

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Chronobiologické aspekty dopadu rozvíjajúcej sa obezity na kardiovaskulárny a autonómny nervový systém v priebehu reoxygenácie po apnoickej epizóde centrálného a obštrukčného typu

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2A/2015 – 4234/15-221

Kľúčové slová o projekte: Chronobiológia, obezita, poruchy dýchania, kardiovaskulárny systém, autonómny nervový systém

Účel projektu: Základný výskum

a) Informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu:

V súčasnej dobe sa obezita stáva vážnym celosvetovým problémom a často je nazývaná ako epidémia 3. tisícročia. Aj v Českej republike počet obéznych narastá a v súčasnej dobe sa odhaduje, že je 21% mužov a 31% obéznych žien. Obezita, okrem iných efektov na organizmus, je aj hlavným rizikovým faktorom pre poruchy pľúcnej ventilácie hlavne pre apnoické epizódy obštrukčného a centrálného typu, ktoré majú zasa proarytmogénne efekty.

Na druhej strane, kardiovaskulárny systém a jeho hlavný regulačný mechanizmus, autonómny nervový systém vykazujú značné cirkadiánne kolísanie, kedy vulnerabilita komôr ku komorovým arytmiám do veľkej miery závisí aj na čase dňa. Spojenie ochorení kardiovaskulárneho systému s obštrukčným typom spánkového apnoe je široko popísané v literatúre, no menej je známe o efekte reoxygenácie na poruchy srdcového rytmu ako aj na aktivitu autonómneho nervového systému, čo rieši aj náš model.

Teda, posúdenie tohto funkčného prepojenia (obezita – kardiovaskulárny systém – autonómny nervový systém – synchronizácia s periodicitami vonkajšieho prostredia) je dobré popísať aj z chronobiologického hľadiska a položiť si otázku: Kedy sú zmeny v citlivosti myokardu pri poruchách pľúcnej ventilácie u rozvíjajúcej sa obezity najviac varujúce? Počas aktívnej alebo pasívnej časti dňa?

V súčasnej dobe táto dynamika zmien pri rozvíjajúcej sa obezite nie je vôbec popísaná. Nie je jasné, pri akom stupni obezity nastávajú varujúce zmeny v elektrofyziológii srdca, alebo v aktivite autonómneho nervového systému v spojení s poruchami pľúcnej ventilácie.

Navrhovaný projekt je principiálne plánovaný v intenciách základného výskumu, v ktorom chceme poukázať na chronobiologické aspekty dopadu rozvíjajúcej sa obezity na zmeny v elektrofyziológických vlastnostiach srdca, autonómnej regulácie srdcovej činnosti a tlaku krvi v komplexnejšom a zatiaľ ešte chýbajúcom pohľade. Chceme sa zamerať na chronobiologické aspekty zmien v samotných interakciách medzi spomínanými systémami počas rozvíjajúcej sa obezity u potkanov za experimentálnych podmienok in vivo.

Využitie poznatkov z nášho experimentálneho modelu je možné v aplikovanom, respektíve aj v klinickom výskume obéznych osôb, trpiacich napríklad na syndróm spánkového apnoe. Pomerne veľa obéznych ľudí pracuje v smenových prevádzkach, alebo napríklad aj pri prechodoch cez časové zóny, kedy sa ich vnútorné rytmy desynchronizujú s rytmicitami vonkajšieho prostredia pričom takáto desynchronizácia môže meniť náchylnosť myokardu na rôzne poruchy srdcového rytmu aj vo vzťahu k apnoickým epizódam a obnove pľúcnej ventilácie. Elektrická stabilita srdca, elektrofyziológické predispozície k arytmiám, tonus autonómneho nervového systému ako aj tlak krvi sú jednoznačne

menené apnoickou epizódou a reoxygénáciou. Otvorenou otázkou zostáva, ako sa budú meniť v závislosti na periodicite vonkajšieho prostredia, v našom modeli na cykle striedania sa svetla a tmy. Znamená to, že vulnerabilita srdca ku komorovým arytmiám v spojení s reoxygénáciou po apnoickej epizóde centrálného alebo obštrukčného typu a v interakciách s faktormi, ktoré spúšťajú poruchy srdcového rytmu (autonómny nervový systém, vnútorné prostredie) môže byť odlišná v rôznych časoch dňa taktiež aj u obežných osôb.

Naše výsledky môžu pomôcť rozšíriť obzor poznania o nepriaznivom vplyve obezity na dynamiku zmien v spomenutých systémoch z chronobiologického pohľadu a v spojení s poruchami pľúcnej ventilácie.

Konkrétne ciele projektu:

Posúdenie efektu reoxygénácie po apnoickej epizóde centrálného typu v prvej sérii experimentov a po apnoickej epizóde obštrukčného typu v druhej sérii experimentov v závislosti na cykle striedajúceho sa svetla a tmy na dynamiku zmien v parametroch EKG (trvanie PQ intervalu, QRS komplexu, QT intervalu, QTc intervalu a amplitúdy vln P, R a T), na dynamiku zmien v aktivite autonómneho nervového systému a tlaku krvi v jednotlivých krokoch experimentu – intaktné zvieratá, po tracheotómii, preparácii arteria femoralis, 5 minútovej stabilizácii, po každých 30 sekundách 2 minútovej apnoickej epizódy respektíve po 1., 2., 3., 4. a 5. minúte 5-minút trvajúceho obštrukčného apnoe a po 5., 10., 15. a 20. minúte následnej reoxygénácie počas rozvíjajúcej sa obezity.

Zvieratá a počet plánovaných zvierat

V plánovanom experimentálnom modeli budú použité pohlavne zrelé samice potkanov z konvenčného chovu WISTAR s úvodnou hmotnosťou 250 g a vekom 2-3 mesiace. Na celý experiment (roky 2016 – 2018) je plánovaných 250 zvierat, ktoré budú v jednotlivých etapách experimentu rozdelené do 6 skupín po 10 zvierat (podrobnejšie v harmonograme projektu).

Po dovoze budú zvieratá rozdelené po dvoch na jednu štandardizovanú klietku a adaptované na režim striedajúceho sa svetla 12h:12h po dobu 4 týždňov, pri štandardných podmienkach chovu a držania zvierat vo zverinci podľa platnej legislatívy (kontrolovaná teplota prostredia 21 °C, teplota v klietkach 24 °C, vlhkosť 60 – 70%). O zvieratá sa budú starať zaškolené pracovníčky zverinca, ako aj vedúci projektu. Počas adaptácie budú mať prístup k štandardizovanej potrave a pitnej vode ad libitum. Klietky budú čistené v rovnakú dennú dobu. Zdravotný stav a behaviorálne chovanie sa bude monitorovať počas celého experimentu.

