

Netechnické zhrnutie projektu podľa § 40 nariadenia vlády 377/2012 Z.z.

Názov projektu: Modulácia tráviacich procesov u hospodárskych zvierat fytogénnymi a minerálnymi aditívami.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: (VEGA 2/0069/17) – 3355/16-221

Kľúčové slová v projekte: zinok, mangán, biovyužitelnosť, medicínálne rastliny, trávenie

Účel projektu:

Popísaný postup bude vykonaný na účely základného výskumu, ktorého prínosom prispieť k zníženiu environmentálneho zaťaženia prostredia s cieľom produkovať zdravé potraviny pre človeka. Účelom predkladaného projektu bude sledovať biovyužitelnosť a metabolický osud Zn a Mn z ich nových organických zdrojov, ktoré sa v súčasnosti používajú ako kŕmne aditíva vo výžive zvierat, ich vzájomnú interakciu v gastrointestinálnom trakte hospodárskych zvierat. Zavádzaním nových organických alebo chelátových foriem stopových prvkov do výživy zvierat sa môže modifikovať ich depozícia v tkanivách a produktoch živočíšneho pôvodu. Pozornosť by sa mala zamerať na ich interakcie v GIT, depozíciu v živočíšnych tkanivách/produktoch a telových tekutinách, celkovú retenciu a exkrementné cesty týchto mikroelementov u brojlerov a nosníc.

Ciele projektu:

Cieľom projektu bude ovplyvňovanie črevného metabolizmu fytogénnymi a minerálnymi aditívami. Budeme sledovať biovyužitelnosť nových organických zdrojov Zn a Mn, používaných vo výžive hospodárskych zvierat, vplyv na ich absorpciu z GIT, metabolizmus, retenciu, exkréciu a depozíciu v tkanivách a produktoch hospodárskych zvierat. Viaceré štúdie zaoberajúce sa distribúciou týchto prvkov a ich depozíciou v tkanivách a produktoch hospodárskych zvierat prijímajúcich krmivo obohatené o stopové prvky z ich organických zdrojov, sú často kontroverzné a nejasné (Yuan a kol., 2011; Ma a kol., 2012; Gresakova a kol., 2016). Naše výsledky z predchádzajúcich projektov, kde sme sledovali metabolický osud Zn a Mn, nám jasne naznačili ich vzájomné ovplyvňovanie v GIT (Gresakova a kol., 2016; Ivanisinova a kol., 2016). Literárne údaje z tejto oblasti sú ojedinelé a neúplné. Zameriame sa na sledovanie dopadu aplikácie kombinácie rôznych zdrojov a dávok Zn a Mn na ich absorpciu a interakcie GIT, ich retenciu, exkrementné cesty a depozíciu v tkanivách a produktoch hydiny. V porovnaní s anorganickými aditívami majú organicko-minerálne komplexy používané vo výžive zvierat niekoľko výhod. Nedochádza k nežiaducim interakciám s komponentmi diéty v gastrointestinálnom trakte, ľahko prechádzajú cez intestinálnu stenu a sú absorbované a metabolizované odlišným spôsobom (Mateos, 2005). Avšak ako bolo spomenuté, vedecké štúdie ohľadne biovyužitelnosti organických aditív-chelátov sú rozporuplné. V niektorých štúdiách sa uvádza, že organické aditíva sú oveľa viac biovyužiteľnejšie ako tradične používané anorganické (Li a kol., 2005; Yuan a kol., 2011), naopak iné štúdie tvrdia, že medzi nimi nie je žiadny rozdiel (Mabe a kol., 2003; Venglovská a kol., 2014; Gresakova a kol., 2016). Získané poznatky o biovyužitelnosti týchto stopových

prvkov z ich organických zdrojov by mohli byť ďalej využité v praxi alebo byť podkladom pre budúci aplikovaný výskum v tejto oblasti. Taktiež budeme sledovať ich vplyv na aktivitu antioxidačných enzýmov a vybraných metaloenzýmov.

V posledných rokoch je snaha FEEDAP Panelu (EFSA, 2014) o zníženie maximálnej povolenej koncentrácie Zn v kompletnej krmnej zmesi zvierat, čím by sa redukovalo zaťaženie životného prostredia zinkom zo živočíšnej výroby až o 20%. Jedným z cieľov predkladaného projektu je tiež stanoviť optimálny obsah Zn a Mn v krmivách súčasných moderných plemien hospodárskych zvierat tak, aby nebolo ohrozené ich zdravie ani úžitkovosť, čo by malo za následok podstatné zníženie kontaminácie životného prostredia zo živočíšnej výroby.

Ďalším cieľom predkladaného projektu je tiež sledovanie účinku rôznych zdrojov vybraných stopových prvkov v kombinácii s rastlinnými aditívami v krmive na morfológiu, metabolické a funkčné procesy tenkého čreva a ich postavenie v antioxidačnej ochrane zvierat, čo by mohlo priniesť nové principiálne poznatky.

Prínos z vykonaného projektu:

Prínosom tohto projektu je zvýšiť rast ekologicky čistej živočíšnej produkcie na kilogram krmiva, ktorý je zlučiteľný s dobrými životnými podmienkami zvierat a zároveň prispieva k zníženiu klimatického zaťaženia prostredia s cieľom produkovať zdravé potraviny pre človeka. Testované aditíva môžu v budúcnosti predstavovať alternatívu k antibiotikám a rastovým stimulantom, predtým používaných v živočíšnej výrobe. Kombinácia mikroelementov s prírodnými rastlinnými aditívami v krmive hospodárskych zvierat by mala pozitívne ovplyvňovať tráviace procesy a črevnú mikroflóru, zlepšiť konverziu krmiva a zvýšiť antioxidačnú ochranu.

Potenciálne vyššia biovyužitelnosť stopových prvkov z chelátových komplexov by mohla taktiež prispieť k zníženiu ich akumulácie v pôde a zaťaženia životného prostredia zo živočíšnej výroby. Stanovenie optimálneho obsahu Zn a Mn v diétach hospodárskych zvierat bez možných negatívnych vplyvov na ich zdravie a zootechnické parametre by mohli prispieť k dosiahnutiu želaného efektu minimalizovania environmentálneho znečistenia. Preto sa bude sledovať dopad aplikácie rôznych dávok Zn a Mn (od 30 mg/kg krmiva až do ich najvyššej povolenej koncentrácie schválenej v EÚ 150 mg/kg) v diétach hydiny a oviec za účelom optimalizácie ich hladín v krmivách u súčasných moderných plemien hospodárskych zvierat tak, aby nebolo ohrozené ich zdravie, ani zootechnické parametre.

Ovplyvňovanie črevného metabolizmu medicínami rastlinami a extraktmi sekundárnych metabolitov (tanínov, saponínov, silíc, polyfenolov) je cielené aj na znižovanie metanogenézy a zlepšovanie fermentačných parametrov. Originálnosť prístupu spočíva v tom, že nami vybrané liečivé rastliny a ich kombinácie svojim špecifickým zložením účinných látok doteraz neboli testované a publikované.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Použitie nosníc a brojlerových kurčiat v pripravovanom pokuse je opodstatnené, keďže jedným z hlavných cieľov je sledovanie depozície mikroelementov v požívateľných tkanivách a produktoch živočíšneho pôvodu (mäso, vajcia). Pokusné zvieratá budú pochádzať zo schválených chovných zariadení.

Opätovné použitie oviec v postupoch použijeme na sledovanie účinku vybraných stopových prvkov v kombinácii s rastlinnými aditívami v krmive na metabolické a funkčné procesy v GIT prežúvavcov, a pri *in vitro* experimentoch.

V pokusoch plánujeme použiť nasledovné druhy zvierat:

Kurčatá nosivého typu/Nosnice: Lohmann Brown resp. Isa Brown - predbežný počet spolu: 220 jedincov.

Kurčatá výkrmové/Ross 308 - predbežný počet spolu: 220 jedincov.

Ovca domáca/Zošľachtená Valaška – počet spolu: 7 kastrovaných baranov- **opätovné použitie v postupe** zo schváleného pokusu (Ro- 4160/13-221)

Ovca domáca/križenec LACAUNE x CIGÁJA x SUFFOLK (62,5% : 25% : 12,5%)- počet spolu: 1 baran- **opätovné použitie** zo schváleného pokusu (Ro- 3397/11-221/3)

Pri zohľadnení všetkých potrieb vedeckého výskumu i predpisov stanovených v nariadení vlády 377/2012 Z.z. maximálny počet použitých zvierat za celé obdobie trvania projektu (01.01.2017-31.12.2020) nepresiahne hore uvedený počet zvierat daného druhu, keďže takéto množstvo je postačujúce na zabezpečenie zmysluplného vyhodnotenia získaných výsledkov.

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

Nepriaznivý vplyv na použité zvieratá nepredpokladáme. Pokusy sú zostavené tak, aby sa minimalizovala bolesť alebo stres, a aby bol zabezpečený a dodržiavaný welfare. Kurčatá budú chované v kotercoch s podstielkou z drevených hoblín, ktorá sa im denne vymieňa. Chov nosníc bude v moderných obohatených kliebkach, ktoré vyhovujú požiadavkám predpisov EÚ proti týraniu zvierat. Pre každú nosnicu bude zabezpečený dostatočný podlahový priestor a kliebka bude primerane vybavená podľa počtu zvierat. Kliebky budú obohatené primerane na vekovú kategóriu zvierat. Bude sa dbať na predpísané zootechnické podmienky ich chovu (teplota, vlhkosť, režim striedania svetla a tmy, stmievanie, plocha/vták a pod). Voda a krmivo budú k dispozícii *ad libitum* a zootechnické podmienky chovu budú dodržiavané podľa technologického postupu pre chov daného plemena zvierat.

