

Príloha: Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Modulačný účinok včelích produktov na vnútorné prostredie potkanov

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2288/16-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): včelie produkty, metabolizmus, potkan, zdravie

Účel projektu*:

Základný výskum, overenie účinnosti potravín pri prevencii a liečbe chorôb človeka, usmerňovaním fyziologických procesov.

Opísať ciele projektu:

Cieľom projektu bude skúmať vplyv včelích produktov: obnôžkový peľ, včelí peľ - perga a jeho kombináciu, teda prípadný synergický účinok, s drienkou na zdravotný stav potkanov kmeňa Zucker diabetic fatty a moduláciu sprievodných symptómov metabolických porúch pri normálnej diéte a urýchľujúcej diéte (vysokoenergetickej) s vyvinutými symptómami *diabetes mellitus* (DM) do 3 mesiacov.

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

Predpokladaným prínosom bude získanie nových originálnych poznatkov o mechanizme účinku látok s potenciálnym antidiabetickým efektom na metabolické ochorenie – diabetes mellitus typu 2 u potkanov kmeňa ZDF.

Predpokladá sa, že včelí produkt - perga (prípadne v kombinácii s extraktom z drienky) bude priaznivo vplývať na homeostázu i zdravotný stav organizmu, bude mať pozitívne účinky na tráviaci trakt, zvýšenie imunity zvierat, zlepšenie metabolických procesov a zmiernenie symptómov spojených s metabolickými ochoreniami (obezita, cukrovka, lipidové poruchy).

Poznatky získané z predkladaného projektu budú podkladom pre vývoj nových výživových doplnkov stravy na inhibíciu procesov u diabetu typu 2 s perspektívou využitia v humánnej medicíne. Zistenia sa doplnia o ekonomickú štúdiu, ktorá bude brať do úvahy cenu produktu, jeho dávkovanie a možné terapeutické účinky na zdravie ľudí.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan laboratórny, kmeň Zucker diabetic fatty (200 ks na 4 roky), samce

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

Počas celého trvania projektu sa bude so zvieratami zaobchádzať šetrne, nebudú robené žiadne invazívne zásahy a preto nepredpokladáme nepriaznivý vplyv na zvieratá. Testované látky budú podávané sondou do žalúdka testovaných zvierat. Počas podávania látok zvieratá utrpia minimálny stres a mierny diskomfort. Manipulácia s nimi bude však veľmi šetrná (predchádzajúci handling), práca so sondou bude rýchla a zvieratá si na túto manipuláciu rýchlo zvyknú. Tento zákrok nebude mať na zvieratá negatívne účinky. Určitý diskomfort môžu zvieratá pociťovať pri odbere kvapky krvi z chvosta.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Počas trvania experimentu (váženie zvierat, odber kvapky krvi z chvosta, sondáž): slabá krutosť

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Testovanie látok a ich účinok na metabolizmus zvierat neumožňuje použiť alternatívnu náhradu a nahradiť animálny model. Pre sledovanie parametrov nie je možné použiť počítačový model zvierat a najvhodnejším modelom, aj z hľadiska interpretácie výsledkov pre humánnu fyziológiu, je laboratórny potkan. Použitie laboratórneho potkana v našich experimentoch vysvetľujeme aj tým, že laboratórny potkan ako živý organizmus je v podstate dynamický systém a z fyziologického hľadiska je podobný človeku.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Predkladaný projekt je plánovaný na najmenšom možnom počte zvierat. Počet zvierat v jednej skupine (10) sme zvolili z hľadiska najlepšej interpretácie výsledkov, štatistického zhodnotenia a objektívneho posúdenia pôsobenia testovaných látok. Dôraz bol kladený na to, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená jeho validita. Počty zvierat sú nastavené tak, aby sme využili čo najefektívnejšie biologický materiál a aby boli vykonané všetky potrebné analýzy.

Zvieratá budú usmrtené humánnym spôsobom, okrem krvných vzoriek budú odobraté vzorky spermií, tkanív a orgánov, podkožného a viscerálneho tuku, vzorky kostí (femur). Tým bude zabezpečená efektívna spolupráca s inými pracoviskami v Nitre [REDAKOVANÉ], ako aj inými ústavmi na Slovensku (SAV Bratislava), čo znamená, že pre tento experiment sa použijú spoločné zvieratá pre všetky pracoviská, čím sa eliminuje vysoký počet zvierat použitých pre podobné experimenty ostatnými pracoviskami.

3. Zjemnenie:

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

Laboratórne potkany budú počas doby trvania experimentu umiestnené v modernom schválenom chovnom zariadení. Budú pod stálou kontrolou zmluvného veterinárneho lekára. Manipulácia so zvieratami bude realizovaná výlučne osobami, ktoré majú dlhoročné skúsenosti s prácou s laboratórnymi potkanmi a boli náležite preškolení. Zvieratá budú v stálych sociálnych skupinách a v známom prostredí počas celého pokusu, so stálym prísunom potravy a vody. Klieťky pre potkanov sú obohatené, čo pomôže minimalizovať stres u zvierat. Usmrtenie zvierat bude vykonané rýchlou dekapitáciou kvôli objektívnemu posúdeniu výsledkov, keďže iné spôsoby usmrtenia (CO₂, anestéza) ovplyvňujú hormonálne a metabolické parametre.

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

Netechnické zhrnutie projektu – 3743/14-221 a – po spätnom posúdení

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

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

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

Ciele projektu:

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

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

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

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

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

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

Prínos z vykonaného projektu

Hlavným prínosom zrealizovanej štúdie je overenie imunomodulačnej úlohy včelieho defenzínu-1 v procese hojenia rán *in vivo* a prvý dôkaz o pozitívnom vplyve včelieho defenzínu-1 na hojenie excíznych rán. Údaje z preklinickej štúdie o defenzínom-1-indukovanej stimulácii produkcie regulačných látok v komplexnom procese hojenia rán a o jeho vplyve na rýchlosť hojenia rany sú nevyhnutné pre jeho prípadné humánne klinické testovanie pri liečbe neinfekčných chronických rán a budú ďalej využité pre plánovanie prípadných klinických štúdií.

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

Nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:

Na chrbte každého zvieratá boli indukované 4 plnoprofilové rany, na ktoré boli aplikované testované látky vo forme gélu. S cieľom čo najväčšieho zmiernenia bolesti, indukcia rán, každodenné ošetrovanie, preväz, aplikácia testovanej látky a odber bioptického materiálu z rán prebehla v celkovom znecitlivení. Na zmiernenie pooperačnej bolesti bol ihneď po ukončení zákroku podaný tramadol i.p. Podľa potreby bol zvieratám medzi zákrokmi podávaný tramadol p.o. (pridávaný do vody) – tramadol p.o. bol podávaný v prvých 5 dňoch po indukcii rán, potom už jeho podávanie nebolo potrebné. Operačný zákrok zvládli zvieratá dobre, podávaná analgézia bola dostatočne účinná, z dôvodu neúčinnnej analgézie nebolo potrebné žiadne zviera predčasne vyradiť z pokusu a usmrtiť. Rovnako nebolo potrebné pooperačne podávať antibiotiká

Úroveň krutosti:

stredná

injekčné podanie anestetík – mierna

injekčné podanie analgetík - mierna

indukcia rán v celkovom znecitlivení a následnou pooperačnou analgéziou – stredná

pooperačné podávanie analgetík - slabá

ošetrovanie, preväz a dokumentácia rán v celkovom znecitlivení – stredná

odber bioptických vzoriek v celkovom znecitlivení – stredná

individuálne umiestnenie potkanov počas 15 dní - stredná

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat: Pre plánované pokusy neexistujú alternatívne metódy *in vitro*. Pre testovanie nového materiálu je potrebný celý živý organizmus so všetkými fyziologickými procesmi. V projekte sa však sleduje a uplatňuje najnovšia legislatíva v súvislosti so smernicami o použití zvierat na vedecké účely, ktorú uzákonil Európsky parlament (smernica 2010/63/EU) a Nariadenie vlády SR (Zbierka zákonov č. 377/2012) a Vyhláška 436 PMaRV SR.

2. Redukcia počtu zvierat:

Počet zvierat použitých v projekte bolo obmedzené na minimum, nevyhnutné pre štatistické vyhodnotenie výsledkov. Experiment bol navrhnutý tak, že každé zviera ako individuum slúži na testovanie štyroch rozličných substancií a po odbere bioptických vzoriek zo všetkých štyroch

rán bolo vyradené z experimentu a humánne usmrtené. Toto usporiadanie pokusu sa ukázalo ako efektívne, keďže testované látky podľa predpokladov pôsobili loálne a nedochádzalo teda k vzájomnému ovplyvňovaniu sa jednotlivých rán na jednom zvierati. Opätovné použitie zvierat nebolo možné, keďže po zhojení rán a odbere bioptického materiálu už nebola dostupná na chrbte intaktná koža pre nasledujúci experiment. Nebolo možné ani použitie zvierat v inom experimente, keďže zvieratám vyradovaným z pokusu boli z rán odoberané bioptické vzorky v plnom profile a je predpoklad, že zviera po takto náročnom operačnom zákroku by až do zotavenia neprimerane trpelo. Preto boli zvieratá po odbere bioptického materiálu v celkovej anestézii humánne usmrtené.

3. Zjemnenie: Potkany boli počas celého pokusu držané za štandardných podmienok, vyžadovaných legislatívou, pričom boli rešpektované základné etické princípy požadované pri zaobchádzaní s pokusnými zvieratami. Počas celého pokusu sa dodržiavali postupy maximálne zjemňujúce pokus. Zvieratám bola zabezpečená štandardná starostlivosť, ktorú vykonával školený personál - pracovníci pokusného zariadenia. Denne sa vykonávala kontrola zdravotného stavu zvierat. Ani v jednom štádiu pokusu nemali zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prísun potravy a vody.

S cieľom čo najväčšieho zmiernenia bolesti, indukcia rán, každodenné ošetrovanie, preväz, aplikácia testovanej látky a odber bioptického materiálu z rán prebehla v celkovom znecitlivení. Tento postup sa ukázal ako efektívny. Na zmiernenie pooperačnej bolesti bol ihneď po ukončení zákroku podaný tramadol i.p. Podľa potreby bol zvieratám medzi zákrokmi podávaný tramadol p.o. (pridávaný do vody), táto potreba bola hlavne v prvých piatich dňoch po indukcii rán.

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

In vivo testovanie farmakokinetiky prípravkov SUL132, SUL138, SUL150 a SUL151

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2468/16-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): farmakokinetika, potkany, SUL-prípravky

Účel projektu:

- a) základného výskumu,
- b) translačného alebo aplikovaného výskumu 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,
- c) v záujme dosiahnutia ktoréhokoľvek z cieľov uvedených v písmene b) pri vývoji, výrobe alebo testovaní kvality, účinnosti a bezpečnosti liekov, potravín, krmív a iných látok alebo výrobkov,
- d) ochrany životného prostredia v záujme zdravia alebo dobrých životných podmienok ľudí alebo zvierat,
- e) výskumu zameraného na ochranu druhov,
- f) vysokoškolského vzdelávania alebo odborného vzdelávania na účely získania, udržania alebo zlepšenia zručností potrebných na výkon povolania,
- g) súdneho vyšetrovania, testovanie kozmetických výrobkov alebo jeho zložiek, kombinácie zložiek, ako povolená výnimka podľa osobitného predpisu.