Počet použitých zvierat: 250 ks

Experimenty budú pozostávať z 2 sérii:

1. Experimentálna séria – hodnotenie parametrov po apnoickej epizóde centrálného typu a reoxygénácie v závislosti na cykle striedania sa svetla a tmy
2. Experimentálna séria – hodnotenie parametrov po apnoickej epizóde obštrukčného typu a reoxygénácie v závislosti na cykle striedania sa svetla a tmy

Prvá (apnoická epizóda centrálného typu – 120 zvierat) aj druhá (apnoická epizóda obštrukčného typu – 120 zvierat) séria sú rozdelené na dve fázy:

Svetlá (60 zvierat) a tmavá (60 zvierat) fáza so 6 skupinami zvierat, kde počas adaptácie (4 týždne) zvieratá budú prijímať štandardnú diétu. Z toho

- *kontrolná skupina:* 10 zvierat, 4 týždne – štandardná diéta
- *1. experimentálna skupina:* 10 zvierat, 6 týždňov – štandardná diéta (4 týždne adaptácia + 2 týždne) + 2 týždne - 10% tuková diéta

- *2.experimentálna skupina*: 10 zvierat, 6 týždňov - štandardná diéta (4 týždne adaptácia +2 týždne), ďalšie 2 týždne - 10% tuková diéta + 4 týždne 45% tuková diéta
- *3.experimentálna skupina*: 10 zvierat, 6 týždňov - štandardná diéta (4 týždne adaptácia +2 týždne), ďalšie 2 týždne - 10% tuková diéta + 4 týždne 45% tuková diéta + 4 týždne 45% tuková diéta
- *4.experimentálna skupina*: 10 zvierat, 6 týždňov - štandardná diéta (4 týždne adaptácia +2 týždne), ďalšie 2 týždne - 10% tuková diéta + 4 týždne 45% tuková diéta + 4 týždne 45% tuková diéta + 4 týždne 45% tuková diéta
- *5.experimentálna skupina*: 10 zvierat, 6 týždňov - štandardná diéta (4 týždne adaptácia +2 týždne), ďalšie 2 týždne - 10% tuková diéta + 4 týždne 45% tuková diéta + 4 týždne 45% tuková diéta + 4 týždne 45% tuková diéta + 4 týždne 45% tuková diéta

Harmonogram projektu

Rok 2016

Január – jún – príprava experimentu, zvládnutie metodiky a hodnotenia biosignálov pomocou prístrojového vybavenia ID instruments

Júl – december - realizácia experimentov je plánovaná počas **svetlej časti** režimového dňa zvierat po adaptácii na cyklus svetla a tmy 12 : 12 hodín, so svetlou časťou od 06.00 do 18.00 hodiny s aplikáciou ventilačnej *apnoickej epizódy centrálného typu a následnej reoxygénácie*. Experimenty budú postupne (jednomesačných intervaloch) robené na 6 skupinách po 10 zvierat.

Rok 2017

Január – jún – realizácia experimentov je plánovaná počas **tmavej časti** režimového dňa zvierat po adaptácii na cyklus svetla a tmy 12 : 12 hodín, so svetlou časťou od 18.00 do 06.00 hodiny s aplikáciou ventilačnej *apnoickej epizódy centrálného typu a následnej reoxygénácie*. Experimenty budú postupne (jednomesačných intervaloch) robené na 6 skupinách po 10 zvierat.

Júl – december - druhá fáza realizácie experimentov je plánovaná počas **svetlej časti** režimového dňa zvierat po adaptácii na cyklus svetla a tmy 12 : 12 hodín, so svetlou časťou od 06.00 do 18.00 hodiny s aplikáciou ventilačnej *apnoickej epizódy obštrukčného typu a následnej reoxygénácie*. Experimenty budú postupne (jednomesačných intervaloch) robené na 6 skupinách po 10 zvierat.

Rok 2018

Január – jún – realizácia experimentov je plánovaná počas **tmavej časti** režimového dňa zvierat po adaptácii na cyklus svetla a tmy 12 : 12 hodín, so svetlou časťou od 18.00 do 06.00 hodiny s aplikáciou ventilačnej *apnoickej epizódy obštrukčného typu a následnej reoxygénácie*. Experimenty budú postupne (jednomesačných intervaloch) robené na 6 skupinách po 10 zvierat.

Júl – december – spracovanie a vyhodnotenie experimentálnych dát na prezentáciu a publikovanie získaných výsledkov.

Anestézia

Experimenty budú robené v in vivo podmienkach, pri celkovej anestézii podaním Zoletilu v dávke 30 mg/kg ip.

Experimentálny protokol

Pred aplikovaním anestetiká, zvieratá sa odvážia a odmerá sa rektálna teplota rýchlobežným teplomerom. Po zmeraní rektálnej teploty, sa podá anestetikum. Po odskúšaní celkovej anestézie štandardnou metódou (aplikácia bolestivého podnetu na labku), sa zvieratá premiestnia do experimentálnej miestnosti.

Príprava zvieratá na samotný experiment

Zviera je fixované na operačnom stolíku v polohe na chrbte v celkovej anestézii a znovu sa zmerá rektálna teplota na posúdenie vplyvu anestetika (cca po 15 minútach). Meranie elektrofyziológických parametrov a srdcovo-frekvenčnej variability (HRV) sa robí neinvazívne, zavedením ihlových elektród pod kožu na končatinách.

Prvý invazívny zásah do zvieratá je preparácia artéria femoralis so zavedením katetra na meranie tlaku krvi. Po tejto príprave zvieratá sa merajú kontrolné hodnoty – EKG, HRV a tlak krvi. V tejto fáze experimentu zviera spontánne dýcha.

Druhý invazívny zásah je tracheotómia so zavedením respiračnej pumpy (dychový objem 1ml/100g telesnej hmotnosti a frekvencia dýchania 50 dychov/min.) pre kontrolu a manipuláciu s pľúcnou ventiláciou (apnoická epizóda - zastavenie pumpy pri centrálnom type apnoickej epizódy na 2 minúty, respektíve navodenie zníženej ventilácie pri obštrukčnom type apnoickej epizódy po dobu 5 minút).

Zviera je potom vyhrievané pomocou infralampy na teplotu, nameranú pred podaním anestetika a po dosiahnutí tejto hodnoty sa znovu odčítava EKG, HRV a tlak krvi. V tejto fáze experimentu je už zviera na umelej ventilácii.