Ovce budú počas experimentu ustajnené individuálne v kotercoch (výška 120 cm, podlahová plocha 2,06 m²) s vyhovujúcimi rozmermi a priestorovými podmienkami, pri dodržiavaní príslušných zootechnických podmienok a budú kŕmené 2 x denne pri voľnom prístupe k vode počas celého pokusu. V čase medzi experimentmi budú ovce spoločne ustajnené v ohrádke s podstielkou (plocha 36 m²), ktorej veľkosť sa môže prispôbiť počtu zvierat a ich telesnej hmotnosti, tak aby boli splnené minimálne priestorové podmienky. Obohatenie prostredia bude zabezpečené pobytom oviec vo vonkajšom areáli prostredníctvom prenosnej ohrádky s rovnakou plochou, zabezpečenou zastrešenou plochou a dostatočným počtom napájadiel.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Kategória krutosti u hydiny- bez možnosti zotavenia. Na konci pokusu budú všetky zvieratá humánne usmrtené (podľa prílohy č. 2 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z.). Na konci pokusu budú kurčatá anestetizované i. p. zmesou xylazínu a tiopentalu pre následnú laparotómiu (kvôli odberom väčšieho množstva krvi intrakardiálnou punkciou) a hneď potom budú eutanazované podaním letálnej dávky uvedenej zmesi narkotík. Navrhnuté spôsoby usmrcovania hydiny

(dekapitácia a usmrtenie nadmernou dávkou anestetika) sú v súlade s § 5 a prílohou č. 2 NV 377/2012 Z.z.

Kategória krutosti u oviec- všetky postupy vykonávané v rámci pokusov (príjem diét obohatených o medicínálne rastliny, Zn a Mn z jeho rôznych zdrojov) spadajú podľa prílohy 4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z. do kategórie krutosti postupov „slabé“, čo znamená, že zvieratá v ich dôsledku nebudú pociťovať žiadnu alebo iba krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach. Všetci pracovníci, ktorí prichádzajú do styku so zvieratami sú príslušne poučení a budú dbať na humánny prístup k zvieratám a starať sa o to, aby neboli v žiadnej fáze pokusov vystavované zbytočnému stresu. Humánne zaobchádzanie so zvieratom pri odbere bachorovej tekutiny bude uskutočnené pomocou vývevy, ktorá slúži pre šetrný spôsob odberu. Všetci pracovníci, ktorí prichádzajú do styku s fistulovaným baranom sú príslušne poučení. Odbery budú uskutočňovať vedeckí pracovníci- veterinárni lekári.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Na tento typ pokusu je potrebné použiť zviera – hydinu. Na dosiahnutie cieľa pokusu neexistuje alternatívna metóda bez použitia zvierat. Keďže cieľom experimentu je sledovať metabolizmus Zn a Mn, ich absorpciu a vzájomnú interakciu v GIT, retenciu, exkrečné cesty a depozíciu v tkanivách hydiny, je nevyhnutné podávať zvieratám rôzne zdroje/dávky stopových prvkov do krmiva a pokus ukončiť odberom tkanív a celého tráviaceho traktu kurčiat. Iným spôsobom, ako týmto biologickým experimentom, sa nové poznatky o ovplyvnení GIT organicko-minerálnymi komplexmi a ich depozíciou v telových tkanivách/orgánoch hydiny získať nedajú, neexistuje alternatívna metóda bez použitia odberu materiálu zo živých zvierat a tento typ experimentu nie je možné vykonať v podmienkach *in vitro*.

Na krátkodobé *in vitro* fermentácie, ktoré budú zamerané na skríning medicínálnych rastlín a naturálnych aditív pri rôznych typoch krmivových substrátov a rôznych diétach, použijeme trus kastrovaných baranov.

V dlhodobějších experimentoch zameraných na sledovanie tráviacich procesov, minerálneho a antioxidačného statusu zvierat použijeme kastrované barany (opätovne použitie), ktorých krmivo bude suplementované rôznymi formami a množstvom Zn a Mn, a ich kombináciou s rastlinnými extraktmi. Odber krvi a trusu bude počas trvania pokusu realizovaný v mesačných intervaloch.

2. Redukcia počtu zvierat:

Uvádzané počty zvierat sú minimálne množstvá potrebné pre preukazné zhodnotenie sledovania stanovených parametrov. V experimentoch na kurčatách sú nami zvolené počty nevyhnutné z dôvodu vytvorenia viacerých replikátov s určitým počtom zvierat, keďže len z takto organizovaného experimentu je možné získať dostatočné množstvo interpretovateľných a štatisticky preukazných vedeckých výsledkov. Uvedené počty boli nami zvolené preto, aby bolo možné jednotlivé experimenty správne štatisticky vyhodnotiť.

Keďže pri pokusoch zameraných na sledovanie dopadu kombinácie rastlinných extraktov a minerálnych komplexov u 7 vykastrovaných baranov (opätovné použitie) použijeme schému

latinského štvorca, výrazne tak zredukujeme počty zvierat v experimentoch. Experiment bude pozostávať zo 4 experimentálnych periód, kedy počas každej periódy bude každé zviera prijímať inú diétu.

3. Zjemnenie:

V priebehu pokusu nebudú vykonávané bolestivé zákroky na zvieratách a bude s nimi šetrne zaobchádzané. Počas experimentov bude ujma spôsobená zvieratám z hľadiska utrpenia, bolesti a strachu minimálna a odôvodnená vzhľadom k očakávaným výsledkom i s ohľadom na etické aspekty. Experiment je nastavený tak, aby bol minimalizovaný stres použitých pokusných zvierat a aby bola zabezpečená primeraná starostlivosť. Všetci pracovníci, ktorí prichádzajú do styku so zvieratami sú príslušne poučení. Odber vzoriek budú uskutočňovať veterinárni lekári. Osoby zodpovedné za starostlivosť o zvieratá sa riadia pokynmi popísanými v Prevádzkovom poriadku schváleného pokusného zariadenia a sú pravidelne školené. Neustále budeme dbať na humánny prístup k zvieratám. Pokusné zvieratá budú chované v takých podmienkach, ktoré u nich nebudú vyvolávať žiaden stres – zohľadní sa veľkosť klieťky/koterca podľa veku zvierat, počet zvierat, svetelný a krmný režim a pod. Vo všeobecnosti, uvedené experimentálne postupy nespôsobia neprimeraný diskomfort pokusných zvierat, v podstate sa jedná o štandardné typy pokusov (bežne používané na špičkových vedeckých pracoviskách) v súlade s etickými požiadavkami. V dôsledku podávania rastlinných extraktov a organicko-minerálnych komplexov ako krmných aditív nehrozí zvieratám žiadne predávkovanie a intoxikácia.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Zoznam použitej literatúry:

1. EFSA (2014). Scientific Opinion on the potential reduction of the currently authorised maximum zinc content in complete feed. 12(5):1–77. doi:10.2903/j.efsa.2014.3668.
2. Gresakova, L., Venglovská, K., Cobanova, K. lambs. (2016) Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, doi:10.1016/j.jtemb.2016.05.003.
3. Li, S.F., Luo, X.G., Crenshaw, T.D., Bu, Z.Q., et al. (2005) Animal Feed Science and Technology, 124, 703-715.
4. Ma, W.Q., Sun, H., Zhou, Y., Wu, J., Feng, J. (2012) Biological Trace Elements Research, 149(2), 204–11.
5. Mabe, I., Rapp, C., Bain, M.M., Nys, Y. (2003) Poutry Science, 82, 1903-1913.
6. Mateos G.G., Lazaro R., Astillero J.R. et al. (2005) Re-defining Mineral Nutrition, Nottingham University Press, Nottingham, p.41-43
7. Venglovská, K., Grešáková, Ľ., Plachá, I., Ryzner, M., Čobanová, K. (2014) Czech Journal of Animal Science, 2014(4):147–155.
8. Yuan, J., Xu, Z., Huang, C., Zhou, S., Guo, Y. (2011) Animal and Feed Science and Technology, 168, 72-79.

Príloha 2

Netechnické zhrnutie projektu

podľa § 40 nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z. 3383/16-221/3

Názov projektu —

Prevenčia hypoxicko-ischemického poškodenia neonatálneho mozgu potkana:
testovanie nových spôsobov farmakologickej a nefarmakologickej intervencie

Kľúčové slová: neonatálny mozog, novorodené potkany, hypoxicko-ischemický infarkt, farmakologická a nefarmakologická intervencia

Účel projektu:

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

Ciele projektu

Cieľom postupu je testovanie nových spôsobov farmakologickej a nefarmakologickej liečby ipsilaterálneho hypoxicko-ischemického poškodenia neonatálneho mozgu u novorodených potkanov.

Prínos z vykonaného projektu:

Predpokladaným prínosom je overenie originálnej hypotézy, že navrhnutá farmakologická a/alebo nefarmakologická intervencia zmierni stupeň poškodenia neonatálneho mozgu potkana. Poznatky získané z projektu budú podkladom pre návrh a vývoj nových liečebných, profylaktických a preventívnych postupov v neonatologickej praxi.