Opísať ciele projektu:

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

Cieľom tohto projektu je sledovanie farmakokinetiky SUL prípravkov (SUL-132/138/150/151) v priebehu 24 h od ich intravenózneho (i.v.) alebo perorálneho (p.o.) podania.

V prvej časti pokusu budú testované 3 koncentrácie (1 mg/kg ž.hm., 5 mg/kg ž.hm. a 10 mg/kg ž.hm.) každého zo SUL prípravkov po dobu 24 h od ich i.v. aplikácie potkanom (n = 5). Vzorky krvi budú z potkanov odobrané vďaka i.v. zavedenej kanyle v časových intervaloch 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, a 7 h od i.v.

podania SUL prípravku. Po 12 h. od podania prípravku SUL sa krv odoberie inzulínkou z protil'ahlej chvostovej žily a po 24 h. punkciou pravej časti srdca, keď sa bude zviera nachádzať v anestézii po podaní letálnej dávky anestetika.

V druhej časti pokusu bude pomocou per orálneho podania testovaná iba jedna koncentrácia (10 mg/kg ž.hm.) každého zo SUL prípravkov po dobu 24 h od ich p.o. aplikácie potkanom (n = 6). Vzorky krvi budú z potkanov odobrané i.v. zavedenou kanylou v časových intervaloch 30 min, 1 h, 3 h, a 7 h od p. o. podania SUL prípravku. Po 12 h. od podania prípravku SUL sa krv odoberie inzulínkou z protil'ahlej chvostovej žily a po 24 h. punkciou pravej časti srdca, keď sa bude zviera nachádzať v anestézii po podaní letálnej dávky anestetika.

Prínos z vykonania projektu:

(napr. aký je prínos pre vedu, ľudstvo, zvieratá)

SUL prípravky vyvinuté holandskou firmou Sulfateq B.V. sú nové prípravky, ktoré boli touto firmou testované v *in vitro* a *in vivo* modeloch na overenie ich protektívneho antioxidačného pôsobenia. Doposiaľ nebola testovaná ich farmakokinetika v organizme živého zvieraťa. Tento projekt preto prispeje k objasneniu mechanizmov absorpcie, distribúcie, biotransformácie a výslednej eliminácie týchto nových prípravkov z organizmu experimentálnych zvierat, čo bude prínosom pri ďalšom testovaní ich biologických účinkov. Tieto SUL-prípravky majú pre svoje protektívne antioxidačné pôsobenie potenciál na medicínske využitie.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V postupe budú použité dospelé potkany (*Rattus norvegicus*), kmeň Wistar. Spolu bude použitých 84 ks zvierat.

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

Na základe doterajšieho testovania tieto SUL prípravky nemali pri *in vitro* ani *in vivo* testovaní toxický účinok na bunky, resp. použité laboratórne zvieratá a preto sa nepredpokladá ani ich toxický účinok na potkany použité v tomto pokuse.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Stredná
Váženie - slabá
Ustajnenie - slabá
Manipulácia so zvieratami pri čistení vaníc - slabá
Zavedenie i.v. kanyly (v celkovej anestéze) - slabá
Opakovaný odber krvi z kanyly - stredná
Odber krvi inzulínkou - slabá
Celkové množstvo odobranej krvi - 1,6 ml - slabá
Podávanie látok cez sondu - slabá
Inhalačná anestéza - slabá

Uplatnenie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Farmakokinetické štúdie nových prípravkov na živých organizmoch umožňujú vyhodnotiť spôsob, akým sú tieto látky v organizme absorbované, biotransformované a vylučované. Potkany sú laboratórne zvieratá štandardne využívané na testovanie farmakokinetiky novo pripravených látok. Preto považujeme potkany ako experimentálneho zvieratá na testovanie farmakokinetiky SUL prípravkov za najvhodnejšie z hľadiska možného využitia získaných výsledkov následne u človeka.

Testovanie farmakokinetiky SUL prípravkov (SUL-132/138/150/151) doposiaľ nebolo nikde vykonané, keďže sa jedná o novo syntetizované zložky, ktorých účinok nebol doposiaľ publikovaný.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Z hľadiska experimentálneho výskumu je nutné zabezpečiť dostatočný počet zvierat so snahou o redukcii chýb, ku ktorým môže dôjsť v priebehu spracovania výsledkov. Zodpovedne sme preto pristúpili k výberu počtu zvierat a minimalizovali sme ho na najmenšiu možnú mieru.

Na testovanie farmakokinetiky štyroch SUL prípravkov (SUL-132/138/150/151) po i.v. podaní bude použitých 60 ks potkanov. Z každého SUL prípravku budú pripravené 3 rôzne koncentrácie. Jedna koncentrácia bude testovaná po i.v. podaní na 5 potkanov.

Na testovanie farmakokinetiky štyroch SUL prípravkov (SUL-132/138/150/151) po p.o. podaní bude použitých 24 ks potkanov, keďže týmto potkanom (n=6) bude podaná iba jedna koncentrácia SUL prípravku (najvyššia koncentrácia použitá pri i.v. podaní).

3. Zjemnenie:

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

Laboratórny potkan je už dlhodobo považovaný za veľmi vhodné modelové zviera pre pokusy v humánnej medicíne.

Zavádzanie i.v. kanyly bude vykonané pod celkovou anestézou, t.j. tak aby to nebolo pre zvieratá bolestivé.

Zvieratá budú ustajnené individuálne v schválených vaniciach s obohateným prostredím, starať sa o ne bude odborne vyškolený a skúsený personál.

Zvieratá budú na konci pokusu humánne usmrtené v celkovej anestéze predávkovaním Zoletilu inj.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Opis pokusu

Príloha 4

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu

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

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2553/16-221

Kľúčové slová: pharmacokinetic, alpha 1-antitrypsin, rabbits, alternative metode

Účel projektu

Aplikovaný výskum

Cieľ projektu

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

Prínos projektu

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

Druh použitých zvierat a ich predbežný počet

Druh: Králik (hybrid NZB)

Predbežný počet: 60ks

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

Vzhľadom na doterajšie skúsenosti nepredpokladáme nepriaznivý vplyv podávaných preparátov na zdravotný stav zvierat.

Klasifikácia krutosti jednotlivých postupov

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

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

Preukázanie súladu s požiadavkami nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Posúdenie pokusu z hľadiska 3R

- Refinement – vzhľadom na to, že v pokuse nebudú vykonané žiadne bolestivé zákroky, nie je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť
- Reduction – počty zvierat v pokuse sú primerané, redukované v maximálnej miere; ich ďalšie zníženie by mohlo ovplyvniť reprodukovateľnosť a validitu pokusu
- Replacement – po preskúmaní databáz ECVAM (<http://ecvam.jrc.it>), ICCVAM (<http://iccvam.niehs.nih.com>) a FRAME (<http://www.frame.org.uk>) sme nenašli zodpovedajúcu alternatívnu metódu

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Vplyv humínových a ďalších prírodných látok na funkčný stav niektorých orgánov a ich mitochondrií vo fyziologickom stave a pri intoxikáciách.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2559/16-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): antioxidačný status, funkčný stav orgánov, intoxikácia, humínové kyseliny, mykotoxíny

Účel projektu*: Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Opísať ciele projektu:

Cieľom je preveriť možnosť prevencie a liečby otráv mykotoxínmi tzv. poľných pliesní aplikáciou prírodných látok, humínových kyselín, ktoré sú povolené EMEA. V rámci tohto hlavného cieľa bude potrebné overiť vplyv podávania humínových kyselín v prevencii otráv a liečby už intoxikovaných zvierat mykotoxínmi (DON a T-2). Na základe predpokladaných výsledkov by sa mohli humínové kyseliny (vyrábané na Slovensku) využiť v prevencii a liečbe intoxikácií mykotoxínmi ako aj pri rozhodovaní o krmivách s mierne nadlimitným obsahom spomenutých látok. Výsledky by sa mohli využiť aj pri výrobe kvalitnejších potravín živočíšneho pôvodu s nižším obsahom škodlivých látok.

Ani v databázach PubMed, Medline alebo Cochrane Database for Systematic Reviews nie sú dosiaľ prístupné údaje o možnostiach zníženia resopcie mykotoxínov poľných pliesní pre zdravie bezpečnými prírodnými látkami akými sú humínové kyseliny. Existujú literárne zdroje dokumentujúce zníženie rezorpcie iných toxínov, napríklad aflatoxínov, z čoho vyplýva aj cieľ tohto projektu overenia potenciálneho využitia týchto látok aj pri znižovaní rezorpcie DON a T-2.

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

Nadväzujúc na výsledky projektov VEGA 1/0799/09 a 1/1236/12 č. rozhodnutia ŠVPS SR Ro-2575/14-221 je predpoklad, že získané poznatky okrem obohatenia teoretických vedomostí o účinku spomenutých látok budú využiteľné aj v poľnohospodárskej a veterinárskej praxi. Humínové látky sú prírodné látky, ktoré bránia rezorpcii ťažkých kovov, toxínov, pesticídov, niektorých mykotoxínov či iných toxických látok a ich následnej kumulácii v organizme. Charakterizácia účinku humínových kyselín voči intoxikáciám mykotoxínmi prispeje k prevencii chorôb zvierat aj ľudí. Doterajšie výsledky naznačujú, že riešená problematika zasahuje aj do liečby chorôb zvierat, so zreteľom na produkciu kvalitnejších potravín živočíšneho pôvodu s nižším obsahom toxických látok, zvýšenou oxidačnou stabilitou a biologickou hodnotou. Výsledky budú publikované okrem vedeckých časopisov aj v odborných a informačných časopisoch, čo môže prispieť aj k zdravšej výžive obyvateľstva a nárastu spotreby domácich potravín.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórne potkany, samce, kmeň Sprague-Dawley v celkovom počte 140 ks pre dve etapy výskumu.

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

Podávanie mykotoxínov v uvedených dávkach môže vyvolať poruchy gastrointestinálneho traktu a zníženie imunity (strata chuti do jedla, žltáčka, nedostatok energie). Pri navrhovanom dávkovaní a dĺžke experimentu by u zvierat nemali vyvolávať bolesť a výrazné klinické prejavy otravy.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Uplatňovanie zásad 3R

Nutnosť vykonania pokusu na laboratórnych zvieratách vychádza z toho, že iné alternatívne metódy uvedené v ECVAM a ICCVAM neumožnia odhaliť kompletnú metabolickú odozvu organizmu, jednotlivých orgánov a bunkových organel.

V projekte je počet zvierat redukovaný na minimálny tak, aby sa dal štatisticky vyhodnotiť vplyv pri oboch odberoch. Počet zvierat je menší ako je dané v OECD (test č. 452) pre štúdium chronickej toxicity kde sa používa 20 ks z každého pohlavia. V našom pokuse je v každej skupine iba 10 zvierat jedného pohlavia.