Experiment

Po 5 minútach umelej ventilácie sa bude sledovať efekt apnoickej epizódy centrálneho (1. séria experimentov) a obštrukčného typu (2. séria experimentov). Po odznení apnoickej epizódy bude upravená umelá ventilácia na vyššie spomenuté parametre dýchania v trvaní 20 minút (reoxigenácia). Počas celú dobu sa bude snímať EKG, HRV a tlak krvi pomocou počítačového systému a modulov pre meranie biosignálov ID Instrument.

Na konci experimentu sa odoberie arteriálna krv z odpreparovanej artérie femoralis na spracovanie acidobázickej rovnováhy a koncentrácie iónov.

Experimenty majú aktívny charakter a končia sa usmrtením zvieratá, podaním bolusu anestetika priamo do srdca.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Počas pokusu nebudú zvieratá pociťovať žiadny diskomfort a budú bez sociálnej izolácie. Experimenty sú aktívne, končiace bezbolestným usmrtením jedinca, nakoľko zvieratá budú v celkovej anestézii. Počet zvierat je obmedzený na minimálne únosnú mieru, aby bolo možné urobiť validné štatistické spracovanie dát. Celková miera krutosti spadá do kategórie „slabá“. Pokus sa končí bez možnosti zotavenia.

Nahradenie:

Pri danom usporiadaní experimentu nie je možné ani absolútne a ani čiastočné nahradenie zvolených skupín. Ciele projektu jasne naznačujú, že vytvorenie takéhoto modelu nie je možné realizovať na počítačových modeloch a ani na evolučne nižšie postavených živočíchov.

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

Obmedzenie:

Počty zvierat sú minimalizované na maximálnu mieru, aby pri štatistickom spracovaní, výsledky mali validitu potrebnú na splnenie kritérií v currentovaných časopisoch.

Zjemnenie:

Možné strádanie a utrpenie zvierat bude minimalizované dodržiavaním každej z piatich slobôd uvádzaným pri definícii welfare zvierat. Nakoľko sú experimenty aktuálne a v celkovej anestézii, zvieratá počas samotného pokusu nebudú vystavené žiadnemu strádaniu a utrpeniu. Zvieratá od dovozu až po samotný experiment budú v starostlivosti zaškolených pracovníkov zverinca a v súlade s paragrafom 31 a prílohou č.5 NV 377/2012 Z.z..

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

Ujma spôsobená zvieratám z hľadiska utrpenia, bolesti a strachu je minimálna a odôvodnená vzhľadom k očakávaným výsledkom i s ohľadom na etické aspekty. Všetci pracovníci, ktorí prichádzajú do styku so zvieratami sú príslušne poučení a budú dbať na humánny prístup k zvieratám a starať sa o to, aby neboli v žiadnej fáze pokusov vystavované zbytočnému stresu. Všetky aplikácie biologicky aktívnych látok (anestetikum ZOLETIL) budú vykonávané pod dohľadom veterinárneho lekára. Všetky invazívne zásahy budú robené len po overení štádia chirurgickej anestézie.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Celková miera krutosti spadá do kategórie „slabá“ / *bez možnosti zotavenia*

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 4236/15-221

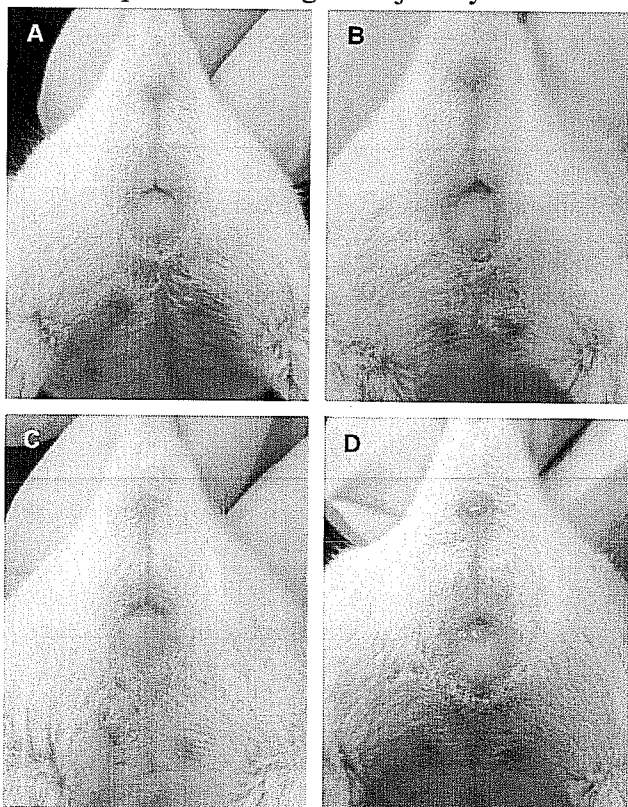
Udržiavanie a chov línií transgénnych modelov neurodegeneratívnych ochorení

Podrobný účel postupu:

Cieľom predkladaného projektu je udržiavanie vlastného chovu transgénnych modelov Alzheimerovej choroby, ktoré následne použijeme na výskum etiopatogenézy, symptomatológie, diagnostiky a terapie tohto ochorenia. Projekt sa bude vykonávať v zariadení na chov zvierat pracujúcim v podmienkach podobných SPF (specific pathogen free), ktoré umožňujú eliminovať nežiadúce faktory okolia a potláčajú heterogenitu fenotypu spôsobenú okolitým prostredím a selektívnou vnímavosťou zvierat voči externým podnetom.

5-7 dňovým mláďatám sa budú odberať vzorky z chvosta na genotypizáciu, odlišenie transgénnych mláďat od netransgénnych v princípoch heterogénneho pripúšťania. Po odstave mláďat sa matky humánne usmrtia.

Cyklus pripúšťania bude prebiehať v pravidelných mesačných intervaloch, v jeden týždeň sa budú pripúšťať všetky potkanie línie a nasledujúci týždeň línie myší. Po vaginálnej laváži sa mikroskopicky určí štádium estrálneho cyklu samíc potkana. U samíc myší vaginálnu laváž nevykonávame, ale cyklus hodnotíme na základe stupňa opuchu a začervenania pošvy externým pozorovaním. Následne samice v štádiu proestra vložíme do kliebok ku transgénnym samcom. Na druhý deň ráno sa urobí opäť vaginálna laváž a skontroluje sa prítomnosť spermií. U myšiek sa zhodnotí prítomnosť vaginálnej zátky.



Mláďatám vo veku 5-7 dní sa odoberú vzorky tkaniva z chvosta na genotypizáciu (0,3-0,5mm). Na základe výsledkov genotypizácie sa pri odstave oddeľia transgénne zvieratá (majú integrovaný gén) od netransgénnych, z ktorých sa väčšina z chovu vyradí.