Druh použitých zvierat a ich plánovaný počet:

V postupe sa použijú potkany kmeňa Wistar vo veku 7 dní v celkovom počte 432 mlád'at. Mlád'atá budeme produkovať sami pomocou chovných párov, ktorých celkový počet bude 72 (18♂ + 54♀). Počty zvierat sú zredukované na minimum, ale tak, aby sa výsledky dali hodnoverne štatisticky vyhodnotiť a bola tak zabezpečená žiaduca validita výsledkov (viď tiež *Rozdelenie a počty zvierat* v Prílohe č. 1, Návrh projektu postupov).

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

Mlád'atá sa podrobia iba miernemu chirurgickému zákroku pod celkovou izoflúranovou anestéziou a následnému vystaveniu miernej hypoxii podľa štandardného experimentálneho protokolu (Rice-Vannucci model, *Brain Research Protocols* 1999; 3(3):252). Samotná chirurgicky navodená ischemia (I) ani mierna systémová hypoxia (H) vykonané separátne nemajú zjavné nepriaznivé účinky a mlád'atá ich znášajú bez evidentnej ujmy. Na druhej strane, kombinácia týchto infarctov (I+H) vyvoláva patofyziologické HI zmeny v ipsilaterálnej hemisfére mozgu. Očakávame, že plánované farmakologické a nefarmakologické prístupy budú mať profylaktický resp. liečebný účinok.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Mlád'atá sa budú každodenne *handlovať*, aby si zvykli na rutinnú manipuláciu experimentátorom. Váženie mlád'at predstavuje *slabú* krutosť, jednorazová injekčná aplikácia - *slabú* krutosť, uvedenie do anestézy - *slabú* krutosť, neinvazívne magneticko-rezonančné meranie v celkovej anestéze - *slabú* krutosť. Chirurgický zákrok (oklúzia *a. carotis communis* sin.) predstavuje *strednú* krutosť, čiastočná mozgová ischemia - *strednú* krutosť, vystavenie miernej hypoxii - *strednú* krutosť.

Súlad s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia (RRR)

Nahradenie (Replacement)

V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatívna metóda ipsilaterálneho hypoxicko-ischemického infarktu neonatálneho mozgu. Preto sa štandardne používa klasický postup (podľa Rice-Vannucci) na mlád'atách laboratórneho potkana, ktorý je systematicky najnižšie postaveným druhom vhodným pre posúdenie dôsledkov hypoxicko-ischemického infarktu mozgu novorodenca.

Zníženie počtu (Reduction)

Abý výsledky testovania farmakologickej a nefarmakologickej intervencie voči hypoxicko-ischemickému infarktu neonatálneho mozgu potkana mali potrebnú výpovednú hodnotu, musí sa použiť dostatočný počet zvierat. Stanovený počet zvierat je minimálny potrebný pre náležité štatistické

vyhodnotenie získaných výsledkov a pre validitu experimentálnych výstupov. Preto počet zvierat nemôže byť viacej redukovaný. Použijú sa samce aj samice, aby sa mohli prejaviť predpokladané medzipohlavné rozdiely.

Zjemnenie (Refinement)

Nakoľko sa pri testovaní farmakologickej a nefarmakologickej intervencie voči hypoxicko-ischemickému infarktu neonatálneho mozgu potkana jedná o postup, pri ktorom sa sleduje zdravotný stav mláďat, dobrá kondícia zvierat hrá dôležitú úlohu. Zvieratá budú ošetrované skúsenými pracovníkmi a budú pod neustálym dohľadom veterinárneho lekára. Patričná pozornosť bude venovaná starostlivosti o zvieratá, manipulácii s nimi ako aj samotnému infarktu s minimálnym zásahom do integrity organizmu ktorý bude vykonávaný skúseným pracovníkom. Postupy používané pri farmakologických a nefarmakologických aplikáciách, ako aj následných vyšetreniach majú nízku úroveň z hľadiska spôsobenej bolesti a stresu; taktiež budú vykonávané skúsenými pracovníkmi s dlhoročnou praxou.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: *NIE*

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

CENTRÁLNA NEUROCHEMICKÁ MODULÁCIA OBRANNÝCH MECHANIZMOV DÝCHACÍCH CIEST

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3516/16

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

neuromediátory, neuromodulátory, antitusiká, kašeľ, obrana dýchacích ciest

Účel projektu*: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

Máme ambície zistiť úlohu neurónových populácií najmä v jadre solitárneho traktu a v rafeálnych jadrách predĺženej miechy pri zosilnení a zoslabení obranných mechanizmov dýchacích ciest (hlavne kašľa, prehĺtania a pod.) lokálnym podaním neuroaktívnych látok (neuromediátory, neuromodulátory, antitusiká). Zistíme pozitívne aj negatívne efekty simultánne podaných dvoch aktívnych látok, primárne antitusík. Otestujeme fungovanie modelu decerebrovaného neparalyzovaného zvieraťa pri štúdiu obrany respiračného traktu a odhalíme rozdiely v motorických dejoch spôsobené anestéziou a rozdielnou modalitou stimulácií. Komplexné elektrofyzologické pokusy sa vykonajú na anestézovaných, spontánne dýchajúcich experimentálnych zvieratách (mačka, králik) a na decerebrovanom modeli mačky. Motorické reflexné deje sa vyvolajú primárne mechanickou stimuláciou dýchacích ciest. Monitorované a analyzované budú najmä respiračné parametre a časovo-intenzitné charakteristiky reflexných odpovedí.

Ciele:

- 1) preskúmať excitačno-inhibičné a synaptické vlastnosti neurónových populácií predovšetkým v oblastiach jadra solitárneho traktu a rafeálnych jadier predĺženej miechy zapojených do regulácie obranných reflexných odpovedí respiračného traktu a dýchania so zameraním na ich úlohu v zvýšenej a zníženej regulácii týchto dejov
- 2) preštudovať funkčné interakcie dvoch látok (neuromediátorov, neuromodulátorov) aktívnych v centrálnej regulácii reflexnej odpovede, najmä antitusík pri kašli, podaných súčasne, zistiť ich efektívnosť a vedľajšie účinky pri inhibícii či zosilnení odpovedí z respiračného traktu
- 3) otestovať model decerebrovaného zvieraťa na štúdium autonómnej regulácie kašľa, prehĺtania, kýchania a ďalších motorických dejov z respiračného traktu bez vplyvu anestetík (s plnou funkciou neurónových C vlákien), špecifikovať centrálné rozdiely v regulácii týchto dejov, keď sú vyvolané stimulmi rozličnej modality (kašeľ indukovaný mechanicky vs. chemicky)

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

Náš projekt plynule nadväzuje na poznatky získané počas riešenia predchádzajúcich ako aj súčasných grantov.

Máme ambíciu docieľiť podstatný pokrok v chápaní regulácie obrany dýchacích ciest so zameraním sa na funkcie oblastí NTS a rafeálnych jadier predĺženej miechy, na význam neurónových populácií v týchto oblastiach a na GABA-ergnú inhibíciu. Taktiež sa pokúsime priradiť zistené funkčné zmeny k činnosti neurónových typov. Otestujeme pozitívne aj negatívne účinky kombinácie centrálne podaných a centrálne účinkujúcich látok – liečiv, ktoré ovplyvňujú reflexné odpovede z respiračného traktu s prioritou centrálne antitusiká a látky bežne medicínsky používané.

Predpokladáme určiť efekt celkovej anestézie na študované deje zavedením modelu decerebrovaného zvieraťa bez efektov celkovej anestézie. Vyvolanie motorických odpovedí rozličným typom podnetov môže odhaliť podstatné rozdiely v ich centrálnej regulácii (napr. kašľa vyvolaného mechanicky a dráždidlami). Výsledky budú základom pre klinické štúdie na moduláciu a manažovanie obrany a ochrany respiračného traktu.

Pri jednotlivých cieľoch sa zameriame najmä na nasledujúce otázky a úlohy:

Ad 1)

- vymedziť úlohu štruktúr NTS pri kašli, prehltaní a ďalších motorických dejoch
- zistiť efekt narušenej glutamát-ergnej neurotransmisie v NTS na kašeľ, prehltanie atď.
- vymedziť úlohu aktívnej inhibície v NTS a rafeálnych jadrách pri kašli, kýchaní, prehltaní a ďalších motorických dejoch
- pokúsiť sa určiť neurónové populácie v NTS a rafeálnych jadrách zodpovedné za pozorované efekty
- opísať efekt kodeínu a opioidného mechanizmu v NTS na reflexné deje najmä kašeľ
- vymedziť možnú úlohu NTS v patológii zosilnenej a zoslabenej obrany dýchacích ciest

Ad 2)

- otestovať účinnosť a účinok 2 simultánne podaných centrálnych antitusík, primárne kombinácie baklofén a kodeín, kodeín a dextrometorfán, dextrometorfán a baklofén

Ad 3)

- nájsť optimálne anestetikum s minimálnym zbytkovým účinkom na študované deje a optimálny postup decerebrácie
- preštudovať rozdiely v dýchaní a indukovaných reflexných dejoch na decerebrovanom modeli voči zvieraťu v celkovej anestézii
- preštudovať rozdiely v kašli indukovanom mechanicky, aplikáciou kyslých roztokov či aerosólov a kapsaicínom na decerebrovanom modeli

Modifikovanie preparácií „mid-colliculárnej“ a totálnej decerebrácie na testovanie mechanicky aj chemicky vyvolaného kašľa by umožnilo špecifikovať rozdiely medzi „mechanickým“ a „chemickým“ kašľom. Tento model je náročnejší na monitorovanie, avšak nakoľko sú štruktúry vyššie od mozgového kmeňa odstránené je plne aktivovaná autonómna regulácia a priebeh experimentu nie je ovplyvňovaný početnými faktormi napr. nocicepciou. Predpokladáme, že validovaný decerebrovaný neanestézovaný a neparalyzovaný model je výhodný pre eliminovanie tlmivých efektov anestetík na funkciu C vlákien pri vzniku a modulácii motorických dejov. To umožní ich porovnanie v exaktne definovaných podmienkach stimulácie (napr. porovnanie s bdelými a anestézovanými zvieratami a možné rozlíšenie modulácie kašľa a iných dejov autonómnou a reguláciou z vyšších centier mozgu).

