

PRÍLOHA 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Imunomodulačný a protinádorový účinok probiotických baktérií rodu *Lactobacillus* v kolorektálnej karcinogéze

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4058/16-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): probiotiká, *Lactobacillus*, kolorektálna karcinogéza, imunomodulácia

Účel projektu: Základný výskum

Ciele projektu:

Slovensko je jednou z piatich krajín sveta s najvyššou incidenciou a mortalitou kolorektálneho karcinómu. Diéta západného typu, charakteristická vysokým príjmom červeného a spracovaného mäsa a nízkym príjmom ovocia, zeleniny a vlákniny významne narúša bakteriálnu rovnováhu črevného mikrobiotického prostredia v prospech patogénnych druhov baktérií, ktorých toxické a mutagénne metabolity poškodzujú prirodzenú bariérovú funkciu výstelky čreva. Modulácia črevnej mikrobioty pravidelnou konzumáciou probiotických baktérií sa ukazuje ako jedna z finančne nenáročných a účinných možností prevencie kolorektálneho karcinómu. Cieľom projektu je štúdium vlastností kombinácie šiestich kmeňov druhu *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus salivarius* vo forme nového probiotického prípravku s potenciálnym využitím na fermentáciu potravín v humánnej výžive. V in vivo modeli chemicky indukovanej karcinogenézy kolorekta bude otestovaný preventívny efekt probiotika, vyhodnotený bude nádorový rast, parametre imunitnej odpovede v krvi, nádorovom tkanive a vybrané biochemické ukazovatele.

Prínos z vykonaného projektu:

Baktérie mliečneho kvasenia sa vyskytujú vo fermentovaných výrobkoch a funkčných potravinách, napr. jogurtoch, syroch, kvasenej zelenine, rybách a cereálnych výrobkoch, ale sú dostupné aj ako potravinové doplnky. Mechanizmy účinku probiotík v kolorektálnej karcinogéze v súčasnosti nie sú dostatočne preskúmané a výrazne závisia od použitého druhu resp. kmeňa probiotických baktérií, z čoho vyplýva nevyhnutnosť detailného testovania probiotických prípravkov. Prínosom predkladaného projektu je testovanie novo vyvinutej kombinácie probiotických kmeňov, ktorá by mohla byť v budúcnosti využiteľná na fermentáciu potravín v širokom meradle, čo by mohlo prispieť k prevencii nádorov kolorekta.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

laboratórne potkany, kmeň Sprague-Dawley, spolu 188 zvierat

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

Bežnú manipuláciu so zvieratami vrátane váženia je možné zaradiť nanajvýš do slabého stupňa krutosti, zvieratá si na manipulačné techniky rýchlo privykajú. Perorálna aplikácia probiotika nemá na zvieratá dlhodobejší nepriaznivý vplyv. Opakované injekčné podanie chemokarcinogénu vyvoláva iba krátkodobý diskomfort, keďže v postupe budú použité inzulinové striekačky s tenkou ihlou. Tieto dva postupy preto možno zaradiť do kategórie strednej krutosti. V pokročilejších štádiach vývinu nádorov sa môžu u zvierat prejavovať poškodenia tráviaceho traktu – napr. hnačky, krvácanie, úbytok hmotnosti, ktoré budú ihneď riešené v spolupráci so zmluvným veterinárnym lekárom. Tieto stavy môžu byť spojené s bolestivosťou, preto ich možno zaradiť do kategórie krutej krutosti.

Predpokladaná úroveň krutosti:

1. Stupeň krutosti: slabý

- váženie zvierat

2. Stupeň krutosti: stredný

- opakovaná s.c. alebo i.p. aplikácia chemokarcinogénu
- opakované p.o. podávanie laktobacilov

3. Stupeň krutosti: krutý

- rast kolorektálnych nádorov

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat

Nahradenie experimentálnych zvierat nie je možné vzhľadom na charakter experimentu. Imunitnú odpoveď organizmu na vznik nádoru je možné skúmať len v podmienkach *in vivo*, za účasti ďalších kľúčových regulačných systémov – nervového a hormonálneho. Laboratórny potkan je fylogeneticky najnižším druhom vhodným pre takéto typy experimentov. Chemicky indukované nádory kolorekta u mnohých kmeňov myší sa vyznačujú nižšou incidenciou a dlhšou latenčnou dobou, preto je potkan vhodnejším modelovým zvieratom pri štúdiu kolorektálnej karcinogenézy ako myš.

2. Redukcia počtu zvierat

Počet zvierat v postupe bol zvolený tak, aby sme dosiahli dostatočnú masu nádorového tkaniva v každej experimentálnej skupine pre všetky metódy vyšetrenia a súčasne aby bolo možné výsledky vyhodnotiť vhodnými štatistickými metódami. V modeloch chemicky indukovanej karcinogenézy je incidencia zvyčajne nižšia ako 100 %, preto je potrebné použiť uvedené počty zvierat. Ďalšie znižovanie počtu zvierat by ohrozilo dosiahnutie hodnoverných výsledkov projektu.