Počas pripúšťacieho procesu bude všetkým zvieratám venovaná štandardná veterinárna starostlivosť. Pri ochorení zvierat, budú choré zvieratá po dohode so zmluvným veterinárnym

lekárom humánne usmrtené. Zvieratám sa nesmie v priebehu chovu spôsobovať zbytočná bolesť, stres a utrpenie.

So všetkými zvieratami sa bude manipulovať, bude sa im venovať starostlivosť a budú umiestnené v súlade s požiadavkami uvedenými v nariadení vlády SR č. 23/2009 Z. z.

V pravidelných mesačných intervaloch sa bude pripúšťať dostatočné množstvo potomstva na udržiavanie jednotlivých línii transgénnych zvierat. Zvieratá sa vyradia z chovu ešte pred úplným nástupom škodlivého fenotypu, humánne sa utratia nadmerným množstvom anestetika a odoberú sa z nich tkanivá.

Cyklus pripúšťania:

Potkanie líníe:

SHR 72	20 samíc / jeden mesiac a nasledujúci mesiac 5 pripustených samíc 12 transgénnych chovných samcov / obmieňanie každý 2-3 mesiac
SHR 24	12 samíc každý mesiac 8 transgénnych chovných samcov / obmieňanie každý 2-3 mesiac
SHR 318	4 samíc / každý druhý mesiac 4 chovných transgénnych samcov / obmieňanie každý 2-3 mesiac
W 72	2 samíc / každý druhý mesiac 2 chovných transgénnych samcov / obmieňanie každý 2-3 mesiac
W 318	2 samíc / každý druhý mesiac 2 chovných transgénnych samcov / obmieňanie každý 2-3 mesiac

Myšacie líníe:

R3m/4	15 samíc / mesiac 6 chovných transgénnych samcov / obmieňanie každý 2-3 mesiac
R4m/7	15 samíc / jeden mesiac a nasledujúci 6 pripustených samíc 6 chovných transgénnych samcov / obmieňanie každý 2-3 mesiac
R4m/8	15 samíc / jeden mesiac a nasledujúci 6 pripustených samíc 6 chovných transgénnych samcov / obmieňanie každý 2-3 mesiac

Celkový počet zvierat použitých na pripúšťanie/rok:

Potkanie líníe:

SHR 72	150 netransg. samičiek 72 transg. samcov
SHR 24	144 netransg. samičiek 48 transg. samcov
SHR 318	24 netransg. samičiek 24 transg. samcov
W 72	12 netransg. samičiek 12 transg. samcov

W 318	12 netransg. samičiek 12 transg. samcov
-------	--

Myšacie línie:

R3m/4	180 netransg. samičiek/ 36 transg. samcov
R4m/7	126 netransg. samičiek 36 transg. samcov
R4m/8	126 netransg. samičiek 36 transg. samcov

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Na našom ústave boli vyvinuté jedinečné animálne modely pre výskum Alzheimerovej choroby. Účelom projektu je udržiavať chov transgénnych línii v dostatočnom množstve, s produkciou potomstva schopného sa ďalej množiť a využívať pre účely výskumu Alzheimerovej choroby.

Biologická bezpečnosť našich zvieracích línii patrí medzi najvyššie priority v našom chovnom zariadení. Preto v našom chove využívame podmienky SPF (specific pathogen free), ktoré umožňujú eliminovať nežiadúce faktory okolia a potláčajú heterogénitu fenotypu spôsobenú okolitým prostredím a selektívnou vnímavosťou zvierat voči externým podnetom. Naším cieľom je produkovať zdravé zvieratá, ktoré budú následne využívané v projektoch s dôverou v získaných výsledkoch.

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

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Vaginálna laváž	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 30 sekúnd.
Odber tkaniva za účelom genotypizácie – špička chvosta	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Odstrihnutie 0,3-0,5mm tkaniva chvosta. Bolesť slabá.
Usmrtenie dislokáciou krčných stavcov po predchádzajúcej anestézii	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Intraperitoneálne sa podá anestetikum (zoletil+xylariem). Cervikálna dislokácia sa vykoná v anestézii. Bolesť žiadna. Trvanie 30 sekúnd.

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné predpisy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám. Nástup príznakov škodlivého fenotypu u zvierat začína až v 4,5-5 mesiaci veku, preto budú z chovu vyradené ešte pred vyvinutím sa fenotypu a budú humánne usmrtené.

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere, v počte nevyhnutnom pre udržiavanie línií s ohľadom na reprodukčnú schopnosť a životaschopnosť mláďat jednotlivých línií.

Nahradenie:

Chov a udržiavanie transgénnych modelov Alzheimerovej choroby je nevyhnutnou súčasťou výskumu tohto ochorenia, keďže doposiaľ nebola objavená žiadna iná metóda *in vitro* testovania, ktorá by spĺňala všetky aspekty výskumu tohto ochorenia.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

Alternatívna metóda neexistuje, jedná sa o prirodzený spôsob pripúšťania zvierat.

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu. Škodlivý fenotyp sa naplno vyvíja až vo vyššom veku v závislosti od tg.línie, zvieratá budú vyradené z chovu ešte pred nástupom viditeľných klinických príznakov a budú humánne usmrtené nadmernou dávkou anestetika a následnou cervikálnou dislokáciou.

Projekt bol naplánovaný tak, aby sa minimalizoval počet použitých zvierat na najvyššiu možnú mieru, nevyhnutnú pre odchov dostatočného množstva potomstva.

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.12.2015 a bude sa realizovať do 31.12.2018.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutia projektu

Názov projektu: Endogénna stimulácia a exogénna aplikácia neurotrofických faktorov na potlačenie sekundárnych zmien v modeli kompresného poškodenia miechy.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2/0173/14 – 4238/15-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): kompresia miechy, neurotrofické faktory, sekundárne poškodenie.

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)

Neurotrofické faktory a ich príslušné receptory sú v mieste poškodenia úzko späté s potenciálom regenerácie. V mieste traumatického poškodenia je hladina neurotrofických faktorov znížená, z toho dôvodu sú liečebné prístupy v súčasnej dobe zamerané na zvyšovanie ich koncentrácie. Cieľom predloženého projektu je redukovať sekundárne poškodenie v mieche po traume. Za účelom zistenia efektívnej terapie sa použijú nové terapeutické prístupy 1) exogénna aplikácia neurotrofických faktorov, 2) endogénna stimulácia neurotrofických faktorov, 3) aplikácia biodegradovateľnej membrány pripravenej z chitosanu, 4) kombinovaná terapia (najúčinnnejšia exogénna/endogénna stimulácia rastových faktorov a biodegradovateľného kompozitu).

