

Príloha č. 2
Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Analýza post-traumatických zápalových a regeneračných procesov pozdĺž rostro-kaudálnej osi miechy po podaní mezenchýmových kmeňových buniek: imunohistochemická a neuroproteomická štúdia.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3345/15-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): poranenie miechy, regenerácia, kmeňové bunky dospelé, proteomika, MALDI

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

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

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

Cieľom projektu bude ovplyvnenie viacerých post-traumatických faktorov v segmentoch nad a pod poranením miechy (PM) a to pomocou bunkovej terapie mezenchýmovými kmeňovými bunkami-MSC. Objasníme mechanizmy pôsobenia MSC a ich produktov za účelom: i) zníženia pro-zápalových cytokínov uvoľnených z mikrogliu/makrofágov v PM a ii) stimulácie prerastania nervových vlákien v in vivo systéme. Pomocou hmotnostnej spektrometrie, zobrazovacej analýzy a imunohistochemických techník získame globálnu mapu chemokínov, cytokínov a trofických faktorov pred a po aplikácii bunkovej terapie.

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

V súčasnosti neexistuje žiadna účinná liečba pre poranenú miechu. Dlhodobá liečba pacientov s PM sa sústreďuje na rehabilitáciu, odstraňovanie bolesti, spasticity a prevenciu komplikácií. Výskum v oblasti mechanizmov neuroprotektie sa teda zaoberá vysoko aktuálnou problematikou z medicínskeho hľadiska. Očakávame, že dôkladná proteomická analýza a mapovanie expresie proteínov v neurónoch a glii prinesú nové originálne poznatky o mechanizme neuroregenerácie a plasticity. Následná proteomická analýza výrazným spôsobom prispeje k odhaleniu podstatných aspektov týchto mechanizmov prostredníctvom cielenej identifikácie látok proteínovej povahy, nachádzajúcich sa v proteóme nervových buniek v rostrálnom *versus* kaudálnom segmente miechy. Výsledky ohľadom zmeny proteómu po aplikácii bunkovej terapie budú kľúčovým faktorom k potvrdeniu neuroprotektívnych a imunomodulačných vlastností dospelých MSC.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch budú použité laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar, samce v počte 210 ks na celú dobu riešenia.

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

Navodenie traumatického poškodenia miechy podľa štandardného modelu SCI sa uskutočňuje chirurgickým zákrokom v celkovej inhalačnej anestéze. Anestetizovaným potkanom do oblúka stavca Th10 vyvrtáme otvor, cez ktorý zavedieme do epidurálneho priestoru 2F Fogartyho katéter až na úroveň Th8-Th9 miechy. Epidurálne umiestnený balónik naplníme vymedzeným objemom tekutiny (12,5µl) a necháme pôsobiť 5 minút. Po uplynutí časového intervalu z balónika odoberieme tekutinu a vytiahneme. Model spôsobí neurodegeneratívne zmeny v najcitlivejších bunkových populáciách v mieche v rostro- kaudálnom smere s tvorbou cýst, ktoré sa navonok odrazia v strate sivej a bielej hmoty a paralýze panvových končatín. Zvieratá dosahujú na 24hodín po poranení BBB skóre 0, žiadna pohyblivosť panvových končatín, avšak v priebehu 7 dní dochádza ku spontánnej regenerácii, kedy dosiahnu BBB skóre maximálne 12-14.

Injekčná aplikácia MSC / dospelých mezenchýmových kmeňových buniek, alebo ich produktov - sekretómov, čo sú vlastne biologicky aktívne látky sa použijú na zvýšenie regeneračnej kapacity v poranených segmentoch miechy. Kompresný model poranenia miechy ako aj injikovanie kmeňových buniek, alebo ich produktov sa vykonáva v celkovej inhalačnej anestézii. Zvieratá po zákroku vykazujú prechodnú úplnú paralýzu panvových končatín. Zvieratá sú denne monitorované a v týždňových intervaloch testované na BBB skóre.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Traumatické poranenie miechy s následným prežívaním a transplantáciou adultných kmeňových buniek sú procesy dynamické, ťažko predvídateľné a závisiace na mnohých endogénnych a exogénnych faktoroch. Z týchto dôvodov nie je možné uskutočniť dané experimenty alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat. Okrem toho, pokus nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet 210 ks zvierat bol stanovený vzhľadom k tomu, že predpokladáme individuálnu variabilitu výsledkov, z tohto dôvodu plánovaný počet 5-9 kusov zvierat v experimentálnych skupinách je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný počet pre získanie štatisticky významných výsledkov s prihliadnutím na úspešnosť modelu, ktorú jeho autori odhadujú ako 70- 80%-nú (hlavne pri dlhodobom 60 dňovom prežívaní). Skupiny zvierat v postupoch, uvedených v prílohe č. 1 sú nevyhnutné na získanie relevantných výsledkov ako stavu poškodenia, tak aj neuroprotektívnych účinkov podávania adultných kmeňových buniek, alebo ich produktov v komplexnom pohľade na mechanizmus účinku. Tkanivo z poranenej miechy nemôže byť použité na biochemicko-proteomické analýzy a zároveň aj na histologické a imunohistochemické analýzy. Uvedená skutočnosť vyplýva z rozdielnych požiadaviek aplikovaných metód na stav a povahu študovaného tkaniva. V prípade biochemicko-proteomických analýz je nevyhnutné tkanivo v čo možno najkratšom čase po

extrakcii zmraziť – teda zachovať v pôvodnom stave, aby sa predišlo nožnej degradácii bielkovín. Imunohistochemické a histologické analýzy si na druhej strane vyžadujú fixáciu tkaniva pomocou fixačného roztoku.

REDUKCIA POČTU ZVIERAT: Za účelom minimalizácie počtu použitých zvierat sme počty zvierat v experimentálnych skupinách zredukovali z 9ks na 7ks (3-21 dňové prežívanie) a v sham skupine na 5ks. Počet 7ks je minimálny počet pre štatistické hodnotenie, s ohľadom na možnú individuálnu variabilitu. Počet zvierat v skupine s dlhodobým prežívaním, t. j. 60 dní, sme ponechali v pôvodnom stave (9ks) z dôvodu zvýšenej pravdepodobnosti rozdielnosti priebehu regeneračných procesov u jednotlivcov počas dlhodobého prežívania.

3. Zjemnenie:

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

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Overenie účinnosti antiadhezívnych prostriedkov obsahujúcich furan, resp. palmitát hyaluronanu na modeli pooperačných adhézií u potkanov

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 34.14/15-221

Kľúčové slová: pooperačné adhézie, model, potkan, furan a palmitát hyaluronanu

Účel projektu:

- aplikovaný výskum s cieľom zabránenia a prevencie chorôb, poškodenia zdravia človeka, pri vývoji zdravotníckych výrobkov.

Ciele projektu:

Produkty, u ktorých sa plánuje použitie pri chirurgických operáciách u ľudí, sa musia otestovať antiadhezívne vlastností látok na modeli brušných pooperačných zrastov. Ako najvhodnejší druh pre testovanie inhibície adhézie sa uvádza laboratórny potkan.

Cieľom projektu je overiť účinnosť textílií obsahujúcich furan, resp. palmitát hyaluronanu v troch modifikáciách a fólie z palmitátu hyaluronanu na proces vzniku pooperačných adhézií v brušnej dutine u zdravých potkanov po období 14 dní, resp. 30 dní.