V pokuse používané laboratórne zvieratá sú v podstate domestikované. Počas celého pokusu budú v kontakte s tými istými ľuďmi, čím je eliminovaný stres. Podávanie humínových kyselín v potrave a mykotoxínov nie je násilnou aplikáciou látok a nenarušuje welfare zvierat. Pokus sa uskutoční v Laboratóriu výskumných biomodelov LF UPJŠ, ktoré pracuje v súlade s § 25 a 26 Nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z. z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na vedecké alebo vzdelávacie účely.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

NÁZOV PROJEKTU

VPLYV GESTAČNÝCH PORÚCH NA POSTNATÁLNY METABOLIZMUS

377/2012 Z.z. NARIADENIE VLÁDY Slovenskej republiky

§ 40 Netechnické zhrnutie projektu -2606/16-22-1

CIEĽ PROJEKTU

Cieľom projektu je identifikácia vplyvov gestačných porúch na postnatálny metabolizmus mláďat, čo má význam nielen pre možné odhalenie príčin a potenciálnych terapeutických cieľov u pacientiek s danými poruchami, ale môže pomôcť odhaliť dôležité rozdiely u experimentálnych zvierat a ľudí, čo umožní lepšie modelovať ľudské metabolické poruchy na zvieratách. Náš projekt bude realizovaný výhradne na experimentálnych zvieratách, pretože je ich použitie jedinou možnosťou ako adekvátne pozorovať a popísať dané vplyvy. 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.

SÚLAD ZÁSAD 3R

Dizajn pokusov, ako aj počet jedincov v skupinách bude vychádzať z dostupnej literatúry, ktorá je zameraná na podobné problémy (a tam je bežný počet $n=10$ na skupinu). Toto je dôležité pre porovnateľnosť výsledkov s inými dátami, ale aj z hľadiska dodržania pravidiel 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. Problém možnej falošnej negativity výsledkov sa budeme snažiť vyriešiť analýzou rovnakých veličín rôznymi testami, resp. metódami.

OČAKÁVANÁ UJMA A PRÍNOS

V tomto projekte sa budeme snažiť použiť viaceré modely gestačných porúch, ktoré sú v súčasnej dobe, žiaľ, veľmi časté u gravidných žien. Využitie experimentálnych zvierat sa ukazuje ako jediná možnosť na adekvátne modelovanie a popis jednotlivých gestačných porúch, preto považujeme tento výskum za veľmi prínosný. Samce bude tendencia po párení využiť aj na iný experiment, respektíve experimenty, avšak pokiaľ sa nám ich nepodarí do 3 mesiacov do žiadneho zaradiť (resp. schváliť), budú usmrtené.

Zvieratá budú podstupovať úkony, patriace do kategórie slabé. 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

Súhrn použitých zvierat:

Druh/plemeno/línia	Pohlavie	Počet (za celé obdobie)	Počet na skupinu
Myši CD-1	Samice		10
Myši CD-1	Samce		

Druh/plemeno/línia	Skupina	Pohlavie	Ukon	Časové obdobie	Počet zvierat	Krutosť
Myši CD-1	Kontrolná	Samice	Hmotnosť, príjem tekutín, strava	3 razy týždenne	10/skupina	Slabá
Myši CD-1	Kontrolná	Samice	Metabolické klieťky (3 hod.)	Jednorázovo		Stredná
Myši CD-1	Kontrolná	Samice	Glykémia (nalačno, po 3 hodinách v metabolických klieťkach)	Jednorázovo		Slabá
Myši CD-1	Kontrolná	Samice	Meranie krvného tlaku	2 razy		Stredná
Myši CD-1	Polycystické ovária	Samice	Hmotnosť, príjem tekutín, strava	3 razy týždenne	10/skupina	Slabá

Myši CD-1	Polycystické ovária	Samice	Metabolické kliečky (3 hod.)	Jednorázovo		Stredná
Myši CD-1	Polycystické ovária	Samice	Glykémia (nalačno, po 3 hodinách v metabolických kliečkach)	Jednorázovo		Slabá
Myši CD-1	Polycystické ovária	Samice	Meranie krvného tlaku	2 razy		Stredná
Myši CD-1	mtDNA	Samice	Hmotnosť, príjem tekutín, strava	3 razy týždenne	10/skupina	Slabá
Myši CD-1	mtDNA	Samice	Metabolické kliečky (3 hod.)	Jednorázovo		Stredná
Myši CD-1	mtDNA	Samice	Glykémia (nalačno, po 3 hodinách v metabolických kliečkach)	Jednorázovo		Slabá
Myši CD-1	mtDNA	Samice	Meranie krvného tlaku	2 razy		Stredná
Myši CD-1	Gestačná hypertenzia	Samice	Hmotnosť, príjem tekutín, strava	3 razy týždenne	10/skupina	Slabá
Myši CD-1	Gestačná hypertenzia	Samice	Metabolické kliečky (3 hod.)	Jednorázovo		Stredná
Myši CD-1	Gestačná hypertenzia	Samice	Glykémia (nalačno, po 3 hodinách v metabolických kliečkach)	Jednorázovo		Slabá
Myši CD-1	Gestačná hypertenzia	Samice	Meranie krvného tlaku	2 razy		Stredná
Myši CD-1	Gestačný diabetes	Samice	Hmotnosť, príjem tekutín, strava	3 razy týždenne	10/skupina	Slabá
Myši CD-1	Gestačný diabetes	Samice	Metabolické kliečky (3 hod.)	Jednorázovo		Stredná
Myši CD-1	Gestačný diabetes	Samice	Glykémia (nalačno, po 3 hodinách v metabolických kliečkach)	Jednorázovo		Slabá
Myši CD-1	Gestačný diabetes	Samice	Meranie krvného tlaku	2 razy		Stredná

Zoznam aplikovaných látok

Skupina	Aplikovaná látka
Kontrolná	Bez aplikácie
Polycystické ovárie	Letrozol
mtDNA	mtDNA
Gestačná hypertenzia	L-NAME
Gestačný diabetes	Diabetická strava

Rozhodli sme sa, že experimentálne zvieratá nebudeme značiť na uchu, ale len na chvoste prostredníctvom permanentnej fixky. Považujeme totiž tento spôsob za menej stresujúci. Odber moču budeme realizovať prostredníctvom metabolických kliebok, kde pobudnú zvieratá maximálne 3 hodiny. 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 45 minút. Meranie krvného tlaku sa bude uskutočňovať prostredníctvom klasického tlakomeru.

Ak by bola mortalita výrazne vyššia u experimentálnych jedincov ako u kontrolných zvierat, experiment ukončíme.

SPÄTNÉ POSÚDENIE

Vzhľadom na to, že ide o projekt, ktorý je bez možnosti zotavenia a predpokladaná ujma je slabá, projekt nebude podliehať spätnému posúdeniu.

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Metódy predikcie degradovateľnosti a stráviteľnosti dusíkatých látok krmív pre prežúvavce

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2438/16-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): bachorová kanyla, intestinálna kanyla, bachorová degradovateľnosť, črevná stráviteľnosť živín

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)

Predkladaný návrh projektu je vysoko aktuálny vzhľadom na potrebu znížiť náklady na chov hovädzieho dobytku (najmä dojníc) a zvýšiť ochranu životného prostredia (keďže dojnica ročne vylúči okolo 130 kg N). Podstata riešenia tohto problému je v precíznom, vybilancovanom kŕmení prežúvavcov. K tomu prispievajú čo najobjektívnejšie informácie o obsahu živín a ich kvalite v krmivách, t.j. o skutočnej nutričnej hodnote krmív. Výskumným pracoviskám je daná úloha vyvinúť rýchle a praktické metódy pre stanovenie charakteristík degradácie, ktoré umožnia na základe matematických modelov predikovať potreby živín a modelovať kŕmne dávky.

Predikčné empirické rovnice k formulovaniu kŕmnych dávok pre optimálnu produkciu sú vypracované v kontrolovaných podmienkach výskumných pracovísk (Fox et al., 2004). Pri celosvetovom raste cien krmív sa zvyšujú vstupy do chovu dojníc, preto je dôležité, aby boli kŕmne dávky zostavené na takej úrovni, ktorá dostatočne zabezpečí potreby organizmu v jednotlivých fyziologických štádiách s minimálnym negatívnym dopadom na životné prostredie. Nie je žiaduce, aby zvýšený obsah živín v kŕmnych dávkach zvyšoval ich vylučovanie a nepriaznivo ovplyvňoval vodné zdroje a ovzdušie. Správne nastavenie parametrov pre výpočet kŕmnych dávok zabezpečí vysokú utilizáciu živín (Chase et al., 2009; Tylutki et al., 2003).

Dojnice majú vysoké nároky na príjem energie a N-látok, resp. jednotlivých aminokyselín, ktoré využijú na produkciu mlieka a zabezpečenie svojich telesných potrieb s prihliadnutím na potreby bachorovej mikrofóry - zabezpečenie optimálneho zloženia bachorovej mikrofóry, jej optimálnej

funkcie a optimálneho mikrobiálneho rastu (Wallace et al., 1996; Ouellet et al., 2004; Marini et al., 2008).

Weendenský systém, ktorý analyzoval hrubý obsah základných živín spolu so systémom celkovo stráviteľných živín umožňoval viac ako jedno storočie vypočítať energiu a N-látky využiteľné z krmív (Morrison, 1958, cit. Sniffen et al., 1992). V osemdesiatych rokoch boli vyvinuté systémy pre hodnotenie energie pre potreby prežúvavcov (Schiemann et al., 1971; NRC 1978; van Es 1978; a iní). Pre svoju nepresnosť v predikovaní potrieb živín a ich skutočného krytia pre konkrétne produkčné skupiny zvierat sa pokračovalo vo vývoji nových systémov aj pre posudzovanie kvality dusíkatých látok. Existujúce systémy hodnotiace N-látky pre prežúvavce (PDI - Vérité et al., 1989; DCE/OEB-system - Tamminga et al., 1994; NRC 2001; AAT/PBV - Madsen et al., 1995; a iné) umožňujú predikovať nutričnú hodnotu N-látok krmív a navrhnúť požiadavky zvierat na N-látky degradované v bachore (RDP) a intestinálne strávené a absorbované bielkoviny. Tieto modely predikujú nielen úžitkovosť zvierat, ale aj exkréciu živín (Fox et al., 2004).

Nutričná hodnota N-látok v krmivách pre prežúvavce je charakterizovaná rýchlosťou degradácie a rozsahom degradácie v bachore a črevnou stráviteľnosťou v bachore nedegradovaných bielkovín (RUP). Pre charakterizáciu N-látok krmiva je nevyhnutné získať presné a správne hodnoty RDP a RUP a črevnej stráviteľnosti RUP. Súčasné modely hodnotenia krmív sú založené na frakcionácii N-látok. V európskych systémoch hodnotenia krmív (PDI - Vérité et al., 1989; DCE/OEB-system - Tamminga et al., 1994; AAT/PBV - Madsen et al., 1995; a iné) i americkom NRC (2001) sa viac ako 30 rokov používa technika *in situ* (alebo *in sacco*) podľa Ørskova a McDonalda (1979).