3. Zjemnenie

V priebehu pokusu bude utrpenie zvierat minimalizované na najnižšiu možnú mieru. Zdravotný stav a prejavy bolesti budú denne monitorované. V prípade známkov ťažkého poškodenia zdravia spojeného s bolesťou, napr. výrazné zníženie lokomočnej aktivity, krvácanie z tráviaceho traktu, úbytok hmotnosti väčší ako 10 %, známky distenzie čriev, zúžená čiarkovitá stolica svedčiaca o zúžení lúmenu čreva nádorom, mimické známky bolesti a pod., bude kontaktovaný veterinárny lekár, zvieratá budú vyradené z pokusu a humánne usmrtené. Objavenie sa niektorého z týchto príznakov u aspoň troch zvierat v skupine bude považované za „human endpoint“ projektu, v tomto bode bude pokus ukončený. Takýmto spôsobom zamedzíme úhynu zvierat v dôsledku rozvinutia nádorového procesu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno

Netechnické zhrnutie projektu č. 27

Názov projektu:

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

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu pokusu, predpokladaná ujma a prínosy: 4062/16-221

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

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

Pre porovnanie s vyvíjanou očkovacou látkou budeme pri skúškach používať 2 skupiny kontrolných zvierat: zvieratá vakcinované nemodifikovanou celobunečnou vakcínou proti DTP a zvieratá, ktorým bude podaný fosfátom purifikovaný fyziologický roztok- PBS.

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

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

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

Prínosy z vykonaného projektu:

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

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

Predpokladaná ujma na použité zvieratá v rámci vykonaného postupu:

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

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná – *kruť*

Počet a druh pokusných zvierat

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

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

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

Spartné posúdenie projektu: áno, do 30. 3. 2018

Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód, či k plánovanému postupu neexistuje alternatívna metóda bez použitia živých zvierat

Kľúčové slová: rabbit, pyrogenicity, logger, bordetela pertussis, body temperature

NICEATM-ICCVAM: 20.9.2016

EURL-ECVAM: 22.9.2016

Existujú alternatívne metódy, ktoré však nie sú plnohodnotné a nemôžu nahradiť jedinečnosť a individualitu živého organizmu. Animálne modely sú nevyhnutné na potvrdenie výsledkov prítomnosti, či neprítomnosti toxicity liečiva, jeho areaktogenity, imunogenicity a následnej aplikácie týchto prípravkov v klinickej praxi.

Využitie zvieracích modelov významne napomáha v pochopení účinnosti a apyrogénosti humánnej vakcíny celobunkovej proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu pri vývoji nových preventívnych postupov a následnom využití u ľudí.

Príloha II

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

Názov projektu: 4091/16-221

Ochrana srdca v situáciách zvýšenej produkcie voľných kyslíkových radikálov: radiačné a reperfúzne poškodenie.

Kľúčové slová v projekte:

radiačné poškodenie, prevencia, srdce a cievy, mechanizmy poškodenia, ischemia, reperfúzia, voľné kyslíkové radikály, molekulárny vodík, mitigátory radiačného poškodenia

Účel projektu: Základný výskum.

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

Ionizujúce žiarenie pôsobí priamo na nukleové kyseliny (NK) buniek, alebo nepriamo cez tvorbu voľných kyslíkových radikálov, ktoré potom poškodzujú jednotlivé orgány buniek alebo ich NK, čo vedie k apoptóze buniek. Tvorba voľných kyslíkových radikálov, ktoré okrem signálizačnej funkcie, majú pri vyšších koncentráciách toxický vplyv na všetky súčasti srdca a ciev je spoločným menovateľom nielen ionizujúceho žiarenia a zápalu, ale i ischemického a reperfúzneho poškodenia. Preto výskum v tejto oblasti, a nájdenie celkom nových vhodných látok, ktoré môžu pozitívne ovplyvniť následky nadmernej tvorby voľných kyslíkových radikálov na kardiovaskulárny systém, môže výrazne zlepšiť kvalitu života onkologických i kardiologických pacientov.

Cieľom projektu je hľadať vhodné látky, ktoré zabránia pôsobeniu nadprodukcie voľných radikálov a zasiahnuť do mechanizmov, ktoré poškodenie spôsobujú. Na dosiahnutie cieľov plánujeme na seba nadväzujúce etapy:

- upresniť mechanizmy poškodenia radiáciou najnovšími dostupnými metodikami
- určiť miesta možného zásahu do mechanizmu
- selekcia látok, ktoré znižujú negatívny efekt radiácie
- zníženie poškodenia zdravého tkaniva a následkov poškodenia vyselektovanými liekmi
- zníženie radiačného poškodenia a nadmernej tvorby voľných radikálov aplikáciou vodíka
- využitie molekulového vodíka na scavengovanie voľných kyslíkových radikálov v situáciách ich zvýšenej tvorby (radiačné poškodenie a I/R poškodenie)
- ochrana zdravého tkaniva pred radiačným poškodením pri rádioterapii
- bezpečnejšia reperfúzia ischemického myokardu aplikáciou vodíka
- testovanie najvhodnejšej aplikácie molekulárneho vodíka pre potreby praktického použitia v klinike
- zlepšenie života onkologických a kardiologických pacientov a osôb vystavených kozmickému žiareniu

