkany, rádiotelemetria, cytometria, správanie

**Účel projektu:**

Základný výskum

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

**Ciele projektu:**

1. Ohodnotiť zmeny kardiovaskulárnych parametrov u potkanov po expozícii 12-hod inverzným posunom svetla a tmy u normotenzných a spontánne hypertenzných potkanov
2. Analyzovať vzťah vzniku neklesajúceho profilu tlaku krvi (TK) u potkanov exponovaných 12-hod posunom svetla a tmy
3. Analyzovať vzťah desynchronizácie organizmu na zmeny v imunitnom systéme a ich koreláciu dosah na zmeny v kardiovaskulárnom systéme
4. Otestovať imunitnú odpoveď u zvierat vystavených posunom svetla a tmy
5. Analyzovať zmeny autonómneho nervového systému a spontánnej baroreflexnej senzitivity u experimentálnych zvierat pomocou parametrov variability frekvencie srdca (FS) a TK
6. Ohodnotiť zmeny v správaní experimentálnych zvierat po dlhodobom vystavení 12-hod inverzným posunom svetla a tmy

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

Epidemiologické údaje ukazujú, že práca na zmeny môže predstavovať rizikový faktor pre vznik viacerých civilizačných ochorení, vrátane hypertenzie. Keďže práci na zmeny sa vo vyspelej spoločnosti nedá vyhnúť a mechanizmy ktorými môže prispievať ku vzniku civilizačných ochorení nie sú zatiaľ známe, sú potrebné experimentálne údaje z animálnych modelov, aby sa spoznali fyziologické mechanizmy, ktoré majú svoj dopad aj na zmeny zdravotného stavu a správania ľudí. Podľa najnovších prác sa ukazuje spojitosť zmien cirkadiánnej regulácie kardiovaskulárneho systému so zmenenou odpoveďou imunitného systému v čase. Nami predkladaný projekt je zameraný na pokračovanie analýz vplyvu fázovo posunutých cyklov vo svetelných podmienkach prostredia na vývin hypertenzie a zmien fyziologických a behaviorálnych ukazovateľov u potkana laboratórneho (*Rattus norvegicus*).

Očakávame, že inverzné posuny svetelného režimu pomôžu pri definovaní základných vzťahov interakcie kardiovaskulárneho, autonómneho nervového, imunitného a cirkadiálneho systému. Tento komplexný pohľad základných interakcií rôznych regulačných systémov môže dopomôcť aj pri detekcii vhodného markera narušených biologických rytmov, či rýchlejšej adaptácii desynchronizovaných cirkadiálnych rytmov.

Z behaviorálneho hľadiska očakávame hlavne zmeny súvisiace s anxiitou, ako aj zmeny vo vybraných formách vrodeneho (explorácia, motorická aktivita, anxieta, emocionalita) a naučeného správania. Uvedené behaviorálne zmeny by podľa našich očakávaní mali byť sprevádzané zmenami autonómneho nervového a imunitného systému.

#### **Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*); normotenzné Wistar: 170 samcov; spontánne hypertenzné SHR 170 samcov.

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

Nepriaznivý vplyv na zvieratá by mohla mať operácia alebo umelý spánok počas implantácie telemetrického zariadenia alebo odberu krvi, aj keď podľa našej skúsenosti sa potkany po operácii zotavujú pomerne rýchlo a už niekoľko minút po odznení účinkov anestézie sú schopné samostatného pohybu, čo je prejavom dobrého znášania anestézie ako aj zákrokov samotných. Pri realizácii behaviorálnych testov s výraznejšou ujmou na základe skúseností nepočítame, keďže testy budú krátkodobé a neinvazívne.

#### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

Operácie, podávanie farmák a odbery krvi budú vykonávané v celkovej anestézii, po ktorej zviera nadobudne vedomie, a preto sa klasifikujú ako „stredné“. Do kategórie "slabé" spadajú z hľadiska krutosti aj všetky nami plánované behaviorálne testy.