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Králik domáci – 40 ks

Mačka domáca – 70 ks

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

Uvedené postupy budú vykonané v celkovej anestézii, pričom budú monitorované všetky parametre (teplota zvieratá, počet dychov, tlak krvi, saturácia krvi kyslíkom) pre minimalizovanie nepriaznivých vplyvov počas projektu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Anestézované jedince – bez možnosti zotavenia

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Projekt nie je možné vykonať bez použitia zvierat. Uvedený projekt nie je možné nahradiť simulačným systémom, pretože zatiaľ vhodný simulačný systém nahradzujúci variabilitu a jedinečnosť živého systému neexistuje.

Komplexné neurónové funkcie a odpovede organizmu sa dajú v súčasnosti študovať len na živom jedincovi alebo obmedzene s použitím modelových a simulačných techník. Počítačové modelovanie je však závislé od experimentálnych dát. Obidve tieto metódy budú použité v našom projekte. Pre komplexné reflexné odpovede z respiračného traktu (prakticky je zapojený celý organizmus) nie sú metódy práce s izolovaným orgánom, tkanivom, či jednotlivou bunkou bez zahrnutia celého individua aplikovateľné.

Mačka domáca a králik domáci sú vhodné laboratórne zvieratá, ktoré sa využívajú v experimentálnych štúdiách obranných reflexov dýchacích ciest. Predovšetkým behaviorálne a centrálné mechanizmy týchto dejov sú najlepšie preskúmané u uvedených druhov a predstavujú najlepšiu variantu pre transláciu výsledkov na človeka. Veľkosť mačky a králika umožňuje také experimentálne postupy, ktoré nie je možné spoľahlivo v našich podmienkach vykonávať u morčiat.

Počítačové modelovanie bude uplatnené tak pri plánovaní pokusov (predikcia), ako aj pri interpretácii a uplatnení získaných výsledkov (validácia a spresnenie modelov).

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Na získanie platných výsledkov použijeme iba nevyhnutne veľký súbor experimentálnych zvierat cca 25 (max. 30) zvierat/rok, pretože sa predpokladá že jedincovi uskutočníme viac ako jeden experimentálny protokol. Takýto počet je nutný pre existujúcu biologickú variabilitu, ktorá by v prípade použitia nižšieho počtu pokusných zvierat mohla viesť k nesprávnym a nejednoznačným výsledkom. Uvedená metodika redukuje počet pokusných

zvierat. Jednotlivé postupy na anestetizovaných zvieratách budú vykonané na najnižšom počte jedincov tak, aby bol výsledok pokusu štatisticky hodnotiteľný a dáta získané z pokusu relevantné. Naše dlhoročné skúsenosti potvrdzujú minimálny počet jedincov v jednej sérii 6 až 8 jedincov. Zvýšenú efektívnosť ako aj minimalizovanie nutného počtu jedincov v projekte dosiahneme: 1) vykonaním viacerých protokolov na jednom zvierati, v poradí od najjednoduchšieho (najmenej invazívneho) po najzložitejší, 2) využitím počítačového modelovania v postupoch a v plánovaní, kde je to aplikovateľné.

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)

Mačka je druh mnoho desaťročí využívaný v neurologickom výskume, odolný, dobre monitorovateľný. Je dostupné značné množstvo dát o neurónových funkciách pri dýchaní, adaptačných respiračných odpovediach, ale aj pri kašli, kýchaní, prehĺtaní atď. Všetky predpokladané skúmané deje sú u mačky vyvolateľné a dobre opísané.

Králik je druh v porovnaní s mačkou menej odolný a aj ťažšie monitorovateľný. Taktiež je dostupné množstvo dát potrebných pre predmet nášho výskumu, najmä o neurónových funkciách pri dýchaní a kašli. Všetky skúmané deje sú vyvolateľné, najmä reflex kýchania. Existujú rozdiely v centrálnej regulácii voči mačke.

Pre jedince použité v terminálnom pokuse sa minimalizuje stres ich sedáciou a anestetizovaním priamo vo zverinci. Pred podaním anestetika sa zvieratá premedikujú podaním diazepamu, rovnako ako pacienti pred operáciou, čo zabezpečí hladší priebeh úvodu do anestézy a minimalizuje stres, ku ktorému by mohlo dochádzať počas podávania anestetika intraperitoneálne. Uplatňujú sa všetky postupy na optimálny monitoring funkcií a parametrov jedinca. Po ukončení tejto časti pokusu sú zvieratá humánne usmrtené predávkovaním anestetika.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno



Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Účinok STAT1 a ISG15 inhibítorov na biochemické a morfológické parametre pri experimentálnom infarkte myokardu

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: (registračné číslo projektu) -3588/16-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

infarkt myokardu, STAT1, ISG15, NF κB, ischemicko-reperfúzne poškodenie

Účel projektu: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

Cieľom projektu je experimentálne - ligáciou ľavej koronárnej artérie vyvolať infarkt myokardu u WKY potkanov za účelom zistenia biochemických a morfológických účinkov inhibítorov STAT1 a ISG15 ako aj ich vplyv na veľkosť infarktu po následnej reperfúzii. Konkrétne, našim cieľom je:

- 1) Objasniť mechanizmy, ktoré vedú k redukcii apoptózy po ischemicko-reperfúznom poškodení po STEMI revaskularizácii a k zvýšeniu kardioprotektívnej autofágie prostredníctvom blokady STAT1 a ISG15.
 - 2) Hodnotiť a porovnať zmeny uvedených parametrov v prípade podania inhibítorov pred a po experimentálne vyvolanom infarkte myokardu.
 - 3) Skúmať asociáciu medzi meranými parametrami a markermi IM a molekulárnymi mechanizmami zahrnutými v patogenéze srdcového zlyhania.
- Patofyziologické zmeny posúdime na molekulovej, funkčnej a morfológickej úrovni.

Prínos z vykonaného projektu

Vplyv blokady STAT1 a ISG15 na krvný tlak a štruktúru orgánov po experimentálnom IM budeme sledovať u dospelých, 12-týždňov starých WKY potkanov, ktoré rozdelíme do ôsmich skupín.

Originalita a inovácia tohto projektu pozostáva v použití inhibítorov STAT1 a ISG15 a sledovaní ich účinku na myokard po experimentálnom infarkte myokardu. Podľa našich vedomostí, nie je doposiaľ publikovaná žiadna práca, ktorá by v tomto prípade popisovala účinok podávania STAT1 a ISG15 inhibítorov po experimentálne vyvolanom infarkte myokardu. V prípade úspešných experimentov sa črtá nová cesta, ktorá môže prispieť k liečbe reperfúzneho poškodenia po infarkte myokardu a zároveň k zmenšeniu veľkosti poškodenej oblasti na štrukturálnej úrovni. Originalita projektu spočíva vo zvýšení kardioprotektívnej autofágie pri infarkte myokardu, ktorá môže zabrániť toxicite vyvolanej degradáciou proteínových štruktúr. Zachovanie funkčnosti čo najväčšej oblasti myokardu je najdôležitejšou podmienkou prežitia pri IM.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: POTKAN LABORATÓRNY (rattus norvegicus) línia WKY 137 ks

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

Chirurgický zákrok v celkovej anestéze a s primeranou analgéziou môže byť spojený s miernou pooperačnou bolesťou a celkovou nepohodou.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná krutosť

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Pre sledovanie nami vytýčených cieľov nie je možné použiť počítačový model zvierat a najvhodnejším modelom je laboratórny potkan. V projekte sme zvolili normotenzívny kmeň Wistar Kyoto potkanov, ktorý bude pochádzať z nášho chovného zariadenia, prípadne bude zakúpený zo schváleného chovného zariadenia.

2. Redukcia počtu zvierat:

V plánovanom experimente je zabezpečený čo najnižší počet experimentálnych zvierat na základe analýzy štatistickej sily. Keďže projekt je zameraný na experimentálne vyvolaný infarkt myokardu a literárne údaje o torakotómii uvádzajú 60% úspešnosť prežitia, plánovaný počet zvierat sme navýšili o dané percento. Pokiaľ je to možné, spájame vyhodnotenie parametrov so spolupracujúcimi laboratóriami, aby sme dosiahli čo najväčší počet výsledkov pre štatistickú analýzu pri čo najmenšom počte experimentálnych zvierat.

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

3. Zjemnenie:

Zvieratá budú chované v modernom, oficiálne schválenom zariadení s maximálnym komfortom. Budú pod stálou kontrolou zmluvného veterinárneho lekára. Osoby, ktoré budú manipulovať so zvieratami majú viacročné skúsenosti. Všetci sú držiteľmi platného osvedčenia o absolvovaní akreditovaného vydelávacieho programu.