V postupe nadväzujeme na náš predchádzajúci projekt schválený ŠVPS SR. Zdravým potkanom sa bude jednorazovo aplikovať dávka ionizujúceho žiarenia (25 Gy a 10 Gy) do oblasti mediastína po dobu asi 2-5 minút v celkovej anestéze. V ďalšej časti experimentov budeme potkanom podávať vybrané liečivá (Atorvastatín, Aspirín, Tadalafíl, Enbrel a vodu

obohatenú molekulovým vodíkom) po dobu 6 týždňov od ožiarenia. Počas experimentu experimentálne zvieratá prejavujú záujem o krmivo a sú aktívne. Liečivá budú podávané v dávke podľa oficiálneho dávkovania pre ľudí, prepočítané na váhu potkanov, vo forme roztoku, nakvapkané na piškótu (Aspirín, Tadalafil) rozpustené v alkohole, po jeho odparení nakvapkané na piškótu (Atorvastatín), injekčne (Enbrel) a *per os* gavážovaním do žalúdka (voda obohatená o molekulový vodík). Atorvastatín, Aspirín, Tadalafil budú podávané 2x denne počas šiestich týždňov, Enbrel 2x za týždeň po dobu 2 týždňov a voda obohatená o molekulový vodík 3x denne 2-3 týždne.

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 zvieratom je možné ich zaradiť do kategórie krutosti „stredná krutosť“.

V pokuse použijeme 544 laboratórnych potkanov samcov kmeňa Wistar s hmotnosťou 220-250 g.

Štúdium mechanizmov, ovplyvňujúcich poškodenie srdca ionizujúcim žiarením prispeje k detailnejšiemu poznaniu mechanizmov prispievajúcich k vzniku ochorení srdca a ciev spôsobených ožiarením. Hľadanie možností ochrany funkcie srdca a ciev s novými prírodnými substanciami s protizápalovými vlastnosťami je stále aktuálne a biotechnologické prístupy môžu nájsť uplatnenie aj v klinickej praxi.

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, 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.

1. Altweb: Alternatives to Animal Testing

4 odkazy nepoužiteľné pre našu problematiku (<http://altweb.jhsph.edu/>)

2. ALTBIB – Bibliography on Alternatives to Animal Testing

žiadny odkaz použiteľný pre našu problematiku (<http://toxnet.nlm.nih.gov/altbib.html>)

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.html>)

5. EUSAAT – European Society for Alternatives to Animal Testing

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

6. European Centre for the Validation of Alternative Methods

7 odkazov nepoužiteľných pre našu problematiku (<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>)

Nakoľko v našich experimentoch používame čiastočnú simuláciu rádioterapie aplikovanej do hrudnej oblasti (mediastínium), kde sa do odpovede organizmu zapájajú viaceré tkanivá, typy buniek a obranné mechanizmy, nie je možné nahradiť animálny model alternatívnymi metódami, ktoré by dostatočne nahradili podmienky v *in vivo* modeloch.

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 Enbrelu aj anestetika sa budú používať sterilné ihly a so zvieratami sa bude šetrne a ohľaduplne zaobchádzať. Usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii, vyvolanej tiopentalom 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, 28. 09. 2016

Príloha 2: Netechnické zhrnutie
Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Zmrazovanie potkaních embryí - 4429/16-227

Podrobný účel postupu:

Cieľom predkladaného projektu je vytvorenie banky embryí ako zdroja udržateľnosti transgénnych línii. Projekt sa bude vykonávať vo viacerých na seba naväzujúcich fázach. V prvej fáze projektu sa budú z dárkyň izolovať embryá v štádiu blastocysty výplachom maternicových rohov. Tieto budú následne zmrazované a dlhodobo uchovávané pre budúce použitie. Za účelom ich získania bude použitých 300-500 samíc, 150 samíc z každej potkanej línie v jednotlivých čiastkových projektoch. Na 4,5 deň od pripustenia so samcami sa humánne usmrtia cervikálnou dislokáciou. Po otvorení brušnej dutiny sa postupne izolujú a vyplachujú maternicové rohy v médiu pre to určenom. Získané embryá sa zmrazia a uchovávajú v tekutom dusíku. V prípade potreby budú rozmrazené a následne použité na prenos do pseudográvidných samíc.

V druhej fáze projektu sa zameriame na in vitro a in vivo hodnotenie viability embryí. V rôznych časových úsekoch budeme embryá rozmrazovať a hodnotiť mikroskopicky percento prežívateľnosti (in vitro hodnotenie). Životaschopné embryá sa budú následne implantovať do príjemkýň a na základe percentuálnej úspešnosti ich zabrezávania sa zhodnotí in vivo viabilita embryí. Pre účely implantácie si v prvom kroku pripravíme sterilných samcov kastrovaných v celkovej anestézii podviazaním semenovodov. Tie sa začnú využívať až 3 týždne po operácii.