### **b) preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia**

#### **Uplatňovanie zásad 3R**

##### **1. Nahradenie zvierat (Replacement; Zdôvodnenie použitia zvierat v projekte, zdôvodnenie prečo sa nemôže použiť alternatívna metóda bez použitia zvierat)**

Keďže pokus je primárne zameraný na sledovanie fyziologických zmien v cirkadiálnom, kardiovaskulárnom, imunitnom a autonómnom nervovom systéme s perspektívou výstupu uplatnenia poznatkov u človeka, nie je možné realizovať pokus na bunkových kultúrach, ktoré tieto komplexné regulačné systémy nemajú. Alternatívna náhrada modelu potkana nižšími stavovcami taktiež nie je možná, nakoľko v odbornej biomedicínskej literatúre venujúcej sa skúmanej problematike je potkan používaný ako akceptovateľná náhrada pri fyziologickom a farmakologickom testovaní s akceptovanou extrapolácie nameraných údajov na človeka.

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

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

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

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

Celý projekt je zameraný na nahradzovanie a obmedzenie počtu zvierat v experimentoch. Rádiotelemetrická metóda umožňuje kontinuálne sledovanie vybraných kardiovaskulárnych parametrov a pohybovej aktivity u toho istého zvierat'a, a teda ich počet je v porovnaní s použitím len histologických a molekulárnych metód významne redukovaný.

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

**3. Zjemnenie (Refinement; 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)**

Zvieratá počas samotného pokusu nebudú vystavené strádaniu a utrpeniu. Vodu a potravu budú mať k dispozícii *ad libitum*. Budú chované v štandardných podmienkach. Počas operácie budú uspané zmesou kyslíka a izofluránu, ktorý umožňuje rýchlejšie prebudenie po operácii a aj lepšiu rekonvalescenciu než iné anestetiká.

Utrpenie zvierat bude minimalizované dodržiavaním každej z piatich slobôd uvádzaných pri definícii walfare zvierat.

## **Netechnické zhrnutie projektu**

### **Názov projektu:**

Obnovenie expresie kaveolínu-1 ako možná forma terapie monokrotalínom indukovanej pľúcnej hypertenzie

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

1115/15-221

**Účel projektu:** základný výskum

### **Cieľ projektu**

Cieľom pokusu je zistiť možný terapeutický efekt obnovy expresie CAV-1 pomocou špecifických liečiv a porovnať ho so štandardnou terapiou, ktorej účinok na expresiu kaveolínu-1 nie je známy v experimentálnom modeli pľúcnej artériovej hypertenzie. Zároveň sa bude sledovať vzťah medzi poškodenou funkciou PK a expresiou CAV-1 v tkanive pravej komory.

### **Prínos z vykonaného projektu:**

Napriek veľkej pozornosti zdravotníckeho systému a neustálemu vývoju a dostupnosti nových liekov je liečba kardiovaskulárnych ochorení oblasťou, kde je naďalej potrebné hľadanie nových cieľov farmakologického zásahu, aby bolo možné implementovať do farmakoterapie účinnejšie a bezpečnejšie liečivá. Táto výzva je ešte naliehavejšie v prípade zriedkavých kardiovaskulárnych ochorení, ako je aj pľúcna artériová hypertenzia (PAH), ktoré sú často mimo výskumných stratégií súkromného sektora, keďže návratnosť vynaložených financií na výskum je veľmi otázná. V tomto projekte identifikujeme kaveolín-1 (CAV-1) ako potenciálny kandidát na budúce terapeutické ciele, keďže, ako je známe z patomechanizmov iných ochorení, táto signálna kaskáda má silné regeneračné účinky.

Prínosom projektu bude získanie poznatkov o vzťahu medzi expresiou CAV-1 a rozvojom PAH u monokrotalínom indukovanej pľúcnej hypertenzie.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty :** Potkany, samce rodu Wistar 300 ks

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

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

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

**Predpokladaná úroveň krutosti:**

stredná

**Uplatňovanie zásad 3R**

**1. Nahradenie:**

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa bude hodnotiť vplyv PAH na rozvíjajúce sa zlyhanie srdca, nie je možné pokus vykonať bez použitia zvierat a použiť alternatívnu metódu. Počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako kultúry buniek, na ktorých je nemožné relevantne posúdiť funkciu srdca ako celku s ňou súvisiace patomechanizmy a molekulárne pozadie.