Prínos z vykonaného projektu:

Predpokladaným prínosom bude získanie nových originálnych poznatkov o mechanizme účinku látok s potenciálnym antiadhezívnym efektom na pooperačné zrasty v brušnej dutine po chirurgických zákrokoch u zdravých potkanov. Najúčinnnejšia látka sa vyberie pre prevádzkové podmienky prípravy nových zdravotníckych prostriedkov. Poznatky získané z predkladaného projektu budú takisto podkladom pre vývoj ďalších nových a bezpečných zdravotných pomôcok v chirurgii pre zabránenie vzniku zrastov s perspektívou využitia vo veterinárnej a humánnej medicíne.

Druh použitých zvierat a ich predbežné počty:

V postupe sa použijú potkany vo veku 10 – 12 týždňov, s telesnou hmotnosťou v rozsahu 270 – 290 g. Počet 75 zvierat postačuje pre stanovenie účinnosti zdravotníckych prípravkov pri zvieracom modeli brušných pooperačných zrastov a porovnanie s negatívnou kontrolou.

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

Potkany sa podrobia operácii v celkovej i lokálnej anestézii, ktorá vychádza z predpokladaného spôsobu užívania zdravotníckeho prípravku, t.j. jednorazová aplikácia implantátov pri chirurgických zákrokoch v brušnej dutine. Pooperačný stav a doba pozorovania 14, resp. 30 dní sú optimálne pri eliminácii nepriaznivých vplyvov na zdravie zvierat denným podávaním analgetík.

Predpokladáme, že ujma na použitých zvieratách bude len v prvých dvoch dňoch po operácii, kedy sa uskutoční proces hojenia vnútorného poranenia. Počas všetkých úkonov sa bude eliminovať stres a utrpenie podaním celkovej anestézie a dennej aplikácii analgetík. Z hľadiska bezpečnosti budúceho zdravotného prostriedku pre človeka prínos projektu výrazne prevyšuje ujmu u experimentálnych zvierat.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Predpokladáme, že postupy vykonávané na zvieratách budú strednej úrovne krutosti podľa klasifikácie krutosti postupov.

Súlad s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia**Nahradenie (replacement)**

V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatívna metóda testovania antiadhezívnych vlastností látok na modeli brušných pooperačných zrastov. Používa sa klasická *in vivo* metóda. Potkan laboratórny je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre posúdenie účinkov zdravotníckeho produktu v mieste jeho podania.

Obmedzenie (reduction)

Aby výsledky sledovania antiadhezívnych vlastností látok na modeli brušných pooperačných zrastov mali určitú výpovednú hodnotu, musí sa použiť dostatočný počet zvierat. Pätnásť zvierat v dvoch časových úsekoch (na 1 látku) je optimálny počet potrebný pre sledovanie účinkov zdravotníckych prostriedkov na modeli brušných pooperačných adhézií a nemôže byť redukovaný. Použijú sa samci potkanov.

Zjemnenie (refinement)

Nakoľko pri testovaní antiadhezívnych vlastností látok na modeli brušných pooperačných zrastov sa jedná o operačný postup, v ktorom dobrý zdravotný stav a dobrá kondícia zvierat hrajú veľmi dôležitú rolu, starostlivosti o zvieratá ako i manipulácii s nimi sa bude venovať veľká pozornosť. Zvieratá budú ošetrované skúsenými pracovníkmi a budú pod neustálym dohľadom veterinárneho lekára. Postupy používané pri aplikácii implantátov majú strednú úroveň z hľadiska spôsobenej bolesti a stresu, preto bude zvieratám podaná celková i lokálna anestézia pri operácii s následnou aplikáciou analgetík, ktoré sa budú ďalej podávať denne počas trvania štúdie. Na zabránenie vzniku pooperačných zápalových reakcií sa použije antibiotikové krytie počas prvých troch dní. Operačné zákroky budú vykonávané skúseným odborným pracovníkom s dlhoročnou praxou.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: **nie**

Kľúčové slová: hypoxia, nádorové mikroprostredie, rádioterapia

Účel projektu:

1. Cieľ projektu:

Cieľom projektu je sledovať vplyv nízkych dávok externého žiarenia na citlivosť resp. rezistenciu zdravého tkaniva na následné vysoké terapeutické dávky žiarenia. Myši budú vystavené nízkej (0,3Gy) a/alebo vysokej (3,0Gy) dávke žiarenia a bude sledovaný vplyv na prežívanie.

2. Prínos z vykonaného projektu

Získané výsledky môžu pomôcť ku skvalitneniu liečby onkologických pacientov. Rádioterapia je jednou zo základných liečebných modalít v terapii nádorového ochorenia. Jej nedostatkom je poškodenie aj zdravého tkaniva a nedostatočná dávka v závislosti od lokality a citlivosti nádoru. Výsledky navrhovaných pokusov by mali prispieť k optimalizácii rádioterapie onkologických ochorení. Ich overenie v predklinických štúdiách na zvieratách je nevyhnutné.

3. Počet a druh použitých zvierat:

Myš laboratórna kmene BDA/2 a C57/bl6 96 a 96 jedincov.

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

Ožarovanie nízkou dávkou nebude mať bezprostredne negatívny vplyv na zvieratá, pri závažnom zhoršení zdravotného stavu (pri podaní vysokej dávky žiarenia) budú zvieratá eutanazované letálnou dávkou tiopentalu.

5. Predpokladaná úroveň krutosti:

Postupy sú hodnotené ako kruté

6. Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie

Pred začatím experimentov na laboratórnych zvieratách boli vykonané experimenty *in vitro* a boli nastavené základné parametre postupov.

Obmedzenie:

Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Použitie dvoch kmeňov laboratórnych myší je potrebné za účelom vylúčenia, že odpoveď na ožiarenie je špecifická len pre jeden kmeň laboratórnych myší.

Projekt nadväzuje na predchádzajúce experimenty s použitím zvierat, základné parametre účinkov *in vivo* sú známe a umožnia zredukovať počet zvierat.

Zjemnenie:

Myši budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. Väčšina pozorovaní bude prebiehať bez toho, aby zviera opustilo prostredie svojej kletky.

7. Spätné posúdenie projektu:

Vzhľadom k tomu že postupy boli klasifikované ako kruté, projekt podlieha spätnému posúdeniu. Toto bude možné vykonať po jeho ukončení do 30. 4 2018.

Netechnické zhrnutie projektu 342a/15-221a

Názov projektu:

Využitie ľudských mezenchýmových stromálnych buniek izolovaných zo zubnej drene na cielenú génovú terapiu gliómov

Kľúčové slová:

Glioblastóm, génová terapia, kmeňové bunky

Účel projektu:

Základný výskum

Cieľ projektu:

Cieľom pokusu je využitie ľudských mezenchýmových stromálnych buniek izolovaných zo zubnej drene na cielenú génovú terapiu gliómov (na princípe použitia samovražedného enzýmu cytozín deaminázy a predliečiva 5-fluorocytozínu). Predkladaný projekt je súčasťou nášho dlhodobého výskumu, v ktorom sledujeme možnosť využitia dospelých kmeňových buniek ako nosičov terapeutických génov na neinvazívnu a cielenú terapiu nádorového ochorenia.