Presne stanovené koeficienty intestinálnej stráviteľnosti (IS) v bachore nedegradovaných bielkovín krmiva sú základnou podmienkou správneho bilancovania krmných dávok. Dôležité je získať čo najviac údajov pre túto charakteristiku za štandardných podmienok vzhľadom k tomu, že existujú rozdiely v stráviteľnosti RUP medzi krmivami (Schwab et al., 2003).

V súčasnosti existuje niekoľko rôznych metód *in vitro*, a bola posudzovaná ich vhodnosť na presnú predikciu v bachore degradovaných N-látok (Schwab et al., 2003). Metódy *in vitro* boli kategorizované na metódy využívajúce bachorovú šťavu a v nej prítomnú mikroflóru, ktorá v anaeróbných podmienkach degraduje bielkoviny krmiva na nižšie frakcie N-peptidy, aminokyseliny až na amoniak (Broderick, 1987; Broderick et al., 2004; a i.). Ďalej na metódy *in vitro* nezávislé od bachorovej šťavy, ktoré zahŕňajú inkubáciu s bezbunečnými proteolytickými enzýmami získanými extrakciou zo zmesi bachorových mikróbov alebo komerčnými proteázami (Aurère et al., 1982). *In vitro* chemické metódy založené na frakcionácii N-látok krmív spočívajú na rozpustnosti N-látok v pufrí a v neutrálnej a kyslo detergentných roztokoch (Sniffen et al., 1992; Licitra et al., 1996). Táto *in vitro* technika nevyžaduje fistulované zvieratá a je menej časovo i finančne náročná. Je to najviac rozšírený a sofistikovaný chemický analytický postup na kvantifikovanie frakcií N v krmivách (Schwab et al., 2003). Schému frakcionácie N-látok používa i Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS), ktorý frakcionuje N-látky na päť frakcií s rôznou rýchlosťou degradácie (Sniffen et al., 1992; Tylutki et al., 2008; van Amburgh et al., 2012; a i.).

Podobne ako na stanovenie bachorovej degradovateľnosti aj na stanovenie intestinálnej stráviteľnosti existuje niekoľko metód, ktoré majú svoje prednosti a nedostatky, napr. metóda *in vivo* (Rohr et al., 1979 a i.), metóda mobilných vrecúšok (*mobile bag* metóda), ktorej používanie je veľmi rozšírené (De Boer et al., 1987; Frydrych, 1992; Taghizadeh et al., 2005; Homolka et al., 2007; Yayota et al., 2009; a i.) a metóda *in vitro* pomocou komerčných enzýmov (Setälä et al., 1984; Todorov a Grigorov, 1991; Calsamiglia a Stern, 1995 a i.). Schwaab et al. (2003) považujú poslednú uvedenú za výbornú alternatívu k *mobile bag* metóde. Z tejto metódy vychádza aj modifikovaná metóda aplikovaná na prístrojové zariadenie DAISYII, v ktorej sa využívajú proteolytické enzýmy. Pepsínom sa simuluje trávenie bielkovín v sleze a na trávenie zodpovedajúce v dvanástniku sa používa pankreatín, ktorý je zmesou trypsínu, amylázy a lipázy.

Z uvedených metód stanovenia bachorovej degradovateľnosti N-látok metóda *in situ* má najväčšie prednosti z dôvodu, že je to dynamický proces a krmivo je vystavené podmienkam trávenia podobným ako sú *in vivo* a rovnako je to i pri metóde *mobile bag* (Schwab, 2003).

Cieľom je preto je rozšíriť metódy stanovenia rozsahu a rýchlosti degradácie jednotlivých frakcií N a intestinálnej stráviteľnosti o metódy rýchlejšie a menej prácne, avšak s dobrou presnosťou a opakovateľnosťou výsledkov. Náhrada používanej metódy *in situ* a *mobile bag* v procese hodnotenia krmív metódami *in vitro* umožní rýchlejšie získať aj ďalšie parametre o kvalite N- látok a tým aj o kvalite krmív, ktoré doplnia databázu krmív pre prežúvavce. To umožní vypracovať systém tvorby lepšie vybilancovaných krmných dávok s efektívnou utilizáciou živín (energie a N- látok) a tým menších strát N počas fermentácie v bachore a intermediárnom metabolizme. Avšak na to, aby sme mohli spomínané metódy porovnať, potrebujeme čo najväčšie množstvo údajov a charakteristík získaných metódou *in sacco* a *mobile bag* na zvieratách s voperovanými bachorovými a duodenálnymi kanylami v proximálnom duodene.

Jedným z hlavných cieľov projektu je zabezpečiť efektívnejšie využívanie, trvalú reprodukciu a ochranu prírodných a teda aj nutričných zdrojov, zvyšovanie kvality a potravinovej bezpečnosti. Kvalita živín a ich premena v procese trávenia ovplyvňuje produkciu živočíšnych produktov, kvalitu potravín, ekonomiku produkcie ako aj životné prostredie.

Výživa zvierat je bezprostredne spätá cez transformáciu živín z rastlín s prírodným prostredím, preto účinné a efektívne ovplyvnenie utilizácie krmív na živočíšne produkty je možné len neustálym prehlbovaním poznatkov. Úroveň utilizácie krmív je výsledkom dokonalého poznania výživnej hodnoty krmiva na jednej strane a potreby živín a energie pre zvieratá na strane druhej. Zámerom riešenia projektu je formulovať biologicky zdôvodnené parametre, postupy a stratégie využitia, úpravy, skladovania, transformácie a efektívneho zhodnotenia produkčného potenciálu domácich a perspektívnych nutričných zdrojov, so zámerom upresniť ich potrebu, podmienky efektívnej utilizácie živín v organizme zvierat a eliminovať negatívne pôsobenie na životné prostredie, zviera a cez kvalitu živočíšnych produktov na človeka.

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

K predloženiu projektu nás viedla snaha, ale aj potreba zlepšiť, zjednodušiť metódy predikcie nutričnej hodnoty krmív pre prežúvavce.

Precíznosť kŕmenia prežúvavcov vyžaduje presnosť v predikcii krmných komponentov, v predikcii vzťahu medzi chemickým zložením krmív a bachorovou degradáciou, resp. črevnou stráviteľnosťou. Veľmi dôležité je vybilancovať bielkoviny a energiu v krmných dávkach. Hlavným cieľom v tejto oblasti je poskytnúť odporúčania (v chove dojníc), na základe ktorých je možné redukovať vstupy N a následných strát N počas produkcie mlieka a mäsa prežúvavcami.

Zlepšenie metód pre stanovenie rýchlosti a rozsahu degradácie krmiva a trávenia v gastro-intestinálnom trakte umožnia farmárom a výrobcom krmív vytvorenie krmných dávok pre dojnice (a ďalšie prežúvavce) s lepšou energetickou a N bilanciou čo následne zredukuje straty N, resp. bielkovín počas fermentácie v bachore a intermediárnom metabolizme.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V projekte použijeme 4 kusy hovädzieho dobytku – kravy (Holsteinské plemeno).

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

Zvieratám bude voperovaná intestinálna a bachorová kanyla po aplikácii celkového a lokálneho anestetika. Operačný zákrok bude vykonávať skúsený veterinárny lekár s dlhoročnou praxou v danej oblasti. Po operácii budeme zvieratám podávať analgetiká, aby sme obmedzili bolestivosť na minimum. Zdravotný stav zvierat bude dôsledne monitorovaný. Počas sledovaného obdobia nebude zvieratám bránené v ich prirodzenom správaní. Budú dodržané štandardy chovu, umiestnenia a starostlivosti.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Na zistenie reálnej bachorovej degradovateľnosti a črevnej stráviteľnosti živín rôznych druhov krmív je nevyhnutné použitie kanylovaných zvierat. Jedine na živom organizme je možné získať exaktné výsledky. Použitie zvierat na takýto typ experimentu je nevyhnutné.

V súčasnosti existuje niekoľko rôznych metód *in vitro*, ktorými sa dá predikovať stráviteľnosť aj v laboratórnych podmienkach, ale aby boli tieto metódy čo najpresnejšie, musia sa odvodiť čo najpresnejšie regresné vzťahy. K odvodeniu týchto regresných vzťahov je nevyhnutné získať čo najviac charakteristík degradácie živín pomocou metódy *in sacco* a črevnej stráviteľnosti metódou *mobile bag*.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Vzhľadom na typ experimentu bude použitý minimálny počet zvierat, ktorý ešte stačí pre štatistické vyhodnotenie. V projekte použijeme 4 kusy hovädzieho dobytku – kravy. Metodika *in sacco* (Ørskov a McDonald, 1979) ukladá použitie minimálne 2 zvierat kvôli exaktnosti výsledkov a 1 zviera bude rezervné.

Pre stanovenie črevnej stráviteľnosti sú podľa metodiky potrebné paralelne 3 zvieratá pre testovanie 1 krmiva a 1 zviera je rezervné.

3. Zjemnenie:

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

Pri referenčnej metóde *in sacco* sa všeobecne využívajú kravy, vzhľadom na ich pomalší rast a v experimentoch ich je možné použiť dlhodobo. S týmto typom experimentov máme dlhoročné skúsenosti.

Pri operácii (vpravenie kanýl) bude bolesť obmedzená na minimum, následkom vhodného podávania sedatív, analgetík a anestetík.

Zvieratá budeme postupne navykať na manipuláciu s nimi pri vkladaní a vyberaní vreciek, takže za krátku dobu bude stres úplne minimalizovaný.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno, výsledky na spätné posúdenie budú zaslané do 30.09.2020

Netechnického zhrnutia projektu

Názov projektu: Neuroprotektívne mechanizmy zahrnuté v stimulácii AT2 receptora po traumatickom poranení miechy.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2/0160/16 - 2855/16-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): traumatické poškodenie miechy, stimulácia AT2 receptora, neuroprotektícia.

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)

Traumatické poranenie miechy predstavuje vážny medicínsky problém, ktorý výrazne ovplyvňuje kvalitu života postihnutých jednotlivcov. Intenzívny výskum mechanizmov poškodenia miechy priniesol v posledných rokoch množstvo sľubných terapií, ale výsledky klinických skúšok boli prevažne negatívne a žiadna z nich nebola úplne akceptovaná pre ich uplatnenie v klinickej praxi. Rozsah sekundárneho poškodenia je pre mnohých pacientov limitujúcim faktorom, ktorý ovplyvňuje funkčnú obnovu. Naša stratégia v liečbe traumou poškodenej miechy spočíva na potlačení sekundárneho poškodenia prostredníctvom lokálnej stimulácie AT2 receptorov.

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

Potlačenie sekundárneho poškodenia miechy po mechanickej traume umožní zachovať väčšie množstvo nervového tkaniva, čím sa vytvoria lepšie podmienky pre regeneráciu a následnú obnovu nervového tkaniva, a tým funkcie miechy. V experimentoch budú merané indikátory axonálneho rastu, angiogenézy, pro-zápalové markery, aktivácia mikroglie a astrocytov, infiltrácia makrofágov, a kvantifikácia demyelinizácie, myelinizovaných a nemyelinizovaných axónov, rostro-kaudálna dĺžka a objem poškodenia, množstvo zachovaného tkaniva, a tieto výsledky budú korelované s funkčnou obnovou miechy. Keďže doteraz neexistuje účinná terapia v poškodení miechy, aj malý pokrok by posunul modernú traumatológiu o veľký krok dopredu.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch budú použité dospelé laboratórne potkany (váha 280-320g) kmeňa Wistar samice v počte 184ks na celú dobu riešenia.