**2. Obmedzenie:**

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

**3. Zjemnenie:**

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

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

**Názov projektu:**

**Úloha vágových nervov vo viscerálnej bolesti**

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1153/15-221

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** pažerák, nociceptor, vágové gangliá, DRG gangliá, membránové receptory

**Účel projektu\*:** Základný výskum, (translačný)

**Opísať ciele projektu:**

Bolesť vnútorných orgánov (viscerálna bolesť) je závažným klinickým problémom, ak poškodenie orgánov nemožno efektívne liečiť. Vývoj nových terapií je brzdený nedostatočným poznaním mechanizmov viscerálnej bolesti. Predpokladáme, že na viscerálnej bolesti sa podieľajú nielen spinálne dráhy ale aj vágové aferentné nervy. Ešte nedávno neboli známe poznatky, že vágové aferentné nervy sú schopné detegovať noxické informácie (vágové nociceptory). V poslednom období sme v podstatnej miere prispeli k identifikácii vágových nociceptorov v gastrointestinálnom trakte. Napriek tomu, že sme sa intenzívne venovali mechanizmom zodpovedným za aktivovanie vágových nociceptorov, stále je veľa neobjasnených procesov, najmä týkajúcich sa expresie rôznych membránových receptorov a kanálov vo vágových neurónoch a ich úlohy v nociceptívnych procesoch.

Vytvorili sme hypotézu, že aktivita vágových nociceptorov zosilňuje viscerálnu bolesť a táto závisí od expresie TRP receptorov, draslíkových K2P kanálov a kyselinou aktivovaných receptorov spriahnutých s G-proteínom. Sústredíme sa na pažerák ako dôležitý zdroj viscerálnej bolesti a na kyselinu ako kľúčový pažerákový noxický mediátor. Našu hypotézu budeme študovať na modeloch u morčiat.

Informácie o pažerákových nociceptoroch budeme získavať identifikovaním receptorov zodpovedných za ich aktivovanie a toto budeme porovnávať s funkciou spinálnych neurónov z ganglií dorzálnych koreňov. Použijeme kombináciu single cell RT-PCR a jednotkovej extracelulárnej elektrickej aktivity.

Predpokladáme, že získame fundamentálne nové poznanie mechanizmov viscerálnej bolesti pomocou najmodernejších technológií. Konkrétne očakávame objasnenie úlohy vágových nociceptorov pri viscerálnej bolesti z pažeráka.

Ako sme ukázali, okrem spinálnych DRG nociceptorov, pažerák obsahuje dva typy vágových nociceptorov: vágové jugulárne nociceptory (vágové jugulárne ganglion embryologicky pochádzajúce z neurálnej lišty) a vágové nodózne nociceptory (pochádzajúce z epibrachiálnych plakód. Očakávame, že hlavne vágové jugulárne nociceptory prispievajú k vzniku bolesti, pretože tieto majú ten istý embryologický pôvod ako aj spinálne DRG nociceptory (neurálna lišta).

Očakávame, že informácie získané na modeli pažeráka budú usmerňovať podobné štúdie aj na iných vnútorných orgánoch. Nakoniec očakávame, že objasnenie úlohy vágových nociceptorov v bolesti bude stimulovať vývoj nových liečiv so špecifickým zameraním na vágové mechanizmy prispievajúce ku vzniku bolesti. Podľa našich znalostí takýto komplexný projekt je nebyvalý v tejto oblasti výskumu.

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

Testovaním našich hypotéz očakávame:

- 1) Získanie originálnych poznatkov o expresii dôležitých membránových receptorov a kanálov, ktoré sa zúčastňujú na mechanizmoch vzniku a modulácii bolestivého stimulu vo vágových a spinálnych nociceptoroch. Sústredíme sa na potenciálne najdôležitejšie skupiny receptorov rodiny TRP, draslíkových kanálov, kyselinou aktivovaných receptorov spriahnutých s G-proteínmi.
- 2) Použitím selektívnych agonistov a antagonistov významných zástupcov membránových receptorov a kanálov prispejeme k poznaniu modulovania noxickéj aktivity všetkých podtypov aferentných vágových a spinálnych nervových dráh inervujúcich pažerák.
- 3) Presná identifikácia exprese najdôležitejších membránových receptorov pre noxické stimuly a poznatky o modulácii noxickéj aktivity eferentných nervových dráh môže stimulovať farmaceutické firmy, aby hľadali nové látky na modulovanie, prípadne inhibíciu týchto receptorov a kanálov a tak prispeli ku kvalitnejšej farmakoterapii viscerálnej bolesti.

Očakávame, že naše výsledky budú mať tiež širšie uplatnenie pre nociceptívny (bolestivý) signálny systém, nielen v hornej časti gastrointestinálneho traktu.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

Morča domáce, outbredné, Dunkin Hartley, samce, predbežne 360/3 roky

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

Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh, metodika retrográdneho značenia vágových a spinálnych neurónov u morčiat je veľmi dobre tolerovaná a taktiež morčatá sa veľmi dobre zotavujú po krátkodobej ketamín/xylazínovej (zoletil) anestézii, po prebudení rýchlo nastupuje motorická aktivita a po hodine sú úplne čulé so záujmom o krmivo a vodu. S metodikou máme na pracovisku už 5-ročné skúsenosti. Pokusy sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov, ktoré môžu pozitívne obohatiť farmakoterapiu. Veľká pozornosť bude zameraná na adaptáciu s personálom a laboratórnym prostredím.

**Predpokladaná úroveň krutosti:**

- **slabé** - retrográdne značenie neurónov inervujúcich pažerák – malý chirurgický zákrok v krátkodobej anestéze (cca 1cm kožná incízia buď v krčnej oblasti alebo v strednej epigastrickej línii na exponovanie pažeráka – injekcia DiI mikropipetou do steny pažeráka cca 20µl). Pozn. Aj napriek tomu, že chirurgický zákrok je klasifikovaný ako stredný stupeň krutosti, v našom prípade nejde o závažný chirurgický výkon ako je popísané v bode 2. Stredné - písmeno c (zvieratá už po hodine sú čulé s dobrou motorickou aktivitou a príjmom potravy)
- **bez možnosti zotavenia** zvieratá pre nasledujúce metodiky, scRT-PCR a qRT-PCR a elektrofyziologické štúdie, sú usmrtené exsanguináciou po predchádzajúcej anestéze zoletil (predávkovaním anestetika) alebo inhaláciou CO<sub>2</sub> a potom sa už pracuje len s tkanivom.

**Uplatňovanie zásad 3R**

**1. Nahradenie zvierat:**

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

Tento projekt nie je možné vykonať bez použitia týchto špecifických zvierat na štúdium neurónov z periférnych nervových ganglií. Preparát so zachovaným intaktným vágovým nervovým systémom nemožno nahradiť inou alternatívnou metódou. Morča domáce je jeden z najrelevantnejších modelov aferentnej inervácie vnútorných orgánov človeka. Alternatívne

metódy na štúdium vágovej aferentnej hypersenzitivity neexistujú. Nie je možné použiť nižší laboratórny živočíšny druh, pretože nižšie laboratórne druhy (myš a potkan) majú odlišnú biológiu kľúčových študovaných buniek, ktoré sú kľúčové pre moduláciu aferentných nervových dráh (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007 Oct;293(4):G850-6. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009 Jul;297(1):G34-420. Prieskum databáz ukázal, že vzhľadom na komplexnosť jednotlivých typov aferentných vágových nervových dráh nie je možné použiť modelovanie ani jednoduchšie systémy (bunkové kultúry a pod.)

## **2. Redukcia počtu zvierat:**

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

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

## **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)

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

### *Retrográdne značenie pažerákových neurónov*

V krátkodobej celkovej anestéze (ketamín-xyzalín/zoletil) sa za sterilných podmienok malým kožným rezom (cca 1cm) exponuje pažerák a retrográdny tracer DiI (0.1%, 2 x 10 $\mu$ l) sa pomocou mikropipety injikuje do svalovej vrstvy pažeráka. Rana bude štandardne ošetrená, zviera sa sleduje a po odznení anestézy sa premiestni do Centrálného zverinca JLF UK a bude udržiavané vo zverinci s najväčšou starostlivosťou do dvoch týždňov.

Podľa protokolu a časového harmonogramu pred použitím metodiky extracelulárnej elektrofyziológie a RT-PCR zvieratá budú usmrtené predávkovaním anestetika alebo inhaláciou CO<sub>2</sub> a v postupe sa bude ďalej pracovať už len s tkanivom.

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

Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o zvieratá, aby sme zabezpečili humánne zaobchádzanie so zvieratami, v záujme odbúravania stresu zvieratá budú adaptované na personál a laboratórne podmienky ešte pred samotným vykonávaním postupov. Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované množstvom prác a prezentované na mnohých odborných fórach nielen doma ale aj v zahraničí. Postupy sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a

utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov prispievajúcich k efektívnej farmakoterapii.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Netechnické zhrnutie projektu 1259/15-221

**Názov projektu:**

Zmeny funkcie renálnych buniek v dôsledku ich aktivácie spojenej s príjmom nanočastíc zlata a oxidu železa.

**Kľúčové slová:**

Nanočastice, obličky, mezangiálne bunky, podocyty

**Účel projektu:**

Základný výskum

**Cieľ projektu:**

Cieľom projektu je zistenie toxicity zlatých nanočastíc a nanočastíc oxidu železa na bunkách obličiek. Predkladaný projekt je súčasťou dlhodobého výskumu nášho pracoviska, v ktorom sa sledujú účinky nanočastíc na rakovinové bunky v rámci nových terapeutických možností liečby rakoviny.

**Prínos projektu:**

Popísanie miery internalizácie nanočastíc (zlata, oxidu železa) do mezangiálnych buniek a podocytov a definovaný stupeň bunkového poškodenia vyvolaný nanočasticami (cytotoxicita, bunková morfológia) prinesie úplne nové poznatky o internalizácii nanočastíc u dvoch významných typov renálnych buniek, ako aj o porovnaní renotoxicity nanočastíc, čo je v tejto oblasti ešte stále veľkou neznámou.

A práve možná a zatiaľ stále málo preskúmaná toxicita vybraných nanočastíc predstavuje základný problém aplikácie poznatkov nanomedicíny do praxe. Ešte stále sa vie veľmi málo o škodlivých účinkoch takýchto nanočastíc na nerakovinové bunky a zatiaľ neexistujú testy, ktoré by umožnili posúdiť riziko ich terapeutickej aplikácie. V tomto kontexte našimi výsledkami prispejeme ku vyplneniu medzier v pochopení toxicity vybraných nanočastíc a charakterizujeme možnosti zdravotného rizika vyvolaného týmito nanočasticami, čo je potrebné pre stanovenie z toho vyplývajúcich rozhodnutí ohľadne možnosti aplikácie týchto nanočastíc v medicíne. Zároveň naše výsledky prispejú ku snahám identifikovať bezpečnosť nanomateriálov, čo bolo prezentované ako nevyhnutná potreba pre blízku budúcnosť v novembri 2010 v Prahe a následne aj v marci 2011 vo Washingtone, keďže v súčasnosti je široké spektrum nanomateriálov už bežne používané.

Zmeny charakteru a tým pádom aj funkcie dvoch základných typov buniek obličky, mezangiálnych buniek a podocytov, sú spojené s počiatočnou fázou fibrogenézy v mnohých zápalových ochoreniach obličiek. Takéto zmeny vedú ku zvýšenej permeabilite obličiek voči plazmatickým proteínom, vznikom nefrotického syndrómu a v konečnom dôsledku aj ku zlyhaniu obličiek. Nanočastice pôsobia rozdielne na zdravé a nádorové bunky a náš výskum pomôže odhaliť, s akými potenciálnymi rizikami by bola spojená terapia s využitím nanočastíc.

**Počet a druh použitých zvierat:**

Myš laboratórna 8-10 týždňov, samičky aj samce

- Kmeň 129/SvImJ oboch pohlaví (navrhovaný počet 60 na tri roky riešenia projektu)

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

Pri izolácii glomeruliek z obličiek sa neočakáva nepriaznivý vplyv na zdravotný stav zvierat, keďže sa jedná o extrakciu obličiek v hlbokom bezvedomí, z ktorého sa zvieratá už nepreberú.

**Predpokladaná úroveň krutosti:**

Bez možnosti zotavenia

**Súlads požiadavkami „3R“****Nahradenie:**

Keďže neexistuje bunková línia podocytov, ktorá by zachovávala dôležité charakteristiky týchto veľmi špecifických buniek, jediný spôsob, ako študovať vlastnosti a bunkové odpovede týchto buniek približujúce sa *in vivo* situácii je príprava primárnej kultúry podocytov. Prechodom do kultúry strácajú podocyty svoju vysoko diferencovanú (neproliferujú) epiteliálnu povahu, získavajú čiastočný mezenchymálny charakter (proliferujú), v dôsledku čoho prestávajú syntetizovať markerové proteíny (nefrín, podocín, synaptopodín), ktoré hrajú významnú úlohu v ich bunkovej odpovedi. Avšak v primárnej kultúre sú syntetizované hladiny týchto špecifických markerov ešte stále do istej miery zachované a detekovateľné, a tým je primárna bunková kultúra podocytov považovaná za prijateľnú a zatiaľ jediný *in vitro* model podocytov. Doteraz vytvorené bunkové línie podocytov nemajú zachované tieto charakteristiky, a preto nie je opodstatnené ich používanie na štúdium vlastností týchto buniek.

**Obmedzenie:**

Počet zvierat je minimalizovaný tak, aby sme získali dostatočný počet glomeruliek na kultiváciu dostatočného počtu buniek na experimentálnu prácu a štatistické vyhodnotenie. Keďže s izolovanými bunkami budeme pracovať *in vitro*, nie je potrebný veľký počet zvierat na extrakciu obličiek. Pretože počty týchto buniek sa ďalej dajú znásobiť pre potreby experimentov metódami *in vitro* kultivácie. Priemerná dĺžka prežitia podocytov v primárnej kultúre je jeden mesiac. Priemerné množstvo izolovaných glomeruliek z jednej myši (dve obličky) je  $3 \times 10^3$ , čo je dosť malé množstvo (glomerulky predstavujú 1% z objemu obličky), preto sa robí izolácia z dvoch myší naraz (štyri obličky), aby sa získal dostatočný počet glomeruliek, a tým aj dostatočný počet podocytov na kultiváciu *in vitro*. Projekt je naplánovaný na 36 mesiacov, a keďže sa jedná o charakterizáciu toxických účinkov viacerých typov nanočastíc (koncentračné a časové závislosti, cytotoxicita, genotoxicita, mechanizmy internalizácie, zmeny morfológie buniek atď.) je počet 60 myší na celé trvanie projektu adekvátny. Ak získame štatisticky relevantné údaje z menšieho počtu zvierat, nebude potrebné použiť celkový plánovaný počet.

**Zjemnenie:**

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

**Spätné posúdenie projektu:**

Projekt nepodlieha spätnému posúdeniu

Netechnické zhrnutie projektu

1262/15-221

Názov projektu:

Vplyv výšky dávky imunogénu na hladiny indukovaných protilátok

Podrobný účel postupu:

Pri vývoji vakcín je dôležité stanoviť optimálnu dávku, ktorá by mala vyvolať protektívnu protilátkovú alebo bunkovú imunitnú odpoveď. Z uvedeného dôvodu je vzťah „dose-response“ dôležitým kritériom prípravy efektívnej vakcíny či už bunkového alebo protilátkového typu.

Predložený projekt má za úlohu testovať účinnosť rôznych dávok vakcíny (imunogénu) na hladinu indukovaných protilátok v podmienkach *in vivo*. Zvieratám budeme subkutánne podávať imunogén (rôzne dávky –viď tabuľka č.1, objem 300µl, adjuvantná látka -Alhydrogel) v mesačných intervaloch, s cieľom vyvolať protilátkovú imunitnú odpoveď. Dva týždne po šiestej dávke (po ukončení imunizačnej schémy), odoberieme zvieratám krv z očného splavu a humánne usmrtime. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieratá neprekračuje stanovené normy. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratornými zvieratami.

### ***Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse***

Preštudovali sme všetky dostupné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili v danom experimente nahradiť zvieratá za iný biologický testovací systém. Na selekciu optimálnej dávky vakcíny je však nevyhnutné použiť imunitný systém cicavcov. Na tento typ experimentov sa najčastejšie používajú malé laboratorné hlodavce, hlavne myši a potkany. Keďže tieto dva živočíšne druhy môžu odlišne reagovať na testovanú dávku, použijeme oba spomínané druhy zvierat. Vzhľadom na skutočnosť, že v súčasnosti nie je dovolené imunogénnosť vakcín (tj. stanovenie hladín protilátok indukovaných vakcínou) skúmať na ľuďoch bez predchádzajúceho otestovania na zvieratách, je použitie zvierat nevyhnutné.

### ***Manipulácia so zvieratami:***

| Charakteristika postupu                                 | Vplyv na zviera                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Váženie zvierat                                         | Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia (1x za mesiac) | Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 0.5 - 1 minútu.                                                                                                                                                                                                                                          |
| Odber krvi (retroorbitálny plexus)                      | Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Podá sa polovičná dávka anestetík na utlmenie bolesti. V okamihu ako je zviera sedované sa sklenená kapilára jemne zasunie pod očnú guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť stredná. Trvanie 1 minútu. |

## **Zohľadnenie 3R**

### **Zjemnenie:**

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

### **Redukcia:**

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov. Stanovený počet zvierat sa opiera o naše predchádzajúce experimenty. Ukázalo sa, že počet zvierat v skupine menší ako 10 nie je dostatočne štatisticky relevantný, keďže aj u zvierat sa vyskytuje určitá miera variability.

### **Nahradenie:**

Súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje testovať imunogénnosť vakcíny (tj. stanovenie hladín protilátok indukovaných vakcínou) v *in vitro* podmienkach. Z legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať priamo na ľuďoch, bez predchádzajúceho otestovania na laboratórnych zvieratách.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

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

### **Utrpenie versus prínos**

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu. Zvieratá dostávajú nízke dávky netoxickej monoepitopovej vakcíny, ktoré nespôsobujú žiadnu nebezpečnú imunitnú odpoveď, ktorá by viedla k poškodeniu organizmu. Subkutánna aplikácia vakcíny trvá niekoľko sekúnd. Odber krvi sa vykonáva na sedovaných zvieratách. Po odbere budú zvieratá humánne usmrtené. Získané informácie z predkladaného experimentu významne napomôžu pri vývoji efektívnej vakcíny zameranej na liečbu ľudských neurodegeneračných ochorení.

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.5.2015 a bude sa realizovať v priebehu necelých dvoch rokoch, do 31.12.2016.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

## NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

### Názov projektu:

Postkondicionovanie ako možný spôsob ochrany neurónov v ischemizovanej mieche: štúdium mechanizmov vyprovokovanej ischemickej tolerancie

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1344/15-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): ischemia, králik, postkondicionovanie, bradykinín, noradrenalín

### Účel projektu\*:

#### Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

### Opísať ciele projektu:

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

Navrhovaný projekt bude zameraný na riešenie možnosti efektívneho spolupôsobenia mechanizmov ischemickej tolerancie a farmakologického ovplyvnenia týchto procesov (jednorazové postkondicionovanie bradykinínom alebo noradrenalínom). Vplyv ischemie sa v závislosti od dĺžky jej trvania nemusí prejaviť vôbec, môže vyvolať vznik ischemickej tolerancie, alebo pri dlhšom trvaní zapríčiniť apoptózu podobnú smrť až nekrózu neurónov. Je dôležité poznať možnosti ako pri dlhších časových intervaloch ischemie môžeme farmakologicky ovplyvniť jej účinky tak, aby sa čo najmenšie množstvo buniek ocitlo v pásme nekrozy a zároveň aby nedošlo k zníženiu schopnosti buniek vytvoriť si vlastnú toleranciu.

Základným parametrom na štúdium tolerancie bude sledovanie výskytu a početnosti degenerovaných neurónov v sivej hmote miechy pomocou Fluoro Jade B po 20 minútovej ischemii a následnom farmakologickom postkondicionovaní (1, 6, 12 alebo 24 hod).

U prežívajúcich neurónov budeme hodnotiť aktivitu látok podieľajúcich sa na reparačných procesoch v bunkách, ako je ubikvitín alebo HSP-72 a prítomnosť enzýmov oxidačného stresu. Funkčnosť neurónov vyhodnotíme v korelácii s neurologickým statusom zvierat.

Cieľom predkladaného experimentálneho projektu je (1) stanovenie optimálneho času aplikácie postkondicionovania za účelom neuroprotektie a (2) odhalenie mechanizmov ochrany neurónov po ischemii a následnom postkondicionovaní (sledovanie antioxidačných enzýmov: SOD, kataláza, heat-shock proteínov, apoptotických markerov).

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

Ischemické poškodenie miechy prejavujúce sa paraplégiou končatín, je častou komplikáciou po operáciách na hrudnej a brušnej aorte u človeka. Incidencia paraplégie sa po týchto operáciách pohybuje v rozmedzí 5 - 40%. V snahe predísť devastujúcemu účinku ischémie/reperfúzie, využívajú sa rôzne experimentálne a klinické modely na ochranu nervových buniek v mieche.

Vzhľadom na to, že sa v našich predošlých experimentoch potvrdil priaznivý účinok farmakologického prekondicionovania pred 20 minútovou ischémiou a následnou reperfúziou (zvýšenie počtu prežívajúcich motoneurónov, ale hlavne zachovanie ich funkčnosti), chceme si overiť aj účinok opačného usporiadania kondicionovania, čo bude mať väčší význam pre aplikáciu do klinickej praxe. Ak sa zistí vhodné terapeutické okno pre časovú aplikáciu druhého stresu v mieche, môže to prispieť k možnosti správneho načasovania aplikácie aj iných, menej agresívnych stresorov. Poznatky získané skúmaním molekulových mechanizmov ischemickej tolerancie môžu slúžiť ako biochemické markery ischemickej tolerancie u ľudí s cievnymi príhodami.