Prínos projektu:

Možnosti liečby gliómov, najčastejšie sa vyskytujúcich primárnych mozgových nádorov sú veľmi limitované predovšetkým kvôli invazívnej a agresívnej povahe týchto nádorov a tiež ich schopnosti odolať chemoterapii či rádioterapii. Glioblastóm je spomedzi gliómov najagresívnejší a nesie najvyšší stupeň malignity (stupeň IV podľa WHO). Štandardný postup liečby začína maximálnym možným chirurgickým odstránením nádoru, po ktorom nasleduje rádioterapia spolu s konkomitantnou a adjuvantnou chemoterapiou. Napriek nemalým pokrokom vo všetkých troch oblastiach liečby, prognóza pre pacientov ostáva naďalej nepriaznivá a skoro vždy dochádza k relapsu ochorenia. Medián prežívania sa pohybuje okolo 14 mesiacov. Na Slovensku sa ročne diagnostikuje okolo 200 nových prípadov glioblastómu.

Projekt, ktorého súčasťou je práca so zvieratami je orientovaný na výskum rakoviny a liečbu nádorového ochorenia. Riešenie projektu priblíži tento inovatívny terapeutický prístup k pacientom.

Počet a druh použitých zvierat:

Potkan laboratórny kmeň Sprague Dawley, 200 jedincov, samičky aj samce

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

Počas všetkých chirurgických zákrokov budú zvieratá v celkovej anestézii, po zákroku môžu pociťovať krátkodobú strednú bolesť. Na základe skúseností z predchádzajúcich projektov predpokladáme, že priebeh ochorenia bude rýchly, zvieratá s náhlým zhoršením stavu budú eutanazované, aby sme zabránili utrpeniu, potkany s progredujúcim ochorením nebudú ponechané na dožitie.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Stredná

Súladi s požiadavkami „3R“**Nahradenie**

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov, projektu predchádzali štúdie *in vitro*.

Obmedzenie:

Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Projekt nadväzuje na predchádzajúce schválené projekty, sme schopní predvídať terapeutickú účinnosť na základe experimentov s mezenchýmovými kmeňovými bunkami izolovanými z tukového tkaniva ako aj priebeh ochorenia u kontrolných skupín, čo nám umožňuje počet zvierat v určitých experimentálnych skupinách redukovať. V prípade nízkeho rozptylu hodnotených kritérií (klinických príznakov, prežívania) v jednotlivých skupinách bude na štatisticky významné vyhodnotenie výsledkov postačujúci nižší počet zvierat.

Zjemnenie:

Pokiaľ to zdravotný stav zvierat umožní, budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. Zvieratá s vážne zhoršeným zdravotným stavom nebudú ponechané na dožitie, ale budú eutanazované.

Spätné posúdenie projektu:

Postupy klasifikujeme ako „stredné“, preto nie je potrebné vykonať spätné posúdenie projektu.

Netechnické zhrnutie projektu 3429/15-221

Názov projektu:

Antioxidačné, antikarcinogénne a fotoprotektívne účinky levanduľového oleja in vitro.

Kľúčové slová:

Primárne myšie keratinocyty, éterický olej levandule (*Lavandula angustifolia*)

Účel projektu:

Základný výskum

Cieľ projektu:

Hlavným cieľom projektu je: i) charakterizovať antioxidačný potenciál levanduľového oleja, ii) zistiť, či tento éterický olej môže chrániť zdravú kožu pred nepriaznivými účinkami UVA žiarenia (fotoprotektívne účinky) a iii) či je LO schopný selektívne inhibovať proliferáciu zhubných melanómových buniek, t.j. či môže mať perspektívne využitie v cielenej terapii/liečbe kožných melanómov. Predkladaný projekt je súčasťou dlhodobého výskumu nášho pracoviska.

Prínos projektu:

Predkladaný projekt je zameraný na komplexné posúdenie antioxidačnej a fotoprotektívnej kapacity levandulového oleja (*Lavandula angustifolia*, LO) na bunkovej a molekulárnej úrovni. Projekt prinesie nové pôvodné výsledky a ukáže, či LO môže chrániť kožu pred nepriaznivými účinkami UV žiarenia, prípadne má kapacitu selektívne inhibovať rast nádorových kožných buniek. Napriek mnohým vedeckým prácam, ktoré sa doteraz venovali biologickým účinkom LO, neexistujú v súčasnosti štúdie, ktoré skúmajú protektívne vlastnosti LO s využitím zdravých keratinocytov (ľudské bunky HaCaT, a primárne myšie keratinocyty) a nádorových kožných buniek (HMB-2 bunky). Kombinácia biologických metód, molekulárno-genetických postupov, mikroskopických techník a analytických metód prispeje k získaniu nových poznatkov: i) o protektívnych účinkoch LO voči cytotoxickým a genotoxickým vplyvom UVA žiarenia (prežívanie buniek, morfológické zmeny buniek, jednovláknové a dvojvláknové zlomy DNA, oxidačné poškodenia DNA); ii) o úlohe LO pri eliminácii oxidačného stresu vyvolanom UVA (aktivita antioxidačných enzýmov, indukcia intracelulárnych reaktívnych foriem kyslíka –iROS); iii) o ochrannom účinku LO na základné bunkové procesy (bunkový cyklus, apoptóza, zmeny v bunkovej signalizácii) v bunkách, ktoré boli exponované UVA žiareniu. Prínosom projektu budú taktiež cenné informácie o dávkach LO, ktoré pôsobia fotoprotektívne. Poznatky získané počas realizácie projektu sú kľúčové pre iniciáciu ďalších výskumných aktivít, ktorých cieľom bude optimalizácia spôsobu aplikácie LO pre komerčné využitie, vo forme opaľovacích krémov alebo iných kozmetických prípravkov ako ochrana voči UVA žiareniu. Jedinečnosťou projektu bude aj objasnenie mechanizmov fotoprotektívnych účinkov a selektívnej toxicity LO voči

nádorovým kožným bunkám, čo môže byť základom pre využitie LO v liečbe nádorových kožných ochorení.

Počet a druh použitých zvierat:

- Myš laboratórna kmeň Balb/c dospelé jedince samičky aj samce (navrhovaný počet 90 na tri roky riešenia projektu)

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

Pri izolácii keratinocytov sa neočakáva nepriaznivý vplyv na zdravotný stav zvierat, keďže sa budú odoberať až po usmrtení zvierat.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Bez možnosti zotavenia

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie:

V pokusoch použijeme aj stabilizované bunkové línie, čo nám umožní znížiť počet zvierat potrebných na odber keratinocytov. Bohužiaľ však neexistuje bunková línia keratinocytov, ktorá by zachovávala dôležité charakteristiky týchto buniek, jediný spôsob, ako študovať vlastnosti a bunkové odpovede približujúce sa *in vivo* situácii je príprava primárnej kultúry. V primárnej kultúre sú po určitý čas zachované hladiny expresie špecifických markerov, preto sú primárne bunkové kultúry keratinocytov vhodným experimentálnym modelom.

Obmedzenie:

Počet zvierat je minimalizovaný tak, aby sme získali dostatočný počet keratinocytov 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 izoláciu keratinocytov. Pretože počty týchto buniek sa ďalej dajú znásobiť pre potreby experimentov metódami *in vitro* kultivácie. Priemerná dĺžka prežitia keratinocytov v primárnej kultúre je 10 dní, potom už dochádza k zmene morfológie a nástupu senescencie. Priemerné množstvo izolovaných keratinocytov z jednej myši (chrbát a chvost) je $16-20 \times 10^6$. Množstvo buniek je dostatočné a preto sa robí izolácia keratinocytov len jednej myši na kultiváciu *in vitro*. Projekt je naplánovaný na 48 mesiacov, a keďže sa zameriava na komplexné posúdenie antioxidačnej kapacity levandulového oleja (koncentračné a časové závislosti, cytotoxicita, genotoxicita, mechanizmy internalizácie, zmeny morfológie buniek atď.) je počet 90 myši 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 klieťok 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

Príloha 2 :

Netechnické zhrnutie projektu

3548/15-221

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

Názov projektu: Očná znášanlivosť opakovanej dávky kvapiek LEVODEXA v porovnaní s aplikáciou samostatného levofloxacinu a dexametazonu u králikov

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová: očná znášanlivosť, kvapky, králik, levodexa, levofloxacin a dexametazon

Účel projektu:

- aplikovaný výskum s cieľom liečby chorôb, poškodenia zdravia človeka, pri vývoji, výrobe a bezpečnosti liekov.