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

Kompresia miechy bude uskutočnená za celkovej inhalačnej anestézy 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 poranení miechy zachované iba čiastočne. Zvieratá by mali byť po prebratí z anestézy schopné pohybu za pomoci predných labiek, čiže schopné sa sami napiť a nakrímiť. V niektorých prípadoch môže dôjsť k prechodnej dysfunkcii močového mechúra.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Poranenie miechy ako aj následná regenerácia sú procesy dynamické, ťažko predvídateľné a závisiace na mnohých faktoroch. Z týchto dôvodov nie je možné uskutočniť dané experimenty alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat. Okrem toho, pokus nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet 184 ks zvierat bolo stanovené 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 neuroprotektívneho vplyvu stimulácie AT2 receptorov; (3) traumou poškodená miecha nemôže byť použitá zároveň na biochemické, histologické, imunohistochemické analýzy a tzv. Angiotensin receptor binding metódu.

3. Zjemnenie:

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

Všetky operačné zákroky, ktoré budú na zvieratách uskutočnené, budú vykonávané pod celkovou anestézou, t. j. nebudú pre zvieratá bolestivé. Po vykonaní chirurgických úkonov bude zvieratám subkutánne podaný sterilný fyziologický roztok z dôvodu prevencie dehydratácie. Až do prebratia z anestézy bude experimentálne zviera umiestnené na ohrievacej podložke nastavenej na teplotu 37,5°C. Experimentálne zvieratá budú po aplikácii terapeutického postupu umiestnené najprv individuálne a po zahojení operačných rán v pároch do kliebok, kde budú mať potravu a vodu *ad libitum*, a umiestnené vo zverinci. V priestoroch zverinca zotrávajú v 1-2 mesačnom monitorovacom období, ktoré zahŕňa regeneračný proces traumou poranenej miechy. Monitorovacie obdobie začína dňom navodenia traumatického poranenia. Na základe našich skúseností s týmto kompresným modelom v predchádzajúcom projekte, zvieratá napriek paraplégii po zotavení z anestézy sú schopné pohybu v klietke za pomoci predných labiek. Keďže zvieratá prvé dva dni nie sú schopné prijímať vodu a potravu zo zásobníka, malé kúsky štandardnej potravy budú umiestnené priamo v klietke a zvieratá napájané vodou pomocou striekačky. Takýto stav trvá maximálne 2 dni. Podľa našich skúseností, umiestnenie potravy v blízkosti zvieraťa je dostatočné pre prijatie potravy. Zvieratám bude kontrolovaná váha v prvý týždeň denne, neskôr každé 2-3 dni. Prijem vody u zvieraťa bude monitorovaný na základe spotreby vody v napájacej fľaši, plnosti močového mechúra a prítomnosti moču. Prijem potravy bude monitorovaný na základe spotreby štandardizovanej peletovej stravy a prítomnosti stolice. Celkový stav zvierat bude po postupe každodenne pozorovaný, a v prípade potreby sa im budú podávať analgetiká. Prenášanie alebo zdvíhanie zvierat po traume miechy bude prevádzané chytaním celého zvieraťa z dorzálnnej strany s prekríženými prednými labkami v blízkosti tela manipulujúcej osoby, a nie pomocou chvosta. V prípade dysfunkcie močového mechúra bude robené jeho manuálne vyprázdňovanie. Po vyprázdnení bude abdominálna časť zvieraťa umytá vlažnou vodou, osušená gázou a zviera umiestnené naspäť v klietke. Keďže obohatené prostredie znižuje stres a prispieva k lepšej regenerácii budú do kliebok umiestnené krátke plastové rúry a/alebo kartónové krabice poskytujúce pocit bezpečia potrebné pre zvieratá po náročnom zákroku. V prípade neočakávaných nezvratných komplikácií bude zviera utratené vysokou dávkou Thiopentalu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

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

Názov projektu: Epigenetické a molekulárne mechanizmy neuroprotektie a ischemickej tolerancie

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2854/16-221

Kľúčové slová: experimental ischemia, alternative methodology, animal model, four vessel occlusion

Účel projektu: základný výskum

Informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, o počte a typoch zvierat, ktoré sa použijú

Ciele projektu:

Cieľom projektu je metabolická a proteomická profilácia a určenie posttranslačných zmien proteínov v cieľovej štruktúre tkanive CNS ako aj endogénnych intracelulárnych dráh v korelácii s morfológickým poškodením/protekciami na modeli ischemického infarktu a vyvolania ischemickej tolerancie. Zmeny epigeneticky riadených procesov (metylácia DNA, modifikácia histónov, hladiny mikroRNA), expresie génov a proteínov (translačná úroveň a posttranslačné modifikácie) v tkanive a plazme regulujúcich bunkovú viabilitu ako aj metabolický profil zvolených štruktúr, budú korelované so stupňom morfológického poškodenia/protektie a behaviorálnymi testami.

Analýza účinku toxikantov a protektantov v IT procese s využitím epigenetických, proteomických, metabolických a morfológických analýz. Vzťah metabolizmu amyloidného prekursorového proteínu (APP) s procesom IT.

Predpokladaný prínos projektu:

Epigenetický výskum, ktorý na modeli ischemického infarktu a vyvolania ischemickej tolerancie študuje vplyv toxikantov na tento fenomén. Rozvoj a vybudovanie endogénnej neuroprotektie (tolerancie) má veľký klinický význam, úloha rizikových faktorov (toxikantov) nie je dostatočne pochopená. Nové poznatky budú získané kombináciou molekulárno-biologických a biochemických metód, epigenetickej, proteomickej a imunohistologickej, biochemickej analýzy a hlavným prínosom je:

a) popísať epigenetické a bunkové mechanizmy ischemickej tolerancie (IT) vyvolané pre- a postkondíciou

b) ako toxikanty (klinicky poznané rizikové faktory) vplyvajú na vybudovanie IT, ktoré potenciálne môžu viesť k ochrane, resp. oddialeniu dysfunkcie a smrti neurónov. Metabolické zmeny z NMR a histologická analýza degeneratívnych apoptotických/ regeneratívnych procesov sa budú korelovať so schopnosťou učenia na Morrisovom vodnom bludisku a biologickými markermi v plazme.

Akútny ischemický infarkt zasahuje vitálne bunkové štruktúry v mieste poškodenia, chceme prispieť k poznaniu:

- i) zmien epigeneticky riadených procesov (metylácia DNA, modifikácia histónov hladiny mikroRNA) a
- ii) proteínov (translačná úroveň a posttranslačné modifikácie) tkanive a plazme, regulujúcich bunkovú viabilitu v cieľovej štruktúre tkanive CNS
- iii) ako aj endogénnych intracelulárnych dráh v korelácii s morfológickým poškodením/protekciami a
- iv) metabolické zmeny v organizme

Kľúčovú úlohu v procese IT majú zmeny prenosu signálov a génovej expresie, resp. epigenetickej regulácie ako aj schopnosť regulácie bioenergetického a proteomického aparátu neurónov spolu so vzájomným vzťahom neurónov a iných neurálnych buniek. Literárne údaje potvrdzujú, že zmeny expresie génov citlivých jednak na redoxný stav a taktiež vitálnych génov signálnych dráh reagujúcich na metabolický stres sú významne epigeneticky regulované a sú súčasťou mechanizmu IT. Kauzálne ischemické vzťahy medzi dostupnosťou kyslíka, redoxným stavom, zmenou signálnych dráh vo vybudovaní IT a jej ovplyvnení však nie sú presne preskúmané.

V poslednej dobe sa popisuje významná úloha epigenetickej regulácie v mechanizme IT. Epigeneticke reprogramovanie predstavuje zvýšenie vnútorného potenciálu mozgu moduláciou patologickej neurálnej génovej expresie, jej úloha je však nedostatočne poznaná. Veľkým metodologickým prínosom je využitie proteomických metód pre štúdium profilácie regulačných produktov génovej expresie a vysokorozlíšenej NMR pre štúdium metabolomických zmien.

1. Základným parametrom bude identifikácia populácie neurónov, resp. neurálnych buniek, u ktorých dochádza k neurodegeneratívnym/neuroregeneratívnym zmenám sledovaná histologicky. Kvantifikácia infarktového objemu pomocou farbenia s trifenyltetrazóliom, analýza obsahu vody (edému), resp. zistenia narušenia hematoencefalickej bariéry farbením s Evansovou modrou. Ďalším krokom je in situ sledovanie degeneratívnych a apoptotických zmien pomocou Fluorojade a TUNEL a kvantifikácia počtu prežívajúcich neurónov pomocou NeuN farbenia a analýza markerov, ktoré sú súčasťou: a) skorej odpovede tkaniva, resp. b) sú súčasťou oneskorenej smrti neurónov.

2. Na integrálnej úrovni organizmu sa miera poškodenia/ochrany funkcie neuronálnych spojov bude sledovať schopnosťou učenia pomocou Morrisovho vodného bludiska (behaviorálne testy) s cieľom získania informácie o poškodení

3. Z pohľadu klinického využitia a verifikácie najnovšej hypotézy o krvnej ceste tolerancie (Neurol. Res, 2015) bude sledovanie profilácie proteínov a posttranslačných markerov v plazme, ako potenciálne využiteľné pre spoluurčenie korelácie medzi stavom poškodenia nervového tkaniva, vybudovanej IT a jej odrazom v profile plazmy

4. Použitím postupov vedúcich k IT: a) rôznej doby preischémie b) rôznej doby postischémie a kombinácie týchto postupov s klinicky identifikovanými toxikantami (homocysteín), resp. neuroprotektívnymi farmakami korelovať stupeň neuroprotektie s expresiou génov/proteínov indukovaných IT a tým prispieť k pochopeniu lokalizácie, časovania a usmernenia neuroprotektívneho procesu

5. Určením:

i) epigenetických regulačných zmien (metylácia DNA, modifikácia histónov), sledovaním expresie mikroRNA) v tkanive CNS ako aj v krvi

ii) génovej expresie (RT-PCR)

iii) translačných produktov bielkovín (metódami RT-PCR a Western blotu, Antigénový microarray), ktoré sú ovplyvnené procesom ischémie a IT (sú regulované hypoxiou, redoxným stavom, metabolickým stresom), analýzou ich časovej závislosti a lokalizácie vo vulnerabilných štruktúrach mozgu (metódou imunohistologickej analýzy,) a porovnaním s vplyvom toxikantov, resp. farmák na tento proces by sme chceli prispieť k objasneniu vzťahu medzi epigenetickým reprogramovaním, zmenenou génovou expresiou, subbunkovými organelami, ich signalizáciou a biologickou odpoveďou buniek na proces ochrany/tolerancie.