V pokuse sa použije 50-100 príjemkýň, v počte zhruba 5 samíc v každom čiastkovom pokuse. Pohlavne dospelé samice sa budú pripúšťať so sterilnými samcami na dosiahnutie pseudográvidity a použijú na príjem revitalizovaných embryí. Prenos embryí sa vykoná v celkovej anestézii implantáciou do rohu maternice. Zvieratám sa poskytne pooperačná starostlivosť formou aplikácie analgetík. Kryozmrazovanie sa bude vykonávať len po dobu získania a uchovania dostatočného množstva viabilných embryí schopných vývoja v životaschopné potomstvo.

Narodeným mláďatám sa odoberú vzorky z chvosta na genotypizáciu pre určenie transgénnych zvierat. Po ich odstave sa matky humánne usmrtia.

V priebehu pokusu bude všetkým zvieratám venovaná štandardná veterinárna starostlivosť.

V prípade ochorenia budú zvieratá po dohode s veterinárnym lekárom z pokusu vylúčené a humánne usmrtené. Zvieratám sa nesmie v priebehu pokusu spôsobovať zbytočná bolesť, stres a utrpenie. Všetky bolestivé zákroky sa vykonávajú v celkovej anestézii. Zvieratá musia byť na začiatku každého experimentu aklimatizované na nové podmienky.

Všetkým zvieratám, s ktorými sa bude manipulovať, bude venovaná potrebná starostlivosť a budú umiestnené v súlade s požiadavkami uvedenými v nariadení vlády SR č. 23/2009 Z. z.

Projekt prebehne v niekoľkých čiastkových experimentoch:

1. Fáza projektu: získavanie a zmrazovanie embryí:

• **Izolácia embryí z maternicových rohov dárkyň – transgénne línie**

- počet zvierat v celom pokuse:
- 150 samíc (dárkyň) SHR 72
- 150-200 samíc (dárkyň) SHR 24
- 150 samíc (dárkyň) W 72
- počet opakujúcich sa čiastkových pokusov: 50

Samice sa na 4,5 deň od pripustenia humánne usmrtia. Po otvorení brušnej dutiny sa postupne izolujú a vyplachujú rohy maternice v médiu pre to určenom. Získané embryá sú zmrazované a dlhodobo uchovávané v tekutom dusíku. V prípade potreby sú revitalizované a následne prenesené do reprodukčného traktu recipientiek.

2. Fáza projektu: in vitro a in vivo hodnotenie viability embryí

• Príprava sterilných samcov

- počet použitých zvierat: 30 samcov z kmeňa Sprague Dawley
- počet opakujúcich sa čiastkových pokusov: 3-5
- počet zvierat v čiastkových pokusoch: 6-10 samcov

Samci vo veku 8 týždňov sa uvedú do celkovej anestézie. Cez drobný rez v stredovej línii brušnej dutiny sa postupne povytiahnu oba semenovody a následne podviažu. Po sutúre rany sa zviera ponechá v čistej klietke. V deň operácie a počas nasledujúcich dvoch dní sa zvieratám intramuskulárne podávajú analgetiká (rimadyl). V prípade vážnych zdravotných komplikácií sa zviera z experimentu vylúči a humánne sa usmrtí.

• Prijemkyne embryí

- počet zvierat v celom pokuse: 50-100 samičiek príjemkýň z kmeňa Sprague Dawley/Long Evans
- počet opakujúcich sa čiastkových pokusov: 20
- počet zvierat v čiastkových pokusoch: 5-10 samičiek

Pseudogavidné samice sú na 3,5 deň po koite použité ako recipientky revitalizovaných embryí. Po uvedení do celkovej anestézie a po obnažení materničného rohu, sú embryá implantované do reprodukčného traktu náhradnej matky. Po transfere je samica umiestnená do čistej klietky a sledovaná počas celého obdobia gravidity. V prípade vážnych zdravotných komplikácií sa zviera vyradí z experimentu a humánne sa usmrtí. Matky sa po odstave humánne usmrtia.

• Odber vzoriek na genotypizáciu

Vo veku 10-20 dní sa mláďatám odstrihne cca 0,3-0,5 mm tkaniva z chvosta, ktoré sa vloží do označenej skúmavky a ponechá v mrazničke až do doby, kým sa začne spracovávať.