Ciele projektu

Cieľom postupu je overenie bezpečnosti opakovaného očného podania, t.j. či nemá vedľajšie nepriaznivé účinky na jednotlivé súčasti oka králikov.

Prínos z vykonaného projektu:

Predpokladaným prínosom bude získanie nových originálnych poznatkov o účinku testovaných látok pre očnú znášanlivosť u králikov. V prípade, že sledovaná kombinácia LEVODEXA nebude mať nepriaznivý vplyv na očné tkanivá, zaradí sa do prevádzkových podmienok prípravy nových očných kvapiek. Poznatky získané z predkladaného projektu budú takisto podkladom pre vývoj ďalších nových a bezpečných liekov v oftalmológii pri liečbe ochorení oka, resp. po chirurgických zákrokoch v humánnej medicíne.

Druh použitých zvierat a ich predbežné počty:

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

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

Králiky sa podrobia len manipulácii pri aplikácii látok a pozorovaní zmien na oku počas štúdie. Postup vychádza z predpokladaného spôsobu užívania prípravku, t.j. opakovaného očného podávania. Preto sa zvolilo opakované očné podanie v objeme a koncentrácii, aké sa budú používať u ľudí. Doba podávania je 15 dní, čo je optimálna doba pre opakovanú lokálnu znášanlivosť.

Predpokladaná ujma na použitých zvieratách bude len v diskomforte pri fixácii králikov a aplikácii očných kvapiek. Samotný úkon však bude krátkodobý nespôsobujúci dlhodobú bolesť, utrpenie alebo stres a bez potreby podania celkovej anestézie i analgetík. Pre zistenie bezpečnosti testovanej látky s plánovaným využitím pre človeka prínos projektu výrazne prevyšuje ujmu u experimentálnych králikov.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Postupy vykonávané na zvieratách budú **slabej** úrovne krutosti podľa klasifikácie krutosti postupov.

Súlad s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia**Nahradenie (replacement)**

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

Obmedzenie (reduction)

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

Zjemnenie (refinement)

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

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: **nie**

Netechnické zhrnutie projektu č. 16

3571/15-221

Názov projektu:

Meranie telesnej teploty u králikov za použitia podkožného snímača teploty - loggera STAR ODDI DST micro-T s následnou aplikáciou vyvíjanej modifikovanej očkovacej látky celobunečnej absorbovanej vakcíny proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu.

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu pokusu, predpokladaná ujma a prínosy:

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

Účelom skúšky je určiť telesnú teplotu u králikov za použitia podkožného snímača teploty – loggera s následnou aplikáciou očkovacej látky proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu. Ako očkovacia látka sa bude používať RALDITEPERA vyvíjaná spoločnosťou Revabiotech SE, Praha.

Pre porovnanie s vyvíjanou očkovacou látkou budeme pri skúškach používať 3 skupiny kontrolných zvierat: zvieratá vakcinované nemodifikovanou celobunečnou vakcínou proti DTP, zvieratá, ktorým bude podaný adjuvans, teda aluminium hydroxid a fyziologický roztok.

Cieľom projektu je sledovať u králikov zvyšovanie sa telesnej teploty použitím podkožných snímačov teploty - STAR ODDI DST micro-T po podaní testovaného prípravku a kontrolných prípravkov. Snímač telesnej teploty bude umiestnený kontralaterálne za lopatku do operačne vytvorenej podkožnej kapsy. Králiky budú v celkovej anestéze. Anestézu vykoná zmluvný veterinárny lekár. Pri návrhu skúšky vychádzame z dostupných publikácií, ktoré pojednávajú o použití králikov pri teste celobunečnej vakcíny proti *Bordetella Pertussis* na pyrogény (Verwer *et al.*, Reducing variation in a rabbit vaccine safety study with particular emphasis on housing conditions and handling, Lab. Anim. 2009, 43: 155, Kaaik *et al.*, Nonclinical vaccine safety evaluation: advantages of continuous temperature monitoring using abdominally implanted data loggers, J. Appl. Toxicol. 2013; 33: 521–526; Dias *et al.*, An improved whole pertussis vaccine with reduced content of endotoxin, Human

vaccines and immunotherapeutics, 9:2, 339 – 348, February 2012). Podľa týchto publikovaných štúdií, nárast teplôt u králikov bol pozorovaný v rozmedzí 5-12 hodín po podaní celulárnej vakcíny s najvyšším nárastom teplôt pri 8 hodinách od podania. Z týchto publikácií zároveň vyplýva, že vzostup teplôt je pomerne nízky v rozmedzí cca 0,5-1°C. Dôležitú úlohu pri celom teste hrá jemná manipulácia so zvieratami a návyk králikov na personál a procedúry, ktoré sú na nich počas skúšky vykonávané. Nevhodné zaobchádzanie, či nové stimuly totiž môžu navodiť stresový stav a vzostup telesnej teploty králikov, čo povedie k skresleniu výsledkov skúšky.

Počas skúšky a počas podávania látok sa zabezpečí jemné zaobchádzanie a manipulácia so zvieratami s konštantným personálom, ktorý bude od začiatku projektu so zvieratami manipulovať. Zvieratá budú mať štandardné umiestnenie, potravu a starostlivosť. Po ukončení postupu budú všetky zvieratá usmrtené podľa NV č. 377/2012, § 5, Príloha č.2, Králiky – Nadmerná dávka anestetík - Zoletil (podáva zmluvný veterinárny lekár) a následná dislokácia krčných stavcov, Náraz/úder do hlavy. Najčastejším spôsobom humánneho usmrtenia králikov je prudký úder tupým predmetom do zátylku zvierat, králik sa drží za kožnú riasu na chrbte.

Prínosy z vykonaného projektu:

Novo vyvíjaná celobunková vakcína proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu, ktorá bude aplikovaná v tomto projekte obsahuje geneticky detoxifikované a chemicky usmrtené bunky baktérie Bordetella pertussis a je formulovaná pomocou adjuvansu aluminium hydroxid tak, aby poskytovala maximálnu imunogenicitu a minimalizovala nežiaduce účinky typu zvýšenie teploty.

Poznatky získané riešením projektu prispejú k celosvetovému významu vakcinácie proti čiernemu kašľu.

Predpokladaná ujma na použité zvieratá v rámci vykonaného postupu:

V projekte budeme vykonávať operačný zákrok aplikácie podkožného snímača telesnej teploty a parenterálnu aplikáciu testovaného prípravku a kontrolných prípravkov. Môžeme predpokladať ujmu ako začervenanie, zápal, opuch v mieste operačného poľa a v mieste aplikácie testovacieho prípravku a kontrolných prípravkov môžeme pozorovať postvákinačnú hrčku, bolestivosť, zvýšená teplota v mieste vpichu, opuch.

Predpokladaná úroveň krutosti: krutá-spätné posúdenie, výsledky projektu doložiť do 31.3.2017

Počet a druh pokusných zvierat

Králik domáci kmeňa HIL, samice, 10 ks zvierat pre testovanie každej vyrobenej šarže RALDITEPERY.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

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

Späťné posúdenie - áno do 31.3.2014

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 3600/221-15

Testovanie biologickej aktivity a štrukturálnej integrity imunogénu v biologickom testovacom systéme

Podrobný účel postupu:

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

Projekt je pokračovaním predchádzajúceho projektu s rovnakým názvom. Jeho cieľom je testovať biologickú aktivitu a štrukturálnu integritu vakcíny určenej na klinické testy. Testovanie môže prebiehať len v biologickom testovacom systéme. Schopnosť produkovať imunitnú odpoveď je považovaná za jednu z najdôležitejších vlastností potrebných pre stanovenie stability imunogénu. Táto forma testovania je požadovaná regulačnými orgánmi EU (EU: Directive 75/318/EEC as amended, júl 1996; ICH: QUALITY OF BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS: STABILITY TESTING OF BIOTECHNOLOGICAL/BIOLOGICAL PRODUCTS (Q5C)). Imunogén je odvodený z proteínu tau, ktorý zohráva kľúčovú úlohu v patogenéze Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatií. Imunogén je netoxický a veľmi dobre ho experimentálne zvieratá zvládajú. Pri prezentácii projektu bol kladený dôraz na význam študovanej problematiky a dôležitosť použitia animálneho modelu (myš) pre získanie biologických vzoriek. Boli preštudované možné 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.

Projekt prebehne v niekoľkých čiastkových experimentoch:

- 30 experimentov, 6ks v skupine. Celkom $30 \times 6 = 180$ myší.

Celkom bude použitých 180 myší C57 (samice) vo veku približne 6 týždňov.

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

- V deň 1, 8 a 15 sa každej myške v experimente aplikuje testovaný imunogén subkutánnou injekciou v dávke 300 µl pro toto.
- V deň 22 sa zvieratám odoberie krv z retroorbitálneho plexu v objeme asi 100-150 ul. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieratá neprekračuje stanovené normy.
- Myšky potom ostanú v experimente bez ďalšej terapie a krv sa podobným spôsobom odoberie ešte na konci mesiacov 3, 6, 9, 12 a 15.
- Následne budú zvieratá z experimentu vyradené a humanne usmrtené v súlade so zákonom: anestézia a dislokácia krčných stavcov.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Testovanie schopnosti imunogénu navodiť imunitnú odpoveď je považované za štandardnú metódu testovania jeho biologickej aktivity. Vzhľadom na skutočnosť, že v súčasnosti nie je dovolené tieto

metódy skúmať na ľudských pacientoch, a na fakt, že daný experiment sa v súčasnosti nedá vykonať v podmienkach in vitro, 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 subkutánna injekcia (3x v intervaloch 7 dní)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 1 minútu.
Odber krvi (retroorbitálny plexus)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Podá sa polovičná dávka anestetík na utlmenie bolesti. V okamihu ako je zviera sedované sa sklenená kapilára jemne zasunie pod očnú guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť stredná. Trvanie 1 minútu.
Usmrtenie v anestéze dislokáciou krčných stavcov	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Intraperitoneálne sa podá anestetikum v dávke 100µl. Cervikálna dislokácia sa vykoná v anestézii. Bolesť žiadna. Trvanie 30 sekúnd

Zohľadnenie 3R

Zjemenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné predpisy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Niekoľko nezávislých štúdií preukázalo, že stres významne modifikuje imunitnú odpoveď, čo je v prípade nášho experiment nežiaduce. Starostlivosť zabezpečuje jedna osoba, na ktorú si zvieratá zvykli. Zvieratá sú chované v počte 5 zvierat na chovnú nádobu, aby sme zabezpečili sociálne interakcie medzi zvieratami. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám. Odber krvi sa vykonáva v čiastkovej anestézii, aby sme utlmili bolesť spôsobenú odberom krvi.

Redukcia:

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

Nahradenie:

Súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje sledovať biologickú účinnosť peptidového imunogénu v in vitro podmienkach. Pri imunizácii sa sleduje celkový titer protilátok, typ imunitnej odpovede, ako aj špecifickosť protilátok, ktoré vznikli po imunizácii. Z legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať na humánnych pacientoch.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

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

Utrpenie versus prínos

Príčina Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatií zostáva neznáma. Dôsledkom tohto stavu je absencia účinnej liečby. Imunologické postupy vo výskume Alzheimerovej choroby priniesli už niekoľko prevratných objavov, napr. identifikácia proteínu tau a beta amyloidu – dvoch kľúčových molekúl zodpovedných za patologické zmeny viazané na ochorenie. Imunizácia zvierat vedie k produkcii špecifických protilátok, ktoré sú dôležité na mapovanie chorobných zmien tau proteínu. Keďže tau proteín je prirodzene neusporiadaný proteín, ktorý nemá stabilnú štruktúru, neexistuje iná možnosť ako mapovať patologické zmeny tau proteínu, ako používať špecifické protilátky, ktoré vznikajú po imunizácii.

Predpokladaný prínos:

- 1) Testovanie biologickej aktivity vakcíny a jej životnosti

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.11.2015 a bude sa realizovať počas nasledujúcich dvoch rokov, do 31.12.2017.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: *Prítomnosť tetraspanínov a partnerských molekúl v rozmnožovacej sústave hovädzieho dobytku a ich účasť v interakcii gamét*

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3869/1T-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): tetraspanínový web, CD9, CD81, spermie, oocyty, reprodukcia

Účel projektu:

a) základný výskum.

b) aplikovaný výskum s cieľom

1. zabránenia, prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka, zvierat alebo rastlín alebo ich účinkov na ľudí, zvieratá alebo rastliny.
2. stanovovania, odhaľovania, usmerňovania alebo úpravy posúdenia, zistenia, regulácie alebo zmeny fyziologického stavu alebo fyziologických procesov ľudí, zvierat alebo rastlín.
3. dobrých životných podmienok zvierat a zlepšenia podmienok produkcie zvierat chovaných na poľnohospodárske účely.

Opísať ciele projektu:

Cieľom projektu bude analýza tetraspanínov CD9 a CD81 a ich potenciálnych partnerov (CD52, CD46, prípadne ďalších) na pohlavných bunkách a tkanivách hovädzieho dobytku s využitím monoklonových protilátok na detekciu CD molekúl exprimovaných na býčích spermách, získaných hybridómovou technikou. Zameriame sa na štúdium tetraspanínov a identifikáciu ich partnerských molekúl v rámci "tetraspanínového webu" na oocytoch a spermách a ich účasti v procese oplodnenia.

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

Výsledky získané počas riešenia projektu by mohli prispieť k objasneniu jednotlivých krokov a mechanizmov reprodukčného deja na molekulárnej úrovni. V konečnom dôsledku by získané poznatky mohli prispieť k vysvetleniu príčin niektorých porúch plodnosti hospodárskych zvierat.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Myš domáca (*Mus musculus*) línia BALB/c , 55 zvierat za obdobie trvania pokusu.

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

Antigén (býčie spermie) bude podávaný intraperitoneálne injekčnou ihlou minimálneho rozmeru. Odber sleziny a makrofágov z peritoneálnej dutiny sa uskutoční u zvierat usmrtených cervikálnou dislokáciou.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Podávanie zmienených antigenov môžeme klasifikovať ako „slabé“ postupy. Postupy týkajúce sa získavania makrofágov *post mortem* so zľadadiska krutosti postupov klasifikované ako postupy „bez možnosti zotavenia“.

Uplatňovanie zásad 3R

Nahradenie/Replacement

V našich experimentoch použijeme hybridómovú techniku na produkciu monoklonových protilátok. Jedna z podstatných výhod tejto techniky oproti klasickému spôsobu produkcie protilátok (na živých zvieratách) je, že celý proces tvorby protilátok prebieha v bukových kultúrach v podmienkach in vitro. Navyše, produkčné hybridómy sa môžu uchovávať časovo neobmedzene pri nízkych teplotách a produkcia protilátky tej istej špecifickosti sa môže obnoviť kedykoľvek v neobmedzenom množstve. Malý počet laboratórnych myší pre antigénnu stimuláciu slezinných buniek je však nutná.

Redukcia/Reduction

Ako už bolo uvedené v predošlej kapitole samotná hybridómová technika umožňuje značnú redukciu počtu použitých zvierat. Pri klasickej ceste tvorby protilátok je potrebné zapojiť do imunizácie veľké počty zvierat za účelom získania väčšej kvantity protilátok, pričom nie je zaručená rovnaká špecifickosť ani homogenita získaných protilátok.

Zlepšenie/Refinement

Celý proces produkcie protilátok je zostavený tak, aby nedochádzalo k zbytočnej traumatizácii a použil sa čo najmenší počet pokusných zvierat. Antigén (býčie spermie) bude podávaný intraperitoneálne injekčnou ihlou minimálneho rozmeru. Odber makrofágov z peritoneálnej dutiny sa uskutoční u zvierat usmrtených cervikálnou dislokáciou. S cieľom znížiť počty pokusných zvierat, budeme využívať reimunizácie „booster“ injekcie u toho istého jedinca v prípadoch, keď prvý antigénny stimul nebude účinný.

Späťne' privedeni - mi

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU: 3841/15-2210

Názov projektu: Udržiavanie infekcie laboratórneho modelového cestóda *Mesocestoides vogae* (syn. *M. corti*) u myši pre výskumné účely

Ciele projektu pokusu a predpokladaná ujma a prínosy: Vo farmakologickom výskume sú nevyhnutné predklinické štúdie v ktorých sa na overenie a vysvetlenie účinkov liekov a nových aktívnych molekúl využívajú laboratórne zvieratá. V prípade chorôb vyvolaných parazitickými helmintami, vrátane pásomníc, je potrebné udržiavať modelové druhy v ich prirodzených hostiteľoch (hlodavce). Izolované larvy *Mesocestoides vogae* budú využité na pasážovanie, infikovanie myši vo farmakologických experimentoch a zvyšné na in vitro testovanie účinkov nových bioaktívnych látok a získanie sekrečných produktov na proteonomické analýzy. Ochorenia ľudí a zvierat spôsobené larválnymi štádiami helmintov parazitujú v parenchymatóznych orgánoch svojich hostiteľov, vrátane ľudí, a sú sprevádzané patologickými prejavmi, ktoré výrazne znižujú účinnosť liečby a dostupnosť liečiv pre larvy. Medzi najvýznamnejšie prejavy patria: imunosupresia vrodenej a adaptívnej zložky imunity, fibrogenéza pečene a ascites v peritoneálnej dutine. Farmakologický výskum sa preto orientuje jednak na hľadanie nových prístupov ku liečbe antihelmintikami s využitím imunomodulačných látok a na druhej strane na hľadanie nových biomolekúl s antiparazitickým účinkom. Udržiavanie infekcie modelovou pásomnicou v myšiach je nevyhnutné pre následné experimentálne štúdie.

Počet a druh pokusných zvierat: neinbrédny kmeň ICR, samce/samice, spolu 200 zvierat na 5 rokov.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Nie sú známe alternatívne metódy na udržiavanie infekcie larválnym štádiom (metacestód) modelovej pásomnice *Mesocestoides vogae*, pretože hlodavce sú prirodzeným hostiteľom. V podmienkach in vitro nie je možné zachovať larvy dlhšie ako mesiac a nie je možné udržať životný cyklus tohto parazita. Človek je náhodným hostiteľom týchto štádií u ktorého spôsobujú larvy rovnaké patologické zmeny, ale nevytvoria dospelé štádia pásomníc. Zásada „zjemnenia“ bude dodržiavaná v plnej miere. Zvieratá budú z vlastného chovu, a preto sú zvyknuté na prítomnosť človeka spojenú s bežnými dennými procedúrami a manipuláciou (čistenie, kŕmenie, napájanie, kontrola zdravotného stavu). Zvieratá budú chované v štandardných podmienkach, nevyvolávajúcich stres.

Kategória krutosti:

1. Slabá:

f) subkutánne, intramuskulárne, intraperitoneálne podávanie látok, podávanie látok cez sondu a intravenózne podávanie látok cez povrchové krvné cievy, ak látka má len slabý vplyv na zviera a jej objemy sú v rámci limitov primeraných pre veľkosť a druh zvieratá.

Zvieratá budú sondou infikované orálne 250-300 larvami, čo nevyvolá masívnu infekciu počas prvých troch mesiacov a teda riziko akútnej bolesti sa nepredpokladá a ani obmedzenie príjmu potravy a pohyblivosti. V priebehu infekcie (3 mesiace) zvieratá nebudú vystavované žiadnym iným úkonom, ktoré by im spôsobovali bolesť. Počas experimentu nedôjde k žiadnym obmedzeniam štandardov na umiestnenie, chov a starostlivosť.

Spätne posúdenie: nie

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU: 3871/17-2216

Názov projektu: Pasážovanie larválneho štádia *Echinococcus multilocularis* na laboratórnych zvieratách - pieskomiloch *Meriones unguiculatus*.

Účel projektu:

základný výskum, overenie akosti, účinnosti a bezpečnosti liekov a) na odstránenie, prevenciu, diagnostiku a na liečbu chorôb (alveolaárna echinokokóza), poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka, zvierat, b) určených nausmerňovanie alebo úpravu fyziologického stavu alebo fyziologických procesov človeka, zvierat.

Cieľ projektu: *In vivo* pasážovanie parazita na udržiavanie živého kmeňa *Echinococcus*

Prínos projektu: Protoskolexy *Echinococcus multilocularis* sa využívajú na experimenty plánované v rámci výskumných úloh. Kultúra protoskolexov *E. multilocularis* slúži aj na prípravu antigénov do sérologických diagnostických kitov, ktoré sa využívajú na monitorovanie tejto zoonózy u ľudí aj zvierat.

Celkový počet zvierat: do 30 *Meriones unguiculatus* na rok (max. 90 za 03/2016- 02/2019)

Dodržiavanie zásad 3 R

Zásada nahraditeľnosti zvierat: Zvolený druh *Meriones unguiculatus* (pieskomil) je v porovnaní s myšami vnímavejší na infekciu *E. multilocularis* a priebeh infekcie u pieskomilov je bez väčších klinických príznakov, zvieratá menej trpia a dlhšie prežívajú.

Zásada zjemnenia pokusu použitím anestézie a analgetík: Manipulácia so zvieratami je jednorazová pri intraperitoneálnej infekcii protoskolexami a cystickými obalmi larválneho štádia *E. multilocularis*. Jedná sa o krátky a pomerne bezbolestný zákrok, ktorý si nevyžaduje anestéziu, ktorá by pre zviera mohla predstavovať väčší stres, ako injekcia samotná. V nasledujúcich 2-3 mesiacoch, počas ktorých sa u zvierat vyvíjajú cysty, sa so zvieratami manipuluje výlučne v rámci každodennej opatery a starostlivosti a nie sú vystavené bolesti, ani utrpeniu, nie je preto potrebné podávanie utišujúcich prostriedkov. Denne sa sleduje ich zdravotný stav a v prípade prítomnosti klinických príznakov ochorenia sú humánne usmrtené cervikálnou dislokáciou.

Zásada znižovania počtu zvierat Počet zvierat žiadanych pre pasážovanie parazita je minimálny možný (súčasná infekcia maximálne 2-4 jedincov) pre zabezpečenie dostatočného množstva parazitárneho materiálu pre vedecké projekty a prípravu antigénov na diagnostiku ochorenia na našom ústave. Menší počet zvierat by mohol znamenať riziko straty fertílých cyst a infekcieschopných protoskolexov v prípade zhoršeného zdravotného stavu alebo úhynu zvierat pred vyzretím cyst do fertílneho štádia. Nie je možné zabezpečiť konštantnú intenzitu infekcie, lebo závisí od individuálnej reakcie parazit-hostiteľ. Strata parazitárneho kmeňa by viedla k problémom s opätovným získaním takéhoto materiálu.

Klasifikácia krutosti postupov

1. **Slabé:** jednorazová intraperitoneálna injekcia protoskolexov a cystických obalov, rýchle usmrtenie cervikálnou dislokáciou.

Spätné posúdenie: nie

NÁZOV PROJEKTU

39 39/15 - 22 1

MOLEKULÁRNY MECHANIZMUS METABOLICKÝCH DÔSLEDKOV DLHODOBÉHO PRÍJMU
KOLOVÝCH NÁPOJOV

377/2012 Z.z. NARIADENIE VLÁDY Slovenskej republiky

§ 40 Netechnické zhrnutie projektu

CIEĽ PROJEKTU

Cieľom projektu je identifikácia mechanizmov, ktoré vedú k pozitívnym účinkom dlhodobého pitia kolových nápojov v experimentálnych zvieratách, čo má význam nielen pre možné odhalenie príčin a potenciálnych terapeutických cieľov u pacientov s metabolickým syndrómom, ale môže pomôcť odhaliť dôležité rozdiely v metabolizme experimentálnych zvierat a ľudí, čo umožní lepšie modelovať ľudské metabolické poruchy na zvieratách. Mechanizmy účinku kolových nápojov na metabolizmus zatiaľ neboli publikované vo vedeckej literatúre, hoci majú nesporný význam pre pochopenie biologickej podstaty sledovaných asociácií s metabolickým syndrómom u ľudí a naopak so zvýšenou inzulínovou senzitivitou u experimentálnych zvierat. Náš projekt bude realizovaný na experimentálnych zvieratách, ale v menšej miere aj na dobrovoľníkoch. V animálnych experimentoch budeme sledovať účinok koly na etablovaných modeloch ľudských chorôb a pokúsime sa o zavedenie nového modelu racionálnou kombináciou faktorov. V pokusoch použijeme bežne dostupné kolové nápoje, ktorých presné zloženie síce nie je známe, ale jednotlivé varianty bez obsahu cukru, resp. bez kofeínu umožňujú testovať aspoň dôsledky týchto známych zložiek. V projekte budeme používať viaceré modely metabolického syndrómu a jeho súčastí. Vychádzajúc z tých, ktoré sa najviac využívajú, budeme kombinovať jednotlivé faktory takým spôsobom, ako sa to deje priamo u pacientov, hoci to nesporne zvyšuje variabilitu a komplikuje interpretáciu. Zároveň však znižuje riziko klinicky irelevantných výstupov, ktoré nie sú reprodukovateľné kvôli mnohým špecifickým faktorom ako je napr. genetické pozadie zvierat. Mechanizmus sledovaných účinkov budeme analyzovať pomocou viacerých prístupov – nutričných – použitím rôznych variant kolových nápojov a mikrobiologických – moduláciou mikrobiómu čreva.

SÚLAD ZÁSAD 3R

Dizajn pokusov, ako aj počet jedincov v skupinách bude vychádzať z dostupnej literatúry, ktorá je zameraná na podobné problémy. Toto je dôležité pre porovnateľnosť výsledkov s inými dátami, ale aj z hľadiska dodržania pravidla 3R pre experimenty so zvieratami. Analýza predbežných dát napr. z behaviorálnych testov poukazuje na to, že veľkosť skupiny by pri sile testu 90% a sledovanej variabilite, resp. rozdieloch mala dosahovať až $n=100$ pri hladine významnosti 5%. Tento prístup, žiaľ, nie je možné aplikovať, preto sa budeme musieť držať zaužívaných postupov a veľkostí skupín, kedy na 1 skupinu plánujeme 15 zvierat. Problém možnej falošnej negativity výsledkov sa budeme snažiť vyriešiť analýzou rovnakých veličín rôznymi testami, resp. metódami.

OČAKÁVANÁ UJMA A PRÍNOS

V rámci ujmy očakávame využitie približne 640 zvierat (320 samcov a 320 samíc) 2 rôznych druhov (120 potkanov, 520 myši) a kmeňov (potkany: 60 Wistar, 60 Sprague Dawley, myši: 60 C57Bl6, 400 CD-1, 60 Balb/c). Jednotlivé úkony, ktoré budeme realizovať sú nasledovné:

Handling zvierat v rámci výmeny podstielok a dopĺňania krmiva a pitiva – 2-3x za týždeň, úroveň krutosti slabá

Váženie a merania zkonsumovanej potravy a pitiva – 1x za týždeň, úroveň krutosti slabá

Odber krvi z retroorbitálneho venózneho plexu v celkovej anestézii Isofluranom – 1x za mesiac, úroveň krutosti slabá

Meranie krvného tlaku – 1x mesačne, vzhľadom na krátkodobú imobilizáciu do 30 min, úroveň krutosti stredná

Metabolické kliečky a zber moča – 1x mesačne, úroveň krutosti slabá

Behaviorálne testy – tzv. Fenotyper, t.j. domáca klietka, ktorá je sledovaná kamerou na posúdenie lokomotorickej aktivity a tzv. test otvoreného poľa na sledovanie anxiózneho správania, - 1x za 3 mesiace, úroveň krutosti slabá.

Zviera bude usmrtené a vyradené z experimentu ak nastane nasledovné:

Pokles telesnej hmotnosti o viac ako 20%, znížený príjem potravy a tekutín pod 40% normálneho príjmu, resp anorexia po dobu 72h, piloerekcia s vypadávaním chlupov,

samopoškodzovanie, a repetitívne správanie, neresponzivnosť na vonkajšie stimuly. Neočakávame mortalitu vyššiu v ani jednej skupine.

Vzhľadom na začatý hon na čarodejnice vo forme zakazovania a obmedzovania nezdravých potravín, kde kolové nápoje patria medzi prvé, ktorých predaj v niektorých štátoch je už obmedzený, resp. limitovaný (pozn. ani alkoholové nápoje nie sú regulované takýmto spôsobom ako sú kolové), považujeme výskum hľadajúci kauzálny vzťah a dôkaz o škodlivosti za prínos. Samotný experiment začína po tom, čo viacerí hlásili pri podobných experimentoch náznak presného opaku, t.j. že kolové nápoje môžu do istej miery pomôcť s inzulinovou rezistenciou a čiastočne ju zmierniť. Cieľom a výsledkom série experimentov má byť potvrdenie/vyvrátenie týchto pozorovaní a popísanie prípadných molekulárnych mechanizmov, ktoré túto rezistenciu ovplyvňujú. Prínosom je teda hľadanie antiobezitných mechanizmov v *in vivo* systémoch.

POPIS EXPERIMENTU

V dostupnej odbornej literatúre je iba minimum experimentov zameraných na účinok kolových nápojov na metabolizmus. Jednou z príčin môže byť, že kola je komplexná zmes s neznámym presným zložením, lenže výpovedná hodnota experimentov s konkrétnymi látkami pre prax je vágna.

Ide o jednoznačne originálny projekt, keďže zatiaľ nikto mechanizmus účinku kolových nápojov na metabolizmus neodhalil, hoci viaceré publikované výsledky poukazujú na možné mechanizmy a práve tie spolu s ďalšími chceme testovať. Originalita projektu zároveň tkvie v spojení kolových nápojov a stravy západného štýlu „Western diet“, čo tiež doteraz experimentálne na zvieratách nikto neskúmal. A napokon doteraz nikto neskúmal ani účinok kolových nápojov na metabolizmus pomocou genetických modelov, ktoré umožňujú identifikáciu konkrétnych signálnych ciest dôležitých pre sledovaný efekt. Ani sekundárne aspekty projektu nie sú menej originálne – nikto doteraz neskúmal pohlavné rozdiely v účinkoch kolových nápojov. Hoci problematika metabolického syndrómu je jednou z priorít celosvetového biomedicínskeho výskumu, podľa literatúry sa väčšina výskumu ohľadom kolových nápojov stále venuje najmä epidemiologickým asociačným štúdiám a nie intervenčným experimentom. Projekt je riskantný, už len samotná téma je kontroverzná a uvedomujeme si, že môže byť posudzovateľmi hodnotená aj negatívne. Nie sme nijakým

spôsobom podporovaní, ani ovplyvňovaní v našom výskume akýmkoľvek výrobcom kolových nápojov. Naopak, sme presvedčení, že takéto experimenty sú dôležité, lebo majú potenciál meniť dogmy, resp. presvedčenia, ktoré nie sú opreté o iné ako asociačné dáta. Vybrali sme si tému, ktorá je veľmi aktuálna, kde v rámci riešiteľského kolektívu máme aspoň v rámci Slovenska najlepších odborníkov na jednotlivé aspekty projektu.

Zvieratá budú podstupovať úkony, patriace do kategórie slabé až stredné. Pri týchto postupoch budú zvieratá pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach, avšak tieto úkony vo významnej miere nenarušujú pohodu ani celkový stav zvierat.

POČET ZVIERAT

Druh/plemeno/línia	Pohlavie	Počet (za celé obdobie)	Počet na skupinu
Myši C57BL/6	Samce+ Samice	60	15
Myši BALB/c	Samce+ Samice	60	15
Myši CD-1	Samce+ Samice	400	15
Potkany Wistar	Samce+ Samice	60	15
Potkany Sprague Dawley	Samce+ Samice	60	15

Rozhodli sme sa, že experimentálne zvieratá nebudeme značiť na uchu, ale len na chvoste prostredníctvom permanentnej fixky. Považujeme totiž tento spôsob za menej stresujúci a zároveň bude zabezpečený častý kontakt so zvieratami. Odber moču budeme realizovať prostredníctvom metabolických klietok, kde pobudnú zvieratá maximálne 12 hodín. Meranie krvného tlaku je ako stredná krutosť klasifikované preto, lebo očakávame krátkodobú imobilizáciu, ktorá sa bude pravidelne opakovať (raz mesačne). Samozrejme bude prebiehať aklimatizačné obdobie, kedy budú zvieratá krátkodobo v restraineroch, aby si na tento proces zvykli. Imobilizácia bude prebiehať maximálne 30 minút. Meranie krvného tlaku sa bude uskutočňovať prostredníctvom klasického tlakomeru.

Na zhodnotenie anxiety a lokomočnej aktivity použijeme test otvoreného poľa, pri ktorom použijeme arénu s podstavou štvorca (100 x100 cm). Testované zviera bude vložené do centra arény a v nej ponechané po dobu 5 minút. Sledovaným parametrom bude celková prejdená vzdialenosť, priemerná rýchlosť pohybu a čas, strávený v centrálnej časti bludiska. Viac času, stráveného v centrálnej časti, je známkou nižšej úrovne anxiety. Doplnujúcou ale dôležitou informáciou bude prejdená vzdialenosť aj rýchlosť pohybu. V experimentálnych štúdiách potkany aj myši chudli, nie priberali. Mechanizmus prečo, je to tak, zatiaľ nie je známe, ale predpokladáme, že v dôsledku účinku napr. kofeínu, by mohla byť zvýšená

lokomotorická aktivita, vedúca následne k vyššej fyzickej aktivite a väčšiemu energetickému výdaju.

Behaviorálny test vo fenotypéri funguje ako domáca klietka, kde sa sleduje dlhodobejšie ako sa zviera správa. Poskytuje to bližší obraz o jeho behaviorálnych charakteristikách. Zvieratá sú umiestnené do boxu, kde majú k dispozícii potravu, tekutiny (pokusné skupiny kolový nápoj, kontrolné skupiny vodu). Box je virtuálne rozdelený na viaceré časti, pričom na rozdiel od testu otvoreného poľa, v tomto prípade majú možnosť tráviť čas aj v tzv. shelteri- „domčeku“. Piliny ako podstielka sa síce dávajú čisté, ale v princípe zmiešané s časťou pôvodných pilín z domácej klietky zvieraťa. Tiež, fenotypéry sa nachádzajú v miestnosti, kde sú domáce kliekty, čiže k presunu medzi miestnosťami neprichádza. Každý box (v našom prípade sú k dispozícii 4) má navrchu umiestnený kamerový snímač, ktorý detekuje zviera po celý čas, ktorý vo fenotypéri strávi a ako sa pohybuje. Celý proces zaznamenávame a vyhodnocujeme v programe EthoVisionXT. Zvieratá budú ponechané vo fenotypéri 12 hodín. Pozorovanými parametrami sú celková prejdená vzdialenosť, priemerná rýchlosť pohybu, čas, strávený v centrálnej časti bludiska. V tomto prípade je potrebné zohľadniť aj fakt, koľko času strávi zviera v svetelnej časti- mimo domčeka- a koľko v tmavej časti. Viac času, stráveného vo svetlej časti bludiska, odráža nižšiu úroveň anxiety. Bližšie info vid' <http://www.noldus.com/animal-behavior-research/products/phenotyper>. Vzhľadom na to, že ide síce vo svete relatívne dlho používanú vec, nie je počet publikácií s týmto typom experimentu taký častý na hodnotenie lokomotorickej aktivity a anxiety. Pravdepodobnou príčinou bude vysoká cena (4 klietky vyše 40tisíc Eur), Preto 5-minútové behaviorálne testovania by sme tiež radi realizovali, ako štandardnú a vo svete predsa len rozšírenejšiu metódu.

Príslušné zvieratá v pokusných skupinách budú mať počas celého polroka k dispozícii len kolový nápoj. Jeden z parametrov, ktorý sa bude sledovať je prežívanie. Ak majú mať kolové nápoje negatívny vplyv na zdravie, mali by mať aj vyššiu mortalitu. Tú síce nepredpokladáme (keďže iné skupiny tento efekt experimentálne nepotvrdili), ale sledovať mortalitu budeme. Ak by bola výrazne vyššia ako u kontrolných zvierat, experiment ukončíme.

SPÄTNÉ POSÚDENIE

Vzhľadom na to, že ide o projekt, ktorý je vyvoláva kontroverzné reakcie, bude projekt podliehať spätnému posúdeniu po každej fáze experimentu.