U zvierat bude vykonaný chirurgický zákrok v celkovej anestéze. Po zákroku budú zvieratám podávané analgetiká na zmiernenie pooperačnej bolesti a diskomfortu (podrobný postup vid' návrh projektu).

Zvieratá budú usmrtené podaním letálnej dávky anestetika.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU - 3619/16-22A

Názov projektu: Vplyv ultra malých superparamagnetických nanočastíc železa na kardiovaskulárny systém potkana v podmienkach vysokého krvného tlaku

Kľúčové slová: nanočastice, regulácia krvného tlaku, stres, antioxidanty, vápnikové kanály

Účel projektu: základný biomedicínsky výskum

Cieľ projektu

Cieľom projektu je zistiť, či akútny stres a chronicky zvýšený krvný tlak môžu 1) zvýšiť prestup ultra malých superparamagnetické nanočastíc na báze oxidov železa (USPIONS) do buniek cievnej steny a srdca, 2) či USPIONS môžu modifikovať funkciu kardiovaskulárneho systému, vrátane zmien v regulácii krvného tlaku, funkcie srdca a ciev, a tiež indukovať metabolické poruchy, oxidačné poškodenie a zmeny v pomere Fe^{2+} a Fe^{3+} v srdci a cievach, 3) po opakovanom podaní prestupovať do mozgu a ovplyvniť správanie, ako aj 4) vyšetriť možnosti prevencie oxidačného poškodenia indikovaného USPIONS pomocou vybraných antioxidantov, napr.: prírodnej látky epikatechín.

Prínos projektu

Získané výsledky prispievajú k lepšiemu pochopeniu účinkov USPIONS na reguláciu krvného tlaku a kardiovaskulárny a centrálny nervový systém v podmienkach akútneho stresu a chronicky zvýšeného krvného tlaku, a tiež k prevencii prípadných rizík vyplývajúcich z akútneho a opakovaného použitia USPIONS ako nosičov pri cielelom transporte liečiv alebo kontrastných látok.

Druh použitých zvierat a ich predbežný počet

Druh: Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*),

kmeň Wistar-Kyoto, $n=120$

Spontánne hypertenzný potkan (SHR), $n=120$

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

Potkanom bude implantovaný katéter do karotickej artérie na meranie krvného tlaku a druhý katéter do jugulárnej vény slúžiaci na podávanie látok. Katétre a podávané látky môžu spôsobiť diskomfort. Aplikovaný bude krátky stresogénny podnet vo forme max. 10s s prúdu vzduchu do vrchnej časti hlavy zo vzdialenosti cca 5-8 cm, ktorý je bezbolestný, ale vyvoláva akútnu zmenu krvného tlaku.

Predpokladaná úroveň krutosti:

rutinná starostlivosť a váženie - slabá krutosť

meranie krvného tlaku na chvoste - slabá krutosť

implantácia katétrov - stredná krutosť

akútne podanie sledovaných látok i.v. v anestézii - bez možnosti zotavenia

akútne podanie sledovaných látok i.v. u bdiacich jedincov (3x v priebehu 6 hodín) - stredná krutosť

opakované podanie sledovaných látok i.v. u bdiacich jedincov (3 dni, 1x denne) - stredná krutosť

akútny stres (air-jet), max. 3x - stredná krutosť

test otvoreného poľa - slabá krutosť

test vo vyvýšenom plusovom bludisku - slabá krutosť

usmrcovanie zvierat v I. etape, v anestézii - bez možnosti zotavenia

usmrcovanie zvierat v II. a III. etape, po uvedení do bezvedomia sa vykoná dekapitácia - slabá krutosť.

Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód

V súlade s § 12 Nariadením vlády SR č.377/2012 sme vykonali overovanie v registroch medzinárodne overených a uznávaných alternatívnych metód, či k plánovanému pokusu neexistujú alternatívne metódy, pri ktorých nemusí byť použité zvieratá. Nakoľko krvný tlak je prítomný iba u živých zvierat, nie je v súčasnosti možné vyšetrovať vplyvy exogénnych faktorov na reguláciu krvného tlaku bez ich použitia. Na použité metódy v pripravovanom experimente neboli nájdené žiadne alternatívne metódy, ktoré by sa dali uskutočniť bez použitia experimentálneho zvieratá. Vyhľadávalo sa najprv pomocou

vyhľadávača www.google.com (ktorý vyhľadáva vo všetkých dostupných textoch a databázach na internete, vrátane špecifických databáz) a hľadali výsledky pre nasledovné frázy:

- 1) alternatívne metódy zisťovania funkcie endotelu a srdca (alternative methods for determination of endothelial and heart function)
- 2) alternatívne metódy vyšetřovania regulácie krvného tlaku (alternative methods for determination of blood pressure regulation)
- 3) alternatívne metódy stresu u potkanov (alternative methods of stress in rats)

Ani vyhľadávanie uvedených fráz v špecifických databázach

www.pubmed.com , <http://www.iaapea.com>, <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>, <https://www.nal.usda.gov>,
<http://iccvam.niehs.nih.gov/>

nenašlo hľadané alternatívy (print screen su uvedené v prílohe Vyhľadavanie).

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat

V biomedicínskom výskume, rovnako teda aj výskume regulačných mechanizmov uplatňujúcich sa v regulácii krvného tlaku je zatiaľ použitie laboratórneho potkana nevyhnutné a nenahradiťelné. Dokumentuje to časť Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód. Pre sledovanie nami vytýčených cieľov nemáme inú možnosť ako použiť laboratórnych potkanov.

2. Redukcia počtu zvierat:

V experimentoch je zabezpečený optimálny počet experimentálnych zvierat na základe analýzy štatistickej sily. Maximálna využiteľnosť a vyťaženosť bude zabezpečená tým, že optimalizujeme počet meraní pri splnení cieľa pokusu.

3. Zjemnenie:

Bolestivosť chirurgických zákrokov (zavedenie katétrov) bude eliminovaná anestéziou s použitím izofluránu (3,5%) a predoperačnou analgéziou meloxicamom (2 mg/kg). Po skončení experimentu budú zvieratá humánne utratené: najskôr sa vystavia oxidu uhličitému v uzavretej nádobe až do straty vedomia; v hlbokom bezvedomí budú následne dekapitované.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Príloha 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Neuronálna plasticita u spevavcov

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3659/16-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): striatum, MRI, neurogenéza, spev, správanie

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:

- Zistiť, či variabilita piesne súvisí s mierou neurogenézy a s rýchlosťou obnovy bazálnych ganglií (BG) po poškodení.
- Sledovať vplyv manipulácie neurogenézy na regeneráciu mozgu a správanie.
- Preskúmať schopnosť samíc diskriminovať zmeny vokálneho prejavu samcov s poškodenými BG.
- Určiť časové a priestorové zmeny v mozgu počas regenerácie BG a axonálneho spojenia zo striata do talamu.
- Určiť schopnosť regenerácie mozgového spojenia zo striata do talamu. Zistiť, či je táto regenerácia nevyhnutná pre vznik kóktania u jedincov s poškodeným striatom.
- Stanoviť časový mechanizmus génovej aktivácie a prežívanie novovzniknutých neurónov počas regenerácie BG

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

Zvýšená neurogenéza v dôsledku lézie bola zistená u cicavcov aj u vtákov. U cicavcov však obnova striata po poškodení predstavuje maximálne 0,2-1 % v závislosti na type poškodených neurónov, zatiaľ čo podľa našich výsledkov je obnova Area X v striate spevavcov takmer úplná. Nahrádzovanie stratených alebo nefunkčných neurónov novými má potenciál v medicíne. Preto

štúdium mechanizmov tejto obnovy u spevavcov môže byť prínosom pri hľadaní stratégií novej obnovy mozgu po poškodení.

V projekte ďalej zistíme, či a kedy sa nové neuróny sa zapoja do neuronálnych okruhov sprostredkujúcich spev, kedy je obnovená dráha z Area X do talamu a tiež kedy je obnovená génová expresia v motorickej dráhe. Na modeli spevavcov určíme, či nové neuróny navodzujú zmeny v piesni, ktorými sú napríklad zmenená rýchlosť spevu a zvýšené opakovanie niektorých slabík pripomínajúce koktanie.

Nemenej dôležitou súčasťou tohoto projektu je sledovanie regenerácie mozgu po poškodení prostredníctvom MRI. Technika *in vivo* zobrazovania magnetickej rezonancie MRI poskytuje veľmi cenné a kvalitné anatomické a štrukturálne informácie v živých systémoch. V závislosti od zvolených parametrov nastavených pri meraní dokáže MRI zviditeľniť rôzne vlastnosti meraného tkaniva, napríklad štruktúru orgánov, v našom prípade mozgu, na základe rôznych vlastností vody v ňom obsiahnutej (T1 a T2 vážené obrazy), perfúziu a difúziu tekutín (perfúzne a difúzne vážené obrazy – PWI a DWI), spojenie nervových dráh (traktografia) a mnohé iné. Ďalšou výhodou magnetickej rezonancie je jej neinvazívna povaha. To umožňuje opakované merania v čase na tom istom jedincovi, čo predstavuje novú dimenziu štúdia neurogenézy, ktorá sa vyvíja v dlhom časovom intervale. Veľký prínos predstavuje výskum magnetickej rezonancie *in vivo* na zvieracích modeloch, pretože umožňuje rôzne opakované merania, a tým dáva možnosť sledovať vývoj namodelovaného patologického stavu (v našom prípade lézie vytvorenej pomocou neurotoxínu) ako aj účinky zvolenej terapie. Už len samotná možnosť kontinuálnej kontroly obnovy mozgu predstavuje prínos z hľadiska technického (jednoznačné určenie polohy a veľkosti lézie od začiatku experimentu) aj etického (menšie množstvo použitých jedincov). Navyše v spojení s behaviorálnou analýzou umožnia tieto výsledky potvrdiť alebo vyvrátiť hypotézu o funkcii nových neurónov v regenerovanej Area X spevavcov pre kontrolu plynulého vokálneho prejavu.