6. Popis molekulárnych mechanizmov doplníme analýzou metabolizmu amyloidného prekursorového proteínu (APP) v procese IT. Prispejeme tým k pochopeniu mechanizmov vedúcich k ischemickej tolerancii a vzťahu ischemického poškodenia, IT a metabolizmu APP, (etiopatogenetickej jednotky vedúcej k rozvoju Alzheimerovej choroby).

7. Sledovaním zmien metabolomického profilu v organizme monitorovať vplyv ischemicko-reperfúzneho poškodenia na metabolomické dráhy.

Predpokladaná ujmá:

V projekte sa očakávajú morfológické a funkčné zmeny vyvolané aplikáciou toxikantu a operačným zákrokom spojeným s cerebrálnou ischémiou. Po opakovanej subkutánnej aplikácii neurotoxikantu homocysteínu sa môžu u niektorých zvierat objaviť na koži malé chrastičky, ktoré sa

po niekoľkých dňoch vysušia a odpadnú. Hyperhomocysteinémia je spojená s rozvojom aterosklerotických zmien a mohla by vystupovať ako nezávislý rizikový faktor ischemického ataku.

Zvieratá si rýchlo zvyknú aj na plávacie testy, ktoré sa časovo limitujú, aby sa zvieratá nevyčerpal. Skúsenosti z našich predchádzajúcich štúdií a taktiež výsledky zahraničných vedeckých tímov uvádzajú výraznejšie biochemické a histopatologické zmeny v nervovom tkanive mozgu po ischemických operačných krokoch a reperfúzii. Zvieratá prejavujú známky neurologického poškodenia – malátnosť, napoly privreté viečko, spomalený pohyb, znížený príjem potravy, ktoré sa väčšinou po 2-3 dňoch upravujú. Predpokladáme aj kognitívne zmeny (poškodenie krátkodobej a dlhodobej pamäte). Indukciou IT by sme chceli navodiť endogénne vybudované neuroregeneratívne procesy na zmiernenie dopadu globálnej cerebrálnej ischemie na organizmus.

Štúdium a pochopenie vzťahov vybudovania IT predstavuje väčší predpokladaný prínos projektu ako spôsobená ujma na zvieratách.

Počet a druh zvierat:

V projekte použijeme dospelé samce laboratórnych potkanov kmeňa Wistar v celkovom počte 350 jedincov

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná úroveň krutosti podľa klasifikácie krutosti postupov

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Nahradenie (Replacement):

Na sledovanie komplexného účinku ischemicko-reperfúzneho poškodenia neexistuje alternatívna metóda, ktorá by buď na izolovaných bunkových líniiach, tkanivových kultúrach, či postupoch *in vitro* dokonale modelovala súbor procesov a mechanizmov súvisiacich s ischemicko-reperfúznym poškodením, ischemickou toleranciou (preischemiou), či neuroprotekciou, ako použitie živých zvierat.

Objasnenie, prečo niektoré typy buniek hynú v skorom časovom intervale po ischemickom inzulte, resp. zistenie mechanizmov obranných procesov bunky voči tejto noxe sa nemôže vykonávať v experimentálnych podmienkach bez využitia celostného prístupu, t.j. na experimentálnych zvieratách. Dôvodom je vysoká komplexnosť procesov, kooperácia rôznych typov buniek, ako aj celková odpoveď organizmu na poškodzujúci podnet. Postupy sú použiteľné pri modelovaní efektorov cieľových bunkových signálov, ktoré sa javia byť rovnaké ako u zvierat, tak aj v humánnej medicíne.

Zníženie (Reduction):

Postup je naplánovaný tak, aby bol použitý čo najmenší počet zvierat, aby sme zabezpečili validitu a reprodukovateľnosť výsledkov. Menší počet zvierat by mohol ovplyvniť objektívne zhodnotenie výsledkov celého projektu.

Zjemnenie (Refinement):

Hlodavčie modely poškodenia a protekcie CNS sú z hľadiska fyziológie, etiopatogenézy najvhodnejšími modelmi. V našom projekte použijeme najnižší vhodný modelový živočíšny druh – potkana laboratórneho.

Zvieratá budú ošetrované skúsenými zaškolenými pracovníkmi a budú pod neustálym dohľadom veterinárneho lekára. Pri injekčnej aplikácii sa so zvieratami bude zaobchádzať šetrne a ohľaduplne, aby si zvieratá zvykli na manipuláciu a minimalizoval sa stres. Zvieratá si rýchlo zvyknú aj na plávacie testy, ktoré sa časovo limitujú, aby sa zvieratá nevyčerpal. Operačné zákroky na zvieratách budú vykonávané v celkovej inhalačnej anestézii a po skončení anestézie pri prežívaní – období reperfúzie, bude zvieratám venovaná zvýšená starostlivosť vyšskoleného personálu. V prípade výskytu bolestivých stavov sa zvieratám podá analgetikum. Usmrtenie zvierat bude prebiehať bezbolestne pod vplyvom celkovej inhalačnej anestézie.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

PRÍLOHA 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Biologicky aktívne látky v liečbe depresie

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2866/16-ZE1

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): depresia, depresii podobné stavy, potkany kmeňa Wistar, prírodné látky

Účel projektu: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

V súčasnosti sú depresívne ochorenia na štvrtej priečke civilizačných ochorení. Kvôli neustálemu stresu a nevyváženému životnému štýlu mladej a strednej generácie sa predpokladá, že o niekoľko rokov budú po rakovine druhou najčastejšie sa vyskytujúcou chorobou. Poruchy nálad postihujú už takmer 10% svetovej populácie. Napriek rozširujúcim sa možnostiam modernej farmakoterapie problémom ostáva nedostatočná účinnosť súčasnej liečby depresívnych stavov. Približne u 30 % pacientov v akútnej fáze ochorenia a u 20 % pacientov v dlhodobej liečbe sa ústup príznakov nedosiahne. Klinické štúdie poukazujú na nižšiu účinnosť antidepresív u ťažkých depresí (35 - 40 %) a vysokú mieru reaktivity na placebo u miernych a ľahkých depresí (až 30 %).

Cieľom tohto projektu je stanoviť účinky biologicky aktívnych látok v depresívnych ochoreniach na animálnom modeli, ktorý je unikátnym v komplexných odpovediach organizmu na vonkajšie, ale i vnútorné stimuly. Prírodné látky na rozdiel od syntetických nemajú toľko vedľajších účinkov a v rôznych štúdiách sa dokonca potvrdilo, že pridaním prírodnej látky k liečbe syntetickou látkou sú eliminované vedľajšie účinky syntetického liečiva. Zároveň sa pôsobením dvoch látok tou istou molekulárnou dráhou zabezpečí využitie syntetickej látky v nižších koncentráciách.

Prínos z vykonaného projektu

V súčasnosti stále pretrváva nedostatok klinických štúdií, zaoberajúcich sa využitím prírodných látok v depresívnych ochoreniach a preto je tento fakt v centre záujmu vedeckej, ale i laickej komunity. Na ovplyvnenie a liečbu depresívnych ochorení sa v súčasnosti aplikujú výhradne antidepresíva. Liečivá tejto skupiny však majú príliš veľa vedľajších účinkov. Jedným z najzávažnejších nežiaducich príznakov je kontroverzne zvýšenie pocitu beznádeje s následnými samovraždennými sklonmi. Medzi ďalšie závažné negatívne účinky sa radia pokles krvného tlaku, srdcovo-cievne poruchy, srdcová arytmia, poruchy pamäte či poškodenie mozgu. Preto by mala spoločnosť viac uprednostňovať prírodné látky, ktoré nemajú pri stanovených účinných dávkach vedľajšie účinky a potenciálne by mohli byť doplnením liečby zaužívanými antidepresívami. V prípade ľahkých stavov by dokonca mohli predstavovať alternatívu štandardnej liečby. Okrem toho prírodné látky v kombinácii so syntetickými umožňujú príjem nižších dávok oboch používaných substancií. Výsledky nášho projektu budú slúžiť ako podklad pre klinickú prax a zároveň obohatia doterajšie poznatky v tejto problematike.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan laboratórny, kmeň Wistar, parentálna generácia samce (6ks) a samice (10ks)

Potkan laboratórny, kmeň Wistar, potomstvo samce (cca. 120ks) a samice (cca. 120ks)

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

V rámci projektu zvieratám spôsobíme krátkodobý imobilizačný stres na vyvolanie depresii podobných stavov, ktorý môže zvieratám vyvolať nepriaznivú ujmu. Imobilizačný stres podľa dostupnej vedeckej literatúry spôsobí zvieratám úzkosť a depresii podobné stavy, ktoré je možné ovplyvňovať prírodnými látkami. Imobilizácia je realizovaná vložением zvierat'a do imobilizačného boxu - plastického valca o priemere 8cm a dĺžke 18cm, kde bude mať zviera značne obmedzenú (nie však úplne zamedzenú) možnosť pohybu.

Na sledovanie zmien v správaní sa využívajú behaviorálne testy, ktoré zvieratám spôsobia mierny diskomfort. Zvieratá sa budú pred samotným testovaním hodinu habituovať na experimentálnu miestnosť. Každé zviera sa bude testovať jednotlivo. Testované zviera bude bezprostredne po ukončení testovania preložené do domovskej klieťky.

Na testovanie úzkosti sa využije test vyvýšeného krížového labyrintu:

Vyvýšený krížový labyrint: zviera sa položí do stredu labyrintu v podobe kríža. V teste v trvaní 5 minút sa sleduje, aký čas strávi zviera v zakrytých a aký čas v otvorených ramenách, počet prechodov cez stred labyrintu, vztyčovanie na zadné končatiny a ďalšie formy správania. Slúži na posúdenie emocionálneho stavu zvierat'a.

Kognitívne funkcie mozgu zvierat budeme sledovať v teste Morisovho vodného bazéna.

Morrisov vodný bazén: zviera je vložené do kruhového bazénu naplneného teplou vodou (25°C). Na dne bazéna je umiestnená priesvitná platforma, ktorú sa má zviera naučiť nájsť. Aby sa zabránilo orientácii zrakom, voda je zafarbená pridaním sušeného mlieka. Pokiaľ zviera nenájde platformu 60 sekúnd, je na ňu položené a ponechané na ňom na 20 sekúnd. Potom sa zviera vyberie z bazéna a po vysušení srsti teplým vzduchom sa vloží späť do klieťky. Test sa bude opakovať trikrát po uplynutí troch hodín (krátkodobá pamäť) a potom o 8 dní jedenkrát (dlhodobá pamäť).

Test otvoreného poľa: zviera sa vloží do ohradeného štvorcového priestoru a sleduje sa správanie zvierat'a počas 8 minút (záznam videokamerou). Zo záznamu sa pomocou počítačového softwaru Smart Junior zistí zastúpenie rôznych druhov správania počas testu.