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

Naša pracovná hypotéza je založená na poznatkoch, že vývin lokálneho edému a výsledná sekundárna ischémia v epicentre poškodenia miechy vedie k narastajúcej degenerácii axónov, ktoré sú inak morfológicky neporušené. Aplikácia trofických faktorov (endogénna a exogénna) v prvých hodinách po poškodení by mala viesť k zlepšeniu prietoku krvi v mieche, a to znížením edému a zápalovej reakcie. Po aplikácii trofických faktorov predpokladáme čiastočnú normalizáciu metabolickej homeostázy bunky. Ak sa poškodená časť miechy premostí prostredníctvom chitosanu a zlepšený metabolicko-funkčný stav sa udrží aj po ukončení liečby, môže dôjsť ku klinicky relevantnému zlepšeniu neurologických funkcií. Na overenie tejto hypotézy použijeme osvedčený model traumatického poškodenia miechy u potkanov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch budú použité laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar, samice v počte 160ks na celú dobu riešenia.

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

Kompresia miechy bude uskutočnená z jej dorzálnej strany, ale tlak na miechu vyvolá poškodenie, ktoré sa rozšíri aj do okolia. Tým sa porušia základné motorické reflexy, ktoré zabezpečujú stálu adaptáciu dĺžky svalu na pohyb, ďalej polysynaptické reflexy, ktoré ukončujú kontrakcie vyvolané napínavým reflexom a exteroceptívne reflexy, ktoré vznikajú dráždením receptorov uložených predovšetkým v koži. Tieto reflexy budú po traumatickom poškodení miechy zachované iba čiastočne.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Existujúce alternatívne metódy nemôžu poskytnúť komplexnú odpoveď, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov. Počet zvierat použitých v kontrolnej a experimentálnej skupine je obmedzený na možné minimum. Zvieratá budú uspaté Isofluranom, po zásahu sa im podajú analgetiká (Novalgin). Odber na biochemické analýzy sa vykoná v hlbkej thiopentálovej anestéze, na histochemické analýzy výlučne po eutanázii zvieraťa; odoberie sa torakálna a lumbosakrálna miecha.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet experimentálnych zvierat (160 ks) bol stanovený vzhľadom k tomu, že (1) predpokladáme veľkú individuálnu variabilitu výsledkov, z tohto dôvodu plánovaný počet 10 kusov zvierat v skupine je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný počet pre získanie štatisticky významných výsledkov; (2) experimentálne skupiny uvedené v prílohe č. 1 sú potrebné na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie poškodenia miechy a určenie protektívneho vplyvu; (3) traumou poškodená miecha nemôže byť použitá zároveň na biochemické ako aj histologické a imunohistochemické analýzy.

3. Zjemnenie:

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

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

Experimentálne zvieratá budú počas zákroku v celkovej anestéze, budú im podávané analgetiká a antibiotiká, aby sa predišlo prípadnej bolesti a zápalovej reakcii. Každodenná starostlivosť experimentálnych zvierat sa člení medzi vysokoškolsky vzdelaných členov projektu, ktorí majú prax s experimentami na zvieratách. Experimentálne zvieratá budú po zásahu označené na chvoste a následne budú umiestnené individuálne v klietkach s uvedením čísla zvieraťa.

Nakoľko nepracujeme s infekčnými ani toxickým materiálmi, zvieratá budú štandardne umiestené v pooperačnom oddelení zvieratníka.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu: Interakcia nitrergickej, neurotrofickej a endokrinnnej signalizácie animálnom modeli schizofrénie

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4240/15-221

Kľúčové slová: vývin mozgu, schizofrénia, endofenotypy

Účel projektu: základný biomedicínsky výskum

Cieľ projektu

Cieľom projektu je priniesť nové poznatky o patogenéze schizofrénie - závažnej a častej psychickej choroby. V projekte preskúmame význam interakcie medzi nitrergicou, neurotroficou a endokrinnou stresovou signalizáciou vo vývine mozgu a jeho poruche, ktorá je základom schizofrénie.

Prínos projektu

Projekt prinesie nové poznatky o neurovývinových procesoch v patogenéze schizofrénie a možnostiach ich farmakologického ovplyvnenia. Tento projekt vychádza zo súčasných poznatkov o centrálnej úlohe genetickej predispozície a vulnerability k stresu v neurovývinovom poškodení pri schizofrénii. Projekt využíva multidisciplinárny prístup a so zámerom postihnúť viacero úrovní - genetickú, neurobiologickú a behaviorálnu. Zameranie na endofenotypy schizofrénie nám umožní integrovať nálezy získané u experimentálnych zvierat s dátami získanými u ľudí s genetickým rizikom schizofrénie.

O prínose projektu svedčí skutočnosť, že projekt bol schválený na financovanie Agentúrou pre podporu výskumu a vývoja.

Druh použitých zvierat a ich predbežný počet

Druh: Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*), kmeň Sprague – Dawley

Predbežný počet: samce n=168 ks, samice n=201 ks (33 matiek, 168 mláďat)

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

V projekte sa plánuje použiť animálny model schizofrénie založený na chove potkanov v sociálnej izolácii po odstavení. Nakoľko sú potkany sociálne žijúce zvieratá, predpokladáme nepriaznivý vplyv na dané zvieratá, ktorá je však pre tento model nevyhnutná, pretože je samotnou podstatou a zmyslom modelu psychickej poruchy. V jednotlivých postupoch budú zvieratá farmakologicky ovplyvnené. Pôjde o opakované i.p. podávanie farmák a tiež chirurgické zavedenie podkožných osmotických minimúmp a peliet s postupným uvoľňovaním v celkovej anestézii. V projekte sa taktiež plánuje vystavenie zvierat behaviorálnym testom, kde najmä test núteného plávania predstavuje silný stresový podnet.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná krutosť

Súčasťou projektu je chov potkanov v čiastočnej izolácii. V izolovanom chove bude zviera v kletke osamote pričom bude mať možnosť vidieť, počuť a cítiť ostatné potkany v miestnosti, zabránené bude iba fyzickému kontaktu medzi zvieratami. Tento postup sa klasifikuje ako slabo krutý (príloha č. 4 nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z. z.). Behaviorálne testovanie je spojené so situáciami diskomfortu a zahŕňajú vyvolávanie vyhýbavých reakcií v podmienkach, v ktorých sa zviera sa podnetu nemôže vyhnúť. Tento postup sa klasifikuje ako stredne krutý.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat

V biomedicínskom výskume, rovnako teda aj výskume schizofrénie, je zatiaľ použitie laboratórneho potkana nevyhnutné a nenahradiťelné. Dokumentuje to príloha Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód. Model sociálnej izolácie potkanov po odstavení je etablovaným neurovývinovým modelom schizofrénie. Pre sledovanie nami vytýčených cieľov nemáme inú možnosť ako použiť laboratórnych potkanov.

