

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 1328/15-221

Toxikologická štúdia lyofilizovaných tabliet – hodnotenie nového humánneho prípravku

A: Akútna toxicita

B: Toxicita po opakovanom podaní

C: Základná skúška na reprodukčnú toxicitu

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu postupu, predpokladaná ujma a prínosy:

Špecifická alergénová imunoterapia je jedinou účinnou kauzálnou liečbou, ktorá môže zmeniť prirodzený priebeh alergických ochorení a navodiť vznik alergén-špecifické imunologické tolerancie u detí a dospelých. Tolerancia je dosiahnutá ovplyvnením funkcie alergén-špecifických pamäťových buniek T a B lymfocytov. Supresiou aktivity Th2 buniek sa znižuje produkcia protizápalových cytokínov IL-4, IL-5, IL-13, je potlačená diferenciácia, prežívanie a aktivácia žírnych buniek, eozinofilov a bazofilov, je indukovaná produkcia IgG4 a suprimovaná produkcia IgE protilátok. Hlavnú úlohu v potlačení alergickej reakcie zohrávajú T regulačné bunky. Špecifická alergénová imunoterapia je vysoko účinná u protilátkami IgE mediovaných ochorení, ako je alergická rinokonjunktivitída, alergická astma a u pacientov so systémovou anafylaktickou reakciou na osí a včelí jed. V súčasnej klinickej praxi sa používa podkožná a sublinguálna aplikácia. Podanie alergénu môže byť spojované s lokálnymi a niekedy i systémovými alergickými reakciami. Vývoj alergénových tabliet pre sublinguálnu aplikáciu otvoril novú epochu pohodlnejšej a bezpečnejšej formy imunoterapie, predovšetkým u detí.

Sublinguálna alergénová imunoterapia pôsobí cestou slizničného lymfatického systému. Vzniká pri tom fyziologický mechanizmus orálnej tolerancie voči rôznym antigénom vonkajšieho prostredia.

Jedným z takýchto prípravkov je **H-AL Phleum pratense sublingual tablets** vyrábaný firmou SevaPharma, CZ. H-AL Phleum pratense sublingual tablets je tvorený extraktom príslušného druhu alergénu obsahujúci 50 objemových percent glycerolu. V skupine peľových alergénov sú odstránené častice o molekulovej hmotnosti menšej ako 5000 daltonov.

Cieľom projektu je overenie farmakologickej spôsobilosti pripravených lyofilizovaných tabliet z hľadiska bezpečnosti a neškodnosti na zvieracích modeloch; overenie akútnej toxicity, toxicity po opakovanom podaní a reprodukčnej toxicity.

Počas postupu a počas podávania látok sa zabezpečí jemné zaobchádzanie a manipulácia so zvieratami. Zvieratá budú mať štandardné umiestnenie, potravu a starostlivosť. Králikom a myšiam sa počas postupu bude odoberať biologický materiál (odber krvi v priebehu a po ukončení postupu). Po ukončení postupu budú všetky zvieratá usmrtené podľa NV č. 377/2012, § 5, Príloha č.2, Králiky usmrcujeme nadmernou dávkou anestetík - Zoletil (podáva zmluvný veterinárny lekár) a následne náraz/úder do hlavy (vykoná zmluvný veterinárny lekár), najčastejším spôsobom humánneho usmrtenia králikov je prudký úder tupým predmetom do zátylku zvieratá, králik sa drží za kožnú riasu na chrbte; myši sa usmrcujú dislokáciou krčných stavcov alebo použitím oxidu uhličitého. Plyn sa vpúšťa postupne.

Prínosy z vykonaného projektu:

Poznatky získané riešením projektu prispievajú k overeniu možnej toxicity lyofilizovaných tabliet pre použitie pre špecifickú alergénovú imunoterapiu u detí aj dospelých pri liečbe alergickej rinokonjunktivitídy, alergickej astmy a u pacientov so systémovou anafylaktickou reakciou na osí a včelí jed.

Špecifická alergénová imunoterapia je doteraz jediná kauzálna liečba, ktorá vedie k dlhodobo pretrvávajúcej tolerancii voči alergénom vzniknutých na základe normalizácie imunitnej odpovede organizmu.

Predpokladaná ujma na použité zvieratá v rámci vykonaného postupu:

V projekte budeme podávať lyofilizované tablety orálnou sondou priamo do žalúdka. Môžeme predpokladať poranenie hltanu alebo pažeráka pri aplikácii liečiva orálnou sondou. Ďalšie nepriaznivé účinky môžu byť zápal žalúdka, opuch steny žalúdka, nechutenstvo, apatia, úbytok na hmotnosti, prípadne hnačka.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná až krutá

Počet a druh pokusných zvierat

A: Myš laboratórna, outbredná/inbredná, ICR/Balb/c, samice, 9 ks/1 šarža

B: Myš laboratórna, outbredná/inbredná, ICR/Balb/c, samec, samica, 40 ks/1 šarža

Králik domáci, HILL, samec, samica, 10 ks/1 šarža

C: Myš laboratórna, outbredná/inbredná, ICR/Balb/c, samec, samica, 40 ks /1 šarža

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Stanovený počet zvierat predstavuje limit, ktorý je nevyhnutný pre získanie dostatočného počtu vzoriek pre validné štatistické vyhodnotenie výsledkov po perorálnom podaní sublinguálnej tablety obsahujúcej alergény. Nie je možné nahradiť postup na zvieratách *in vitro* testami na bunkových líniiach. So zvieratami budú zaobchádzať zaškolené osoby s praktickými skúsenosťami.

Spätné posúdenie sa vzťahuje iba v prípade, ak aplikácia kontrovannej látky vyvolá na zvieratách krutú bolesť.
Žiadosť zaslať do 30.4.2016 výsledky projektu na spätné posúdenie podľa §37 nariadenia vlády

PRÍLOHA Č. 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Vplyv dlhodobého užívania vitamínových prípravkov na centrálny nervový systém

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1/0772/15 – 1444/15-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

lipofilné vitamíny, centrálny nervový systém, juvenilný organizmu

Účel projektu* : Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

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

V poslednom období výrazne vzrastá trend užívania rôznych multivitamínových prípravkov deťmi, u ktorých ešte pomerne intenzívne prebieha vývin a dozrievanie centrálneho nervového systému. Odborníci čoraz častejšie zaznamenávajú výskyt rôznych porúch správania a rozvoj psychických ochorení u detského pacienta .Cieľom projektu bude zistiť či užívanie vitamínových prípravkov zdravými jedincami môže byť jedným z faktorov, ktoré prispievajú k rozvoju psychických ochorení a behaviorálnych porúch u detí. Súčasťou výskumu bude detekcia možných zmien v štruktúrach limbického systému, ktoré sa výraznou mierou podieľajú na riadení správania jedinca.