Látky, ktoré budeme perorálne podávať, môžu počas podávania spôsobiť mierny stres a diskomfort. Dané prírodné látky nemajú známe vedľajšie účinky a ich podávanie by nemalo spôsobiť žiadny nepriaznivý vplyv. Ak by nastalo zhoršenie zdravotného stavu zvierat'a, vedúci projektu rozhodne o jeho preložení do osobitnej klieťky s intenzívnou zabezpečenou kontrolou, prípadne o jeho smrti humánnym spôsobom (predávkovaním anestetikom). Za súlad vykonávaného projektu je zodpovedný vedúci projektu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Kategória krutosti:

parentálna generácia: samce – slabá (oddiel III, bod 1), samice – stredná až krutá (oddiel III, bod 2)

potomstvo F1: stredná až krutá (podľa oddielu III, body 2-3)

Uplatňovanie zásad 3R

Predkladaný projekt je v súlade so zásadami 3R:

Zásada nahraditeľnosti:

Depresívne ochorenia sa za posledné desaťročia týkajú čoraz väčšieho počtu ľudí rôzneho veku a je pravdepodobné, že sa čoskoro dostanú medzi najčastejšie civilizačné ochorenia. Ovplyvňujú kvalitu života pacientov a preto je potrebné sústrediť sa na mechanizmy, ktorými by bolo možné utlmiť príznaky tohto ochorenia, prípadne ich úplne zvrátiť. Vzhľadom na charakter pokusu je nevyhnutné, aby bol projekt vykonaný v podmienkach *in vivo*, ktoré tvoria systém dejov a odpovedí na stimuly z vonkajšieho a vnútorného prostredia. *In vitro* podmienky nikdy nevystihnú takú komplexnosť stimulov a dejov, ako je to v živom organizme, a navyše doteraz nie sú známe bunkové línie, izolované z depresívnych pacientov. *In vivo* pokusy tvoria neodmysliteľný stupeň v predklinickom výskume. Projekt je zároveň naplánovaný tak, aby výsledky z neho mohli prejsť priamo do klinickej praxe. Potkany využité v postupe sa navyše budú testovať na zmeny správania, majúce vzťah so symptómami depresívnych ochorení človeka. Pre tento typ pokusov sa podľa literárnych údajov najviac hodia laboratórne potkany, ktoré disponujú dostatočným spektrom vrodených druhov správania a sú schopné taktiež pomerne zložitých foriem naučeného správania (napr. zapamätanie si určitého priestorového usporiadania alebo situácie s nadväznosťou na kladný alebo záporný emočný obsah a pod.).

Zásada zníženia:

Plánovaný postup je zostavený tak, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov použitých čo najmenej zvierat a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého použitého pokusného zvieratá. Zároveň sa dbá o to, aby bola minimalizovaná bolesť alebo stres použitých pokusných zvierat a aby bol zabezpečený primeraný welfare od ich privezenia až po smrť.

Zásada zdokonalenia (zjemnenia):

Počas postupu bude zabezpečená komplexná starostlivosť o zvieratá. Bežnú starostlivosť o zvieratá budú zabezpečovať laborantky, ktoré sú príslušne školené a poučené. Všeobecne sa dá konštatovať, že uvedené experimentálne postupy nespôsobia neprimeraný diskomfort pokusných zvierat a že ide o štandardné typy pokusov (bežne používané v špičkových vedeckých pracoviskách) v súlade s etickými požiadavkami. Ak by nastalo zhoršenie zdravotného stavu zvieratá, vedúci projektu rozhodne o jeho preložení do osobitnej kletky s intenzívnou zabezpečenou kontrolou, prípadne o jeho smrti humánnym spôsobom (predávkovaním anestetikom). Za súlad vykonávaného projektu je zodpovedný vedúci projektu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: **áno, do 3 mesiacov od ukončenia projektu tzn. do 31.03.2019 bude vykonané spätné posúdenie projektu ŠVPS SR**

NÁZOV PROJEKTU

VPLYV CHEMOTERAPEUTICKEJ LIEČBY POUŽITEJ PRI RAKOVINE SEMENNÍKOV
NA POPIS BEHAVIORÁLNYCH A SEXUÁLNYCH FUNKCIÍ

377/2012 Z.z. NARIADENIE VLÁDY Slovenskej republiky

3033/16-221

§ 40 Netechnické zhrnutie projektu

CIEĽ PROJEKTU

Cieľom projektu je popísať vplyv chemoterapeutík na správanie a sexuálne funkcie experimentálnych zvierat, čo má význam nielen z hľadiska možného odhalenia príčin a potenciálnych negatívnych účinkov chemoterapeutík u pacientov s nádorom semenníkov, ale môže pomôcť odhaliť dôležité rozdiely medzi experimentálnymi zvieratami a ľuďmi, čo umožní lepšie modelovať poruchy správania ľudí na zvieratách. Klinických štúdií, sledujúcich vplyv chemoterapeutík na správanie pacientov, je v dostupnej vedeckej literatúre málo, hoci majú nesporný význam pre pochopenie biologickej podstaty terapeutického i vedľajšieho účinku protinádorových liekov. Výskum na humánnej úrovni naráža na výrazné etické problémy, preto náš projekt bude realizovaný na experimentálnych zvieratách. V animálnych experimentoch budeme sledovať účinok kombinácie chemoterapeutík na správanie hemikastrovaných myší. V projekte budeme používať viaceré metodické postupy na sledovanie jednotlivých foriem správania (sexuálne správanie, úzkosť, depresia, lokomotorická aktivita a pod.). Budeme kombinovať jednotlivé faktory takým spôsobom, ako sa to deje priamo u pacientov s rakovinou semenníkov, 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.

SÚLAD ZÁSAD 3R

Pri práci so zvieratami budú dodržané všetky predpísané predpisy pre chov a zaobchádzanie s laboratórnymi zvieratami podľa zásad 3 R.

REPLACEMENT

Pretože v plánovaných experimentoch sa budú hodnotiť zmeny správania a následky chemoterapeutických intervencií, je nevyhnutné, aby sa experiment vykonal „*in vivo*“ na celom

zvierati. Využitie bunkových kultúr alebo počítačových simulácií neprichádza pri tomto type experimentu do úvahy ako alternatívny spôsob výskumného prístupu.

Plánovaný experiment je zostavený tak, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov použitých čo najmenej zvierat, avšak pri zachovaní štatistickej spracovateľnosti a najmä relevantnosti. Zároveň sa snažíme aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého použitého pokusného zvieratá. Postupy budú vykonávať iba dostatočne vyškolené a zacvičené osoby, čím sa výrazne zníži možná chybovosť výsledkov a nutnosť opakovania postupu. Počet použitých zvierat bol stanovený tak, aby bola zachovaná reprodukovateľnosť a validita pokusov. Na druhej strane, počet jedincov, ktorý je plánovaný je dostatočný, aby dal jasnú odpoveď na položenú vedeckú otázku, kedy nebude potrebné ďalej experimenty opakovať inými výskumnými tímami. Podobne bude v experimente použitý rovnaký počet kontrolných zvierat. Táto varianta využije najmenej zvierat. Pre zachovanie štatistickej sily, zníženie kontrolnej skupiny vedie k zvýšeniu experimentálnej skupiny. Pomer kontrolné:experimentálne zviera 1:1 je preto najvhodnejší v zmysle najmenšieho počtu zvierat. Vzhľadom na väčší počet zvierat, zvieratá budú objednávané na etapy v 5 týždňových odstupoch. V experimentoch sa použijú geneticky homogénne rovnaké skupiny zvierat od jedného dodávateľa.

REFINEMENT

Zvieratá budú počas pokusov kontinuálne sledované a výsledky priebežne vyhodnocované a v prípade zistenia nevhodných prípadne neočakávaných udalostí bude experiment ukončený. Denným sledovaním zdravotného stavu zvierat dochádza k jemnej manipulácii so zvieratami a kontaktu s tými istými osobami, čím sa maximálne eliminuje stres zvierat v rámci tzv. handlingu. Súčasťou procesu zjemnenia bude aj minimalizácia možného strádania a utrpenia zvierat, a to dodržiavaním piatich slobôd (sloboda od smädu- á 2 dni výmena vody za čerstvú, hladu a podvýživy – nerušený ku krmivu, ktoré sa dopĺňa dľa potreby, sloboda od nepohodlia – poskytnutím zodpovedajúceho prostredia s pilinami vrátane úkrytu (toaletová rolka, hračky) a pohodlného miesta k odpočinku; sloboda od bolesti, zranenia a chorôb – jednak denným sledovaním a podávaním analgetík pri potenciálne bolestivých výkonoch, prípadne anestézia, sloboda od strachu a úzkosti – poskytnutím vhodného prostredia a spoločnosti zvierat rovnakého druhu; sloboda realizovať normálne správanie – zaistením takého prostredia a zachádzania, pri ktorom bude vylúčené mentálne strádanie, zvieratá budú v kletke viaceré po 5, v priehľadných vianiciach, bez akustickej a čuchovej izolácie

s ostatnými zvieratami v miestnosti). Keďže v rámci experimentov je plánovaná operácia (hemikastrácia/sham), táto bude vykonávaná v celkovej anestézii ketamin/xylazín. Ketamín okrem anestetického účinku má aj analgetické účinky, ktoré budú ďalej umocnené analgetikom Ketoprofenom v dávke 5mg/kg s.c., ktorý bude podaný ku koncu operačného zákroku. Následne každých 24h sa podá rovnaká dávka ešte 2x (2 dni), dľa protokolu a odporúčaní (<http://www.iacuc.ucsf.edu/Proc/awMouseFrm.asp>). Zvieratá po zákroku budú po prebratí sa umiestnené do domácej kliecky spolu s ostatnými v ten deň operovanými a prebratými zvieratami. Do prebratia budú zvieratá aktívne otepľované, pričom určený pracovník ich bude kontinuálne monitorovať v prebúdzacej kliecke. Na zabránenie vytrhávania stehov použijeme alkohol (Spitaderm), ktorým budeme rany dezinfikovať á 24h, čím budeme zároveň brániť vzniku lokálneho zápalu. Zo skúseností vieme, že takto ošetrované zvieratá si stehy netrhajú a nehryzú, keďže tento alkohol má trpkú chuť a ľuďom ani zvieratám nechutí. Alternatívou k stehom sú klipy, ktoré môžeme tiež použiť, ak SVPS SR túto možnosť povolí. Napriek tomu, že zvieratá sú umiestnené v skupinách aj počas rekonvalescencie aj počas celého experimentu, sú zároveň umiestnené v priehľadných vaniciach, čo minimalizuje ich sociálny deficit. Stehy budú vybraté o cca. 7-10 dní, a keďže predpokladáme 2 stehy/klipy na zviera, zákrok trvá asi 10s. Zviera na tento čas uspíme Isofluranom. Samotné vyberanie stehov je nebolestivé, keďže sa živé tkanivo nereže ani nestrihá, strihajú sa stehy/niť, prípadne pri klipoch sa použije odklipovač. Behaviorálne testy, ktoré sa plánujú ako i umiestnenie do metabolických kliecok plánujeme zjemniť najmä šetrnou manipuláciou, privyknutím si na miestnosť, kde sa budú experimenty vykonávať a tiež každodenným handlingom tými istými ľuďmi, aby si zvieratá zvykli na manipuláciu. Týždňový oddych medzi behaviorálnymi experimentami je dostatočný vzhľadom na zaťaženie v rámci jednotlivých behaviorálnych testov. V metabolických klieckach budú zvieratá umiestnené síce osve, ale samotná kliecka je priehľadná, takže zviera bude mať kontakt vizuálny ale aj pachový a sluchový s ostatnými zvieratami miestnosti.