Na základe výsledkov genotypizácie sa mláďatá rozdelia na pozitívne (majú integrovaný nový gén) a negatívne, z ktorých je väčšina z chovu vyradená.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Animálne modely majú nezastupiteľné postavenie vo výskume ľudských neurodegeneračných ochorení. Predstavujú zjednodušené modely neurodegeneratívnych zmien, ktoré nám pomáhajú pochopiť a objasniť patologické mechanizmy ochorenia. S nedávnym progresom v oblasti genetických technológií rastie počet animálnych modelov exponenciálnym radom, čím sa zvyšujú aj požiadavky na ich chov a ustajnenie. Produkcia transgénnych zvierat v takomto rozsahu nie je možná bez organizácie kryobáňk embryí. Zmrazovanie línii v embryonálnom štádiu predstavuje ekonomickú a bezpečnú alternatívu ku chovným líniiam a zároveň poskytuje ochranu zvierat pred mikrobiálnou kontamináciou a spontánnymi genetickými zmenami. Kryozmrazovanie je zdrojom trvalej udržateľnosti transgénnych línii a je tiež v súlade so zásadami 3R: zjemnenie, redukcia, nahradenie.

Embryo transfer predstavuje „zlatý štandard“ revitalizácii zmrazených línii a v kombinácii s rederivačným programom umožňuje produkciu tzv. SPF zvierat z kontaminovaných línii.

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

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Vaginálna laváž	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia anestetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Odber blastocýst-donorky (transgénne samice)	Donorky sa humánne usmrtia cervikálnou dislokáciou. Embryá v štádiu blastocysty sa získajú výplachom rohov maternice. Bez možnosti zotavenia.
Operačný zákrok v celkovej anestézii-príjemkyne embryí	Urobí sa otvor v brušnej dutine (1,5cm incízia) a embryá v štádiu blastocysty sa implantujú do rohu maternice. Pooperačná bolesť bude utlmená analgetikami. Bolesť stredná.
Operačný zákrok v celkovej anestézii-príprava sterilných samcov (vazektómia)	Urobí sa drobný rez v stredovej línii dutiny brušnej, povytiahnu sa semenovody a tie sa následne podviažu. Pooperačná bolesť bude utlmená analgetikami. Bolesť stredná.
Odber tkaniva za účelom genotypizácie-špička chvosta	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Odstrihnutie 0,3-0,5mm tkaniva chvosta. Bolesť slabá.

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie: So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebudú zbytočne vystavované stresu. Pooperačná bolesť bude utlmená analgetikami. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám, v chovných nádobách s obohateným prostredím. V týždni predpokladaného rodenia mláďat sa minimalizuje vstup do miestnosti ako aj manipulácia so samicami. Do chovných nádob sa samiciam pridáva materiál na tvorbu hniezd.

Redukcia: Kryozmrazovanie sa bude vykonávať len po dobu získania a uchovania dostatočného množstva viabilných embryí schopných vývoja v životaschopné potomstvo. Zmrazovanie embryí predstavuje ekonomickú a bezpečnú alternatívu ku chovným líniam, tzn. redukuje počet chovných zvierat potrebných pre udržanie línie.

Nahradenie: Tento typ pokusu vyžaduje použitie zvierat, nakoľko nie je možné ho realizovať v podmienkach in vitro a neexistuje žiadna alternatívna metóda, ktorá by ich použitie nevyžadovala.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

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

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu. Odber embryí sa bude vykonávať až po humánnom usmrtení zvierat cervikálnou dislokáciou. Ostatné zákroky sa budú vykonávať v hlbokjej anestézii a zvieratám bude poskytnutá pooperačná starostlivosť. Na zmiernenie bolesti im budú podané analgetiká (rimadyl).

Po ukončení projektu budú všetky zvieratá humánne usmrtené nadmernou dávkou anestetika a cervikálnou dislokáciou. Po získaní dostatočného množstva viabilných embryí sa projekt ukončí.

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu.

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.12.2016 a bude sa realizovať do 31.12.2018.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Príloha 2: Netechnické zhrnutie
Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

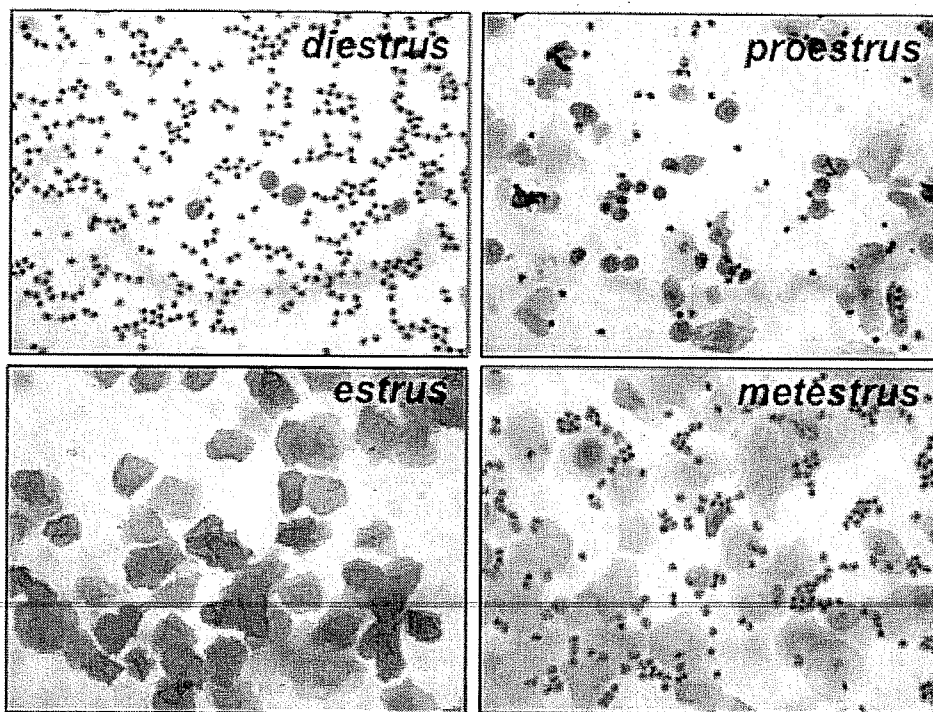
Udržiavanie a chov línií transgénnych modelov neurodegeneratívnych ochorení 4429/16-221a