Ďalším prínosom projektu je, že určíme fyziologickú relevantnosť zmien v speve po poškodení striata spevavcov. Zistíme, či samice vedia odlišiť a preferujú niektorý typ piesne, či už pred alebo po poškodení striata. Zistíme tiež, či je ich výber ovplyvnený spevom otca.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

zebríčka červenozobá (*Taeniopygia guttata*), 57 samcov a 45 samíc, z toho 15 samíc bude slúžiť len na indukovanie spevu a nebudú experimentálne ovplyvnené;

36 samcov pestúnky japonskej (*Lonchura striata domestica*).

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

Nepriaznivý vplyv na zvieratá by mohla mať operácia alebo umelý spánok počas MRI meraní, aj keď podľa našej skúsenosti sa zebričky po operácii zotavujú pomerne rýchlo a niektoré jedince začnú spievať už po pár hodinách od operácie, čo je prejavom ich komfortu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Operácie a MRI budú vykonávané v celkovej anestéze, po ktorej zviera nadobudne vedomie. Podávanie BrdU bude i.m. a blokátor mitózy bude podávaný prostredníctvom kanyly do mozgu. Tieto postupy sa klasifikujú ako „slabé“ alebo „stredné“. Transkardiálna perfúzia sa klasifikuje

ako „bez možnosti zotavenia“. Dlhodobé umiestnenie samcov vo zvukotesných boxoch s prítomnosťou samičky 2 dni za týždeň klasifikujeme ako „stredne kruté“.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Metóda MRI umožňuje kontinuálne sledovanie lézie alebo obnovy mozgu u toho istého zvieraťa, a teda ich počet je v porovnaní s použitím len histologických metód značne redukovaný. Navrhované počty zvierat zohľadňujú možnú variabilitu vo výsledkoch a tiež umožňujú štatistické vyhodnotenie.

Keďže pokus je primárne zameraný na sledovanie obnovy striatálnej časti mozgu po poškodení s perspektívou výstupu na človeka, nie je možné realizovať pokus na bunkových kultúrach, pretože u týchto sa mozog nevyskytuje. Alternatívne nahradenie vtáčieho modelu nižšími stavovcami alebo cicavcami tiež nie je možné, nakoľko zvýšená miera neurogenézy a obnova striata u týchto modelov nebola doteraz pozorovaná.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počty zvierat sú minimalizované na najmenšiu možnú hranicu, aby mali získané údaje akceptovateľnú výpovednú hodnotu a bolo možné štatisticky ich vyhodnotiť.

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)

Zebrička červenozobá a v posledných rokoch aj pestúnka japonská sú výhodné pri štúdiu naučenej vokálnej komunikácie kvôli veľkosti, rýchlemu dospievaniu a rozmnožovaniu v zajatí, typu naučenej piesne, a tiež kvôli tomu, že sú u nich výborne popísané mozgové okruhy kontrolujúce spev. Ich použitie v experimentoch je preto jasnou výhodou v porovnaní s použitím iných druhov učiach sa vokálne komunikovať, ako sú veľryby alebo papagáje (hlodavce túto schopnosť nemajú). Zvieratá počas samotného pokusu nebudú vystavené strádaniu a utrpeniu. Vodu a potravu budú mať k dispozícii *ad libitum*. Budú chované v štandardných podmienkach. Počas operácie budú uspaté zmesou kyslíka a izofluránu, ktorý umožňuje rýchlejšie prebudenie

po operácii a aj lepšiu rekonvalescenciu než iné anestetiká. Počas operácie bude použitá výhrevná podložka udržiajúca konštantnú teplotu zvierat'a v anestéze. Po operácii budú jedinci umiestnení na pár hodín pod infračervené svetlo, ktoré umožní rýchlejšiu rekonvalescenciu. Pred poškodením kože na hlave použijeme Mesocain gél, pomocou ktorého môžeme znížiť celkovú dávku inhalačného anestetika. Pred transkardiálnou perfúziou bude zvieratám podaná letálna dávka izofluránu alebo tiopentalu, čím sa minimalizuje ich utrpenie na najnižšiu možnú mieru.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

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

Názov projektu: Farmakologické ovplyvnenie obranných mechanizmov dýchacích ciest, zápalu a remodelácie derivátmi flavonolov v podmienkach experimentálnej alergickej astmy.

Kľúčové slová: alergická astma, flavonoly, morin, kinematika cílií, ovalbumín, morčatá, glykokonjugáty

Účel projektu: Základný biomedicínsky výskum - 3663/16-221

Cieľ projektu: Hľadanie nových zdrojov látok v liečbe alergickej astmy je opodstatnené zvyšujúcou sa prevalenciou uvedeného ochorenia v populácii. Súčasná farmakoterapia je založená na podávaní látok s bronchodilatačným účinkom tzv. uvoľňovačov a látok s protizápalovým pôsobením tzv. kontrolórov astmy. Pričom kombinovaný protizápalový aj bronchodilatačný efekt majú len antagonisty leukotriénov a teofylín. Každá skupina antiastmatík má svoje limitácie použitia buď v samotnom mechanizme pôsobenia alebo výskyte nežiaducich účinkov. Z uvedeného dôvodu je potrebné sa orientovať na látky s komplexným antiastmatickým pôsobením, ktoré sú schopné ovplyvniť obranné mechanizmy, alergický zápal a zároveň aj remodeláciu dýchacích ciest. Z uvedeného dôvodu je cieľ našej experimentálnej práce zameraný na selekciu nových typov látok zo skupiny polyfenolov, u ktorých sa zameriame na vyšetrenie všetkých spomínaných farmakodynamických vlastností v podmienkach experimentálnej alergickej astmy. Najštudovanejším derivátom zo skupiny polyfenolov s protizápalovým pôsobením je v súčasnosti flavonol quercetín. Problémom sledovania účinku quercetínu je však jeho nízka biologická dostupnosť a na dosiahnutie účinku je nutné použiť vysoké dávky.

Prínos projektu: Projekt prinesie nové informácie o terapeutických možnostiach pri liečbe astmy. V našich experimentoch budú sledované viaceré deriváty zo skupiny flavonolov - morin, fisetin a kaemferol, u ktorých boli v predchádzajúcich experimentálnych prácach prezentované pozitívne účinky na aktivitu imunitných buniek počas alergického zápalu. V našich experimentoch zhodnotíme komplexne účinky sledovaných flavonolov po ich akútnom aj dlhodobom podaní na citlivosť kašľa, bronchokonstrikcie, kinematiku cílií respiračného traktu, zápal a remodeláciu v podmienkach experimentálnej alergickej astmy. Pričom na overenie účinku sledovaných flavonolov bude použitá široká paleta metód. Z obranných mechanizmov dýchacích ciest bude hodnotený vplyv na bronchokonstrikciu metódou in vitro aj in vivo, citlivosť kašľového reflexu metódou in vivo u bdelého zvierat'a. Zaujímavou časťou projektu je sledovania kinematiky cílií riasinkového epitelu dýchacích ciest originálnou „brushing metódou“ a snímaním pohybu cílií vysokorýchlostnou kamerou. Protizápalový efekt liečby bude potvrdený pomocou stanovenia buniek imunitného systému a zápalových cytokínov typických pre alergický zápal. Remodelácia dýchacích ciest bude po dlhodobej liečbe overená histologickými a imunohistochemickými vyšetreniami. Komplexy polyfenolických látok s rastlinnými polysacharidmi preukázali v našich predchádzajúcich experimentoch vynikajúce účinky na citlivosť obranných mechanizmov a alergický zápal dýchacích ciest. V poslednej časti projektu sa pokúsime vyselektovať najúčinnější derivát zo skupiny flavonolov schopný tlmiť kašeľ, bronchokonstrikciu, alergický zápal, znižovať remodeláciu a mierne stimulovať pohyb cílií. U vyselektovaného derivátu bude pripravený konjugát s rastlinným polysacharidom, kde sa predpokladá zlepšenie farmakokinetických vlastností a ďalších sledovaných účinkov v podmienkach alergickej astmy.

Druh použitých zvierat a ich počet: Charakter postupov nedáva možnosť dosiahnuť požadovaný, reprodukovateľný a validný výsledok inou dostupnou metódou bez použitia zvierat. Na uvedené postupy použijeme outbredné morčatá kmeň TRIK mužského pohlavia zbavené patogénov s hmotnosťou 200-350 g v celkovom počte **368 jedincov**.