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

Zvýšený výskyt rôznych psychických ochorení u detí vedie odborníkov k tomu, aby hľadali príčiny ich vzniku. Vysokou mierou je za ich vznik zodpovedná genetika, ale aj mnohé environmentálne faktory môžu prispievať k

ich rozvoju, resp. k zhoršeniu stavu. Nami navrhovaný projekt prispeje k objasneniu či jednou z príčin vzniku porúch správania u detí by mohlo byť nadmerné užívanie vitamínových doplnkov. Podľa našej hypotézy, dieťa, ktoré sa zdravo stravuje nepotrebuje si dopĺňať vitamíny prostredníctvom multivitamínových prípravkov. Doteraz už boli popísané rôzne ochorenia a poškodenia zdravotného stavu po nadmernom užívaní vitamínov. Otázkou však zostáva, čo sa stane s detským organizmom, keď sa v ňom nahromadí viac druhov lipofilných vitamínov, resp. aký to má dopad na funkcie jednotlivých mozgových štruktúr. Predkladaný projekt pomôže objasniť tieto nejasnosti a poukáže na možné riziká spojené s užívaním výživových doplnkov, obzvlášť u detského jedinca.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Ako experimentálne zvieratá použijeme potkany kmeňa Wistar vo veku 3 týždňov (21-dňové). Celkový počet zvierat na celú dobu riešenia bude 200 samíc a 200 samcov.

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

Z hľadiska bolestivosti predpokladáme minimálny nepriaznivý vplyv na zvieratá. Keďže vitamíny budú zvieratám podávané per os, nebude to pre nich predstavovať nepríjemný, resp. bolestivý zásah. Taktiež behaviorálne testovanie nemá negatívny vplyv na zvieratá. Počas celého experimentu budú zvieratá chované v štandardných podmienkach, v pravidelných intervaloch budú podstupovať handling, bude sa o nich starať a s nimi manipulovať odborne vyškolený personál. Zvieratám bude poskytovaná všeobecná veterinárna starostlivosť. V prípade zhoršenia zdravotného stavu zvierat počas experimentu, budú choré zvieratá z pokusu vyradené a humánne usmrtené podaním vysokej dávky anestetika. Jediným invazívnym zákrokom na zvieratách bude transkardiálna perfúzia, ktorá sa bude realizovať na konci každej fázy experimentu. Tá však bude uskutočnená zvieratám v celkovej anestéze po podaní chloralhydrátu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Účel experimentu vyžaduje použitie živého zvieratá. Laboratórny potkan je najoptimálnejším modelom na experimenty takéhoto charakteru. V pokuse sa budú popisovať mikroskopické

zmeny nervového a srdcového tkaniva a práve nervový systém je dokonale vyvinutý len u cicavcov.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Vyššie uvedený počet zvierat bol stanovený s ohľadom na neskoršie spracovanie výsledkov štatistickými metódami. Väčšina zvierat bude použitá viackrát (najprv za účelom behaviorálneho testovania, neskôr na odobratie vzoriek nervového, srdcového tkaniva a krvi).

3. Zjemnenie:

Na zvieratách sa počas priebehu experimentov nebudú uskutočňovať invazívne zákroky, nebudú trpieť, ani pociťovať bolesť, resp. diskomfort. Budú chované v štandardných podmienkach s obohateným prostredím a v pravidelných intervaloch budú podstupovať handling. Bude im poskytovaná všeobecná veterinárna starostlivosť. Až v závere experimentov bude na nich v celkovej anestéze vykonaná transkardiálna perfúzia.

(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)

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Príloha 4

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU - 1929/15-221

Výskum nových liekových foriem prípravkov izolovaných z ľudskej plazmy na králikoch.

Účel projektu

Aplikovaný výskum

Cieľ

Farmakokinetické experimenty - exploratívne farmakokinetické (PK) - na králikoch poskytnú výsledky o PK nových resp. inovovaných produktov ako napr. a1-Antotrypsin, rFVIII a i.. Keďže okrem nových prípravkov, ide aj o vývoj nových liekových foriem bude potrebné testovať viac formulácií pre každý jednotlivý produkt.

Testovací systém

Experimenty budú vykonané na králikoch samcoch, (hybrid NZB) CVŽV Nitra, Číslo schválenia: SK CH 29 004, hmotnosti 3,0 – 40 kg. Zvieratá budú počas pokusu ustajnené individuálne v označených kovových, štandardná peletovaná strava a pitná voda ad libitum. Počas experimentu budú mať zvieratá riadený svetelný režim - svetlo/tma -12/12. Klimatické podmienky v chovných priestoroch – teplota $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ a rel. vlhkosť vzduchu 45-65% sú riadené klimatizačnou jednotkou .

Karanténa zvierat – minimálne 7dní .

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

Experimentálny postup

Experiment začína rozdelením zvierat do skupín (3 zvieratá na každú testovanú látku). Zvieratám bude látka podaná jednorázovo s.c. alebo i.v. Vzorky krvi budú odobrané z marginálnych ušných vén v objeme približne 3ml 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48, 72, 96 a 120hod po aplikácii. Pred každým odberom a po odbere bude miesto vpichu dezinfikované. Odbery budú vykonané bez anestézy, pre možnú interferenciu testovanej látky s anestetikom.

Po poslednom odbere sa zvieratá humanne utratia úderom do hlavy.

1. Relevantnosť a odôvodnenie použitia zvierat:

Predklinický vývoj nových produktov získaných frakcionáciou a izoláciou z ľudskej plazmy vrátane rekombinantných krvných faktorov. Experimenty realizované v spolupráci s firmou Octapharma, svetový producent liekov pripravovaných izoláciou z ľudskej plazmy.

Experimenty - exploratívne PK štúdie na králikoch (skupiny po troch králikoch, odbery do 12 odberov) majú poskytnúť výsledky o PK nových resp. inovovaných produktov ako napr. a1-Antotrypsin, rFVIII a i.. Keďže ide o vývoj nových liekových foriem bude

potrebné testovať viac formulácií pre každý jednotlivý produkt. Počet králikov bude - 3 na produkt skupinu.

2. Možnosť náhrady testami in vitro:

Test na zvieratách sa nedá nahradiť alternatívnymi metódami in vitro, z dôvodu potreby reakcie živého organizmu na podanie látok ako aj systémové pôsobenie.

V tomto zmysle sme preskúmali databázy:

ECVAM

<http://ecvam.jrc.it>

ICCVAM

<http://iccvam.niehs.nih.com>

FRAME

<http://www.frame.org.uk>

NC3R^s

www.nc3rs.org.uk

AltTox.org: Non-animal Methods for Toxicity Testing

Po preskúmaní databáz sme nenašli zodpovedajúcu alternatívnu metódu.

3. Plánované použitie anestézie, analgézie

V pokusoch nebudú použité postupy vyžadujúce analgézu alebo anestézu.

4. Klasifikácia krutosti jednotlivých postupov

Metóda patrí medzi slabo kruté. Hodnotenie jednotlivých postupov je uvedené v tabuľke.

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Zaradenie podľa krutosti
Vázenie zvierat	Krátkodobý mierny stres	slabá
Krátka fixácia pri aplikácii	2 – 3 min. Krátkodobý mierny stres	slabá
Opakované odbery vzoriek krvi	Obmedzenie na 3-5 min	stredná
Usmrtenie úderom do hlavy	Krátka fixácia	slabá
Celkové hodnotenie krutosti štúdie		stredná

5. Preukázanie súladu s požiadavkami nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Posúdenie pokusu z hľadiska 3R

- Refinement – vzhľadom na to, že v pokuse nebudú vykonané žiadne bolestivé zákroky, nie je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť
- Reduction – počty zvierat v pokuse sú primerané, redukované v maximálnej miere; ich ďalšie zníženie by mohlo ovplyvniť reprodukovateľnosť a validitu pokusu

Replacement – po preskúmaní databáz ECVAM (<http://ecvam.jrc.it>), ICCVAM (<http://iccvam.niehs.nih.com>) a FRAME (<http://www.frame.org.uk>) sme nenašli zodpovedajúcu alternatívnu metódu

6. Podmienky umiestnenia a starostlivosť o zvieratá

Zvieratá budú počas pokusu ustajnené individuálne v označených kliebkach, štandardná peletovaná strava a pitná voda ad libitum. Počas experimentu budú mať zvieratá riadený svetelný režim - svetlo/tma -12/12 .

Klimatické podmienky v chovných priestoroch – teplota $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ a rel. vlhkosť vzduchu 45-65% sú riadené klimatizačnou jednotkou .

Karanténa zvierat – minimálne 7dní .

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

7. Usmrtenie a použitie rezervných zvierat v ďalšej štúdi

Všetky štúdie budú ukončené usmrtením zvierat úderom do hlavy.

8. Spôsobilosť osôb, ktoré sa zúčastňujú na riešení štúdie (projektu)

Všetci pracovníci majú dlhodobú prax (väčšina z nich viac ako 20 rokov) v práci s laboratórnymi zvieratami v krátkodobých aj dlhodobých štúdiách vrátane ošetrojúceho personálu. V rámci interných školení Správnej laboratórnej praxe boli oboznámení aj s etickými princípmi pokusov na zvieratách.

9. Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu: 1998/15-221

Názov projektu: Účinok nanoenkapsulovaného simvastatínu na kardiovaskulárny systém pri experimentálnom metabolickom syndróme (NANOSIMKA)

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: (registračné číslo projektu)

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

koenzým Q10, simvastatín, nanoenkapsulácia, PCSK9

Účel projektu: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

Cieľom projektu je preskúmať vplyv nanoenkapsulovaného simvastatínu súčasne s koenzýmom Q10 pri metabolickom syndróme a hypertenzii, zvýšiť biodostupnosť simvastatínu v pečeni, znížiť tak jeho dennú dávku, zabrániť zníženiu hladiny CoQ10 a blokovať aktiváciu PCSK9. Pokiaľ je nám známe, experimentálne a klinické štúdie doteraz neanalyzovali účinky súčasného podávania nanoenkapsulovaného simvastatínu a koenzýmu Q10.

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

Zvýšenie lipoproteínov s nízkou denzitou (LDL-C) je spojené so zvýšeným rizikom kardiovaskulárnych ochorení. Statíny sú nosným kameňom lipidovej terapie na zníženie LDL-C počas posledných dvoch dekád. Napriek ich klinickej účinnosti u väčšiny pacientov však existuje stále vysoké riziko vzniku inicálnej, alebo rekurentnej aterosklerotickej choroby. Vzhľadom na nežiaduce účinky statínov, signifikantné množstvo pacientov netoleruje statíny v žiadnej dávke, prípadne účinnú dávku. Z týchto dôvodov sa v súčasnosti vyvíjajú nové terapeutické látky ako antisenzné nukleotidy proti apolipoproteínu B, inhibítory proroteín konvertázy subtilisin/hexín typ 9 (PCSK9) a inhibítory mikrozomálnych transfer-proteínov triglyceridov. Z týchto dôvodov je zrejmé, že podávanie statínov pacientom je na jednej strane prínosné, avšak výskyt vedľajších účinkov je pomerne častý. Originalita projektu preto spočíva v podstatnom znížení nežiaducich účinkov simvastatínu vrátane zvýšenej biodostupnosti, cieleného transportu, obmedzenia poklesu hladiny koenzýmu Q10, zamedzenia nárastu LDL-C a zvýšenia antioxidačnej kapacity tkaniva. Predpokladáme, že zníženie nežiaducich účinkov zabezpečí nanoenkapsulácia simvastatínu v špeciálnom polyméry súčasne s koenzýmom Q10 resp. inhibítorom PCSK9.

Použitie enkapsulovaných liečiv v nanočasticiach umožňuje zvýšenie koncentrácie liečiva v cieľovej oblasti, prienik liečiv do bunky a zníženie toxicity prostredníctvom zníženia koncentrácie v necieľových tkanivách. Zároveň sa výrazne zvyšuje biodostupnosť zle rozpustných substancií, prípadne substancií, ktoré podliehajú degradácii v gastrointestinálnom trakte. Je možné dosiahnuť prolongované uvoľňovanie substancií z nanočastíc v cieľovom tkanive, prípadne aj frakcionované uvoľňovanie viacerých liečiv. Tieto vlastnosti umožňujú použiť nanočastice ako selektívny nosič pre mnohé liečivé látky s nízkou

biodostupnosťou. V poslednej dobe boli publikované práce, ktoré dokázali, že enkapsulácia statínov umožňuje zvýšiť ich biodostupnosť a tým významne znížiť aplikovanú dávku.

Schopnosť posunúť hranice poznania nášho projektu spočíva práve v príprave, testovaní a aplikácii kombinácie nanoenkapsulovaného simvastatínu s látkami, o ktorých je známe, že znižujú nežiaduce účinky statínov (koenzým Q10, inhibítor PCSK9 a využitie polyméru s antioxidačnými vlastnosťami). Pokiaľ nanoenkapsulácia zabezpečí zníženie degradability, zvýšenie biodostupnosti a teda efektivity liečby, bude možné využiť na terapiu významne nižšie dávky liečiva. Je známe, že súčasné podávanie statínov a koenzýmu Q10 viedlo k zníženiu výskytu myopatie u liečených pacientov v randomizovanej štúdii až o 75%. Súčasná podávanie koenzýmu Q10 v enkapsulovanej forme, a najmä využitie polyméru s antioxidačnými vlastnosťami na enkapsuláciu by mohlo ešte viac znížiť výskyt nežiaducich účinkov. Inhibítory PCSK9 sú v súčasnosti pokladané za nádejné liečivá porúch lipidového metabolizmu a v súčasnosti prebieha fáza III. ich klinického testovania. V súčasnosti nie sú známe možnosti a potenciálne prínosy ich aplikácie v spojení s nanonosičom.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan laboratórny (<i>Rattus norvegicus</i>) línia ZUCKER-Lepr ^{fa} /Lepr ^{fa}	72 ks
Potkan laboratórny (<i>Rattus norvegicus</i>) línia ZUCKER-Lepr ^{fa} /Lepr ^{fa} lean	6 ks
Potkan laboratórny (<i>Rattus norvegicus</i>) línia WKY	72 ks

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

Nepredpokladáme nepriaznivý vplyv na zvieratá.

Predpokladaná úroveň krutosti: slabá krutosť

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Pre sledovanie nami vytýčených cieľov nie je možné použiť počítačový model zvierat a najvhodnejším modelom je laboratórny potkan. V projekte sme zvolili normotenzívny kmeň potkanov Wistar Kyoto a líniu ZUCKER-Lepr^{fa}/Lepr^{fa} a ZUCKER-Lepr^{fa}/Lepr^{fa} lean.

2. Redukcia počtu zvierat:

V plánovanom experimente je zabezpečený čo najnižší počet experimentálnych zvierat tak, aby bol experiment štatisticky vyhodnotiteľný a závery všeobecne prijateľné.

Po humánnom usmrtení zvierat sa odoberie maximálne množstvo vzoriek na sledovanie fyziologických, biochemických a morfológických parametrov. Je zabezpečená spolupráca medzi laboratóriami (ako v rámci _____ ak aj s inými laboratóriami), aby sa v rámci experimentov jednotlivých laboratórií dalo použiť čo najväčšie množstvo spoločných experimentálnych zvierat.

3. Zjemnenie:

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

Zvieratá budú usmrtené dekapitáciou.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Príloha č. 5

Názov projektu: Perspektívy použitia ventilátora AURA V (Chirana, SR) v liečbe experimentálnych modelov respiračného zlyhávania novorodencov

Netechnické zhrnutie projektu - 2086/15-2216

a) Informácie o cieľoch projektu:

Cieľom projektu je zistiť, či novo vyvinutý ventilátor AURA V od slovenského výrobcu Chirana (Stará Turá) zabezpečí porovnateľnú výmenu dýchacích plynov a hodnoty respiračných parametrov ako v súčasnosti jeden z najčastejšie používaných ventilátorov na Slovensku SLE5000 (SLE Limited, UK). Zároveň je naším cieľom overiť hypotézu, že kombinovaná ventilácia HFO+CMV (ktorá je jednou z možností SLE5000) resp. bi-level ventilácia (ktorá je jednou z možností ventilátora AURA V) môžu byť vhodnými alternatívami klasickej nízko-objemovej konvenčnej mechanickej ventilácie (SV-CMV) resp. vysokofrekvenčnej oscilačnej ventilácie (HFO), a to predovšetkým pri závažných formách RDS/ARDS alebo MAS u novorodencov. Tretím cieľom je overiť hypotézu, že impulzný a expulzný efekt ventilácie, ktorý bol v minulosti dokázaný pri vysokofrekvenčnej ventilácii, je možné demonštrovať aj pri CMV, pričom impulzný efekt by bolo možné následne využiť ako pomocnú metódu pri intratracheálnom podaní liečiv a expulzný efekt pri odstraňovaní aspirovaného materiálu (napr. mekónia) z pľúc. V rámci tejto časti projektu overíme, aké sú technické možnosti ventilátorov SLE500 a AURA V realizovať impulzný resp. expulzný efekt pri SV-CMV režime. Okrem účinkov jednotlivých ventilačných režimov na respiračné parametre budeme hodnotiť aj ich prípadné nežiaduce účinky na pľúcne tkanivo (t.j. na markery zápalu, oxidačného poškodenia a apoptózy), na tkanivo iných orgánov (srdce, pečeň) a tiež na kardiovaskulárne parametre (tlak krvi, frekvenciu srdca a variabilitu frekvencie srdca). Experimentálne modely respiračného zlyhávania novorodencov (RDS/ARDS a MAS) vytvoríme s použitím dospelých králikov. Model RDS/ARDS (syndrómu respiračnej tieňe/akútneho syndrómu respiračnej tiesne) vytvoríme opakovaným lavážovaním pľúc zvieraťa fyziologickým roztokom. Tým odstránime významnú časť pľúcneho surfaktantu, čím vyvoláme pľúcny edém a zápal. Model MAS (syndrómu aspirácie mekónia) indukujeme intratracheálnym podaním suspenzie mekónia, čím spôsobíme obštrukciu dýchacích ciest, dysfunkciu surfaktantu, zápal, pľúcny edém a pľúcnu vazokonstrikciu. Tieto modely sú všeobecne akceptované a používané v rámci experimentálneho testovania účinnosti rôznych druhov liečby respiračného zlyhávania novorodencov. Účinky jednotlivých druhov ventilačnej liečby budeme hodnotiť počas 4 hodín od vytvorenia príslušného modelu respiračného zlyhávania novorodencov resp. počas 2 hodín od podania liečiva impulzným efektom resp. od začiatku odstraňovania mekónia expulzným efektom. Z hľadiska posúdenia celkovej finančnej náročnosti ventilačnej liečby budeme okrem účinnosti ventilačných režimov hodnotiť aj spotrebu medicínskeho kyslíka oboma ventilátormi pri uvedených režimoch.

Predpokladáme, že ventilátor AURA V (Chirana, Stará Turá) dosiahne porovnateľné výsledky s ventilátorom SLE5000 (SLE Limited, UK), vďaka čomu by sa v budúcnosti mohlo jeho uplatnenie rozšíriť aj do skupiny novorodeneckých pacientov.

Rozdiely v účinnosti jednotlivých typov a nastavení ventilácie v prvej etape projektu posúdime na základe:

- krvných plynov a parametrov acidobázickej rovnováhy (PO_2 , PCO_2 , pH, BB, BE, HCO_3^-) a iných respiračných parametrov (indexov oxygenácie a ventilácie, poddajnosti pľúc, pravo-ľavých pľúcnych skratov)
- zmien celkového a diferenciálneho počtu leukocytov v krvi
- zmien celkového a diferenciálneho počtu buniek v bronchoalveolárnej lavážnej tekutine (BAL) tekutine
- povrchových vlastností BAL tekutiny zistených pomocou surfaktometra
- stanovenia stupňa pľúcneho edému (wet-dry lung weight ratio)
- markerov zápalu a oxidačného stresu v krvi, BAL a homogenáte pľúc, pečene a srdca biochemickými metódami (ELISA, rtPCR, Western-blot)
- hodnotenia apoptózy (programovateľnej smrti) buniek v BAL tekutine a pľúcnom tkanive rôznymi metódami (analýza viability buniek BAL bunkovým analyzátorom, analýza apoptózy buniek pľúc pomocou TUNEL metodiky a imunohistochemických metód)
- histologického hodnotenia poškodenia pľúcneho parenchýmu umelou pľúcnou ventiláciou
- analýzy možných nežiaducich účinkov liečby na kardiovaskulárne parametre (tlak krvi, frekvencia srdca, variabilita frekvencie srdca) a markery poškodenia organizmu (aldosterón, AST, ALT, GGT atď.) v korelácii s hladinami markerov stresu a poškodenia organizmu v plazme (analýza HPLC/hmotnostným spektrofotometrom).

Rozdiely v účinnosti impulzného efektu v druhej etape projektu posúdime na základe:

- rovnomernosti distribúcie podaného liečiva v jednotlivých segmentoch pľúc pomocou značenia farbenými mikročasticami a následného stanovenia ich množstva spektrofotometricky a tiež pomocou značenia fluorescenčnými mikročasticami a ich následného stanovenia pomocou fluorescenčnej spektrofotometrie

Rozdiely v účinnosti expulzného efektu v druhej etape projektu posúdime na základe:

- množstva odstráneného mekónia v BAL tekutine (stanovenie pomocou mekónium-kritu a spektrofotometricky)
- množstva zostatkového mekónia v jednotlivých segmentoch pľúc pomocou značenia farbenými mikročasticami a následného stanovenia ich množstva spektrofotometricky a tiež pomocou značenia fluorescenčnými mikročasticami a ich následného stanovenia pomocou fluorescenčnej spektrofotometrie.

Získané výsledky budeme hodnotiť vhodnými štatistickými metódami (test ANOVA, Studentov t-test), prípadne aj neparametrickými testami (Wilcoxon a Kruskal-Wallis).

Predpokladaný prínos projektu:

Rozvoj zápalu, pľúcneho edému a poškodenia surfaktantu a pľúcneho parenchýmu je v akútnej fáze akútneho poškodenia pľúc veľmi rýchly a včasná diagnostika a správna liečba má výrazný vplyv nielen na pľúcne parametre pacienta, ale aj na jeho ďalšiu prognózu. Prínosom nášho projektu budú jedinečné a doteraz neoverené informácie o tom, či má novo vyvinutý ventilátor AURA V od slovenského výrobcu Chirana (Stará Turá) porovnateľné parametre výmeny dýchacích plynov a ostatných ventilačných parametrov a markerov poškodenia pľúc ako v súčasnosti jeden z najčastejšie používaných ventilátorov SLE5000 (SLE Limited, UK). Naše experimentálne výsledky budú predstavovať bázu pre priamu aplikáciu poznatkov do praxe, pričom predpokladáme, že výrazne ovplyvnia prípadné použitie ventilátora AURA V v liečbe respiračného zlyhávania aj u novorodencov.

Ďalším predpokladaným prínosom projektu bude porovnanie SV-CMV ventilácie a bi-level resp. kombinovaného režimu ventilácie, ktorý by vzhľadom na využitie znalostí o stratégii otvorených pľúc mohol predstavovať vhodnú alternatívu ku SV-CMV aj HFO najmä u kriticky chorých novorodencov.

Z hľadiska zefektívnenia a rovnomernosti distribúcie intratracheálneho podania liečiv u ventilovaných pacientov považujeme za významné aj informácie o možnosti využitia impulzného efektu ventilácie. Pre neonatológov by mohlo byť zaujímavé aj využitie expulzného efektu ventilácie pri odstraňovaní aspirovaného mekónia z dýchacích ciest, keďže pre klasické odsávanie sú distálne dýchacie cesty prakticky nedostupné.

Dôležitým prínosom projektu bude aj objektívne hodnotenie možných nežiaducich účinkov zvolenej ventilačnej liečby na kardiovaskulárne parametre (tlak krvi, frekvenciu srdca a variabilitu frekvencie srdca), ktoré budú analyzované použitím najnovších matematických metód, doteraz neaplikovaných v experimentálnom výskume. Z pohľadu klinickej aplikácie sú tieto poznatky jedinečné a môžu predstavovať prelom v zaužívaných ventilačných intervenciách.

Predpokladáme, že správne zvolené ventilačné intervencie zvýšia efektivitu liečby RDS/ARDS a MAS. Sledovanie účinnosti ventilačnej liečby súčasne na viacerých úrovniach poskytne možnosť realizovať ventiláciu tak, aby sa eliminovali jej možné nežiaduce účinky v rámci celkového monitoringu terapie. Originalita predloženého projektu je založená na komplexnom prístupe optimalizácie terapeutických postupov pri RDS/ARDS a MAS, ktoré z klinického hľadiska môžu znamenať záchranu života novorodeneckých pacientov s respiračným zlyhávaním.

Ujma na zvieratách:

Manipulácia so zvieratami bude zabezpečená tak, aby boli uspokojené ich základné fyziologické potreby vrátane klimatických podmienok a poskytnutia optimálneho množstva vhodnej potravy a tekutín *ad libitum*. Do laboratória budú zvieratá privezené z centrálného zverinca vozidlom špeciálne upraveným na transport zvierat tesne pred postupom a budú umiestnené v laboratóriu, kde im zabezpečíme vhodné podmienky. Po aklimatizácii na podmienky prostredia šetrným spôsobom a bez vyvolávania zbytočného

stresu zvieratám podáme úvodnú dávku anestézy i.m.: tiletamín/zolazepam (Zoletil, Virbac; 15 mg/kg hmot.) + xylazín (Xylariem, Riemser GmbH; 5 mg/kg). V celkovej anestéze budú následne vykonávané všetky chirurgické zákroky – naoperovanie a zavedenie tracheálnej kanyly a katétrov do a. a v. femoralis a v. jugularis ext. Aj v celom ďalšom priebehu postupu budú zvieratá v celkovej anestéze, hĺbka ktorej bude udržiavaná kontinuálnym podávaním anestetika (Zoletil, 10 mg/kg hmot./hod.) i.v. pumpou a bude priebežne monitorovaná a kontrolovaná. V prípade potreby bude dávka anestetika zvýšená. Počas postupu budú zvieratá umiestnené na vyhrievanom operačnom stole, aby nedošlo k neprimeranému poklesu ich telesnej teploty. Priebežne budú zvieratám kontrolované vitálne funkcie (tlak krvi, frekvencia srdca). Po skončení postupu zvierat'u v bezvedomí podáme letálnu dávku anestetika - Thiopentalu za kontinuálnej kontroly tlaku krvi a EKG záznamu.

Z hľadiska posúdenia možného prínosu projektu je predpokladaná ujma na zvieratách primeraná, keďže celý postup je vykonávaný v celkovej anestéze zvierat'a.

Klasifikácia krutosti postupov: slabá/bez možnosti zotavenia.

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

Predpokladaná doba riešenia projektu:

Predpokladaná doba riešenia projektu – **48 mesiacov (1.7.2015-30.6.2019)**, počas ktorých uskutočníme **144 čiastkových postupov**, pričom v každom použijeme **iba jedno zviera (králik domáci)**.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Charakter nášho projektu nedáva možnosť dosiahnuť požadovaný, reprodukovateľný a validný výsledok inou dostupnou metódou bez použitia zvierat. Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami ako aj medzinárodne zavedenými osvedčenými metódami v starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne a zodpovedné zaobchádzanie so zvieratami.

Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu, používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh (projektov VEGA a APVV). Výsledky získané týmito metódami boli publikované a prezentované na mnohých odborných fórach doma aj v zahraničí. Z hľadiska dodržiavania zásad práce s pokusnými zvieratami neboli voči nim vznesené žiadne námietky, či už na odborných fórach v rámci diskusií alebo v oponentských posudkoch publikovaných článkov.

Postupy projektu 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 účelnej terapii. Považujeme preto nami navrhované metódy za vhodné aj pre realizáciu predkladaného projektu.

Pri realizácii postupov projektu sa budeme snažiť dodržiavať všeobecné **zásady 3R**:

- **zjemnenie** (Refinement), **zníženie** (Reduction) a **nahradenie** (Replacement).

Zjemnenie (Refinement): Spôsob manipulácie so zvieratami a starostlivosť o zvieratá počas postupu bude v súlade s požiadavkami uvedenými v *Nariadení vlády SR č. 377/2012 Z.z.* a *Vyhláske Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR č. 436/2012 Z.z.*

Operačné výkony budú vykonávané v celkovej anestéze: úvodná dávka anestézy i.m.: tiletamín/zolazepam (Zoletil, Virbac; 15 mg/kg hmot.) + xylazín (Xylariem, Riemser GmbH; 5 mg/kg). Po operácii bude zvieratám venovaná štandardná pooperačná starostlivosť. Aj počas ďalšieho priebehu postupu budú zvieratá v celkovej anestéze, ktorá bude udržiavaná kontinuálnym i.v. podaním Zoletilu (10 mg/kg hmot./hod.) injekčným dávkovačom.

Zníženie (Reduction): Na získanie platných výsledkov použijeme 8 zvierat v každej skupine, čo považujeme za najnižší možný počet tak z hľadiska reprodukovateľnosti, ako aj z hľadiska získania nevyhnutných údajov a objektívne hodnotiteľných výsledkov. Menší počet zvierat by mohol spôsobiť výraznejšie pôsobenie inter-individuálnych rozdielov s možnosťou spochybnenia objektívnosti výsledkov.

Nahradenie (Replacement): Postupy projektu nie je možné vykonať bez použitia zvierat. Králik domáci je v súčasnosti akceptovaný ako najrelevantnejší model RDS/ARDS vyvolaného opakovanou lavážou pľúc fyziologickým roztokom a tiež ako model MAS vyvolaného intratracheálnym podaním suspenzie mekonie. Pri takto plánovanom projekte nie je možné použiť nižší živočíšny druh, nakoľko pre posúdenie zmien respiračných, kardiovaskulárnych a zápalových parametrov v súvislosti s vytvorením modelov respiračného zlyhávania a následne aplikovanou ventilačnou liečbou je potrebné použiť zvieratá s hmotnosťou a priemerom dýchacích ciest porovnateľnými s hmotnosťou a priemerom dýchacích ciest u novorodencov, aby sa zabezpečila optimálna výťažnosť a klinická aplikovateľnosť výsledkov. Vzhľadom na protokol postupov projektu je králik domáci najvhodnejším živočíšnym druhom použiteľným v našich podmienkach.

Klasifikácia krutosti postupov: slabá/bez možnosti zotavenia.

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

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 2236/15-221

Testovanie účinnosti aktívnej a pasívnej vakcíny na animálnom modeli pre FTDP 17

Podrobný účel postupu:

FTDP 17 predstavuje skupinu ochorení, ktoré sú vyvolané špecifickými mutáciami na tau proteíne. Jednotlivé mutácie stimulujú tvorbu rozmanitých patologických štruktúr v rôznych oblastiach mozgu. S tým súvisí aj rôznorodá klinická symptomatológia. FTDP17 prípady majú pomerne zriedkavý výskyt, napriek je veľký záujem o účinnú terapiu, ktorá by dokázala zastaviť alebo vyliečiť tieto závažné ochorenia.

Predložený projekt má za úlohu testovať účinnosť aktívnej a pasívnej vakcíny zameranej proti patologickým formám tau proteínu v podmienkach in vivo. Pre tieto účely použijeme myšie modely, ktoré v centrálnej nervovej sústave produkujú mutované formy tau proteínu. Zvieratám budú aplikované intraperitoneálne protilátky alebo subkutánne imunogén s cieľom potlačiť neurodegeneračné zmeny v centrálnej nervovej sústave. Po ukončení experimentu, zvieratám odoberieme krv z očného splavu, humánne usmrtime a odoberieme vzorky mozgu na biochemické a imunohistochemické vyšetrenie. Preštudovali sme všetky dostupné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili nahradiť zvieratá za bunkové systémy. Komplexnosť sledovaných molekulárnych procesov si však vyžaduje použiť cicavčí model. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Testovanie schopnosti aktívnej a pasívnej imunoterapie terapeuticky ovplyvniť neurodegeneračné zmeny v centrálnej nervovej sústave animálnych modelov FTDP17 nie je možné vykonať na bunkových kultúrach, keďže in vitro systémy nie sú schopné vytvoriť plnú formu neurodegeneračných zmien. Vzhľadom na skutočnosť, že v súčasnosti nie je dovolené tieto metódy skúmať na ľudských pacientoch bez predchádzajúceho otestovania na zvieratách, je použitie animálnych modelov nevyhnutné.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia (1x v za týždeň) LEN PASÍVNA IMUNOTERAPIA	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 1 minútu.
Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia (1x za mesiac) LEN AKTÍVNA IMUNOTERAPIA	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 0.5-1 minúta.
Odber krvi (retroorbitálny)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Podá sa polovičná dávka anestetík na utlmenie bolesti. V okamihu ako je

plexus)	zvíra sedované sa sklenená kapilára jemne zasunie pod očnú guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť stredná. Trvanie 1 minútu.
---------	--

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie:

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

Redukcia:

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

Nahradenie:

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

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

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

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu, všetky odbery tkanív sa uskutočnia v hlbokoj anestézii a po odbere budú zvieratá humánne usmrtené. Odber, krvi trvá len pár sekúnd a vykonáva sa na sedovaných zvieratách. Intraperitoneálna a subkutánna aplikácia trvá niekoľko sekúnd. Zvieratá dostávajú nízke dávky netoxických protilátok alebo imunogénu (bol už nezávisle otestovaný v rozsiahly toxikologických štúdiách na potkanoch, myšiach, psoch a králikoch), ktoré nespôsobujú žiadnu nebezpečnú imunitnú odpoveď, ktorá by viedla k poškodeniu organizmu. Získané informácie z predkladaného experimentu významne napomôžu pochopiť mechanizmus šírenia neurofibrilárnej degenerácie a jej prípadného zastavenia prostredníctvom imunitnej odpovede.

Dátum predpokladaného začatia projektu, dĺžka trvania projektu:

Začiatok pokusu je plánovaný na 20.5.2015 a bude sa realizovať v priebehu nasledujúcich dvoch rokov, do 20.5.2017.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Príloha 2

Netechnické zhrnutie projektu. 2314/15-221

Názov projektu: Izolácia, množenie a ožiovovanie Rickettsií, Coxiella burnetii, Chlamýdií a im príbuzných mikroorganizmov na laboratórnych zvieratách.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): vnútrobunkové baktérie, epitopy, protilátky.

Účel projektu* :

1. Základný výskum a
2. Vysokoškolské, odborné vzdelávanie, ktoré bude prebiehať výlučne formou „školení“, resp. práce so zvieratami, úzkej skupiny vybraných PhD. študentov (absolventov prípadne), ktorý na našom pracovisku pôsobia ako interní aspiranti.

Ciele projektu a prínos z vykonaného projektu:

Cieľom projektu je izolácia, množenie a ožiovovanie Rickettsií, Coxiella burnetii, Chlamýdií a im príbuzných mikroorganizmov na laboratórnych zvieratách. Pokúsime sa získať hlbšie poznatky o pôsobení nami sledovaných patogénov (Rickettsia spp., Coxiella spp. a Chlamýdia spp.) v živom organizme, ako aj rozšíriť naše vedomosti o imunitnej odpovedi infikovaných zvierat (myši, morčiat či králikov). Aplikácia sérologických (ELISA, IFA), molekulárne biologických (PCR) a biochemických metód, použitá na spracovanie získaných orgánov a krvi, nám umožní prehĺbiť doterajšie poznatky o vzniku a priebehu ochorení, ktoré uvedené baktérie spôsobujú.