Podrobný účel postupu:

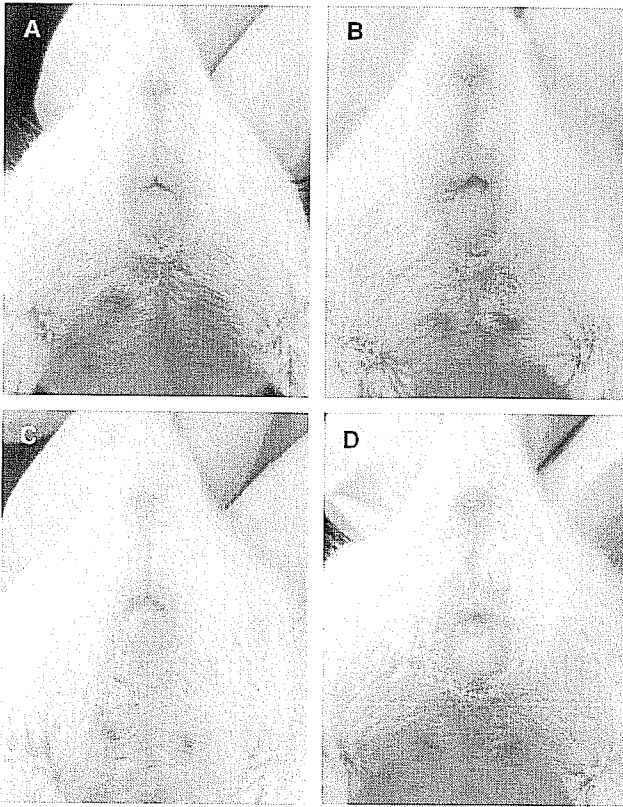
Cieľom predkladaného projektu je udržiavanie vlastného chovu transgénnych modelov Alzheimerovej choroby, ktoré následne použijeme na výskum etiopatogenézy, symptomatológie, diagnostiky a terapie tohto ochorenia. Projekt sa bude vykonávať v zariadení na chov zvierat pracujúcim v podmienkach podobných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

Cyklus pripúšťania bude prebiehať v pravidelných mesačných intervaloch, v jeden týždeň sa budú pripúšťať všetky potkanie línie a nasledujúci týždeň línie myší.

Po vaginálnej laváži sa mikroskopicky určí štádium estrálneho cyklu samíc potkana. Následne samice v štádiu proestra vložíme do kliebok ku transgénnym samcom. Na druhý deň ráno sa urobí opäť vaginálna laváž a skontroluje sa prítomnosť spermií.



U samíc myší vaginálnu laváž nevykonávame, ale cyklus hodnotíme na základe stupňa opuchu a začervenania pošvy externým pozorovaním. Samice v štádiu proestra vložíme do kliebok ku transgénnym samcom a na druhý deň ráno sa zhodnotí prítomnosť vaginálnej zátky.



Mláďatám sa odoberú vzorky tkaniva z chvosta (0,3-0,5mm) na genotypizáciu, odlišenie transgénnych mláďat od netransgénnych v princípoch heterogénneho pripúšťania. Zároveň pri odbere vzoriek sa zvieratá budú značiť tetovaním labiek alebo dierkovaním uší, aby nedošlo k zámene zvierat. Na základe výsledkov genotypizácie sa oddelia transgénne zvieratá (majú integrovaný gén) od netransgénnych, z ktorých sa väčšina z chovu vyradí. Po odstave mláďat sa matky humánne usmrtia a odoberie sa tkanivo mozgu, ktoré sa použije do mozgovej banky.

Počas procesu pripúšťania bude všetkým zvieratám venovaná štandardná veterinárna starostlivosť. Pri ochorení zvierat, budú choré zvieratá po dohode so zmluvným veterinárnym lekárom humánne usmrtené. Zvieratám sa nesmie v priebehu chovu spôsobovať zbytočná bolesť, stres a utrpenie.

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

V pravidelných mesačných intervaloch sa bude pripúšťať dostatočné množstvo potomstva na udržiavanie jednotlivých línii transgénnych zvierat. V procese pripúšťania je nevyhnutné zachovať heterogenitu, preto sa z potomstva vyberajú chovní samci od rôznych otcov. Zvieratá sa vyradia z chovu ešte pred úplným nástupom škodlivého fenotypu. Zvieratá sa humánne utratia nadmerným množstvom anestetika a odoberú sa z nich tkanivá.

Cyklus pripúšťania na záchov:

Cyklus pripúšťania na záchov bude prebiehať v pravidelných 1-2 mesačných intervaloch v priebehu 2 týždňov. V jeden týždeň sa budú pripúšťať všetky potkanie línie a nasledujúci týždeň všetky myšacie. Potomstvo narodené z pripúšťaní bude následne rozdelené na:

- Pripúšťanie
- Experimenty
- Časť zvierat sa vyradí, predovšetkým netransgénne zvieratá
- Transgénne a netransgénne potomstvo, ktoré nebude využité na pripúšťanie ani na experimenty sa humánne utratí a tkanivo mozgu sa použije do mozgovej banky

Potkanie línie:

SHR 72	3-6 netrangs. samíc každý druhý mesiac 5 transg. chovných samcov (použitý vo veku 3-5 mesiacov, následne výmena) -2 tg samice/ 2 netrangs. samci (použitie v pripúšťaní iba v prípade nedostatku tg. samcov)
SHR 24	5-10 netrangs. samíc každý druhý mesiac 5-8 transgenných chovných samcov (použitý vo veku 3-5 mesiacov, následne výmena) -2 tg samice/ 2 netrangs. samci (použitie v pripúšťaní iba v prípade nedostatku tg. samcov)
W 72	2-4 nontransg. samice / každý druhý mesiac 2-4 chovní transg. samci (použitý vo veku 3-5 mesiacov, následne výmena) -2 tg samice/ 2 netrangs. samci (použitie v pripúšťaní iba v prípade nedostatku tg. samcov)
SD	2-4 samice / každý druhý mesiac
LE	Pripúšťanie len na záchov, väčšie pripúšťanie v prípade využitia v experimentoch 2-4 samice / každý druhý mesiac

Myšacie línie:

R3m/4	5 netrangs. samíc v jeden mesiac/ 10 netrangs. samíc v ďalšom mesiaci 8-10 chovných transgenných samcov / obmieňanie každý 2-3 mesiac -2 tg samice/ 2 netrangs. samci (použitie v pripúšťaní iba v prípade nedostatku tg. samcov)
R3m/7	5 samíc každý mesiac 5 samcov/ obmieňanie každý 2-3 mesiac -2 tg samice/ 2 netrangs. samci (použitie v pripúšťaní iba v prípade nedostatku tg. samcov)
R4m/7	15 samíc v jeden mesiac/ 10 samíc v nasledujúci (veľmi ťažké pripúšťanie, málo gravidných samíc) 8-10 chovných transgenných samcov / obmieňanie každý 2-3 mesiac -2 tg samice/ 2 netrangs. samci (použitie v pripúšťaní iba v prípade nedostatku tg. samcov)
R4m/8	4 samice každý druhý mesiac 2-4 chovných transgenných samci / obmieňanie každý 2-3 mesiac -2 tg samice/ 2 netrangs. samci (použitie v pripúšťaní iba v prípade nedostatku tg. samcov)
R4m/2	2-4 samice každý druhý mesiac 2-4 chovných transgenných samci
R4m/3	2-4 samice každý druhý mesiac 2-4 chovných transgenných samci
CD1	2 samice každé 3-4 mesiace 2 chovný samci -budeme pripúšťať len v prípade ak bude potreba pre experiment
C57BL/6NCr1	2 samice každé 3-4 mesiace 2 chovný samci -budeme pripúšťať len v prípade ak bude potreba pre experiment

Celkový počet zvierat použitých v prípúšťaní na záchov/rok:

V tabulkách je započítané vyššie množstvo netransgénnych samičiek z dôvodu započítania aj prípadných negravidných samičiek.

Potkanie línie:

SHR 72	40-60 netransg. samičiek 30-40 transg. samcov Max:24tg samičiek/12 netg.samcov
SHR 24	50-70 netransg. samičiek 40-55 transg. samcov Max:24tg samičiek/12 netg.samcov
W 72	30-40 netransg. samičiek 20-25 transg. samcov Max:24tg samičiek/12 netg.samcov
SHR	5-10 netrang. samičiek 5 netransg. samcov Max:24tg samičiek/12 netg.samcov
SD	20-30 samičiek 20 samcov
LE	20-30 samičiek 20 samcov

Myšacie línie:

R3m/4	90-110 netransg. samičiek 70-80 transg. samcov Max:24tg samičiek/12 netg.samcov
R3m/7	60-80 netransg. samičiek 50-60 transg. samcov Max:24tg samičiek/12 netg.samcov
R4m/7	150-180 netransg. samičiek 90-100 transg. samcov Max:24tg samičiek/12 netg.samcov
R4m/8	24-50 netransg. samičiek 30-35 transg. samcov Max:24tg samičiek/12 netg.samcov
R4m/2	20-40 netransg. samičiek 15-25 transg. samcov Max:24tg samičiek/12 netg.samcov
R4m/3	20-40 netransg. samičiek 15-25 transg. samcov Max:24tg samičiek/12 netg.samcov
CD1	10-12 samíc 10 samcov
C57BL/6NCrI	10-12 samíc 10 samcov

Cyklus pripúšťania na experimenty:

V prípade potreby vyššieho počtu zvierat, ktoré je potrebné použiť v konkrétnom schválenom experimente, sa v procese pripúšťania zvýši počet pripustených zvierat. Vždy sa však musí počítať s časťou potomstva, ktoré sa ponechá na pripúšťanie na záchov.

Na základe predpokladanej potreby zvierat na experimenty pre budúci rok uvádzame v tabuľke maximálny počet zvierat, ktoré sa použijú **na pripúšťanie na experimenty/rok**:

Potkanie línie:

SHR 72	40-60 netransg. samičiek 30 transg. samcov -6 netransg. samcov/12 samičiek
SHR 24	60-80 netransg. samičiek 40 transg. samcov -6 netransg. samcov/12 samičiek
W 72	- 30tg samcov/60 netransg. samíc -6 netransg. samcov/12 samičiek
SD	20 samcov 80 samičiek
LE	20 samcov 70 samičiek

Myšacie línie:

R3m/4	-30 transg. samcov/ 80 netransg. samičiek -10 netransg. samcov/20 transg. samičiek
R3m/7	-30 transg. samcov/ 80 netransg. samičiek -10 netransg. samcov/20 transg. samičiek
R4m/7	-30 transg. samcov/ 80 netransg. samičiek -10 netransg. samcov/20 transg. samičiek
R4m/8	-15 transg. samcov/ 50 netransg. samičiek -8 netransg. samcov/16 transg. samičiek
R4m/2	20-40 netransg. samičiek 15 transg. samcov Max:12tg samičiek/6 netg.samcov
R4m/3	20-40 netransg. samičiek 15 transg. samcov Max:12tg samičiek/6 netg.samcov
CD1	5samcov 15 samičiek
C57BL/6NCrI	5samcov 15 samičiek

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

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

Biologická bezpečnosť našich zvieracích línií patrí medzi najvyššie priority v našom chovnom zariadení. Preto v našom chove využívame podmienky SPF (specific pathogen free), ktoré umožňujú eliminovať nežiadúce faktory okolia a potláčajú heterogenitu fenotypu spôsobenú

okolitým prostredím a selektívnou vnímavosťou zvierat voči externým podnetom. Naším cieľom je produkovať zdravé zvieratá, ktoré budú následne využívané v projektoch s dôverou v získaných výsledkoch.

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

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Vaginálna laváž	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 30 sekúnd.
Odber tkaniva za účelom genotypizácie – špička chvosta	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Odstrihnutie 0,3-0,5 mm tkaniva chvosta. Bolesť slabá.
Identifikácia zvierat	Pri odbere vzoriek na genotypizáciu, sa zvieratá identifikujú tetovaním labky alebo dierkovaním ucha. Bolesť slabá.
Perfúzia zvierat	Otvorenie hrudnej dutiny, zavedenie ihly do ľavej komory srdca. Cez ihlu bude prenikať do celého tela zvieratá roztok PBS s heparínom a následne PFA. Prebehne v celkovej anestézii. Bolesť slabá.
Odber mozgovo-miechovej tekutiny	Zviera sa uvedie do celkovej anestézie. Nastrihne sa koža v oblasti krčnej chrbtice. Zavedie sa ihla do cisterna magna a odoberie sa max. 100ul CSF. Následne sa zviera humánne usmrtí. Bolesť slabá
Usmrtenie dislokáciou krčných stavcov po predchádzajúcej anestézii	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Intraperitoneálne sa podá anestetikum (zoletil+xylariem). Cervikálna dislokácia sa vykoná v anestézii. Bolesť žiadna. Trvanie 30 sekúnd.

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné predpisy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám. V týždni predpokladaného rodenia mláďat sa samičkám nebude vymieňať podstielka, ani sa so samičkou nebude nemanipulovať, a taktiež sa obmedzí vstup do miestnosti, aby sa obmedzilo zbytočné vyrušovanie samíc a znížil sa prípadný stres. Do chovných nádob sa prikladá materiál na tvorbu hniezd. Nástup príznakov škodlivého fenotypu u zvierat začína okolo 4-5 mesiaca veku v závislosti od línie, preto budú z chovu vyradené ešte pred vyvinutím sa fenotypu a budú humánne usmrtené.

Redukcia:

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

Nahradenie:

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

Zásada nahraditeľnosti zvierat

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

Utrpenie versus prínos

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

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

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.1.2017 a bude sa realizovať do 31.12.2021.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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