2. Redukcia počtu zvierat:

V experimentoch je zabezpečený optimálny počet experimentálnych zvierat na základe analýzy štatistickej sily. Maximálna využiteľnosť a vyťaženosť bude zabezpečená tým, že optimalizujeme počet meraní a maximalizujeme počet odobraných vzoriek na sledovanie fyziologických, biochemických a morfológických parametrov.

3. Zjemnenie:

Bolestivosť chirurgických zákrokov (subkutánne zavedenie minipúmp a peliet) bude eliminovaná anestéziou s použitím isofluránu (2.5%). Po skončení experimentu budú zvieratá za účelom výskumu vnútorných orgánov humánne utratené: najskôr sa vystavia oxidu uhličitému v uzavretej nádobe až do straty vedomia; v hlbokom bezvedomí budú následne dekapitované a odkrvené.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu:

In vivo testovanie systému Bacterial Ghosts a cytostatík.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4245/15-221

Kľúčové slová v projekte:

BGs, protinádorová terapia, bunky CT 26, bacterial ghosts

Účel projektu: Aplikovaný výskum

Ciele projektu:

Úlohou tohto projektu je získať ďalšie *in vivo* výsledky pre aplikáciu BGs v protinádorovej terapii. *In vivo* testy na myšiach budú vykonané na BGs pripravených z probiotického kmeňa *E. coli* Nissle 1917. Primárne koncentrácie cytostatika a dávky BGs budú vychádzať z výsledkov predchádzajúcej štúdie Ro-2509/15-221. Cieľom projektu bude stanovenie minimálnej účinnej dávky cytostatika, maximálne tolerovateľnej dávky systému BGs a optimalizácia imunizačného protokolu. Experimenty budú zamerané na stanovenie účinnosti liečby vzhľadom na dobu prežívania zvierat po terapii a *ex vivo* analýza stimulovanej protinádorovej imunity, ktorá bude zahrňovať cytokínový profil v sére zvierat a vyhodnotenie špecificity stimulovanej protinádorovej bunkovej imunitnej odpovedi.

Prínos z vykonaného projektu:

Systém Bacterial Ghosts (BGs) vyvinutý v období posledných rokov predstavuje novú platformu nachádzajúcu svoje uplatnenie pri vývoji vakcín ako vhodná alternatíva v súčasnosti dostupných vírusových a bakteriálnych transfekčných systémov, s nízkou cytotoxicitou a s vysokou účinnosťou prenosu špecifických antigénov a liečiv. Systém BGs, ktorý predstavujú prázdne bakteriálne obaly Gram-negatívnych baktérií, v sebe spája vlastnosti účinného nosiča na prenos proteínov, DNA, antineoplastík a imunomodulátorov, ako aj vlastnosti prirodzeného adjuvans.

Zároveň by systém BGs mal byť v budúcnosti využitý aj ako prenosový systém pre vysokotoxické cytostatiká priamo do nádorového mikroprostredia.

Tieto skutočnosti podporujú potenciál systému BGs v nádorovej terapii s cieľom zabezpečiť výrazné zníženie nežiadúcich vedľajších účinkov konvenčných chemoterapeutík, a tak zvýšiť jednak ich terapeutický efekt, ako aj kvalitu života onkologických pacientov.

Využitie BGs (Bacterial Ghosts) ako protinádorového liečiva predstavuje nové možnosti v liečbe nádorových ochorení u ľudí.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Balb/c myši - 500, samci a samice, 20-25g

Príloha 3

Projekt je plánovaný na obdobie jedného roka a bude prebiehať v niekoľkých experimentoch, v jednom exp. bude zaradených cca 80-100 zvierat. V každom experimente budú negatívna kontrola, kontrola BGs, skupina s cytostatikom a testovacie skupiny (kombinácie cytostatika a BGs). Budú overované aj viaceré terapeutické schémy primárnej protinádorovej terapie rovnako aj dávkovacie schémy pre BGs. Z predchádzajúcich experimentov sa ukazujú rozdiely v citlivosti u samcov a samíc, preto budú experimenty vykonávané na oboch pohlaviach.

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

Vzhľadom na doterajšie skúsenosti s modelom nepredpokladáme výrazný nepriaznivý vplyv pri vývoji samotného modelu a podávania látok. Akékoľvek zhoršenie 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.

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 (500) zvierat v pokuse a 10 jednotlivých skupinách je potrebný z dôvodu štatistického hodnotenia.

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 podliehať opätovnému schvaľovaniu: ☒ áno ☐ nie

Príloha č. 2

Netechnického zhrnutia projektu

Názov projektu: Úloha syntézy proteínov pri tvorbe faktora indukujúceho ischemickú toleranciu v mozgu

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2/0012/15 - 4244/15-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): ischemia mozgu, kondicionovanie, inhibítor syntézy proteínu, krv

Účel projektu* : Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat
Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

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

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

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

V prípade experimentálneho potvrdenia našej teórie na dvoch najčastejších modeloch mozgovej ischemie veríme, že zistíme chemickú povahu a parentálnu populáciu produkujúcu faktor indukujúci toleranciu voči ischemickým podmienkam. Táto informácia predstavuje kľúčový bod pre rozlíšenie presného mechanizmu prenosu a akcie faktora navodzujúceho toleranciu a teda aj pre ďalší klinicko-experimentálny výskum.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch budú použité laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar, samce v počte 160ks na celú dobu riešenia.

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

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

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

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

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet 160 ks zvierat bol stanovený vzhľadom k tomu, že (1) predpokladáme veľkú individuálnu variabilitu výsledkov, z tohto dôvodu plánovaný počet zvierat v skupine je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný pre získanie štatisticky významných výsledkov; (2) experimentálne skupiny uvedené v prílohe č. 1 sú potrebné na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie poškodenia mozgu a krvných parametrov, určenie protektívneho vplyvu kondicionovania a definovanie chemickej podstaty faktora indukujúceho toleranciu a jeho parentálnej populácie; (3) ischémiou poškodené nervové tkanivo nemôže byť použité zároveň na biochemické ako aj histologické a imunohistochemické analýzy.

