

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Molekulárno-farmakologické prístupy k inovatívnej terapii reumatoidnej artritídy hodnotenej v experimentálnych podmienkach in vivo a in vitro

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3146/16-221/3
evidenčné číslo projektu APVV-15-0308

a) Ciele projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, počte a typoch zvierat

Ťažiskom projektu bude štúdium terapeutického potenciálu vybraných látok pre terapiu reumatoidnej artritídy (RA), a to najmä pre kombinovanú terapiu s metotrexátom. Hodnotiť sa budú: nízkomolekulové prírodné a syntetické zlúčeniny a ich deriváty (glutatión, mezo-2,3-sulfhydryljantárová kyselina, N-butyldexoyjirimycín); imunomodulátory bakteriálneho pôvodu (rôzne probiotické kmene sp. *Lactobacillus*); zlúčeniny rastlinného pôvodu izolované z rastlín, ich deriváty a komplexy (astaxantín, komplex kvercetín-fosfatidylcholín (fytosóm), kyselina karnozová, karnozol, sulforafán, diplakon, glabridín, ginkolidy, bilobalid, feruloylaldehyd a mono- a digalaktozyldiacylglycerol, epigalokatechín galát, kyselina galová, chinová a elagová, fatsiflogín, robinín) a im prislúchajúce štandardizované extrakty; polysacharidy s rôznou molekulovou hmotnosťou a ich deriváty (chitosan-glukán a chitosan izolované z mycélia plesní *Schizophyllum commune* a ich deriváty, hyaluronan sodný bakteriálneho pôvodu).

Použije sa model adjuvantnej artritídy (AA) indukovanej u potkanov kmeňa Lewis. Rozvoj AA a jeho farmakologické ovplyvnenie sa bude charakterizovať parametrami opisujúcimi imunologické, oxidačné a zápalové procesy. Hodnotené látky sa budú aplikovať v usporiadaní preventívne-terapeutickom a terapeutickom.

Subchronický model AA sa doplní aj akútnym modelom karagenínom indukovaného zápalu. Účinnosť vybraných látok sa overí v závere projektu aj na modeli kolagénom typu 2 indukovanej artritíde. Hodnotenie látok in vivo budú dopĺňať experimenty na chemických systémoch a bunkových kultúrach, pomocou ktorých sa bude analyzovať molekulárny mechanizmus efektu študovaných látok. Predmetom výskumu bude aj hodnotenie kardiovaskulárnych komplikácií sprevádzajúcich artritídu na modeli izolovaného srdca v podmienkach ischemicko-reperfúzneho poškodenia.

Metódy použité v projekte umožnia detailnejšie pochopiť súvislosti medzi zápalovými a imunologickými procesmi, ako aj oxidačným stresom v artritických ochoreniach. Široký výber metód na stanovenie parametrov (klinických, zápalových, imunologických a biochemických), ktoré sú reprodukovateľné a stabilne zavedené umožnia podrobne monitorovať priebeh AA u potkanov a sledovať účinnosť hodnotených testovaných látok. Použijú sa metódy hodnotenia funkčnosti fagocytov v plnej krvi i tkanivách metódou chemiluminiscencie, funkčných parametrov izolovaného srdca v podmienkach ischemicko-reperfúzneho poškodenia. V projekte sa zároveň budú aplikovať zavedené štandardné techniky laboratórií bunkových kultúr. V poslednom roku riešenia projektu sa použije aj model kolagénom typu II vyvolanej artritídy (KIA) s veľmi podobným priebehom ochorenia ako u ľudí.

V projekte sa získajú informácie o terapeutickom potenciáli látok s imunomodulačnými a antioxidačnými vlastnosťami pre terapiu RA a to najmä kombinovanú terapiu s MTX. Ďalej sa budú sledovať mechanizmy pôsobenia skúmaných látok regulujúcich redoxnú rovnováhu organizmu v biochemických a imunologických procesoch sprevádzajúcich artritídu na intra- aj extra-celulárnej úrovni. Na úrovni expresie dôležitých transkripčných faktorov zapojených do regulácie zápalu (NF-kappa B) a redoxnej rovnováhy (Nrf2) sa objasnia ich vzájomné prepojenie v regulácii patogenézy chronických zápalových ochorení. Použije sa aj kvantitatívna RT-PCR, ktorá umožní kvantifikovať expresiu mRNA génov Nrf2, NF-kappa B, ako aj dôležitých zápalových mediátorov - TNF-alfa, IL-1beta a indukovateľnej NO syntázy (iNOS). Na molekulárnej úrovni sa bude sledovať expresia spomenutých transkripčných faktorov vo vybraných tkanivách a meraním biochemických markerov oxidačného stresu sa rozlíši, či je pôsobenie vybraných látok priamo antioxidačné (oxidačno-redukčné reakcie) alebo nepriamo antioxidačné (zvýšenie antioxidačnej ochrany prostredníctvom Nrf2 alebo znížením expresie NF-kappa B), prípadne je ich kombináciou. Bude sa študovať dysbalancia metabolizmu lipidov meraním expresie a aktivity butyrylcholinesterázy a expresie PPAR γ transkripčných faktorov v bielom tukovom tkanive a v pečeni potkanov s AA a jej farmakologické ovplyvnenie testovanými látkami. Pre probiotiká (kmeň *Lactobacillus plantarum* LS/07 zbierkové číslo CCM 7766) sa bude sledovať vzťah artritídy a zmien v počte laktobacilov ako aj pH ich kolónií v hrubom čreve potkanov.

Minimálny stres zvieratá utrpia počas aplikácie látok perorálne sondou a pri podaní samotnej anestézie intramuskulárne. Zvieratá môžu pociťovať mierny diskomfort pri čiastočnej fixácii počas aplikácie testovaných látok sondou *per os* a pri podaní anestetika. Tieto zákroky nemajú na zvieratá žiadne nepriaznivé trvalé účinky. Diskomfort pri prežívaní potkanov po indukcii artritíd spôsobený opuchmi zadných končatín budeme eliminovať podávaním analgetík, podaním krmiva do chovných vaníc a znížením ústia pijátok do vaníc, vložením nezávadných papierových valcov na preliezanie a zvyšovanie pohody zvierat. Pre zistenie účinnosti testovaných látok s plánovaným využitím pre človeka prínos projektu výrazne prevyšuje ujmu u experimentálnych potkanov.

V postupe sa použije **1470 laboratórnych potkanov kmeňa Lewis**, samcov 5-6 týždňových o hmotnosti 120-150 g.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

Testované substancie neprídu do kontaktu so živými potkanmi. V postupoch *in vivo* sa bude testovať len obmedzený počet najúčinnějších látok a derivátov z postupov v monoterapii. Aby sa zmiernilo utrpenie zvierat, použije sa analgetikum vo forme

Tramalu. Nutnosť realizácie postupov hodnotiacich účinkov prírodných látok na experimentálnych jedincoch podporuje aj skutočnosť, že sa bude jednať o štúdie biologickej aktivity viacerých novopripravených zlúčenín. V medzinárodných databázach (ECVAM, FRAME) sa zisťovali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. Pre komplexnosť procesov absorpcie, distribúcie a metabolizácie liečiv v živých organizmoch nie je možné v projekte nahradiť navrhnuté animálne modely alternatívnymi metódami.