OČAKÁVANÁ UJMA A PRÍNOS

V dostupnej odbornej literatúre je iba minimum experimentov zameraných na vedľajší účinok protinádorových liekov na celkové správanie ľudí. Jednou z príčin môže byť, že účinok chemoterapeutík na správanie ľudí, je značne individuálny. Pozornosť jednotlivých klinických

i animálnych štúdií sa venuje hlavne sledovaniu morfológických zmien reprodukčného systému a fertility.

Ide o jednoznačne originálny projekt, keďže zatiaľ nikto nesledoval účinok kombinácie troch najčastejšie používaných chemoterapeutík – **bleomycínu, etopozidu a cisplatínu** (BEC) na celkové/komplexné správanie samcov myší, zahŕňajúc sledovanie lokomotorickej aktivity, úzkostného, depresívneho, sexuálneho správania a kognitívnych schopností. Originalita projektu spočíva aj v tom, že zvieratá podstupujú chirurgický zákrok – hemikastráciu (úplné odstránenie jedného semenníka) z dôvodu, aby sme čo najviac napodobňovali liečbu rakoviny semenníkov u ľudí, kde odstránenie rakovinou poškodeného semenníka je prvou etapou liečby pacientov s touto chorobou. 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 slabých postupoch budú zvieratá pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach, avšak tieto úkony vo významnej miere nenarušujú pohodu ani celkový stav zvierat. Pri stredných postupoch je pravdepodobné, že v ich dôsledku budú zvieratá pociťovať krátkodobú strednú bolesť, utrpenie alebo strach, alebo dlhotrvajúcu slabú bolesť, utrpenie alebo strach, a postupy, pri ktorých je pravdepodobné, že stredne narušia pohodu alebo celkový stav zvierat.

Súhrn jednotlivých úkonov na zvieratách:

Po dovezení zvierat (dospelé samce CD-1 myši vo veku 8 týždňov) do pokusného zariadenia budú zvieratá neodkladne a bez zbytočného meškania šetrne umiestnené do čistých kliebok na to určených v **karanténnej miestnosti** na tento účel vyhradenej. Bezodkladne im bude podaná strava a dostatok tekutín obvyklým spôsobom. Zvieratá ostanú v **karanténnej miestnosti 14 dní**, čo je optimálna doba na prejav chorôb a vylúčenie väčšiny chorôb prichádzajúcich do úvahy. Po uplynutí karanténnej doby zvieratá vo vyhovujúcom stave budú zaradené do pokusu. Zvieratá sa z karanténnej miestnosti šetrne a bez zbytočných stresov premiestnia do **chovnej miestnosti**. Táto miestnosť je riadne označená na aký účel slúži a zabezpečená pred vstupom cudzích osôb.

U pacientov s nádorom semenníka je prvou etapou liečby chirurgické odstránenie nádorom postihnutého semenníka, po ktorom nasleduje chemoterapeutická liečba. Zvieratá (myši CD-1; tab 1.) budú rozdelené do dvoch skupín - **kontrolná skupina (CTRL; n = 100)** a skupina **ovplyvnená kombináciou chemoterapeutík – experimentálna skupina (BEC; n = 100)**. BEC skupina zvierat podstúpi **hemikastráciu**, aby náš zvierací model čo najviac

napodobňoval situáciu pri liečbe pacientov s rakovinou semenníka. Chirurgické odstránenie jedného semenníka (hemikastrácia) sa uskutočňuje pod vplyvom **anestézie** (ketamín 100 mg/kg a xylazín 10 mg/kg, v pomere 3:1), aplikovanej intraperitoneálne. Po chirurgickom zákroku zvieratám necháme **2 týždne na rekonvalescenciu**, počas ktorej pravidelne budeme sledovať ich zdravotný stav. Zvieratá budú mať počas celého experimentu *ad libitum* prístup k vode a k štandardnej potrave.

Tabuľka 1: POČET ZVIERAT

Súhrn použitých zvierat:

Druh/plemeno/línia	Pohlavie	Kastrácia (orchiektómia)	Skupina zvierat	Počet na skupinu za celé obdobie
Myši CD-1	Samce	Nie	Kontrolná	100
Myši CD-1	Samce	Áno	Experimentálna	100
Myši CD-1	Samice	Nie	Kontrolná	20

Tabuľka 2: Súhrn jednotlivých úkonov na zvieratách počas experimentu:

Druh/plemeno/línia	Skupina	Pohlavie	Úkon	Časové obdobie	Počet zvierat	Krutosť	
Myši CD-1	Kontrolná	Samce	1. Podávanie fyziologického roztoku 2. Hmotnosť, príjem tekutín, strava 3. Odber krvi z chvostovej žily 4. Odber moču 5. Behaviorálne testy: TOP, TNP, TRNO, F, S	1. 13x/cyklus 2. 1x týždenne 3. 2x 4. 1x mesačne 5. 1x – každý typ testu	100	1. Slabá 2. Slabá 3. Stredná 4. Slabá 5. TOP, TRNO, F, S – slabá TNP - stredná	200 samcov + 20 samíc
Myši CD-1	Experimentálna (BEC)	Samce	1. Anestéza (ketamín:xylazín) a hemikastrácia 2. Podávanie chemoterapeutík (BEC) 3. Hmotnosť, príjem tekutín, strava 4. Odber krvi z chvostovej žily 5. Odber moču 6. Behaviorálne testy: TOP, TNP, TRNO, F, S	1. 1x – 1x 2. B:3x/cyklus E:5x/cyklus C:5x/cyklus 3. 1x týždenne 4. 2x 5. 1x mesačne 6. 1x – každý typ testu	100	1. Stredná 2. Slabá 3. Slabá 4. Stredná 5. Slabá 6. TOP, TRNO, F, S – slabá TNP - stredná	
Myši CD-1	Kontrolná	Samice	Behaviorálny test: sledovanie sexuálneho správania	1 ♀ - 5x	20	Slabá	

Vysvetlenie skratiek v tabuľke:

- a. test otvoreného poľa (TOP);
- b. test núteného plávania (TNP);
- c. test rozpoznávania nového objektu (TRNO);
- d. fenotyper (F);
- e. sledovanie sexuálneho správania vo fenotyper (S).

Rozhodli sme sa, že experimentálne zvieratá budeme značiť na chvoste prostredníctvom permanentnej fixky, lebo to považujeme za menej stresujúci spôsob označovania. Na sledovanie **koncentrácie testosterónu v plazme** a na overovanie úspešnosti hemikastrácie od zvierat bude odobratá krv pred hemiskastráciou a tiež 2 týždne po chirurgickom zákroku. Krv bude odobratá aj od kontrolných zvierat. **Odber moču** budeme realizovať prostredníctvom metabolických klietok, kam vložíme zvieratá maximálne na 3 hodiny.

Na zhodnotenie **anxiety a lokomočnej aktivity** použijeme test otvoreného poľa (TOP), pri ktorom použijeme arénu s podstavou štvorca (45 x 45cm). 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.

Na zhodnotenie **depresívneho správania** použijeme test núteného plávania (TNP), pri ktorom použijeme priehľadnú vodnú nádrž kruhovej podstavy s priemerom 30cm, do dvoch tretín naplnenú vodou o teplote 24-26°C. Myš bude vložená do nádrže a ponechaná v nej po dobu 6 minút. Zaznamenávaný bude čas imobility, ktorý pozitívne koreluje s mierou depresie.

Na zhodnotenie **kognitívnych schopností** použijeme test rozpoznávania nového objektu (TRNO), ktorý sa skladá z troch fáz: habituácia, familiarizácia a testovacia fáza. Počas prvej fázy zviera exploruje otvorené pole v neprítomnosti objektov. Po uplynutí času je zviera premiestnené do domácej klietky. Počas familiarizácie je zviera umiestnené na 5 minút do otvoreného poľa, kde sú už prítomné dva objekty (A1+A2). Po čase (retenčný interval) je zviera opäť premiestnené do klietky. Po uplynutí retenčného intervalu (1 hodina), počas testovacej fázy (trvanie 5 min) je zviera vrátené do otvoreného poľa s dvomi objektmi, jeden je identický objektu z familiarizácie a druhý je nový (A3+B). Počas familiarizácie a testovacej fázy sú predmety umiestnené symetricky v protihľahlých rohoch otvoreného poľa. Pokiaľ si zvieratá známy objekt pamätajú, trávajú viac času exploriáciou nového objektu. Sledovanými parametrami budú doba kontaktu a počet kontaktov s objektmi.

V rámci projektu plánujeme aj **behaviorálny test** v tzv. **fenotyper (F)**, ktorý 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 a pitnú vodu *ad libitum*. 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 kliecky zvieratá. Tiež, fenotypery sa nachádzajú v miestnosti, kde sú domáce kliecky, 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 12-24 hodín. Pozorovanými parametrami sú celková prejdená vzdialenosť, priemerná rýchlosť pohybu a 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 na <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 kliecky vyše 40tisíc eur), preto 5-minútové behaviorálne testovania by sme tiež radi realizovali, ako štandardnú a vo svete predsa len rozšírenejšiu metódu.

Na sledovanie **sexuálneho správania** (S) myši by sme použili fenotyperové kliecky. Tým, že v tých klieckach by bola sledovaná ich celodenná aktivita, sledovanie sexuálneho správania by nebolo ovplyvnené stresom z nového prostredia. V čase testovania by sme vložili testovaného samca do fenotyperovej kliecky a po 5 min by sme vložili sexuálne receptívnu samicu k nemu. Doba trvania testu by bola 30 min, počas ktorej by sme sledovali prejavy sexuálneho správania iniciované testovaným samcom: latencia a frekvencia očuchávania anogenitálnej oblasti, tzv. mounting-u (lezenie), intromisií a ejakulácií.

Príslušné zvieratá počas experimentu budú vystavené účinku kombinácie troch chemoterapeutík: bleomycínu, etopozidu a cisplatínu (BEC) podávaných intraperitoneálne v určitých časových intervaloch (viď. tabuľku).

Spôsob podávania chemoterapeutík:

Aplikovaná látka	Dávka	Spôsob podávania	Čas podávania	Interval podávania
Bleomycín	0,75 mg/kg	intraperitoneálny	3cykly; 1 cyklus = 21 dní	na 2., 9., a 16. deň od začatia cyklu

Etoposid	7,5 mg/kg	intraperitoneálny		od 1. až do 5. dňa cyklu
Cisplatin	1,5 mg/kg	intraperitoneálny		od 1. až do 5. dňa cyklu

Jeden z parametrov, ktorý sa bude sledovať je aj **prežívanie**. Ak majú mať chemoterapeutiká negatívny vplyv na zdravie a správanie, môžu zvýšiť mortalitu zvierat. Tú síce nepredpokladáme (keďže plánujeme podávať 0,5-násobnú dávku originálnej dávky u ľudí), ale sledovať mortalitu budeme. Ak by bola výrazne vyššia (nad 5%) ako u kontrolných zvierat, experiment ukončíme.

SPÄTNÉ POSÚDENIE

Nepredpokladáme, že projekt bude podliehať spätnému posúdeniu.