3. Zjemnenie:

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

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

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

podľa §35 ods. 2 písm. b) a § 40 nariadenia vlády SR č. 377/2012

Názov projektu: CHARAKTERIZÁCIA ANXIOLYTICKÝCH A ANTIDEPRESÍVNYCH VLASTNOSTÍ PYRIDOINDOLOVÝCH DERIVÁTOV

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4248/15-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): pyridoindoly, potkan, antidepresíva, anxiolytiká, správanie

Účel projektu*: Základný výskum, (translačný)

Vedecké ciele

Cieľom projektu bude zistiť mieru anxiolytických a antidepresívnych účinkov derivátov pyridoindolu stobadinu. Potenciál týchto derivátov budeme hodnotiť neinvazívnymi metódami etologickej analýzy v testoch prispôbených na zisťovanie miery motorickej aktivity, emocionality a úzkosti v kombinácii s biochemickou detekciou hladín biogénnych amínov pomocou HPLC-ED vo vybraných štruktúrach mozgu. Keďže stobadin je derivát neuroleptika Karbidínu, predpokladáme výrazné anxiolytické, respektíve antidepresívne vlastnosti týchto derivátov.

Stručný stav problematiky

Podľa WHO na svete trpí duševnými poruchami viac ako 450 miliónov ľudí a len napríklad s depresiou je viac ako 350 miliónov ľudí všetkých vekových kategórií. Práve depresia je najrozšírenejším duševným ochorením a hlavnou príčinou invalidity vo svete. Medzi ďalšie najčastejšie mentálne poruchy v EU patria úzkostné ochorenia. Depresia je charakterizovaná smútkom, stratou schopnosti pociťovať radosť, pocitmi viny a narušeným cyklom spánku a príjmu potravy, ako aj stratou koncentrácie. Úzkosť je definovaná ako stav neočakávaného a neprimeraného nepokoja, často spojeného s nervozitou, napätím, rozptyľovaním, podráždenosťou a poruchami spánku, ktoré spôsobujú somatické prejavy úzkosti (dýchavičnosť, potenie, nevoľnosť, zrýchlenie srdcovej činnosti a zvýšenie tlaku krvi (Sandford a spol., 2000). Podľa odhadov WHO bude v roku 2020 depresia spolu so srdcovo-cievnyimi ochoreniami najčastejším ochorením a neliečená môže viesť až k samovražde. Podľa Národného centra zdravotníckych informácií patrili v roku 2012 k ochoreniam s najvyšším výskytom v psychiatrických ambulanciách na Slovensku afektívne poruchy prejavujúce sa neprimeranou dlhodobou emočnou reakciou organizmu na stres. Ďalej to boli neurotické, stresom podmienené a somatoformné poruchy.

Pred viac ako 40-timi rokmi sa benzodiazepíny (BZ) rýchlo stali najpoužívanejšími psychotropnými liečivami. Avšak v súčasnej dobe sa prístup k týmto látkam výrazne zmenil z dôvodu návykovosti, abstinenčných príznakov po vysadení a krátko- a dlhodobými vedľajšími nežiaducimi účinkami po dlhodobom užívaní (Basile a spol., 2004). Z tohto dôvodu sa výskum zameriava na hľadanie látok, ktoré by neboli chemicky príbuzné BZ so špecifickejšim terapeutickým účinkom bez sprievodných nežiaducich účinkov. U látok s pyridindolovou štruktúrou ako napr. [6-Fluoro-9-metyl-2-fenyl-4-(pyrolidin-1-ylkarbonyl)- 2,9-dihydro-1H-pyridol[3,4-b]indol-1-one] bolo dokázané, že sú agonisti GABA_{A2} receptorov a mohli by byť klinicky využité ako anxiolytiká a myorelaxanciá (Licata a kol., 2005). Pyridoindol stobadin (STO) [(-)-cis-2,8-dimetyl-2,3,4,4a,5,9b-hexahydro-1Hpyrido[4,3-b]indol] je derivát gama-

karbolínového antidepresíva a neuroleptika Karbidínu ako jeho aktívny (-)-enantiomér. Originálnymi syntetickými postupmi sa pripravila rozsiahla séria nových derivátov antioxidantu STO so zvýraznenými antiradikálovými a protektívnymi vlastnosťami, ako napríklad schopnosť inhibovať enzým aldózareduktázu, vstupovať do oxidoredukčných procesov, vychytávať voľné radikály (Štefek a kol., 2008). Pri návrhu nových molekúl sa vychádzalo z kvantovochemických výpočtov ich vlastností (Račková a kol., 2006). Popri zvýraznení ochranných účinkov sa podarilo u nových látok obmedziť niektoré nežiadúce účinky pôvodnej látky a znížiť akútnu toxicitu. Cieľená modifikácia molekuly STO viedla nielen k zvýšeniu jeho antioxidačných vlastností, ale aj ku zvýšeniu jeho neuroprotektívnych účinkov (Štolc a kol., 2008). Dokázalo sa to pri poškodení centrálného nervového systému akútnym nedostatkom kyslíka a traumou. Podobný účinok sa zistil aj u chemicky príbuzného nového antioxidantu 2,3- dihydromelatoninu (Gáspárová a kol., 2006). Jedným z nových derivátov, substituovaný metoxy-skupinou na aromatickom jadre a etoxykarbonyl-skupinou v polohe gama na pyrimidínovom dusíku, 2-etoxykarbonyl-8- metoxy-2,3,4,4a,5,9b-hexahydro-1H- pyrido-[4,3b] indolinium chlorid (SMe1EC2). Doterajšie výsledky poukazujú na jeho účinné antioxidačné a neuroprotektívne vlastnosti (Štolc a kol., 2008). Nové pyridoindolové deriváty možno pokladať za alternatívne farmaká na prevenciu a liečbu ochorení spojených s prítomnosťou oxidačného stresu. K ich antioxidačným vlastnostiam sa pridružuje aj ich možný anxiolytický resp. antidepresívny účinok. Predbežné experimenty poukazujú na anxiolytickú aktivitu SMe1EC2 v teste vyvýšeného bludiska v tvare plus, ako aj v diskriminačnom teste light/dark boxu (Mach a kol., 2009). Ak zoberieme do úvahy nízku toxicitu týchto látok (LD_{50} u väčšiny je viac ako 2500 mg/kg) (Štolc a kol., 2008) a vynikajúce antioxidačné vlastnosti, tieto deriváty by mohli byť vhodnými kandidátmi na podrobné preskúmanie.