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych potkanov tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť i validita postupu pre fyziologické, biochemické, makroskopicko-morfologické analýzy, ako aj ich štatistické vyhodnotenie. Zvieratá budú rovnakého pohlavia, veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom.

Zásada zjemnenia (refinement)

Zvieratá budú po privezení z chovného zariadenia v karanténe: po dobu 7 dní budú umiestnené po dvoch v dostatočne veľkých vaniciach za stanoveného svetelného, tepelného a kŕmneho režimu. Budú v kontakte len so školenými pracovníkmi zverinca. Potkany počas postupu prežívajú stres, ktorý budeme minimalizovať šetrným zaobchádzaním i obohatením prostredia vanice predmetmi na hru a ohryzovanie. Pri odbere krvi z retro-orbitálneho sínusu sa bolesť obmedzí použitím celkovej anestézie a stres sa zmierni používaním tenkých jednorazových ihlíc, šetrným a ohľaduplným zaobchádzaním so zvieratami. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokjej celkovej anestézii vykŕvením punkciou srdca.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie áno

Do 30. 9. 2020 budú na SVPS se zaslať výsledky z projektu na spätné posúdenie.

Príloha II

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

Názov projektu: 3199/16-221

Bioenergetické aspekty ochrany myokardu pomocou procesov krátkodobej adaptácie. Úloha srdcových mitochondrií.

Kľúčové slová v projekte

Srdcové mitochondrie, adaptačné mechanizmy, farmakologický a remote preconditioning, diabetes mellitus, bioenergetika

Účel projektu:

- základný výskum,
- prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka, zvierat alebo ich účinkov na ľudí, zvieratá,
- odhaľovania zmeny fyziologického stavu alebo fyziologických procesov ľudí, zvierat

1a) Informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, o počte a typoch zvierat, ktoré sa použijú

Cieľom projektu bude upresnenie úlohy mitochondrií v energetickom metabolizme srdca v podmienkach ochrany myokardu pomocou „remote ischemického preconditioningu“ (RIP) proti jeho ischemicko-reperfúznemu poškodeniu.

Projekt má za úlohu prispieť k objasneniu molekulových mechanizmov vedúcich k funkčnej remodelácii srdcových mitochondrií, ktorou sa tieto organely podieľajú na zvýšení ischemickej tolerancie myokardu. Rozlíšenie pozitívnych od negatívnych zmien, ktoré RIP indukuje na cieľových štruktúrach v srdcových mitochondriách.

Ďalším cieľom bude porovnanie účinnosti ochrany energetiky myokardu zvýšením jeho ischemickej tolerancie klasickým ischemickým preconditioningom, RIP a chemickým preconditioningom (aplikáciou diazoxidu) a farmakologickým ovplyvnením s dichloroacetátom pri poškodení myokardu civilizačnými ochoreniami (ischémia, hypoxia, diabetes mellitus, hypertenzia atď.).

Výsledky získané v priebehu riešenia projektu budú náplňou dvoch doktorandských dizertačných prác. Zvieratám bude jednorázovo podaný streptozotocín v dávke 65mg/kg. Počas 7 dní vývoja akútneho štádia diabetes mellitus I. typu budú zvieratá pociťovať mierny diskomfort, majú zvýšené močenie, dochádza k miernemu úbytku na ich hmotnosti. Počas navodenia tzv. remote ischemického preconditioningu bude zvieratám v celkovej anestéze vyvolaná krátkodobá ischémia tromi 5 minútovými oklúziami s 5 minútovými reperfúziami, medzi jednotlivými oklúziami (Xin P et al. 2010). Zaškrtenie ciev zásobujúcich zadnú končatinu bude vyvolané tlakovou manžetou pri 200 mm Hg. Farmakologický preconditioning bude potkanom v celkovej anestéze navodený diazoxidom, ktorý bude podávaný intravenózne v dávke 10 mg.kg⁻¹ tesne pred samotnou excíziou srdca (cca 15 min) (Fryer a kol., 2000). Dichloroacetát bude použitý pre účel farmakologického ovplyvnenia metabolizmu potkanov. Táto chemická zlúčenina bude podávaná anestetizovaným potkanom

intravenózne v dávke 100 - 300 mg/kg niekoľko minút (15 min) pred usmrtením zvierat (excíziou srdca) (Gahutu, 2008).

Pri projekte nepredpokladáme výraznejšiu ujmu na zdraví experimentálnych zvierat. Postupy sú navrhnuté tak, aby sa minimalizovalo ich utrpenie, bolesť a strach. Zvieratá budú chované počas celého pokusu za štandardných podmienok podľa Nariadenia vlády č.377/2012 a podľa vyhlášky MPRV SR č.436/2012 Z.z.. V zmysle Klasifikácie krutosti postupu, Oddiel I: Kategórie krutosti a Oddiel II: Kritériá zaradenia do kategórií podľa zákroku a manipulácie so zvierat'om je možné ich zaradiť do kategórie krutosti „*stredná krutosť*“.

V pokuse použijeme 630 laboratórnych potkanov samcov kmeňa Wistar, a 90 potkanov samcov SHR s hmotnosťou 220-250 g.

1b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

V medzinárodných databázach a databázach medzinárodných patentov (ECVAM, CAAT systemic review, www.google.com, Altweb: Alternatives to Animal Testing, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, www.patents.com, ALTBIB – Alternatives to Animal Testing, New Technologies as Alternatives to Animal Testing) sme hľadali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. Objasnenie adaptačných zmien v bunkovej energetike myokardu sledujeme na izolovaných srdcových mitochondriách a na preparáte izolovaného perfundovaného srdca (model podľa Langendorffa). V prípade nášho projektu nie je možné nahradiť animálny experiment alternatívnymi metódami.

1. Altweb: Alternatives to Animal Testing

1 odkaz nepoužiteľný pre našu problematiku (<http://altweb.jhsph.edu/>)

2. ALTBIB – Bibliography on Alternatives to Animal Testing

8 odkazov nepoužiteľných pre našu problematiku (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>)

3. CFHS: Alternatives to Animal Testing

žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku (http://cfhs.ca/research/alternatives_to_animal_testing/)

4. New Technologies as Alternatives to Animal Testing

žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku (<http://www.aboutanimaltesting.co.uk/search.htm>)

5. Alternatives to Animal Testing / Britannica Blog

žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku (<http://www.britannica.com/blogs/2007/12/scientific-alternatives-to-animal-testing/>)

6. EUSAAT – European Society for Alternatives to Animal Testing

žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku (<http://www.eusaat.org/>)

7. European Centre for the Validation of Alternative Methods

žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku (<http://ecvam.jrc.it/>)

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych zvierat tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu, bola zabezpečená reprodukovateľnosť a validita postupu pre fyziologické a biochemické stanovenia a ich štatistické vyhodnotenie.

Zásada zjemnenia (refinement)

Potkany v priebehu pokusu prežívajú stres, ktorý bude minimalizovaný šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia klieťky predmetmi na hru a ohryzovanie. Pri

injekčnej aplikácii liečiv aj anestetika sa budú používať sterilné tenké ihly a so zvieratami sa bude šetrne a ohľaduplne zaobchádzať. Usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v hlbkej celkovej anestézii, vyvolanej thiopentalom v dávke 50-60 mg/kg. Postupy sú navrhnuté tak, aby sa minimalizovalo ich utrpenie, bolesť a strach. Počas celého postupu budú zvieratá pod dohľadom skúsených a školených pracovníkov, ktorí budú dodržiavať humánne postupy v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o zvieratá.

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

Bratislava, 14. 07. 2016

Príloha II

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

Názov projektu: 3214/16-221

Hypoxia ako prevencia zlyhávania srdca potkana a jej vplyv v rôznych fázach zlyhávania: Charakteristika funkčných, štrukturálnych a molekulárnych zmien.

Kľúčové slová v projekte : srdcové zlyhávanie, intermitentná hypoxia, adaptačné zmeny, kardioprotekcia

Účel projektu: Základný výskum. Prevencia, diagnostiky alebo liečba chorôb, poškodenia zdravia človeka, zvierat alebo ich účinkov na ľudí, zvieratá. odhaľovania zmeny fyziologického stavu alebo fyziologických procesov ľudí, zvierat.

1a) Informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, o počte a typoch zvierat, ktoré sa použijú

Budeme skúmať molekulárne mechanizmy účinkov intermitentnej hypoxie na rozvoj srdcového zlyhávania a hypertrofie. Zameriame sa aj na charakterizáciu úlohy komplexu CaMKII-ERK a jeho vplyv na kaskády spojené so vznikom srdcového zlyhávania a vplyvu intermitentnej hypoxie na dynamiku komplexu.

Na zvieratách bude vykonávaný jeden chirurgický zákrok v celkovej anestézii a s primeranou pooperačnou analgéziou. Počas celého postupu bude zviera umiestnené na vyhrievanom operačnom stolčeku alebo podložke, aby bola zabezpečená udržanie normálnej telesnej teploty. V hlbokjej anestézii sa zviera intubuje a napojí na umelú pľúcnu ventiláciu pred otvorením hrudníka. Miesto chirurgického zákroku - ľavá časť hrudníka - sa ostrihá strojčekom a oholí depilačným krémom a vydezinfikuje betadínom. Počas chirurgického zákroku bude zvieraťu vykonaný 1 cm dlhý rez medzi štvrtým a piatym rebrom na ľavej strane hrudníka za účelom prístupu k srdcu, na ktorom bude po úvodnej stabilizačnej fáze navodená 60-min regionálna ischémia oklúziou ľavej zostupnej vetvy koronárnej artérie. Po ischémii bude nasledovať reperfúzia (uvoľnenie oklúzie). Následne budú medzirebrové svaly, hrudné svaly a koža v mieste otvorenia hrudnej dutiny zošité vstrebateľným šicím materiálom a rana bude opätovne vydezinfikovaná a prekrytá tzv. roztokom na krytie rán (Solutio Novikov). Zvieraťu bude ešte v anestéze perorálne aplikované analgetikum (ibuprofenum v dávke 6mg/zviera/deň) a vytiahnutá intubačná hadička (v prípade potreby bude zvieraťu odsatý hlien z priedušnice). Zviera bude po ošetrení chirurgickej rany umiestnené do kletky s čistým filtračným papierom (aby nedošlo k podráždeniu alebo kontaminácii operačnej rany), ktorá bude umiestnená na vyhrevnej podložke a pozorované až do úplného nadobudnutia vedomia. Chirurgický zákrok, ktorý zvieratá podstúpia je spojený s 30-50% úmrtnosťou, ktorá je vo väčšine prípadov spôsobená pretrvávajúcim výskytom závažných komorových arytmií vyskytujúcich sa počas ischémie alebo reperfúzie. Zotavovanie zvierat po chirurgickom zákroku je veľmi dobré. Prvý deň po zákroku pozorujeme u jedincov miernu malátnosť, počas ktorej zvieratá môžu pociťovať krátkodobý diskomfort, ktorý však v ďalších dňoch ustúpi a nenarušuje významne pohodu ani celkový stav zvierat. Pokiaľ počas 2 hodín po zákroku pozorujeme, že zviera sa nezotavuje dobre, takéto zviera je usmrtené nadmernou dávkou anestetika, aby sa predišlo jeho ďalšiemu utrpeniu.

Tri až sedem dní pred samotným chirurgickým zákrokom bude zvieraťu vykonané kontrolné echokardiografické vyšetrenie v celkovej anestéze. Následne bude na zvierati vykonané echokardiografické vyšetrenie v celkovej anestéze v dobe jeden, tri a päť týždňov po

operačnom zákroku. Echokardiografické vyšetrenie v celkovej anestéze trvá približne 20 min, počas ktorých sa vyholí srst' na hrudi elektrickým strojčekom a zvyšné ochĺpenie sa odstráni depilačným krémom. Následne prebehne samotné echokardiografické meranie.

V závislosti od experimentálnej skupiny budú zvieratá vystavené intermitentnej hypoxii (10% O₂) 5 hodín denne, 5 dní v týždni po dobu 2 týždňov buď pred samotným chirurgickým zákrokom alebo po chirurgickom zákroku. Intermitentnej hypoxii budú zvieratá vystavené v hypoxickej komore z priehľadného plexiskla, v ktorej budú zvieratá umiestnené vo svojej klietke s krmivom a vodou *ad libitum* a nebudú tak pociťovať izoláciu, strach ani diskomfort. V zmysle Klasifikácie krutosti postupu, Oddiel I: Kategórie krutosti a Oddiel II: Kritériá zaradenia do kategórií podľa zákroku a manipulácie so zvieratom navrhujeme kategóriu krutosti postupov „strednú krutosť“.

Výsledky *in vivo* experimentov poskytnú značné množstvo informácií o činnosti zdravého i chorého srdca v reálnom čase. Parametre získané echokardiografickými meraniami poskytnú vedomosti nielen o štruktúre srdca (remodelácia komôr) a jeho funkcii, ale umožnia hodnotiť normálny a abnormálny prietok krvi srdcom. V súčasnosti, vyšetrenia intrakardiálnej hemodynamiky (P-V loops) a echokardiografia srdca sa považujú za najmodernejšie metodiky relevantné obzvlášť v oblasti výskumu hypertrofie srdca a srdcového zlyhávania. Získané výsledky môžu prispieť k cielenej aktivácii adaptačných procesov v myokarde za účelom spomalenia rozvoja srdcového zlyhania a potlačenia negatívnych vplyvov pridružených komorbidít na mechanizmy vlastnej odolnosti srdca voči pretrvávajúcim dôsledkom myokardiálnej ischémie a infarktu myokardu a tým aj k objasneniu mechanizmov srdcového zlyhávania u pacientov zaťažených ďalšími komorbiditami so zvláštnym zreteľom na ich vek.

V postupoch použijeme potkany kmeňa Wistar, samce vo veku 3 a 18 mesiacov v celkovom počte 384 jedincov. Potkany oboch vekových kategórií budú rozdelené do ôsmich experimentálnych skupín s počtom 24 jedincov v skupine.

1b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

V medzinárodných databázach a databázach medzinárodných patentov (ECVAM, : Alternatives to Animal Testing , www.google.com, Altweb: Alternatives to Animal Testing, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, www.patents.com, ALTBIB – Alternatives to Animal Testing, New Technologies as Alternatives to Animal Testing,) sme hľadali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat.

Komplexnosť srdca ako súčasti kardiovaskulárneho systému neumožňuje v našom projekte nahradiť animálny model alternatívnymi metódami, ktoré by nahradili podmienky v *in vivo* modeloch.

1. Altweb: Alternatives to Animal Testing
8 odkazov nepoužiteľných pre našu problematiku (<http://altweb.jhsph.edu/>)
2. ALTBIB – Bibliography on Alternatives to Animal Testing
25 odkazov nepoužiteľných pre našu problematiku (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>)
3. CFHS: Alternatives to Animal Testing
žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku (http://cfhs.ca /research/alternatives_to_animal_testing/)
4. New Technologies as Alternatives to Animal Testing
10 odkazov nepoužiteľných pre našu problematiku (<http://www. aboutanimaltesting.co.uk/search.htm>)
5. Alternatives to Animal Testing / Britannica Blog

žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku

(<http://www.britannica.com/blogs/2007/12/scientific-alternatives-to-animal-testing/>)

6. EUSAAT – European Society for Alternatives to Animal Testing

žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku (<http://www.eusaat.org/>)

7. European Centre for the Validation of Alternative Methods

žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku (<http://ecvam.jrc.it/>)

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych zvierat tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu, bola zabezpečená reprodukovateľnosť a validita postupu pre fyziologické, biochemické a morfológické analýzy a ich štatistické vyhodnotenie.

Zásada zjemnenia (refinement)

Potkany v priebehu pokusu prežívajú stres, ktorý bude minimalizovaný šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia klieťky predmetmi na hru a ohryzovanie. Pri injekčnej aplikácii anestetika sa budú používať sterilné ihly a so zvieratami sa bude šetrne a ohľaduplne zaobchádzať. Chirurgické zákroky, echokardiografické vyšetrenia a usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v hlbkej celkovej anestézii, vyvolanej thiopentalom v dávke 50-60 mg/kg. Postupy sú navrhnuté tak, aby sa minimalizovalo utrpenie, bolesť a strach zvierat. Počas celého postupu budú zvieratá pod dohľadom skúsených a školených pracovníkov, ktorí budú dodržiavať humánne postupy v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o zvieratá.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: ☒ áno ☐ nie

Bratislava, 14.07. 2016

Príloha 4: Netechnické zhrnutie projektu podľa § 40 nariadenia vlády

3248/16-221

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

1. "Zavedenie nových vedecko-výskumných a diagnostických metód určenia evolučných zmien enterovírusov a ich dopad na patogenézu infekčných ochorení" v rámci monitoringu projektu podporeného z Finančného mechanizmu EHP a Nórskeho finančného mechanizmu Úradu vlády SR na grant pre projekt SK0082.
2. Antivírusová aktivita v myšacom Dicer modeli v rámci projektov DEFNS - HORIZON2020

l) Podrobné ciele projektu, očakávané výsledky a ich využitie v praxi:

Projekty majú dva hlavné ciele. Prvým cieľom je získať poznatky o antivírusových aktivitách RNAi v Dicer myšacom modeli. Budeme sledovať patogenézu EV, budeme sa snažiť pochopiť antivírusovú aktivitu v zmysle redukcie replikácie vírusu v rôznych orgánoch infikovaných myší, v závislosti od času po infekcii, histopatologických zmien a imunitnej odpovede a spôsob podporenia novej stratégie pre antivírusovú terapiu. Druhým cieľom je definovať model na štúdium patogenézy po viacnásobnej infekcii rôznymi sérotypmi CVB. Táto štúdia slúži ako paralelné porovnanie viacnásobných infekcií CV v ľudskej populácii. Ďalej budeme študovať patogenézu coxsackievírusovej infekcie pri dvoch spôsoboch infikovania (parenterálny a perorálny). Vzhľadom k tomu, že v súčasnosti sú k dispozícii prevažne údaje o priebehu infekcie po parenterálnej aplikácii vírusu, ale prirodzená cesta infekcie enterovírusmi u ľudí je alimentárna, experimenty sú zamerané na podrobné štúdium účasti črevného imunitného systému (GALT) na rozvoji infekcie a vzniku ochorenia. Na štúdie sa používali štandardné laboratórne kmene vírusov.

Počet zvierat v pokuse: Prehľad o počte zvierat pre riešenie projektu

Poradové číslo	Číslo pokusu	Druh, plemeno, chovná línia, pohlavie pokusných zvierat	Plánovaný počet použitých zvierat	za obdobie	Manipulácia zvierat/ trvania pokusov projektu
Projekt 1				15. Október 2016 – 31. Október 2018	
1	1 ^{1*}	C57B6♂	48♂	Október – November 2016	45 dní
2	2 ¹	C57B6♀	48♀	Apríl – Máj 2017	45 dní
3	3 ¹	C57B6 dicer♂	48	Október – November 2017	45 dní
4	4 ¹	C57B6 dicer ♀	48	Apríl - Máj 2018	45 dní
5	5 ¹	C57B6♂	48	Október – November 2018	45 dní
6	6 ¹	C57B6♀	48	September – Október 2019	45 dní
Projekt 1: Celkový počet myší: 288					
Projekt 2				1. Október 2016 – 15. December 2020	
7	1 ²	CD1, ♂	30♂	Október – November 2019	45 dní
8	2 ²	CD1♂	86♂	Apríl – Jún 2020	70 dní
9	3 ²	CD1♂	86♂	Október – December 2020	70 dní
Projekt 2: Celkový počet myší: 202					

1^{1*} = číslo pokusu projectové číslo

Masarykova univerzita, Brno

C262760157

30048/2007-1001

ENVIGO RMS SRL +++++ (=nástupnická organizácia Harlanu)

IT 00406 IT0046 Friuli Centrale

Ústav molekularnej genetiky AV CR

v.v.i., C68378050

del15/06/1964

II) Projekty nepredpokladajú ekonomické prínosy.

III) Patogenéza a šírenie sa coxsackievírusu v organizme sa nedá skúmať na ľudskej populácii, preto vďaka podobnosti mCAR receptoru u myši a CAR receptoru u ľudí, je vedecky uznávaným modelovým organizmom štúdia patogenézy coxsackievírusov myši model. Z tohto hľadiska výsledky pokusu majú výslovne význačnú/významnú vedecko-výskumnú hodnotu. Výsledky budú zverejnené formou publikácií, prezentácií na národných a medzinárodných vedeckých podujatiach, formou diplomových a dizertačných doktorandských prác.

b) preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

c) Vďaka podobnosti mCAR receptoru u myši a CAR receptoru u ľudí, modelovým organizmom štúdia patogenézy coxsackievírusov je najvhodnejším modelom je myši model. Patogenéza a šírenie sa coxsackievírusu v organizme sa nedá skúmať na ľudskej populácii. Preto plánované projekty nám pomôžu v hľadaní prirodzenej formy antivírusovej terapie, založenej na prirodzených mechanizmoch imunitného systému hostiteľa a ako paralelné porovnanie viacnásobných infekcií CV v ľudskej populácii.

Analýzy projektov, pokiaľ ide o pomer ujmy a prínosu, ukazujú, že ujma spôsobená zvieratám z hľadiska utrpenia, bolesti a strachu odôvodnená očakávaným výsledkom s ohľadom na etické aspekty je v konečnom dôsledku prospešná ľuďom, zvieratám alebo životnému prostrediu

Po zhodnotení literárnych zdrojov v súčasnej dostupnej vedeckej literatúre zameranej na hľadanie alternatívnych laboratórnych techník, navrhovaný projekt pokusu plne rešpektuje zásadu 3 R, projekt je v súlade s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Replacement: Nie je známa náhrada použitia zvierat v uvedenom projekte. Navrhnutý zvierací druh – myši. U ľudí nie je reálne možné sledovať patogenézu vírusových infekcií a kinetiku deštrukcie buniek. Myšiaci model, vzhľadom na podobnosť priebehu infekcie s ľuďmi vďaka prítomnosti mCAR receptoru, je vhodným prostriedkom na štúdium ochorení spôsobených coxsackievírusmi. Na súčasnom stupni vedeckého poznania neexistuje dostatočne validovaný *in vitro* alternatívny spôsob sledovania patogenézy vírusových infekcií. Všetky pokusy budú vykonané podľa doporučenej a schválenej metodiky OCED.

Refinement (zjemnenie manipulácie so zvieratami) – Pri manipulácii so zvieratami budeme dodržiavať ŠPP/ EZ/V001-013 a ŠPP/IMU/V017

Reduction (obmedzenie počtu zvierat) – Predpokladaný počet zvierat potrebných na pokus je minimalizovaný na najmenšiu možnú mieru, aby sa však zaručila štatistická validita údajov. Akékoľvek zníženie počtu zvierat môže viesť k zníženiu validity a štatistických kalkulácii preukaznosti pokusu a nevyhnutnosti jeho opakovania.

Bezbolestné usmrtenie zvierat, najhumánnejší spôsob je predávkovanie anestetikom.

Eutanáziu zvierat vykonáva poverený ošetrovateľ v miestnosti na to určenej. Eutanázia (v konkrétnych prípadoch podľa plánu pokusu) sa prevedie intraperitoneálne podaním thiopentabarbiturátu. Bez možnosti zotavenia: postupy, ktoré sa celé vykonávajú v celkovej anestézii, po ktorej zviera nenadobudne vedomie, sa klasifikujú ako „bez možnosti zotavenia“. Human end point: Cocksackievírusová infekcia nespôsobuje výraznú bolesť ani utrpenie, ani smrť (preto ich patogenéza nie je objasnená). Preto projekty končia posledným dňom pozorovania po infekcii (pitvou).

2) Netechnické zhrnutie projektov je anonymné bez mena, adresy užívateľa a osôb

3) Projekt sa nemusí spätne posúdiť.

4) Netechnické zhrnutia projektov pre schválené projekty a ich aktualizácie sa uverejnia.

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3326/16-221/3a
Neurochemické a neurofyziologické vplyvy telesného cvičenia, antidepresív a ich kombinácia

Kľúčové slová v projekte: dobrovoľné behanie potkanov v koliečku (VWR), serotonin (5-HT), dopamín (DA), norepinefrín (NE), selektívne inhibítory spätného vychytávania serotoninu (SSRI)

Účel projektu:

Zistiť, či antidepresívny a antianxiolytický účinok, ktorý vyvoláva fyzická aktivita je sprostredkovaný tými istými alebo inými mechanizmami ako klasické účinky antidepresív.

Opísať ciele projektu:

Objasnenie účinku dobrovoľného behania v kolese na aktivitu neurónov produkujúcich neuropeptidy β -endorfín, oxytocín a vazopresín *in vivo*. Preštudovať účinok dobrovoľného behania v kolese na aktivitu neurónov produkujúcich monoamíny serotonin, noradrenalin a dopamín *in vivo*. Objasniť účinok podávaných antidepresív na aktivitu β -endorfinových, oxytocinových a vazopresinových neurónov *in vivo*.

Prínos z vykonaného projektu:

Jedná sa o základný výskum, ktorý v dlhodobom meradle môže byť ďalej využitý v klinickej praxi. Je známe, že fyzická aktivita má pozitívny účinok na náladu a kogníciu. Taktiež bolo nedávno zistené, že fyzická aktivita môže mať aj výrazný antidepresívny účinok. Nakoľko tento mechanizmus ešte nie je objasnený, zaoberáme sa jeho štúdiom. Objasnenie fungovania tohto mechanizmu by veľmi pomohlo v klinickej praxi najmä pri liečbe depresie.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórny potkan – *Rattus norvegicus*, samce 240 jedincov Sprague-Dawley (Velaz, Praha, Česká republika).

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

Zvieratá až do začatia experimentálneho postupu nebudú vystavené žiadnym nepriaznivým vplyvom. Osmotické minipumpy im budú aplikované v celkovej anestézii (Narcostart), aby sme znížili riziko bolesti a stresu. Svojou veľkosťou a umiestnením sú prispôbované na to, aby zvieratám nebránili v pohybe. Ani samotná 21 dňová aplikácia antidepresív neovplyvní prežívanie zvierat. Pred samotným elektrofyziologickým meraním *in vivo* budú uvedené do celkovej anestézie (chloralhydrát) a až následne budú podrobené meraniu. Po ukončení tohto merania budú humánne usmrtené podaním nadmerného množstva anestézie.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Podľa prílohy č.4 nariadenia vlády Slovenskej republiky č.436/2012 Z.z. klasifikujeme krutosť aplikácie osmotických minipump na úrovni „slabé“ a elektrofyziologické merania *in vivo* na úrovni „bez možnosti zotavenia“. Rýchlu a bezbolestnú smrť zabezpečíme zvieratám podaním nadmerného množstva anestézie.

Uplatňovanie zásad 3R

1. **Nahradenie zvierat:** V projekte budú sledované vzájomné interakcie dobrovoľnej fyzickej aktivity a vplyv podávania antidepresív na aktivitu neuropeptidy-sekretujúcich neurónov v mozgu. Nakoľko je mozog veľmi zložitý orgán a jednotlivé neuróny nie sú schopné delenia sa, z tohto dôvodu nie je možné vykonávať experimentálny postup na tkanivových kultúrach ani alternatívnych modeloch bez použitia zvierat.

2. **Redukcia počtu zvierat:** Počty zvierat sú nastavené z hľadiska reprodukovateľnosti a validity projektu. Znižovanie počtu zvierat by ovplyvnilo samotnú validitu dosiahnutých výsledkov. Do jednej skupiny bude zaradených 10 jedincov. Rozdelenie je opísané v prílohe 1 (časť 4.). projekt bude koncipovaný tak, aby sme mali jednu spoločnú kontrolnú skupinu v rámci každej časti experimentálneho postupu.

3. **Zjemnenie:** Operačné zákroky budú vykonávané v anestézii, zvieratám bude poskytnutá pooperačná starostlivosť a prostriedky proti bolesti, ak to bude potrebné. Zjemnenie spočíva aj v umiestnení a starostlivosti o zvieratá podľa požiadaviek ustanovených v nariadení vlády. Zvieratá budú pri zistení príznakov zhoršeného zdravotného stavu z projektu vyradené a humanne usmrtené. Všetky invazívne zákroky budú vykonávané v anestézii. Minipumpy sú svojou veľkosťou prispôbené na to, aby zvieratám nespôsobovali bolesť alebo stres a nebránili im v pohybe.

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

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

B 326/16-22 1/3

In vivo identifikácia a charakterizácia neuropeptidy-sekretujúcich neurónov u samcov a samíc laboratórnych potkanov

Kľúčové slová v projekte: oxytocín, vazopresín, β -endorfín, neuropeptid-Y, hypotalamus, supra-optic nucleus (SON), arcuate nucleus (ARN), cholecystokinín (CCK), leptín, rozdiely medzi pohlaviami, elektrofyziológia

Účel projektu:

Hlavným cieľom projektu je skúmanie úloh jednotlivých neuropeptidy-sekretujúcich neurónov v rôznych fyziologických a patologických podmienkach, a ich rozdielov v aktivite jednotlivých buniek u opačných pohlaví.

Opísať ciele projektu:

Preskúmanie funkčných interakcií medzi neurónmi produkujúcimi monoamíny a neurónmi produkujúcimi neuropeptidy. Snaha o objasnenie rozdielov týchto interakcií medzi jednotlivými pohlaviami.

Prínos z vykonaného projektu:

Jedná sa o základný výskum, ktorý v dlhodobom meradle môže byť ďalej využitý v klinickej praxi. Objasnenie fungovania jednotlivých neurónov a ich vzájomných interakcií môže mať pozitívny význam pri diagnostike a samotnej liečbe mnohých ochorení (depresia, závislosť alebo anorexia).

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórny potkan – *Rattus norvegicus*, samce (160 ks) a samice (160 ks) Sprague-Dawley (Velaz, Praha, Česká republika). Dohromady 320 jedincov za celé obdobie trvania pokusu.

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

Zvieratá až do začatia experimentálneho postupu nebudú vystavené žiadnym nepriaznivým vplyvom. Po navodení celkovej anestézie budú podrobené *in vivo* elektrofyziologickému meraniu. Po ukončení tohto merania budú humánne usmrtené podaním nadmerného množstva anestetika.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Podľa prílohy č.4 nariadenia vlády Slovenskej republiky č.436/2012 Z.z. klasifikujeme krutosť našich postupov na úrovni „bez možnosti zotavenia“. Zvieratá budú humánne usmrtené podaním nadmerného množstva anestetika.

Uplatňovanie zásad 3R

1. **Nahradenie zvierat:** v projekte budú sledované beta-endorfinové a neuropeptidy-sekretujúce neuróny. Nakoľko sa jedná o zložité štruktúry buniek, ktoré nie sú schopné delenia, je potrebné pracovať so zvieratami.

2. **Redukcia počtu zvierat:** počty zvierat sú stanovené z hľadiska reprodukovateľnosti a validity projektu. Znižovanie počtov by ovplyvnilo validitu dosiahnutých výsledkov. V jednej skupine bude zaradených 10 zvierat.

3. **Zjemnenie:** experimentálne postupy budú vykonávané v celkovej anestézii, aby nedochádzalo k zbytočnému utrpeniu, spôsobovaniu bolesti alebo zbytočného stresu. Zjemnenie spočíva aj v dodržiavaní starostlivosti o zvieratá podľa požiadaviek ustanovených v nariadení vlády. Zvieratá budú v prípade zistenia zhoršenia zdravotného stavu z projektu vyradené a humánne usmrtené.

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

Názov projektu: Úloha vitamínu D a ďalších markerov vo vzťahu k priebehu sclerosis multiplex

Príloha č. 4

Netechnické zhrnutie projektu

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3352/16-221

Kľúčové slová: demyelination, encephalomyelitis

Účel projektu: základný výskum

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

Ciele projektu:

Hlavnou patogenetickou črtou sclerosis multiplex (SM) je abnormálna imunitná reakcia, ktorá vzniká v dôsledku interakcie environmentálnych a genetických faktorov a spúšťa kaskádu procesov smerujúcich k demyelinizácii, ktoré môžu byť vo výraznej miere ovplyvnené vitamínom D. Experimentálna alergická encefalomyelitída je všeobecne akceptovaným a najviac využívaným experimentálnym zvieracím modelom SM. Keďže presné mechanizmy už dokázaného vplyvu vitamínu D na riziko vzniku a priebeh SM nie sú presne objasnené a odber tkanív z centrálného nervového systému u ľudí je výrazne obmedzený, cieľom projektu je analýza mechanizmov vplyvu vitamínu D na priebeh EAE u myší. Čiastkovými cieľmi projektu je charakterizácia vplyvu derivátov vitamínu D a ďalších markerov na rozvoj a závažnosť priebehu a progresie experimentálnej alergickej encefalomyelitídy (EAE) u myší určením: 1. neurologického outcome pomocou EAE skóre, 2. histologického poškodenia CNS, 3. regulácie génovej expresie a translácie génov zodpovedných za metabolizmus vitamínu D 4. hladín selektívnych typov mikroRNA 5. metylačného obrazu DNA, 6. proteomickej analýzy v rôznych oblastiach CNS, resp. cerebrospinálnom moku, 7. MRS analýzy metabolitov v mozgovom tkanive u kontrolných zdravých myší, ako aj v rôznych štádiách vývoja patológie (relapse, remisii, počiatkovej a chronickej fáze degenerácie).

Cieľom projektu je po indukcii a optimalizácii modelu experimentálnej alergickej encefalomyelitídy u C57BL/6NCrI myší vyhodnotiť vplyv derivátov vitamínu D na frekvenciu a závažnosť výskytu rôznych štádií vývoja patológie EAE (relaps, remisia) a na progresiu neurologického zneschopenia zvierat. Pre získanie uvedených cieľov budú používané najnovšie molekulárno-biologické a proteomicke techniky ako je real time quantitative PCR, reverse transcriptase PCR, Western blotting, imunohistochemia a izolácia mikrooblastí mozgu. Proteomická analýza sa bude vykonávať kombináciou HPLC s MALDI TOF-TOF a bude sa určovať proteomický profil, resp. verifikovať hladiny proteínov s Western blotmi. Hladiny metabolitov budú v mozgovom tkanive merané pomocou MR spektroskopie.

Predpokladaný prínos projektu:

Experimentálna autoimunitná encefalomyelitída, ako najvhodnejší model pre štúdium ľudského ochorenia Sclerosis Multiplex (SM), je charakterizovaná vznikom demyelinizovaných ložísk v centrálnom nervovom systéme (mozgu a mieche) postihnutých zvierat, v mieste poškodenia dochádza k zmenám v zastúpení buniek imunitného systému, zmenám bunkových štruktúr mieste poškodenia, narušeniu rýchlosti vedenia vzruchov, poškodeniu axónov a ďalším procesom. Vzhľadom k biologickým účinkom vitamínu D je predpokladateľný a už aj čiastočne dokázaný jeho vplyv na patologické procesy prebiehajúce v centrálnom nervovom systéme na úrovni orgánovej, tkanivovej, bunkovej aj subcelulárnej, a procesy prebiehajúce v celom organizme, no presné mechanizmy jeho pôsobenia ešte stále nie sú úplne objasnené. Indukciou EAE u myši a podávaním derivátov vitamínu D chceme vo vzťahu k závažnosti progresie EAE a neurologického poškodenia prispieť k poznaniu:

- i) zmien regulácie génovej expresie a translácie génov,
- ii) zmien epigeneticky riadených procesov (metylácia DNA, modifikácia histónov hladiny mikroRNA) a
- iii) proteínov (translačná úroveň a posttranslačné modifikácie) tkanive a plazme, regulujúcich bunkovú viabilitu v cieľovej štruktúre tkanive CNS
- iv) ako aj endogénnych intracelulárnych dráh v korelácii s morfológickým poškodením a charakterom progresie ochorenia
- v) metabolomické zmeny v celom organizme a v mozgovom tkanive
- vi) zmeny hladín biomarkerov v telesných tekutinách (plazma, cerebrospinálny mok)
- vii) validity jednotlivých genetických a biochemických markerov vo vzťahu k progresii EAE a vzniku neurologického poškodenia

Vzhľadom k faktu, že stále nie je jasné prečo u niektorých pacientov so SM dochádza k relatívne benígnemu priebehu ochorenia, zatiaľ čo u iných vedie SM k rýchlemu nástupu invalidity, využitie výsledkov dosiahnutých pri experimentoch na zvieracom modeli budú využiteľné v kombinácii s určením polymorfizmov génov, epigenetických markerov, hladín mikroRNA, proteomických profilov a hladín jednotlivých metabolitov v mozgu v klinicky definovaných skupinách pacientov s rôzne rýchlou progresiou SM pri prevencii vzniku neurodegeneratívnych zmien, bližšej stratifikácii pacientov s SM a pri predpovedaní prognózy ochorenia. Získané výsledky by po štandardizácii a harmonizácii protokolov mohli byť použité aj v rutinej klinickej praxi predovšetkým v procese individuálnej diagnostiky a predpovedania prognózy ochorenia, ale aj pri výbere vhodných preventívnych stratégií a terapie šitej na mieru a monitorovaní jej účinku. Na základe dosiahnutých predbežných výsledkov sa zameriame na sledovanie vplyvu vitamínu D na procesy, ktoré v modeloch SM už ukázali zmeny, no nie sú úplne objasnené mechanizmy jeho účinku a preto dosiahnutie vytýčených cieľov považujeme za reálne.

Predpokladaná ujma:

Po aplikácii toxikantu sa môžu u niektorých zvierat objaviť na koži malé chrastičky, ktoré sa po niekoľkých dňoch vysušia a odpadnú. Zvieratá si rýchlo zvyknú aj na testy, pri ktorých sa hodnotí EAE skóre, ktoré sa časovo limitujú tak, aby zviera nepociťovalo výrazný diskomfort a aby sa nevyčerpal.

Zákroky smerujúce k vyvolaniu EAE zvieratá výrazne neovplyvňujú ani im nespôsobujú výraznú bolesť. Po vzniku príznakov EAE sú zvieratá ovplyvnené viac, dochádza k zhoršeniu zdravotného

stavu, postihnuté zvieratá prejavujú známky neurologického poškodenia – predovšetkým poruchy chôdze, slabosť zadných končatín až ich paralýza, ktorá môže vyústiť do kvadruplégie, zhoršené pohybové schopnosti, koordinácia, strata tonusu chvosta, malátnosť a znížená schopnosť pohybu za potravou. Stav sa počas priebehu chronickej relapsujúcej EAE môže intermitentne zlepšovať a zhoršovať, zriedkavo môže vyvolané ochorenie prebiehať ako chronická progresívna EAE, kedy sa môže stav progresívne zhoršovať, no pri podaní látok, ktoré sú uvedené v protokole projektu je vznik tejto formy EAE nepravdepodobný. Vo veľmi ojedinelých prípadoch by mohlo dôjsť k úhynu zvieratá v dôsledku narušeného príjmu potravy. V dôsledku vyvolania EAE je nepredpokladáme u zvierat vznik bolesti, vynímajúc injekčnú s.c. a i.p. aplikáciu látok, ktorá môže byť pre zvieratá krátkodobo mierne bolestivá.

Počet a druh zvierat:

V projekte použijeme dospelé samice myši kmeňa C57BL/6NCrI v celkovom počte 150 jedincov.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Ide o zvierací model ľudského ochorenia Sclerosis Multiplex s názvom Experimentálna autoimunitná encefalomyelitída (EAE), pri ktorom je pravdepodobné, že tento postup vážne naruší pohodu alebo celkový stav zvierat, a teda sa klasifikuje ako „kruté“.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Na sledovanie vplyvu vitamínu D na poškodenie centrálného nervového systému v dôsledku autoimunitnej demyelinizácie a zápalu počas experimentálnej autoimunitnej encefalomyelitídy neexistuje alternatívna metóda, ktorá by buď na izolovaných bunkových líniiach, tkanivových kultúrach, či postupoch *in vitro* dokonale modelovala súbor procesov a mechanizmov súvisiacich s autoimunitným zápalovým poškodením centrálného nervového systému, ako použitie živých zvierat.

Metodické postupy v predkladanom projekte používame na našom pracovisku dlhodobo a sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat.

Uplatňovanie všeobecných zásad 3R:

Nahradenie (Replacement):

Objasnenie molekulárnych, biochemických, epigenetických a ďalších markerov, ktoré súvisia s vplyvom vitamínu D na vznik a priebeh demyelinizácie, autoimunitného zápalu, funkcie imunitného systému a hladiny jednotlivých biomarkerov v telesných tekutinách sa nemôže vykonávať v experimentálnych podmienkach bez využitia celostného prístupu, t.j. na experimentálnych zvieratách. Dôvodom je vysoká komplexnosť procesov, kooperácia rôznych typov buniek a systémov, ako aj celková odpoveď organizmu na poškodzujúci podnet. Postupy sú použiteľné pri modelovaní procesov, prebiehajúcich na subcelulárnej a bunkovej úrovni, no spôsobujúcich zmeny vyjadrené na úrovni centrálného nervového systému, ktoré sú regulované hlavne systémovo a javia sa byť rovnaké ako u zvierat, tak aj v humánnej medicíne.

Hlodavčie modely autoimunitného demyelinizačného poškodenia CNS sú z hľadiska fyziológie, etiopatogenézy najvhodnejšími modelmi. V našom projekte použijeme najnižší vhodný modelový živočíšny druh – myš kmeňa C57BL/6NCrI.

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):

Spôsob manipulácie so zvieratami, starostlivosť o zvieratá a umiestnenie zvierat počas postupu bude v súlade s požiadavkami uvedenými v Nariadení vlády SR č.377/2012 Z.z. a Vyhláske Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR č.436/2012 Z.z.

Zákroky smerujúce k ovplyvneniu a vyvolaniu EAE, t.j. subkutánne a intraperitoneálne podávanie látok, zvieratá výrazne neovplyvňujú ani im nespôsobujú výraznú bolesť. V dôsledku vyvolania EAE je nepredpokladáme u zvierat vznik bolesti, vynímajúc injekčnú s.c. a i.p. aplikáciu látok, ktoré môže byť pre zvieratá krátkodobu mierne bolestivá. Po ukončení experimentu, pred operačným zákrokom vedúcim k celkovej transkardiálnej perfúzii budú zvieratá uvedené do celkovej anestézie podaním inhalačného anestetika Sevoflurane/Isoflurane, ktorú znášajú veľmi dobre.

Vyvolanie chronickej relapsujúcej EAE narušuje pohodu resp. celkový stav zvierat, no neskracuje dĺžku života zvierat, pretože zvieratá sa približne po mesiaci z príznakov EAE zotavujú a dochádza k úprave ich stavu a vymiznutiu príznakov demyelinizácie. Úhyn zvierat v dôsledku EAE je zriedkavý a nepredpokladáme ho. Eventuálny úhyn zvierat je možný iba v dôsledku vyhladovania resp. podvýživenia, kedy vzniknutá vážna paralýza všetkých končatín by mohla spôsobiť obmedzený príjem potravy a vody. Naše predchádzajúce skúsenosti s modelom EAE u C57BL/6NCrI myši však hovoria, že aj zvieratá, u ktorých vzniká najčastejší motorický príznak EAE, ktorým je paraplégia zadných končatín sú veľmi životaschopné a presúvajú sa k zdroju potravy pomocou predných končatín. V prípade viditeľných ťažkostí s príjmom potravy a vody, hlavne v dôsledku paraplégie, bude zviera presunuté k zdroju potravy a vody, a ak potravu nebude prijímať samostatne, bude mu pravidelne ošetrovateľom 3 krát denne perorálne pomocou striekačky podávaná kašovitá strava pripravená rozmixovaním potravy a jej zmiešaním s vodou. Takto postihnuté zvieratá budú umiestnené po dvoch pre optimalizovanie maximálnej individuálnej starostlivosti a zníženie ich utrpenia. Kliecky všetkých zvierat sú obohatené o iglu domčeky, ktoré zabezpečujú zvieratám úkryt, u takto postihnutých zvierat v počte jeden domček na jedno zviera. Okrem toho obsahujú kliecky všetkých zvierat papierové valčeky, umožňujúce zvieratám prechodný úkryt, miesto na naháňanie, prechádzanie a hranie, ktoré zvieratá vyhľadávajú. Chronická relapsujúca EAE, ktorá bude vyvolaná u C57BL/6NCrI myši v našom projekte, sa prejavuje akútnym vznikom príznakov, ktoré postupne asi v priebehu jedného mesiaca odznejú a zviera sa zotaví, pričom neskôr môže dôjsť k ďalšiemu relapsu ochorenia. Chronická relapsujúca EAE bude rozvinutá do štádia vzniku príznakov, charakterizujúcich vznik demyelinizácie, k čomu je potrebných 10-14 dní od začiatku imunizácie, pre vykonanie projektu – t.j. vyhodnotenie účinku derivátov vitamínu D na vzniku priebehu EAE je potrebné ďalšie sledovanie zvierat, v dĺžke trvania 28 dní, keď po vykonanom skórovaní budú zvieratá usmrtené za účelom odberu tkaniva centrálného nervového systému pre ďalšie analýzy. EAE skóre bude u zvierat hodnotené denne v

ranných hodinách počas 28 dní od vzniku príznakov EAE, pričom jedno vyšetrenie EAE skóre trvá približne 5 minút. K vyradeniu zvierat z projektu na základe jeho zhoršeného zdravotného stavu dochádza, keď je zviera niekoľko dní neschopné samostatného pohybu a aj napriek asistovanému kŕmeniu vo frekvencii 3 krát denne pomocou striekačky naplnenej rozmixovanou stravou a vodou zviera odmieta prijímať potravu, výrazne stráca hmotnosť a zhoršuje sa jeho celkový stav. V prípade bolesti, ktorú však v priebehu EAE nepredpokladáme a neočakávame bude zvieratám podané subkutánne analgetikum, MELOXICAM v dávke 1-2 µg/g, a to pri pozorovaní akýchkoľvek z prejavov bolesti a negatívnych emócií, ktoré sa podľa najnovších výskumov u myší najvýraznejšie prejavuje na očiach a hlave – t.j. mimickými prejavmi, očná štrbina sa zúži, zviera „žmúri“, fúziky sa posúvajú dopredu, jemne sa zježia, ušká sa skrútiť ako šunkové rolky a pritlačia k hlave, oblasť nosa a líc sa vyhladí.

Spätné posúdenie projektu: projekt vyžaduje spätné posúdenie