## **Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

králik domáci, novozélandský biely, dospelé samce, 205 kusov (na 3 roky trvania experimentu)

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

Počas celého postupu bude monitorovaný zdravotný stav zvierat, ischémia miechy bude vykonaná v celkovej anestéze, analgetiká na zníženie bolestivosti budú podávané v čase operácie a po celé obdobie prežívania (3 dni) podľa potreby. Pre zabránenie novej infekcie po operačnom zásahu budú zvieratám preventívne podávané antibiotiká.

## **Predpokladaná úroveň krutosti:**

Stredná (2 stupeň) – jednorazový chirurgický zásah vykonaný v celkovej anestézii

## **Uplatňovanie zásad 3R**

### **1. Nahradenie zvierat:**

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

Vybrané stavy vyskytujúce sa v klinickej medicíne nie možné inak, ako s použitím experimentálnych zvierat verifikovať. Medzi takéto stavy patrí aj akútne ischemicko reperfúzne poškodenie tenkého čreva. Tento experimentálny model sa snaží do určitej miery simulovať zmeny, ktoré prebiehajú v tenkom čreve následkom jeho poškodenia. V súčasnosti nie je možné tento model inak verifikovať iba v experimentálnom modeli. Iné alternatívne modely (bunkové kultúry) nie sú vhodné, pretože nesimulujú priamo stav akými prebiehajú jednotlivé mechanizmy v živom organizme. Preto je použitie experimentálnych zvierat nevyhnutné na opísanie nových mechanizmov vzniku ischemickej tolerancie neurónov

vyprovokovanej farmakologickým stresom aplikovanom po 20 minútovej ischémii v mieche kráľika.

## 2. Redukcia počtu zvierat:

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

Z hľadiska experimentálneho výskumu je nutné zabezpečiť dostatočný počet experimentálnych zvierat so snahou o redukciiu chýb v priebehu spracovania výsledkov, ako aj na zabezpečenie štatisticky spracovateľných údajov. V našom experimente skúmame histopatologické zmeny v sivej hmote miechy po ischémii a postkondicionovaní (7 ks zvierat v rámci každej skupiny), kde odobratý, zafixovaný materiál bude spracovaný pre účely svetelnej mikroskopie. Cieľom nášho projektu je aj odhalenie možných mechanizmov účinku postkondicionovania. Zameriame sa na sledovanie aktivity endogénnych antioxidantných enzýmov, ktoré je možné dokázať len z čerstvo odobratého materiálu hneď po ukončení doby reperfúzie (10 kusov zvierat v rámci každej skupiny). Redukcia počtu zvierat bola uskutočnená už pri vytvorení počtu zvierat v skupinách. V rámci každej skupiny (histologicky a biochemicky spracovaných) spolu získame štatisticky významný súbor 17 ks zvierat aj pre vyhodnotenie funkčnosti panvových končatín po ischémii a postkondicionovaní.

## 3. Zjemnenie:

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

Výber druhu laboratórneho zvierat'a sa opiera o mnohé vedecké práce z odboru experimentálnej chirurgie, ktorý detailne aplikuje poznatky o rozvoji a patogenéze zmien prebiehajúcich pri jednotlivých chorobných stavoch. Simulácia stavov z klinickej medicíny do experimentálnych podmienok umožňuje skúmanie protektívnych postupov a ich zavádzanie do praxe a tiež hľadanie možných mechanizmov na zlepšenie stavu.

V postupe bude použitý králik domáci, ktorý má metamérne usporiadanie ciev odstupujúcich z aorty, čo zaručuje vznik takmer úplnej ischémie miechy. Iné alternatívne modely (bunkové kultúry) nie sú vhodné, pretože nesimulujú priamo stav ako v živom organizme.

Redukcia stresu, utrpenia a bolesti u pokusných králikov bude zabezpečená na podklade aplikácie anestetík a analgetík v predoperačnom, operačnom ako aj v pooperačnom období, aby bol čo v najvyššej miere redukovaný stres a utrpenie zvierat. Zvieratám budú preventívne aplikované antibiotiká. Zvieratá budú pod kontrolou veterinárneho lekára počas celého postupu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:      áno      nie