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu: 320 zvierat bude senzitizedovaných, čo znamená opakovanú injekčnú a inhalačnú aplikáciu ovalbumínu. Injekčná aplikácia alergénu môže spôsobiť krátkodobú (30 s) strednú bolesť. Pri inhalačnom podaní budú denne krátkodobu (1 min) umiestnené v celotelovom bodypletyzmografe. Obmedzenie pohyblivosti môže pôsobiť ako stresogénny podnet. Pri vyšetrení reaktivity a kašľového reflexu budú zvieratá tiež umiestnené v bodypletyzmografe. Celková doba trvania vyšetrenia kašľa a reaktivity in vivo nepresiahne 10 min, pričom 136 zvierat v projekte je vystavených 2 takýmto vyšetreniam s odstupom 4 hodín a 184 zvierat iba raz. Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami ako aj medzinárodne zavedenými osvedčenými metódami v starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne a zodpovedné zaobchádzanie so zvieratami. Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované množstvom prác a prezentované na mnohých odborných fórach nielen doma ale aj v zahraničí. Z hľadiska dodržiavania zásad práce so zvieratami neboli voči nim vznesené žiadne námietky či už na odborných fórach v rámci diskusií alebo v oponentských posudkoch publikovaných článkov. Postupy sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov prispievajúcich k účelnej farmakoterapii.

Uplatnenie zásad 3R:

Nahradenie – v experimentoch použijeme na sledovanie zmien reaktivity dýchacích ciest a na sledovanie kinetiky cilií respiračného epitelu metódu in vitro. Na rozdiel od metódy in vivo sledujeme reaktivitu preparátov hladkých svalov dýchacích ciest a frekvenciu kmitania cilií na preparátoch pripravených zo zvierat a usmrteného humánnym spôsobom a nevystavujeme tak zviera priamemu pôsobeniu látok a bronchokonstrikčných mediátorov. Okrem toho nám táto metóda umožní pripraviť viac preparátov tak z trachey, čím bude možné použiť menej zvierat.

Zníženie - na získanie platných výsledkov použijeme len 8 zvierat v každej skupine, čo považujeme za optimálny počet tak z hľadiska reprodukovateľnosti ako aj získania nevyhnutných údajov a objektívne hodnotiteľných výsledkov. Menší počet zvierat by mohol spôsobiť výraznejšie pôsobenie interindividuálnych rozdielov s možnosťou spochybnenia objektívnosti výsledkov.

Zjemnenie (Refinement) – metódu in vitro považujeme pri tomto type postupu za vhodnú z toho dôvodu, že zviera nevystavujeme priamo pôsobeniu sledovaných látok a mediátorov, ktoré by mohli spôsobiť zvieratú za určitých podmienok diskomfort. Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami ako aj medzinárodne zavedenými osvedčenými metódami v starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne a zodpovedné zaobchádzanie so zvieratami. Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované množstvom prác a prezentované na mnohých odborných fórach nielen doma ale

aj v zahraničí. Z hľadiska dodržiavania zásad práce so zvieratami neboli voči nim vznesené žiadne námietky či už na odborných fórach v rámci diskusií alebo v oponentských posudkoch publikovaných článkov. Postupy sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov prispievajúcich k účelnej farmakoterapii.

Klasifikácia krutosti postupov podľa prílohy č. 4 nariadenia vlády:

Kontrolné nesenzitizované a experimentálne nesenzitizované skupiny zvierat (počet: 6 skupín, 48 zvierat) nebudú vystavené aplikácii injekcií, iba perorálnemu, resp. inhalačnému podanie látok – navrhovaná **slabá** krutosť.

Ostatné skupiny zvierat (celkový počet: 320 zvierat) budú vystavené opakovanému injekčnému podaniu ovalbumínu (i.p. a s.c) – navrhovaná **stredná** krutosť.

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

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

Antimikrobiálna účinnosť Elektro-chemicky aktivovanej vody na modeli bakteriálnej keratitídy u králikov

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3105/16 - 2216

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

Zápaly rohovky, králiky, antibakteriálny účinok

Účel projektu*: 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,

Ciele projektu a prínos z vykonaného projektu:

Zápal oka patrí medzi najčastejšie sa vyskytujúce ochorenia postihujúce oko a pomocné orgány oka. Zápaly očných spojoviek konjunktivitída vznikajú najčastejšie preniknutím a zanesením mikroorganizmov (baktérie, vírusy, plesne, parazity atď.) do spojovkového vaku. Choroboplodné zárodky sa v spojovkovom vaku rozmnožia a takto vyvolajú zápalovú reakciu na spojovkách. Tento typ konjunktivitída sa zvyčajne lieči antibiotickými očnými kvapkami alebo masťami. Pri nedostatočnej resp. nesprávnej liečbe ochorenie môže prejsť hlbšie s vývojom keratitída.

Aj keď sú dostupné lieky, je nevyhnutné študovať ďalšie možnosti liečby, a to najmä v prípade závažných rekurentných ochorení. Takouto kandidátnou látkou je i „Elektrochemicky aktivovaná voda“(EAW), pripravovaná originálnou patentovanou technológiou firmy AZAD so zámerom terapeutického využitia.. Účinnými zložkami EAW je HOCl/NaClO (pH 6-7,8).

Keďže nie sú dostupné *in vitro* metódy, ktoré by poskytovali reálny a komplexný obraz všetkých interakcií medzi infekčným agens a hostiteľom v procese vyvolania ochorenia, je nevyhnutné v rámci predklinického testovania použiť zvierací model. Veľmi veľa látok účinných *in vitro* neboli efektívne v podmienkach *in vivo*. Potvrdenie efektu *in vivo* je preto v súlade s EU legislatívou (ICH Topic M 3 (R2) CPMP/ICH/286/95 Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals) podmienkou pre podanie žiadosti o prvé podanie človeku.

Najčastejším modelom pre štúdium bakteriálnej keratitída je Novozélandský králik. Zvieratám je po anestézii do rohovky (intrastromálne) aplikovaný infekčný agens. Rohovka je injikovaná malým objemom suspenzie mikroorganizmov. Následne sa sledujú účinky testovanej látky.

V *in vitro* experimentoch sme testovali antimikrobiálnu aktivitu prípravku Elektro chemicky aktivovaná voda na zbierkových a klinických kmeňoch. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že Elektro chemicky aktivovaná voda by sa mohla používať na liečbu mikrobiálnych infekcií oka.

Cieľom tejto predklinickej štúdie je otestovať terapeutický účinok Elektro-chemicky aktivovanej vody v liečbe keratitídy vyvolanej *in vivo* na zvieracom modeli.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Novozélandský biely králik, samci alebo samice -20 ks

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

Plánované experimenty: Aplikácia skúšaného liečiva patrí do kategórie „slabé“ krutosti postupov, keďže bude aplikovaná lokálne po jednej kvapke (45 µl) do spojivkového vaku. Intramuskulárne podanie anestézie je tiež neinvazívny zásah do organizmu. Jediný invazívnejší zákrok, ktorý zvieratá podstúpia je navodenie infekcie - intrastromálna aplikácia, tento úkon bude robený v anestézii avšak a preto by tento úkon nemal žiadnym závažným spôsobom zhoršiť zdravotný stav zvierat a preto je klasifikovaný do kategórie krutosti postupov „slabé“.

Ani v jednom štádiu pokusu nebudú mať zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prísun potravy a vody. Zvieratá budú umiestnené v klietkach (1 ks v jednej klietke) označované budú individuálnymi záznamovými kartami. Na konci experimentov budú zvieratá humánne usmrtené.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov, postupy ktoré budeme vykonávať na zvieratách v plánovaných pokusoch zaradíme do kategórie „slabé“.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Infekčné ochorenia očí nezahŕňajú iba bakteriálnu kolonizáciu a faktory virulencie, ale tiež odpoveď organizmu na patogén. Táto interakcia medzi baktériami a hostiteľom je dôvodom nevyhnutnosti použitia zvieracích modelov pre štúdium očných infekcií a ich efektívnej liečby a práve preto sa v tomto prípade nedá „*in vivo*“ nahradiť bunkovými kultúrami.

Podľa zoznamu registra alternatívnych metód z European Centre for the Validation of Alternative Methods:

<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/@@search?SearchableText=keratitis+model>

testovanie účinku ako súčasť predklinického hodnotenia **nie je možné** bez modelového systému a je nevyhnutné použiť vhodný zvierací model. V tomto prípade je možné použiť králika.

2. Redukcia počtu zvierat:

Pre štatistickú reprodukovateľnosť výsledkov a na základe našich dlhoročných skúseností je potrebné, aby každá vyšetrovaná skupina obsahovala 5 ks králikov. Plánovaný počet zvierat (20 ks) je konečný a zahrňa všetky variácie postupov.

Základný (minimálny) dizajn postupov: Budeme mať štyri základné skupiny králikov: 1) králiky infikované kmeňom *Pseudomonas aeruginosa*, 2) králiky infikované a liečené testovanou látkou Elektro-chemicky aktivovanou vodou, 3) králiky infikované a liečené

referenčným produktom UNIFLOX a 4) skupinu kontrolných, neinfikovaných králikov, ktorým bude aplikovaná testovaná látka. Každá skupina bude zložená z 5 králikov.

3. Zjemnenie:

Každodennú starostlivosť o zvieratá v pokusoch bude vykonávať školený personál - pracovníci pokusného zariadenia.