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

Vedecký prínos vidíme najmä v možnosti odhalenia dominantných, imunologicky aktívnych epitopov. Určenie antigenicity proteínových alebo iných stavebných zložiek bakteriálnych buniek nám môže dať príležitosť na zlepšenie diagnostiky a liečby rickettsií, koksielózy alebo chlamýdiového ochorenia. Bez aplikácie živých zvierat v pokusoch nie je možné odhaliť imunologicky aktívne miesta ani prípadné mutácie, ktoré v inkriminovaných zložkách nastávajú. Príprava vhodných diagnostických preparátov je tiež základom tvorby budúcich vakcín.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Myši BALB/c, samičky, v počte 660 ks

Morčatá v počte 30 ks

Králik, 2,5-3kg, v počte 60 ks

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

Nepredpokladá sa nutnosť aplikácie prípravkov na tlmenie bolesti a ak sa predsa spozoruje zmena správania, ktorá by mohla súvisieť s bolesťou, zvieratám podáme prípravok na tlmenie bolesti v dávke predpísanej príslušným výrobcom.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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), Nariadenie Vlády SR (Zbierka zákonov č. 377/2012) a Vyhláška 436 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR. Imunologickú odpoveď živého organizmu na pôsobenie baktérií nie je možné sledovať v in vitro systémoch.

2. Redukcia počtu zvierat:

Plánovaný počet zvierat je maximálny a je v ňom zahrnutý maximálny počet potrebný pre pokrytie požiadaviek riešiteľov vedeckých projektov. Použitie zvierat obmedzíme na nevyhnutné minimum. Opätovné použitie zvierat nie je možné.

3. Zjemnenie:

Myši, morčatá aj králiky budú počas celého pokusu držané v štandardných podmienkach podľa platnej normy EU, pričom budeme rešpektovať základné etické princípy požadované pri zaobchádzaní s pokusnými zvieratami. Počas celého pokusu budeme dodržiavať postupy maximálne zjemňujúce podmienky a priebeh práce so zvieratami. 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 prísun potravy a vody.

Projekt nebude podliehať opätovnému schvaľovaniu.

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu:

In vivo účinok BGs (Bacterial Ghosts) ako nosiča protinádorových liečiv.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2509/15-221

Kľúčové slová v projekte:

BGs, Oxaliplatina, bunky CT 26, bacterial ghosts

Účel projektu: Aplikovaný výskum

Ciele projektu:

Úlohou tohto projektu je overiť či výsledky *in vitro* pokusov, kde sa po použití BGs ukázalo, že proliferčná aktivita nádorových buniek bola významne nižšia, ako po použití iba samotného liečiva, budú potvrdené aj na experimentálnych zvieratách. Projekt je súčasťou vývoja nového terapeutického postupu na určité druhy nádorových ochorení.

Prínos z vykonaného projektu: Využitie BGs (Bacterial Ghosts) ako protinádorového liečiva predstavuje nové možnosti v liečbe nádorových ochorení u ľudí. BGs predstavujú prirodzený adjuvans, ktorý má schopnosť sa naviazať na imunokompetentné bunky a vďaka PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern) aj na nádorové bunky. Väzba BGs na povrch tumorových buniek môže zvýšiť imunitnú odpoveď voči nádoru pomocou zvýšenej aktivity antigén prezentujúcich buniek.

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

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Balb/c myši, samice, 20-25g

Projekt sa bude skladať z dvoch častí; prvá časť je zameraná na vývoj modelu kolorektálneho karcinómu u myší najmä v zmysle optimalizácie počtu nádorových buniek CT-26, rastu nádora a terapeutického ovplyvnenia rastu nádora. V tejto fáze plánujeme použiť 10 zvierat. V druhej časti projektu bude testovaný účinok BGs s obsahom Oxaliplatiny na rast nádoru indukovaného i.p. implantáciou nádorových buniek CT 26. V tejto fáze plánujeme použiť 8 skupín po 10 myší. 10 samíc plánujeme ako rezervu.

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

Vzhľadom na to, že ide o nádorový model a podávanie cytostatika musíme počítať s nežiaducimi účinkami, ktoré sa môžu po podaní liečiva prejaviť. Akékoľvek zhoršenie

Príloha 3

zdravotného stavu zvierat bude konzultované s veterinárnym lekárom a tieto zvieratá v prípade ťažkých stavov budú humánne utratené.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Jednotlivé postupy (váženie, i.p. aplikácia, implantácia nádorových buniek) podľa klasifikácie krutosti boli hodnotené ako slabé až stredné. Možné prejavy nežiadúcich účinkov cytostatika - kruté

Zvieratá prejavujúce bolesť budú humánne utratené.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Test na zvieratách sa nedá nahradiť alternatívnymi metódami *in vitro*, *in vitro* výsledky je potrebné v tejto fáze potvrdiť/nepotvrdiť na zvieratách. *In vivo* hodnotenie zahŕňa aj vplyv faktorov organizmu čím sa približuje podmienkam dôležitým pre humánne aplikácie.

2. Redukcia počtu zvierat:

Počty zvierat v pokuse sú primerané, redukované v maximálnej miere; ich ďalšie zníženie by mohlo ovplyvniť reprodukovateľnosť a validitu pokusu.

Uvedený počet (100) zvierat v pokuse a jednotlivých skupinách je potrebný z dôvodu štatistického hodnotenia pokusu vzhľadom nato, že nie u každého zvieratá inokulácia nádorových buniek vyvolá nádor.

3. Zjemnenie:

Myš je najčastejším modelom pre hodnotenie *in vivo* účinnosti protinádorovej terapie. Tento model i keď ide o malé laboratórne zvieratá poskytuje dostatok informácií pre potvrdenie účinku, návrh dávok, dávkovacej schémy, prípadne ďalšieho biologického materiálu pre rozšírené hodnotenie: biochémia, hematológia, protilátky a pod.

Vzhľadom na to, že v pokuse nebudú vykonané žiadne bolestivé zákroky, nie je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť. Pri aplikácii a manipulácii so zvieratami budú uplatňované postupy zamerané na zníženie miery strachu. Projekt bude vykonávaný tak, aby boli zvieratá eutanazované skôr než nastúpi krutá krutosť

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno

Do 30.03.2016 budú výsledky z projektu zaslané v požadovanom formáte na ŠVPS SR na spätné posúdenie.