Literatúra

- BASILE, A.S. a kol. Anxiolytics: can less be more?. In *Eur J Pharmacol*, 2004, vol. 500, no. 1-3, p. 441-51.
- GÁSPÁROVÁ, Z. a kol. In vitro physiological evidence of enhanced neuroprotective and antioxidant action of 2,3-dihydromelatonin: a melatonin analogue. In *Pharmacol Res*, 2006, vol. 53, no. 1, p. 22-27.
- LICATA, S.C. a kol. Contribution of GABAA receptor subtypes to the anxiolytic-like, motor, and discriminative stimulus effects of benzodiazepines: studies with the functionally selective ligand SL651498 [6-fluoro-9-methyl-2-phenyl-4-(pyrrolidin-1-ylcarbonyl)- 2,9-dihydro-1H-pyridol[3,4-b]indol-1-one]. In *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, vol. 313, no. 3, p. 1118-1125.
- MACH, M. a kol. Behaviorálne hodnotenie anxiolytických vlastností pyridoindolového derivátu SMe1EC2. In *Aktuality súčasného biomedicínskeho výskumu IV*. Bratislava : Asklepios, 2009. ISBN 978-80-7167-148-0, s. 54-58.
- RAČKOVÁ, L. a kol. Free radical scavenging and antioxidant activities of substituted hexahydropyridoindoles. Quantitative structure-activity relationships. In *J Med Chem*, 2006, vol. 49, no. 8, p. 2543-2548.
- SANFORD, J.J. a kol. The psychobiology of anxiolytic drugs Part 1: basic neurobiology. In *Pharmacol Ther*, 2000, vol. 88, no. 3, p. 197-212.
- ŠTEFEK, M. a kol. Carboxymethylated pyridoindole antioxidants as aldose reductase inhibitors: Synthesis, activity, partitioning, and molecular modeling. In *Bioorg Med Chem*, 2008, vol. 16, no. 9, p. 4908-4920.
- ŠTOLC, S. a kol. New pyridoindoles with antioxidant and neuroprotective actions. In *Bauer, V. Trends in pharmacological research*. Bratislava : Institute of Experimental Pharmacology, 2008. ISBN 978-80-970003-7-0, s. 118-136.

Predpokladaný prínos

Zistenie anxiolytických resp. antidepresívnych vlastností nových pyridoindolových derivátov stobadínu, ktoré vychádzajú z molekuly neuroleptika Karbidínu by mohol prispieť k rozšíreniu poznatkov o ich využití v psychofarmakológii a tak pomôcť v liečbe a prevencii úzkostných a depresívnych stavov, ktoré sú závažným problémom súčasnej populácie. Keďže tieto deriváty majú osobitné antioxidačné vlastnosti a nízku toxicitu, v prípade výrazných

anxiolytických/antidepresívnych vlastností by bolo využitie v praxi ako náhrada benzodiazepínov v liečbe a prevencii úzkostných stavov veľmi dôležité.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

potkan kmeň Wistar/DV, predbežne 840/5 rokov

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

Uvedené behaviorálne testy u potkanov sú štandardné testy podľa Current Protocols In Neuroscience: Behavioral Neuroscience, Supplement 28, Jonh Wiley & Sons, Inc. 2004, sú neinvazívne, vychádzajú z hodnotenia ich spontánneho správania a za žiadnych okolností nespôsobujú zvierat'u bolesť ani utrpenie. Nepredpokladáme nepriaznivé účinky testovaných látok v nami stanovených dávkach.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Slabé – všetky typy použitých postupov zaradíme podľa prílohy č.4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z.

Použitý postup v rámci modelu chronického nepredvídateľného stresu	Oddiel III – Klasifikácia krutosti postupov
Predátorský stres	Slabé
Nútené plávanie	Stredné
Nadpočet zvierat vo vanici	Slabé
Mokrú podstielku	Slabé
Odobratie potravy	Slabé
„Air puff“ stres	Slabé

V rámci chronického nepredvídateľného stresu ani jeden stresor samotný neprekračuje úroveň slabej krutosti podľa prílohy č.4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z. Avšak z dôvodu opakovania môže byť diskomfort a welfér zvierat zhoršený, čo je aj účelom postupu. Preto sme sa na základe konzultácie rozhodli preklasifikovať úroveň krutosti ChNS na slabá/stredná.

Použitý postup/experiment	Oddiel III – Klasifikácia krutosti postupov
i.p. aplikácia skúmaných látok	Slabé
Modifikovaný Irwinov test	Slabé
vyvýšené budisko v tvare plus	Slabé
explorácia v tmavom/svetlom prostredí	Slabé
exploračné správanie v otvorenom poli	Slabé
test vynúteného plávania (Porsoltov test)	Stredné
Morrisovo vodné bludisko	Slabé
Učenie aktívnym vyhýbaním	Stredné
Hypertermia spôsobená stresom (HSS)	Slabé
Humánne utratenie	bez možnosti zotavenia

Uplatňovanie zásad 3R

Replacement (nahraditeľnosť zvierat)

Postup nie je možné vykonať bez použitia animálnych modelov zvierat na štúdium potenciálnych anxiolytických a antidepresívnych vlastností nami vybraných derivátov, ktoré boli navrhnuté *in silico* pomocou programu DRAGON na základe deskriptorov „drug-likeness“. Pokus nie je možné realizovať v podmienkach *in vitro*, je potrebné ho uskutočniť *in vivo*. Rovnako nie je možné pokus vykonať na systematicky nižšom druhu živočíchov. Pri tomto plánovanom postupe neexistujú alternatívne metódy.

Reduction (znižovanie počtu zvierat)

Reprodukovateľné výsledky je možné získať len pri spracovaní dostatočného počtu zvierat. Počet zvierat je zredukovaný na najnižší možný počet v jednotlivých skupinách, potrebný na validáciu a reprodukciu výsledkov a štatistické hodnotenie (10 na skupinu). K ovplyvneným zvieratám je nutné priradiť aj kontrolnú skupinu zvierat ako aj pozitívnu kontrolnú skupinu, takže celkový počet použitých zvierat bude 840 ks v priebehu celého trvania projektu. Ďalšie znižovanie počtu zvierat v postupe je spojené s rizikom falošne negatívnych alebo falošne pozitívnych výsledkov, ktoré by potenciálne viedli k neopodstatneným postupom na ďalších zvieratách.

Refinement (zjemnenie pokusu)

S cieľom minimalizovať stres u zvierat, budú pri experimente prítomné len osoby nevyhnutné na vykonanie samotného pokusu, ktoré budú k zvieratám pristupovať veľmi šetrne. Počas celého priebehu experimentu bude o zvieratá náležite postarané, budú ošetrované odbornými pracovníkmi zverinca a pravidelne kontrolované vedúcim experimentu. Zdravotný stav zvierat bude denne monitorovaný. Zvieratá budú pri použitých testoch minimálne vystavené stresu a bolesti. Po ukončení experimentu a humánnom usmrtení zvierat sa už ďalej bude pracovať len s tkanivom.

Spätné posúdenie: nie