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov, postupy ktoré budeme vykonávať na zvieratách v plánovaných pokusoch zaraďujeme do kategórie „slabé“:

Navodenie infekcie zaraďujeme do kategórie krutosti postupov „slabé“, keďže králiky budú infikované intrastromálne v anestézii. Aplikácia skúšaného liečiva patrí tiež do kategórie „slabé“ krutosti postupov, keďže bude aplikovaná lokálne po jednej kvapke (45 µl) do spojivkového vaku. Intramuskulárne podanie anestézie je tiež neinvazívny zásah do organizmu. Spomenutým invazívnym a neinvazívnym postupom sa pre úspešné splnenie cieľov navrhovanej štúdie nedá vyhnúť, ale sú minimalizované na najnižšiu možnú mieru tak, aby zvieratá neutrpeli žiadnu zdravotnú, fyzickú ani psychickú ujmu a preto je klasifikovaný do kategórie krutosti postupov „slabé“.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Názov projektu:

„Vplyv prenatalného a perinatálneho pôsobenia endokrinných disruptorov na neurobehaviorálnu charakteristiku takto ovplyvneného potomstva potkana laboratórneho“

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3426/16 - 221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

endokrinné disruptory, pre- a perinatálne pôsobenie, neurobehaviorálna charakteristika potomstva, autizmus, potkan laboratórny

Účel projektu:

Základný výskum

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

Cieľ projektu:

- sledovať vplyv pre- a perinatálneho vystavenia endokrinným disruptorom reprezentovaným zmesou troch v prostredí sa najčastejšie vyskytujúcich ftalátov na neurobehaviorálnu charakteristiku (so zreteľom na neurobehaviorálne zmeny súvisiace s autizmom) takto ovplyvneného potomstva potkana laboratórneho.

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

Endokrinné disruptory (ED) sú exogénne látky, ktoré účinkujú ako hormóny a narúšajú fyziologické funkcie endogénnych hormónov. Tieto látky sa len z malej časti nachádzajú v prírode prirodzene. Veľká väčšina je produkovaná ľudskou činnosťou. Medzi tieto látky patria aj ftaláty, využívané ako plastifikátory pri výrobe polyvinylchloridu, ktorý sa vo veľkom využíva v stavebníctve, potravinárstve aj zdravotníctve. V bežnom živote sa s nimi človek stretáva pri konzumácii jedla a nápojov, pri používaní prostriedkov osobnej hygieny. Ku kontaktu s nimi však môže prichádzať už v rannom detstve - pri hre s plastovými hračkami, resp. prostredníctvom matky ešte v čase pred narodením. Viaceré epidemiologické štúdie poukazujú na skutočnosť, že expozícia tehotných žien týmto látkam a následná vyššia gestačná koncentrácia ich metabolitov koreluje s výskytom oneskoreného mentálneho a fyzického vývinu, abnormálneho správania a neurodegeneratívnych ochorení.

V súčasnosti sa čoraz častejšie dostáva do popredia otázka existencie možného vzťahu medzi ftalátmi a autizmom. Spojitosť medzi pôsobením ED v prenatalnom období a výskytom autizmu v postnatálnom období je však z etických dôvodov možné testovať iba na animálnych modeloch. Preto sme sa v našom projekte sústredili na výskum vplyvu pre- a perinatálneho pôsobenia ED reprezentovaných trojicou najčastejšie sa v prostredí vyskytujúcich ftalátov na neurobehaviorálnu charakteristiku takto ovplyvneného potomstva na modeli potkana laboratórneho.

Očakávame, že v dôsledku adaptácie na zmenené intrauterinné podmienky príde u takto ovplyvneného potomstva k „preprogramovaniu“, čoho dôsledkom budú aj neurobehaviorálne zmeny súvisiace s výskytom autistického spektra. Očakávame, že ED ovplyvnené potomstvo bude vykazovať odchýlky v neuromotorickom, senzoryckom a reflexnom vývine, ďalej zníženú sociabilitu, komunikačný deficit a prejavia sa u neho aj prvky repetitívneho správania, zmeny v emocionálnosti, ako aj prvky anxiety a depresii podobného správania. Taktiež očakávame určité zmeny v motorike resp. exploračnom správaní. Očakávame tiež, že bude vykazovať zmeny vo vybraných neurotransmiteroch a ich receptoroch a tiež v systéme neuronálnej inhibície, ktoré budú pripomínať zmeny zdokumentované u autistickej populácie a tiež u animálnych modelov autizmu. Keďže ED narušajú fyziologické funkcie endogénnych hormónov očakávame, že nimi prenatálne ovplyvnené potomstvo bude vykazovať skrátenie anogenitálnej vzdialenosti, ako aj zvýšenú hodnotu pomeru druhého a štvrtého prsta - indikátormi ktoré odrážajú mieru prenatálneho vystavenia testosterónu .

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V projekte plánujeme použiť potkany laboratórne (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar, pričom rodičovskú generáciu bude tvoriť 7 kontrolných (K) a 7 endokrinnými disruptormi počas gravidity a tesne po pôrode ovplyvnených (ED) samíc a 7 samcov. Ich potomstvo bude optimalizované na 8 mláďat (4 samice a 4 samce)/vrh. Celkovo teda plánujeme pracovať s 56 K a 56 ED mláďatami.

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

Pri realizácii pozorovaní správania v domácom prostredí a tiež pri realizácii behaviorálnych testov s výraznejšou ujmom na základe skúseností nepočítame, keďže vo všetkých prípadoch pôjde o neinvazívne metodické prístupy. Za neinvazívne tiež považujeme meranie vybraných morfometrických parametrov. Čo sa týka odberu biologických vzoriek bude realizovaný až po humánnom usmrtení zvierat dekapitáciou v celkovej anestézii vyvolanej inhaláciou izofluránu. Navrhované postupy sú z hľadiska krutosti zaradované do kategórie „slabé“ a iba v dvoch prípadoch do kategórie „stredné“, pričom v oboch prípadoch budú zvieratá vystavené tomuto postupu iba krátkodobo, po dobu 5-10 min.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Všetky nami realizované pozorovania, behaviorálne testy, ako aj metodické prístupy umožňujúce meranie vybraných morfometrických parametrov spadajú z hľadiska krutosti do kategórie slabé/stredné (viď tabuľka).

Postup	Stupeň krutosti
individuálne značenie pomocou kožu-neiritujúceho značkovacieho pera/fixky	slabý
párenie	slabý
vaginálne výtery	slabý
aplikácie zmesi ftalátov gravidným matkám	slabý
váženie a manipulácia so zvieratami	slabý
monitorovanie otvárania očí	slabý

monitorovanie odliepania ušnic	slabý
monitorovanie otváranie ušného kanála	slabý
monitorovanie zostupovania semeníkov	slabý
monitorovanie otvárania vaginálneho lúmenu a osrstenia	slabý
monitorovanie schopnosti negatívnej geotaxie	slabý
monitorovanie schopnosti prevrátenia sa z chrbta na bruško	slabý
monitorovanie schopnosti dynamického rightingu	slabý
monitorovanie sily úchopu predných končatín	slabý
monitorovanie akustického preľaknutia	slabý
monitorovanie schopnosti olfaktorickej orientácie	slabý
priame pozorovanie mláďat v domácom prostredí	slabý
test párovej interakcie	slabý
stanovenie zmien v emocionálnosti na základe mimických výrazových prostriedkov (tzv. RGS skóre)	stredný
test otvoreného poľa	slabý
test vyvýšeného bludiska tvaru plus	slabý
test núteného plávania	stredný
test preferencie sacharózy	slabý
stanovenie pomeru druhého a štvrtého prsta	slabý
meranie anogenitálnej vzdialenosti	slabý
dekapitácia v celkovej anestézii vyvolanej inhaláciou izofluránu	bez možnosti zotavenia

b) preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat (Replacement; Zdôvodnenie použitia zvierat v projekte, zdôvodnenie prečo sa nemôže použiť alternatívna metóda bez použitia zvierat)

Keďže projekt je primárne zameraný na sledovanie s autistickým spektrom súvisiacich neurobehaviorálnych zmien vyvolaných pre- a perinatálnym vystavením ED s perspektívou výstupu uplatnenia poznatkov u človeka, nie je možné projekt realizovať na bunkových kultúrach, ktoré štúdium mechanizmov týchto zmien neumožňujú. Alternatívna náhrada modelu potkana nižšími stavovcami taktiež nie je možná, nakoľko v odbornej biomedicínskej literatúre venujúcej sa skúmanej problematike je potkan používaný ako akceptovateľná náhrada pri fyziologickom a behaviorálnom testovaní s akceptovanou extrapoláciou nameraných údajov na človeka.

Pri výskume nami prezentovaného charakteru nie je možné ani absolútne a ani čiastočné nahradenie zvolenej skupiny/druhu laboratórneho zvieratá. Nemožno ho realizovať ani na bunkových kultúrach a ani za využitia počítačovej simulácie. Taktiež v ňom nemožno použiť iný, systematicky nižšie postavený druh zvieratá.

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

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

Celý projekt je zameraný na nahradzovanie a obmedzenie počtu zvierat použitých v experimentoch. Počty zvierat sú minimalizované na najmenšiu možnú hranicu tak, aby získané údaje mohli byť štatisticky spracované a mali serióznú výpovednú hodnotu.

3. Zjemnenie (Refinement; 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)

Zvieratá nebudú počas realizácie postupov vystavené strádaniu ani utrpeniu. Vodu a potravu budú mať k dispozícii *ad libitum*. Budú chované v štandardných podmienkach. Využitie metodické prístupy budú neinvazívne a k odberu biologických vzoriek príde až po humánnom usmrtení zvierat na konci projektu. Utrpenie zvierat bude minimalizované dodržiavaním každej z piatich slobôd uvádzaných pri definícii zásad welfare zvierat.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie