

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Imunoterapia Alzheimerovej choroby: analýza mechanizmu účinku - 4429/16 - 2216

Podrobný účel postupu:

V populácii stúpa každý rok počet pacientov s Alzheimerovou chorobou. Súčasná terapia je zameraná na symptomatické potlačenie ochorenia a podporné mechanizmy, ale nerieši kauzálny prístup. Aj preto sa v súčasnosti hľadajú nové prístupy a spôsoby terapie, ktoré by vedeli ovplyvniť molekulárne mechanizmy zodpovedné za prepuknutie a progres ochorenia. Jedným z možných terapeutických prístupov je pasívna a aktívna imunoterapia Alzheimerovej choroby. Pri vývoji vakcín je dôležité poznať mechanizmus účinku imunoterapie.

Predložený projekt má za úlohu štúdium mechanizmu účinku pasívnej vakcíny (terapeutickej protilátky). Mechanizmus účinku budeme analyzovať v podmienkach *in vivo* na myšiacích transgénnych modeloch a v podmienkach *in vitro* na primárnych bunkových kultúrach. Na *in vivo* experimenty použijeme transgénne myši a potkany exprimujúce rôzne patologické formy tau proteínov a kontrolné zdravé zvieratá. Na *in vitro* experimenty budeme používať primárne neuronálne bunkové kultúry izolované z 18-dňových embrií a primárne gliové bunkové kultúry izolované z 1-dňových mláďat potkanov a myši.

Zvieratá dostanú v priebehu dvoch dní dve dávky pasívnej vakcíny. Týždeň po druhej dávke odoberieme zvieratám krv z očného splavu a humánne usmrtime. Mozgové tkanivá budú použité na imunohistochemickú a biochemickú analýzu terapeutického efektu. Sérum bude použité na analýzu hladín protilátok indukovaných vakcínou a analýzu tau proteínu. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieratá neprekročí stanovené normy.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Preštudovali sme všetky dostupné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili v danom experimente nahradiť zvieratá za iný biologický testovací systém. Avšak mechanizmus účinku v podmienkach *in vivo* môžeme študovať len na transgénnych modeloch. Primárne neuronálne a gliové bunkové kultúry izolované zo zvierat sú nenahraditeľným systémom na modelovanie reálnych procesov prebiehajúcich v mozgu. Vzhľadom na to, že cieľom projektu je odhaliť jednotlivé dráhy aktivované vplyvom therapeutickej protilátky, nie je možné tento modelový systém nahradiť stabilnými bunkovými líniami. Na tento typ experimentov sa najčastejšie používajú gravidné myši a potkany. 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
Vázenie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia (1x za mesiac)	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 0.5 - 1 minútu.
Odber krvi	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Podá

(retroorbitálny plexus)	sa polovičná dávka anestetík na utlmenie bolesti. V okamihu ako je zviera sedované sa sklenená kapilára jemne zasunie pod očné guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť stredná. Trvanie 1 minútu.
--------------------------------	--

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné ŠPP. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám.

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov. Stanovený počet zvierat sa opiera o naše predchádzajúce experimenty. Ukázalo sa, že počet zvierat v skupine menší ako 20 nie je dostatočne štatisticky relevantný, keďže aj u zvierat sa vyskytuje určitá miera variability.

Nahradenie:

Súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje testovať efektívnosť vakcín (pasívnych aj aktívnych) v *in vitro* podmienkach. Z legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať priamo na ľuďoch, bez predchádzajúceho otestovania na laboratórnych zvieratách.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

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

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu. Zvieratá dostávajú nízke dávky dávky protilátky, ktoré nespôsobujú žiadnu nebezpečnú reakciu, ktorá by viedla k poškodeniu organizmu. Intraperitoneálna aplikácia vakcíny trvá niekoľko sekúnd. Odber krvi sa vykonáva na sedovaných zvieratách. Po odbere budú zvieratá humánne usmrtené. Získané informácie z predkladaného experimentu významne napomôžu pri vývoji efektívnej vakcíny zameranej na liečbu ľudských neurodegeneračných ochorení.

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.1.2017 a bude sa realizovať v priebehu necelých dvoch rokoch, do 31.12.2018.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Infekčné formy tau proteínu v ľudských tauopatiách. 4429/16-221C

Podrobný účel projektu:

Projekt je pokračovaním predchádzajúceho projektu s rovnakým názvom, s tým, že sa budú okrem potkaních animálnych modelov využívať aj myšacie animálne modely. Cieľom predkladaného projektu je identifikovať jednotlivé kmene infekčných foriem patologicky pozmeneného proteínu tau, ktoré sú zodpovedné za šírenie neurofibrilárnej patológie v mozgu pacientov postihnutých neurodegeneračnými tauopatiami (napr. Alzheimerova choroba). Keďže patologicky pozmenený proteín tau je tvorený stovkami rôznych kmeňov, z ktorých pravdepodobne len niektoré disponujú infekčnými vlastnosťami, je nevyhnutné identifikovať práve tie, ktoré sa dokážu šíriť v mozgu a v tomto procese navodzovať neurofibrilárne zmeny. Tieto poznatky je možné získať po vpravení presne ocharakterizovaných kmeňov proteínu tau do mozgu experimentálnych potkanov a myší a sledovať šírenie jednotlivých kmeňov v animálnom modeli.

Pre účely projektu sa bude používať mozgové tkanivo pacientov postihnutých Alzheimerovou chorobou (AD) a ďalšími tauopatiami (Pickovou chorobou PiD a Progresívnou supranukleárnou obrnou PSP, Cortikobazálna degenerácia CBD). Ľudské izoláty budú následne rozdelené do jednotlivých frakcií, z ktorých získame na základe veľkosti rôzne kmene tauónov. Takto pripravené formy proteínu tau budú vpravené do mozgovej kôry a hipokampu, prípadne aj do iných častí mozgového tkaniva animálnych modelov. Budú sa využívať transgénne aj netransgénne potkanie a myšacie línie. Keďže je silný predpoklad, že rôzne kmene majú v jednotlivých líniách rozdielny potenciál vyvolať šírenie neurofibrilárnej patológie. Aplikácie budú vykonané s použitím stereotaktického aparátu. Táto metóda je v našom laboratóriu zabehnutá a vykonáva ju zaškolený personál.

Popis operácie: Pred operáciou budú zvieratá uvedené do hlbkej anestézie kombináciou anestetík Zoletyl 100mg/ml (Tiletamine, Zolazepam) a Xylariem 20mg/ml (Xylazine), v pomere 3:5, ktoré budú podané intraperitoneálne. Intraperitoneálne podanie anestetík je bežne používaná metóda, ktorá je u hlodavcov uprednostňovaná pred intravenóznym podaním kvôli ľahšej a rýchlejšej manipulácii so zvieratami a zároveň zabezpečuje rýchly nástup účinku. Po tom, čo sa uistíme, že je zviera v hlbkej anestézii, bude pripevnené do stereotaktického aparátu vďaka ktorému sme schopný presne určiť miesto podania. Počas celej operácie a po nej budú zvieratá udržiavané pri teplote 37°C, aby nedošlo k ich podchladeniu. Zvieratám najprv nastrihne kožu na hlave (1cm rana), aby sme odkryli lebku, potom podľa presne určených koordinátov vyvrtáme malý otvor do lebky (1mm). Samotná aplikácia patologicky pozmenených proteínov tau bude prebiehať čo najpomalšie, maximálne 0,5 μ l/min. Podávať budeme rôzny objem, do jednej alebo do oboch hemisfér, aby sme zabezpečili dostatočné množstvo podávanej látky a zároveň nebola jej koncentrácia príliš vysoká. Po aplikácii necháme ihlu v mozgu ešte ďalších 5 - 8 minút, aby sme zabránili vytečeniu podávaného materiálu von a potom ju pomaly a opatrne vytiahneme. Posledným krokom operácie je zošitie rany a jej dezinfekcia, aby sme zabránili nechcenej infekcii. Pooperačnú bolesť budeme tlmiť analgetikami. Zdravotný stav zvierat budeme sledovať každý deň. Aplikácie prebehnú v niekoľkých krokoch. Postupne sa budú aplikovať rôzne kmene patologicky pozmeneného proteínu tau, ktoré boli izolované z pacientov postihnutých tauopatiami. budeme meniť objem, kontrolovať vhodnosť koordinátov, atď

V druhej časti projektu sa plánujeme zamerať na popísanie úlohy imunitného systému a úrovne neurozápalu v šírení neurofibrilárnej patológie v mozgu. Potkanie a myšacie animálne modely budú vystavené účinku lipopolysacharidu gram negatívnych baktérií (LPS), ktorý účinkuje ako induktor silnej imunitnej odpovede a má prozápalové účinky alebo naopak, prostredníctvom nesteroidných antiflogistík (NSAID) bude imunitná odpoveď zvierat potlačená. Počas experimentu budú zvieratá

monitorované pomocou kombinácie elektrofyziologických, zobrazovacích, optogenetických, farmakogenetických techník. Podrobné mapovanie aktivity buniek zodpovedných za imunitnú odpoveď mozgu umožní porozumenie úlohy imunitného systému na šírenie patológie a úroveň kognitívnych zmien.

Niektoré skupiny zvierat budú testované rôznymi behaviorálnymi testami (Morisovo vodné bludisko, novel object recognition, catwalk...). Behaviorálne testy sa budú využívať na odsledovanie prípadných kognitívnych a motorických zmien po aplikácii patologických foriem tau proteínu.

Ďalším krokom práce bude behaviorálne otestovanie zvierat, budú sa používať rôzne behaviorálne testy, ktoré sú na našom pracovisku zabehnuté (Morrisovo vodné bludisko, test rozpoznávania nového objektu, atď.). Niektoré skupiny zvierat budú chované v obohatenom prostredí a budú hodnotené oproti skupinám bez obohateného prostredia za účelom zistenia, či aktívna stimulácia mozgu dokáže spomaliť alebo zastaviť šírenie neurofibrilárnej patológie v mozgu zvierat.

Morrisovo vodné bludisko: Zvieratá budú testované v Morrisovom vodnom bludisku počas 7 po sebe nasledujúcich dní. V prvej časti testu, tzv. „spatial acquisition“ fáze budú zvieratá testované 4x každý deň počas prvých 4. dní, pričom platforma bude umiestnená v SV kvadrante. Zvieratá sa budú učiť orientovať sa na základe obrázkov v tvare trojuholníka, štvorca a kruhu umiestnených po stenách v okolí bazénu. Ako aj schopnosť naučiť sa a zapamätať si umiestnenie platformy. Budeme hodnotiť čas, za aký zvieratá nájdu platformu(s) a tiež dĺžku, ktorú naplávajú (m). Na piaty deň sa platforma vyberie z Morrisovho vodného bludiska, tzv. probe test a zvieratá necháme plávať 60s, pričom sa bude hodnotiť čas, ktorý strávia v jednotlivých kvadrantoch. Na 6. deň, sa platforma znova umiestni do bazénu, avšak zmeníme umiestnenie do kvadrantu JZ (juho-západ), tzv. „reversal acquisition“ test. Táto fáza testu slúži na zhodnotenie schopnosti zvierat „uhasiť“ predchádzajúce učenie miesta platformy, zorientovať sa a nájsť v čo najkratšom čase nové umiestnenie platformy. Na ďalší deň sa znova platforma vyberie, tzv. „reversal probe“ test.

Test rozpoznávania nového objektu: je využívaný na hodnotenie pamäti zvierat na základe ich prirodzenej schopnosti rozoznať nový objekt v známom prostredí. Test pozostáva z troch fáz. V prvej sa zvieratá habituujú na prostredie testovacej komory (1 hodina). V druhej (tréningovej), sú do komory umiestnené dva rovnaké neznáme predmety, ktoré môže zvieratá explorať desať minút. V tretej fáze (testovacej) sa jeden z predmetov nahradí novým, pre zvieratá neznámym predmetom a zvieratá je do arény vložené na desať minút. Sleduje sa čas strávený exploračiou nového objektu, frekvencia navštívenia zóny tohto objektu a latencia, teda čas od začiatku testovania po prvé navštívenie zóny tohto objektu.

Catwalk: Catwalk predstavuje plne automatizovaný systém pre komplexné vyhodnotenie chôdze zvierat. Niekoľko dní pred začiatkom testu experimentátor pravidelne manipuluje so zvieratami, aby sa minimalizoval stres zvierat počas priebehu testu. Zvieratá budú testované vždy v rovnakom čase medzi 13-16h v troch po sebe nasledujúcich dňoch. Budú robené štyri opakovania korektného priebehu testu. Mozgové tkanivo experimentálnych zvierat bude určené pre histopatologické a biochemické analýzy, prostredníctvom ktorých identifikujeme kmene s infekčnými vlastnosťami a potenciálom vyvolať šírenie neurofibrilárnej degenerácie v jednotlivých líniiach. Po dosiahnutí terminálneho alebo iného predom určeného veku, budú všetky zvieratá usmrčované v celkovej anestézii, do ktorej budú uvedené kombináciou anestetík Zoletyl 100mg/ml (Tiletamine, Zolazepam) a Xylariem 20mg/ml (Xylazine), v pomere 3:5 a následne vykonáme perfúziu s roztokom PBS a so 4% paraformaldehydom. Popis perfúzie a odberu mozgu: Po uistení sa, že zvieratá boli uvedené do hlbkej anestézie, budú pripevnené na podložku. Zvieratám otvoríme hrudnú dutinu, prestrihujeme uško pravej predsiene a priškrtneme brušnú aortu. Do ľavej komory okamžite zavedieme ihlu, ktorou bude do tela potkana prúdiť roztok PBS s heparínom (10 IU/ml) po dobu jednej minúty (10 ml roztoku). Po jednej minúte vymeníme roztok PBS za 4% paraformaldehyd, ktorý bude do tela prúdiť 7 minút. Pri myšiacích líniiach priebeh perfúzie bude trvať 3 minúty. Perfúzia so 4% paraformaldehydom nám zabezpečí precíznu fixáciu tkaniva. Po prebehnutí perfúzie budú zvieratá dekapitované a opatrne im vyberieme mozog.

V prípade odberu vzoriek na biochemickú analýzu, perfúzia vykonáme iba PBS, bez použitia PFA.

Projekt prebehne v niekoľkých čiastkových experimentoch:
 Kontrola na overenie miesta podania- max. 5 zvierat z každej línie
 Izolát z pacientov s AD –rôzne frakcie
 Transgénne potkanie potkany-400
 Netransgénne potkany-200
 Transgénne myšacie animálne modely- 400
 Myšacia línia C57BL/6NCrI/ netransgénne-150

Maximálny počet použitých zvierat počas priebehu experimentu bude:

- 610 potkanov, vo veku približne 8 týždňov, z toho transgénnych 405 a netransgénnych 205
- 570 myší, z toho transgénnych 420 a netransgénnych 150.

Budú použité samce aj samice.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Zámerom predkladaného projektu je identifikovať a charakterizovať infekčné formy proteínu tau v biologických systémoch. Patologicky pozmenený proteín tau je tvorený stovkami rôznych kmeňov, z ktorých sú pravdepodobne infekčné a schopné šírenia neurofibrilárnej patológie len niektoré, preto je nevyhnutné identifikovať práve tieto formy.

Keďže progres neurodegeneračných zmien prebiehajúcich v mozgu pacientov postihnutých niektorou z tauopatií, ako aj získanie kompletnej imunitnej odpovede mozgu na podnet akým je prítomnosť infekčných foriem proteínu tau nie je možné simulovať v podmienkach in vitro, animálne modely pre nás ostávajú aj naďalej jedinou možnou variantou schopnou poskytnúť údaje, ktoré sa v čo najväčšej miere približujú procesom odohrávajúcim sa v mozgu pacientov. Jednotlivé formy proteínu tau budú ocharakterizované a vpravené do mozgovej kôry experimentálnych potkanov a myší. Takýmto spôsobom identifikujeme kmene, ktoré sú schopné infikovať neuróny a šíriť sa v mozgu.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Vázenie zvierat	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.
Stereotaktická aplikácia v celkovej anestézii	Nastrihnutie kože na hlave (1cm rana), vyvrtanie malého otvoru do lebky (1mm), zošitie rany. Po-operačná bolesť bude utlmená analgetikami
Implantácia kraniálneho okna	Nastrihnutie kože na hlave (1cm rana), vyvrtanie malého otvoru do lebky (priemer 3 mm), aplikácia sterilného krycieho sklíčka, ošetrovanie okolia rany. Po-operačná bolesť bude utlmená analgetikami.
Perfúzia zvierat	Otvorenie hrudnej dutiny, zavedenie ihly do ľavej komory srdca. Cez ihlu bude prenikať do celého tela zvieraťa roztok PBS s heparínom a následne PFA. Prebehne v celkovej anestézii. Bolesť slabá.
Zaznamenávanie elektrofyziologickej	Štandardná metóda. Zvieratá sú počas akútnych pokusov v celkovej inhalačnej anestézii. Bolesť žiadna. Trvanie 1-8

aktivity neurónov in-vivo	hod. Chronické pokusy budú vykonávané štandardnými metódami určenými pre prácu s imobilizovanými hlodavcami. Bolesť žiadna. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a cca 20s imobilizáciou pri pripájaní aparatury. Trvanie 1-2 hod.
Zaznamenávanie štruktúry neurónov pomocou multifotónového mikroskopu	Štandardná metóda. Opakovaná inhalačná anestézia pri chronických pokusoch. Trvanie 1-2 hodiny. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a úvodom do anestézie.
Behaviorálne testovanie	Morisovo vodné bludisko, catwalk, prípadne iné testy. Pred začatím testovania sú zvieratá handlované, aby sa minimalizoval stres. Bolesť žiadna.

Zjemenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné predpisy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a v najväčšej možnej miere sa budeme snažiť eliminovať stres, pretože stres nežiaduco ovplyvňuje experiment. Starostlivosť zabezpečí jedna osoba, na ktorú si zvieratá zvykli. Počet zvierat v chovnej nádobe zohľadňuje normy dané zákonom, potkany sú chované v počte 4-5 zvierat na chovnú nádobu, a myši v počte 5/chovnú nádobu, aby sme zabezpečili sociálne interakcie medzi zvieratami. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám. Operácia prebehne v celkovej anestéze, po jej ukončení budú zvieratám podávané analgetiká na tíšenie bolesti, perfúzia s roztokom PBS a 4% paraformaldehydom a dekapitácia prebehne v celkovej anestéze.

Redukcia:

Navrhovaný počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov. Počty zvierat pre jednotlivé skupiny experimentov budú zohľadňovať konkrétne postupy, napr. skupiny, v ktorých budú robené aj behaviorálne testy budú pre lepšie vyhodnocovanie výsledkov pozostávať z väčšieho počtu zvierat (max. 20). Uvedené množstvá použitých myšacích a potkaních modelov sú maximálne počty, akonáhle sa nám podarí získať relevantné výsledky, zvyšné zvieratá použité nebudú.

Nahradenie:

Súčasná úroveň vedeckého poznania nám neumožňuje sledovať šírenie infekčných foriem proteínu tau v in vitro podmienkach a zároveň získať relevantné výsledky v čo najväčšej miere odzrkadľujúce deje prebiehajúce v mozgu pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou alebo inou príbuznou tauopatiou. Animálny model je tiež nevyhnutný aj pre ďalšie pokusy, kde po aplikácii proteínu tau do mozgu budeme sledovať vplyv imunitného systému a úrovne neurozápalu na šírenie neurofibrilárnych zmien v mozgu, čo nie je možné v in vitro systémoch. Z legislatívneho a etického hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať na ľudských pacientoch.

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

Príčina Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatií zostáva neznáma. Na pochopenie kompletnej patogenézy týchto neurodegeneračných ochorení je nevyhnutné pochopiť kompletnú kaskádu dejov a ich spúšťačov. Je známe, že neurofibrilárna patológia sa šíri v mozgu pacientov v časovo a anatomicky definovaných sekvenciách, avšak konkrétne kmene patologicky pozmeneného proteínu tau zodpovedné za infekčné vlastnosti a schopnosti šírenia neboli doposiaľ identifikované a charakterizované. Predpokladaný prínos projektu zahŕňa identifikáciu kmeňov s infekčnými vlastnosťami a schopnosťou šírenia v mozgu pacientov s Alzheimerovou chorobou a tiež popísanie vplyvu úrovne neurozápalu na šírenie neurofibrilárnej patológie. Počas všetkých úkonov eliminujeme stres a utrpenie zvierat, t. z. všetky úkony na zvieratách, ako intracerebrálna injekcia a perfúzia, budú prebiehať v úplnej anestézii a po prebratí z anestézie im budú podávané analgetiká.

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.12.2016 a bude sa realizovať počas nasledujúcich troch rokov, do 31.12.2019.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Testovanie biologickej aktivity a štrukturálnej integrity imunogénu v biologickom testovacom systéme 4429/16-221d

Podrobný účel postupu:

Alzheimerova choroba, rovnako ako veľa ďalších neurodegeneračných ochorení, sa spája s akumuláciou abnormálnej formy proteínov v centrálnej nervovej sústave, ktorá spôsobuje degeneráciu a následnú dysfunkciu neurónov. Podľa súčasných štatistík trpí Alzheimerovou chorobou 24 miliónov ľudí a každý rok sa toto číslo zväčší o 4,5 milióna nových prípadov. Podľa predpokladov počet pacientov do roku 2040 stúpne celosvetovo v priemere o 200 percent. Súčasné liečebné postupy spočívajú najmä v symptomatickej a podpornej terapii avšak terapia kauzálna zatiaľ neexistuje.

Projekt je pokračovaním predchádzajúceho projektu s rovnakým názvom. Jeho cieľom je testovať biologickú aktivitu a štrukturálnu integritu vakcíny určenej na klinické testy. Testovanie môže prebiehať len v biologickom testovacom systéme. Schopnosť produkovať imunitnú odpoveď je považovaná za jednu z najdôležitejších vlastností potrebných pre stanovenie stability imunogénu. Táto forma testovania je požadovaná regulačnými orgánmi EU (EU: Directive 75/318/EEC as amended, júl 1996; ICH: QUALITY OF BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS: STABILITY TESTING OF BIOTECHNOLOGICAL/BIOLOGICAL PRODUCTS (Q5C)). Imunogén je odvodený z proteínu tau, ktorý zohráva kľúčovú úlohu v patogenéze Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatií. Imunogén je netoxický a veľmi dobre ho experimentálne zvieratá zvládajú. Pri prezentácii projektu bol kladený dôraz na význam študovanej problematiky a dôležitosť použitia animálneho modelu (myš) pre získanie biologických vzoriek. Boli preštudované možné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili nahradiť zvieratá za bunkové systémy. Komplexnosť sledovaných molekulárnych procesov si však vyžaduje použiť cicavčí model. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Projekt prebehne v niekoľkých čiastkových experimentoch:

- 86 experimentov, po 6 ks v skupine. Celkom $86 \times 6 = 510$ myší.

Celkom bude použitých 510 myší C57 (samice) vo veku približne 6 týždňov.

Po vstupnej karanténe a veterinárnom vyšetrení budú zvieratá priradené do príslušného experimentu.

- V deň 1, 8 a 15 sa každej myške v experimente aplikuje testovaný imunogén subkutánnou injekciou v dávke 300 μ l pro toto.
- V deň 22 sa zvieratám odoberie krv z retroorbitálneho plexu v objeme asi 100-150 μ l. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieratá neprekračuje stanovené normy.
- Myšky potom ostanú v experimente bez ďalšej terapie a krv sa podobným spôsobom odoberie ešte na konci mesiacov 3, 6, 9, 12 a 15.
- Následne budú zvieratá z experimentu vyradené a humánne usmrtené v súlade so zákonom: anestézia a dislokácia krčných stavcov.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Testovanie schopnosti imunogénu navodiť imunitnú odpoveď je považované za štandardnú metódu testovania jeho biologickej aktivity. Vzhľadom na skutočnosť, že v súčasnosti nie je dovolené tieto metódy skúmať na ľudských pacientoch, a na fakt, že daný experiment sa v súčasnosti nedá vykonať v podmienkach in vitro, je použitie animálnych modelov nevyhnutné.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia (3x v intervaloch 7 dní)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 1 minútu.
Odber krvi (retroorbitálny plexus)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Podá sa polovičná dávka anestetík na utlmenie bolesti. V okamihu ako je zviera sedované sa sklenená kapilára jemne zasunie pod očnú guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť stredná. Trvanie 1 minútu.
Usmrtenie v anestéze dislokáciou krčných stavcov	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Intraperitoneálne sa podá anestetikum v dávke 100µl. Cervikálna dislokácia sa vykoná v anestézii. Bolesť slabá. 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. Niekoľko nezávislých štúdií preukázalo, že stres významne modifikuje imunitnú odpoveď, čo je v prípade nášho experiment nežiaduce. Starostlivosť zabezpečuje jedna osoba, na ktorú si zvieratá zvykli. Zvieratá sú chované v počte 5 zvierat na chovnú nádobu, aby sme zabezpečili sociálne interakcie medzi zvieratami. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám. Odber krvi sa vykonáva v čiastkovej anestézii, aby sme utlmili bolesť spôsobenú odberom krvi.

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov.

Nahradenie:

Súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje sledovať biologickú účinnosť peptidového imunogénu v in vitro podmienkach. Pri imunizácii sa sleduje celkový titer protilátok, typ imunitnej odpovede, ako aj špecifickosť protilátok, ktoré vznikli po imunizácii. Z legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať na humánnych pacientoch.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

Pre hľadanie alternatívnej metódy sme použili nasledovné registre medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód (ECVAM, NICEATM-ICCVAM, NC3Rs, AltTox), kde sme

nenášli žiadnu alternatívnu metódu, ktorú by sme mohli použiť vo svojom projekte, aby sme nemuseli vykonávať experimenty na zvieratách.

Utrpenie versus prínos

Príčina Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatii zostáva neznáma. Dôsledkom tohto stavu je absencia účinnej liečby. Imunologické postupy vo výskume Alzheimerovej choroby priniesli už niekoľko prevratných objavov, napr. identifikácia proteínu tau a beta amyloidu – dvoch kľúčových molekúl zodpovedných za patologické zmeny viazané na ochorenie. Imunizácia zvierat vedie k produkcii špecifických protilátok, ktoré sú dôležité na mapovanie chorobných zmien tau proteínu. Keďže tau proteín je prirodzene neusporiadaný proteín, ktorý nemá stabilnú štruktúru, neexistuje iná možnosť ako mapovať patologické zmeny tau proteínu, ako používať špecifické protilátky, ktoré vznikajú po imunizácii.

Predpokladaný prínos:

- 1) Testovanie biologickej aktivity vakcíny a jej životnosti

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.12.2016 a bude sa realizovať počas nasledujúcich troch rokov, do 31.12.2019.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Imunoterapia Alzheimerovej choroby: testovanie účinnosti aktívnej a pasívnej vakcíny

Podrobný účel postupu: 4429/16-221e

V populácii stúpa každý rok počet pacientov s Alzheimerovou chorobou. Súčasná terapia je zameraná na symptomatické potlačenie ochorenia a podporné mechanizmy, ale nerieši kauzálny prístup. Aj preto sa v súčasnosti hľadajú nové prístupy a spôsoby terapie, ktoré by vedeli ovplyvniť molekulárne mechanizmy zodpovedné za prepuknutie a progres ochorenia. Jedným z možných terapeutických prístupov je pasívna a aktívna imunoterapia Alzheimerovej choroby. Pri vývoji vakcín je dôležité stanoviť optimálnu dávku, ktorá by mala vyvolať protektívnu protilátkovú alebo bunkovú imunitnú odpoveď. Z uvedeného dôvodu je vzťah „dose-response“ dôležitým kritériom prípravy efektívnej vakcíny či už bunkového alebo protilátkového typu.

Predložený projekt má za úlohu testovať účinnosť aktívnej a pasívnej vakcíny na transgénnych modeloch. Pri testovaní aktívnej vakcíny budeme sledovať vplyv veľkosti dávky vakcíny na hladinu indukovaných protilátok a terapeutickú účinnosť vakcíny. Zvieratám bude v rôznych intervaloch (4, 6 a 8 týždňov) subkutánne aplikovaná vakcína (imunogén) s cieľom vyvolať dostatočnú hladinu protilátok navodzujúcu terapeutický efekt. Pri testovaní pasívnej vakcíny (myšia monoklonová protilátka) budeme sledovať vplyv dávky (tri rôzne dávky protilátky) na terapeutickú účinnosť vakcíny v transgénnych myšiach. Monoklonová protilátka bude zvieratám aplikovaná intraperitoneálne v dvojtýždňových intervaloch.

Dva týždne po poslednej dávke (po ukončení imunizačnej schémy) odoberieme zvieratám krv z očného splavu a humánne usmrtime. Mozgové tkanivá budú použité na imunohistochemickú a biochemickú analýzu terapeutického efektu. Sérum bude použité na analýzu hladín protilátok indukovaných vakcínou a analýzu tau proteínu. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieraťa neprekročí stanovené normy.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Preštudovali sme všetky dostupné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili v danom experimente nahradiť zvieratá za iný biologický testovací systém. Na selekciu optimálnej dávky vakcíny a jej terapeutického účinku je však nevyhnutné použiť imunitný systém transgénnych zvierat. Na tento typ experimentov použijeme transgénne myši a potkany, exprimujúce rôzne formy tau proteínov. Vzhľadom k tomu, že tieto dva živočíšne druhy môžu odlišne reagovať na testovanú dávku vakcíny, použijeme oba spomínané druhy zvierat. 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.
Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia (1x za mesiac)	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 0.5 - 1 minútu.

Odbor krvi (retroorbitálny plexus)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Podá sa polovičná dávka anestetik na utlmenie bolesti. V okamihu ako je zviera sedované sa sklenená kapilára jemne zasunie pod očnú guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť stredná. Trvanie 1 minútu.
---	---

Zohľadnenie 3R**Zjemnenie:**

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné ŠPP. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám.

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov. Stanovený počet zvierat sa opiera o naše predchádzajúce experimenty. Ukázalo sa, že počet zvierat v skupine menší ako 20 nie je dostatočne štatisticky relevantný, keďže aj u zvierat sa vyskytuje určitá miera variability.

Nahradenie:

Súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje testovať efektívnosť vakcín (pasívnych aj aktívnych) v *in vitro* podmienkach. Z legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať priamo na ľuďoch, bez predchádzajúceho otestovania na laboratórnych zvieratách.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

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

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu. Zvieratá dostávajú nízke dávky netoxickej monoepitopovej vakcíny alebo nízke dávky protilátky, ktoré nespôsobujú žiadnu nebezpečnú reakciu, ktorá by viedla k poškodeniu organizmu. Subkutánna aj intraperitoneálna aplikácia vakcíny trvá niekoľko sekúnd. Odbor krvi sa vykonáva na sedovaných zvieratách. Po odbere budú zvieratá humanne usmrtené. Získané informácie z predkladaného experimentu významne napomôžu pri vývoji efektívnej vakcíny zameranej na liečbu ľudských neurodegeneračných ochorení.

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.1.2017 a bude sa realizovať v priebehu necelých dvoch rokov, do 31.12.2018.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Príprava monoklonových protilátok špecifických k patologickým formám tau proteínu a iným proteómom

Podrobný účel postupu: 4429/16-221f

Alzheimerova choroba je charakteristická akumuláciou patologicky modifikovaných foriem tau proteínov v centrálnej nervovej sústave, ktorá spôsobuje degeneráciu a následnú dysfunkciu neurónov. V súčasnosti trpí týmto ochorením viac ako 20 miliónov ľudí a štatistiky zaznamenávajú 4 až 5 miliónov nových prípadov ročne. Súčasné liečebné postupy spočívajú najmä v symptomatickej a podpornej terapii avšak terapia kauzálna zatiaľ neexistuje.

Projekt je pokračovaním predchádzajúceho projektu so zameraním na prípravu monoklonových protilátok (MP) namierených voči rôznym formám tau proteínu a iným rekombinantným proteómom. Monoklonálne protilátky vďaka svojej vysokej špecifickosti slúžia ako extrémne citlivé štruktúrne sondy pre výskum, diagnostiku a terapeutické aplikácie.

Tau proteín je jedným z hlavných znakov neurodegeneračného procesu pri Alzheimerovej chorobe. V procese vývoja Alzheimerovej choroby je možné pomocou monoklonálnych protilátok detekovať rôzne patologicky modifikované formy tau proteínu. Pretože patologická fosforylácia tau proteínu zohráva kľúčovú úlohu pri vývoji a progresii ochorenia, záujem vedeckej verejnosti sa zameriava na identifikáciu fosforylačných miest zapojených do formovania patologických štruktúr typických pre toto ochorenie. Príprava MP voči fosfoepitopom zodpovedným za patologické procesy nám umožní determinovať funkčný význam takýchto epitopov a poukázať na možný vzťah k vývoju neurodegenerácie. Navyše, pomocou získaných protilátok bude možné identifikovať strategicky významné antigénne determinanty (epitopy) ako potenciálne terapeutické ciele.

Ako pokusné zvieratá budú slúžiť myši BALB/c (samičky). Imunizácia patologickými formami tau proteínu navodí u týchto myší imunitnú odpoveď. Slezinové bunky myši budú použité na prípravu hybridómov produkujúcich monoklonové protilátky. Pokusy na myšiach sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Celkom bude použitých 100 myší Balb/c (samice) vo veku približne 6 týždňov.

Po vstupnej karanténe a veterinárnom vyšetrení budú zvieratá priradené do príslušného experimentu.

- Každdej myške v experimente sa aplikuje testovaný antigén (rôzne formy patologického tau proteínu) subkutánnou a intraperitoneálnou injekciou v dávke v 200ul fyziologického roztoku s kompletným a inkompletným Freundovým adjuvantom. Zvieratá dostanú 3-5 dávok antigénu v mesačných intervaloch s cieľom získať dostatočnú imunitnú odpoveď.
- 10-14 dní po poslednej imunizačnej dávke sa zvieratám odoberie krv z retroorbitálneho plexu v objeme asi 100-150 ul s cieľom stanoviť titer imunizáciou indukovaných protilátok v sérach zvierat. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieratá neprekračuje stanovené normy.
- Zvieratá budú následne v rôznych časových intervaloch od poslednej dávky (3,6,9,12 mesiacov) postupne humánne usmrtené v súlade so zákonom: anestézia a dislokácia krčných stavcov.

- Rozhodnutie o usmrtení je nevyhnutné pre získanie sleziny ako zdroj plazmatických buniek na prípravu hybridómov produkujúcich monoklonové protilátky. V tomto prípade nie je možné zachovať život zvierat'a.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Cieľom projektu je príprava monoklonových protilátok namierených voči patologicky modifikovaným formám proteínu tau, ktoré nám umožnia determinovať funkčný význam epitopov zodpovedných za patologické zmeny a poukázať na možný vzťah k vývoju neurodegenerácie. Zároveň bude možné identifikovať štatisticky významné antigénne determinanty (epitopy) ako potenciálne terapeutické ciele. Vzhľadom na fakt, že daný experiment sa v súčasnosti nedá vykonať v podmienkach *in vitro*, keďže špecifické protilátky vznikajú po imunizácii zvierat, ani na ľuďoch, je použitie animálnych modelov nevyhnutné.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolest' žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia, subkutánna a intraperitoneálna injekcia	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolest' slabá. Trvanie 1 minútu.
Odber krvi (retroorbitálny plexus)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Podá sa polovičná dávka anestetík na utlmenie bolesti. V okamihu ako je zviera sedované sa sklenená kapilára jemne zasunie pod očné guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolest' stredná. Trvanie 1 minútu.
Usmrtenie v anestéze dislokáciou krčných stavcov	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Intraperitoneálne sa podá anestetikum v dávke 100µl. Cervikálna dislokácia sa vykoná v anestézii. Bolest' žiadna. Trvanie 30 sekúnd

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné ŠPP. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Počet zvierat v nádobe zohľadňuje normy dané zákonom. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám.

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere. V jednotlivých skupinách bude maximálne 5 zvierat. Počet zvierat zohľadňuje variabilitu imunitnej odpovede.

Nahradenie:

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.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

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

Utrpenie versus prínos

Cieľom projektu je príprava monoklonových protilátok, ktoré sú namierené voči patologicky modifikovaným (fosforylovaným) formám proteínu tau a iným proteínom. Monoklonové protilátky namierené voči fosfoepitopom zodpovedným za patologické zmeny v mozgu pacientov postihnutých Alzheimerovou chorobou umožnia určiť funkčný význam týchto epitopov s následným potenciálne terapeutickým využitím. Keďže proteín tau je prirodzene neusporiadaný proteín, ktorý nemá stabilnú štruktúru, neexistuje iná možnosť mapovanie jeho patologických zmien, ako používať špecifické protilátky, ktoré vznikajú po imunizácii. Imunizované zvieratá v experimente nebudú vystavené utrpeniu. Intraperitoneálna a subkutánna aplikácia imunogénu trvá niekoľko sekúnd. Odber krvi trvá maximálne jednu minútu a vykonáva sa na sedovaných zvieratách. Experiment sa ukončí odobratím sleziny imunizovaného zvieratá v celkovej anestézii za účelom získania plazmatických buniek na prípravu hybridómov produkujúcich monoklonové protilátky najmenej tri týždne od poslednej dávky a najviac rok po poslednej dávke. Pre tieto dôvody prínos experimentov výrazne prevyšuje mieru utrpenia zvierat.

Začiatok pokusu je plánovaný na 7.1.2017 a bude sa realizovať v priebehu necelých dvoch rokov, do 31.12.2019.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Budovanie mozgovej banky tkanív transgénnych modelov pre Alzheimerovu chorobu

Podrobný účel postupu: 4429/16-22 1g

Alzheimerova choroba, rovnako ako veľa ďalších neurodegeneračných ochorení, sa spája s akumuláciou abnormálnej formy proteínov v centrálnej nervovej sústave, ktorá spôsobuje degeneráciu a následnú dysfunkciu neurónov. Podľa súčasných štatistík trpí Alzheimerovou chorobou 24 miliónov ľudí a každý rok sa toto číslo zväčší o 4,5 milióna nových prípadov. Podľa predpokladov počet pacientov do roku 2040 stúpne celosvetovo v priemere o 200 percent. Súčasný liečebný postup spočíva najmä v symptomatickej a podpornej terapii avšak terapia kauzálna zatiaľ neexistuje. Aj preto sa v ostatnom čase hľadajú nové terapeutické ciele, ktoré sú zapojené v patogenéze ochorenia. Zdrojom nových poznatkov sú predovšetkým mozgové tkanivá z ľudského mozgu ako aj z mozgu animálnych modelov.

Predložený projekt si kladie za svoj cieľ zbierať mozgové tkanivá zo všetkých transgénnych a kontrolných zvierat, ktoré boli súčasťou iných experimentov, alebo boli vyradené z chovu. Zvieratá budú testované v rôznych behaviorálnych testoch (Catwalk, Phenotyper), po ich ukončení budú uvedené do hlbkej anestézie, odoberie sa im mozgovo-miechová tekutina a krv a následne budú humane usmrtené pomocou dekapitácie, alebo pomocou perfúzie. Mozgové tkanivá a mozgovo-miechová tekutina budú slúžiť pre proteomické, metabolomické a transkriptomické analýzy. Výsledky týchto analýz môžu viesť k identifikácii nových terapeutických cieľov a biologických markerov.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Informácie získané z ľudského mozgového tkaniva majú často obmedzenú výpovednú hodnotu vzhľadom na veľmi vysokú heterogenitu ľudskej populácie. Aj preto sa čoraz viac využívajú animálne modely, kde je heterogenita významne redukovaná, čo zvyšuje pravdepodobnosť objavenia nových členov kaskády chorobných zmien. Pre tieto účely budeme využívať všetky zvieratá, ktoré sú určené na vyradenie z chovu, alebo tie, ktoré boli súčasťou iného experimentu, ktorý nevyužíval mozgové tkanivo pre ďalšie analýzy. Vďaka tomuto prístupu ušetríme pomerne veľké množstvo laboratórnych potkanov. 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.
Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia anestetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Perfúzia zvierat	Otvorenie hrudnej dutiny, zavedenie ihly do ľavej komory srdca. Cez ihlu bude prenikať do celého tela zvieraťa roztok PBS s heparínom a následne PFA. Prebehne v celkovej anestézii. Bolesť slabá.
Odbor mozgovo-miechovej	Zviera sa uvedie do celkovej anestézie. Nastrihne sa koža v oblasti

tekutiny	krčnej chrbtice. Zavedie sa ihla do cisterna magna a odoberie sa max. 100ul CSF. Následne sa zviera humánne usmrtí. Bolesť slabá
----------	--

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie: Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné ŠPP. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám.

Redukcia: V danom experimente budeme využívať zvieratá vyradené z chovu, čím redukuje množstvo experimentálnych zvierat, ktoré by bolo potrebné pre účely experimentu zvlášť odchovať.

Nahradenie: Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v ľudskom mozgu, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané z tkaniva animálnych modeloch za tie, ktoré pochádzajú z in vitro experimentov.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

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

Utrpenie versus prínos

Príčina Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatii zostáva neznáma. Nadalej sa pátra po mechanizme ochorenia a po jednotlivých molekulových dráhach, ktoré by boli zapojené v patogenéze ochorenia. V tomto ohľade sa čoraz viac využívajú animálne modely, pretože ich variabilita je ďaleko menšia, ako to vidíme v ľudskej populácii. Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu, všetky odbery tkanív sa uskutočnia v hlbokjej anestézii, a po odbere budú zvieratá humánne usmrtené.

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.1.2017 a bude sa realizovať počas nasledujúcich dvoch rokov, do 31.12.2019.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Názov projektu: Nechirurgický prenos myších embryí

Podrobný účel postupu: 4429/16-221h

Cieľom predkladaného projektu je prenos transgénnych myších línií za účelom rederivácie chovu a zachovania fenotypu.

Projekt sa bude vykonávať vo viacerých na seba nadväzujúcich fázach. Úvod projektu bude spočívať v príprave 10 sterilných samcov kastrovaných v celkovej anestézii podviazaním semenovodov. Samce sa začnú využívať až 3 týždne po operácii. V nasledujúcej fáze projektu sa budú z darkýň izolovať embryá v štádiu blastocysty výplachom materničných rohov. Za týmto účelom bude použitých 200 samíc, 50 samíc z každej línie v jednotlivých čiastkových projektoch. Časť darkýň sa hormonálne stimuluje, a to 1.deň použitím PMSG a na tretí deň hCG. Následne sa pripustia so samcami. Zvyšná časť darkýň sa pripustí bez predchádzajúcej hormonálnej stimulácie. Obe skupiny darkýň sa humánne usmrťia cervikálnou dislokáciou na 3,5 deň od pripustenia. Po otvorení brušnej dutiny sa postupne izolujú a vyplachujú materničné rohy v médiu pre to určenom. Získané embryá sa ďalej použijú na transcervikálny prenos do pseudogavidných samíc. V pokuse sa použije 50 príjemkyň, v počte zhruba 5 samíc v každom čiastkovom pokuse. Pohlavne dospelé samice sa budú pripúšťať so sterilnými samcami na dosiahnutie pseudogravidity a následne sa použijú na príjem darcovských embryí. Prenos embryí jednotlivých línií sa bude realizovať nechirurgickou metódou bez použitia anestézie, a to len po dobu narodenia dostatočného množstva potomstva schopného rozmnožovať sa a udržať transgénnu líniu.

Narodeným mláďatám sa po 5-7 dňoch sa odoberú vzorky z chvosta na genotypizáciu pre určenie transgénnych zvierat. Po ich odstave sa matky humánne usmrťia.

Po úspešnom prenose embryí a narodení prvej generácie potomstva sa zameriame na udržanie chovu jednotlivých línií. Po detekcii pohlavného cyklu samíc sa samice v proestre pripustia ku transgénnym samcom a na druhý deň ráno sa u nich detekuje prítomnosť vaginálnej zátky.

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:

- **Príprava sterilných samcov**

- počet použitých zvierat: 10 samci z kmeňa CD1, 10 samci z kmeňa C57

- počet opakujúcich sa čiastkových pokusov: 4

- počet zvierat v čiastkových pokusoch: 5 samcov

- celková dĺžka pokusu: 10-18 mesiacov

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 podajú analgetiká (ketoprofén). V prípade vážnych zdravotných komplikácií sa zviera z experimentu vylúči a humánne sa usmrťi.

- **Izolácia embryí z materničných rohov darkýň – transgénne línie**

- počet zvierat v celom pokuse:

- 50 samičiek darkýň R3m4

- 50 samičiek darkýň R3m7

-50 samičiek darkýň R4m2

-50 samičiek darkýň R4m3

-počet opakujúcich sa čiastkových pokusov: 40

-celková dĺžka pokusu: 10 mesiacov

Samice sa na druhý deň po pripustení humánne usmrtia. Po otvorení brušnej dutiny sa postupne izolujú a vyplachujú materničné rohy v médiu pre to určenom. Získané embryá sú transcervikálne prenesené do reprodukčného traktu recipientiek.

- **Príjemkyne embryí**

-počet zvierat v celom pokuse: 50 z kmeňa CD1

-počet opakujúcich sa čiastkových pokusov: 10

-počet zvierat v čiastkových pokusoch: 5

-celková dĺžka pokusa: 10-18 mesiacov

Pseudogavidné samice sú na 2,5 deň po koite použité ako recipientky darcovských embryí. Získané embryá sa pomocou katétra aplikujú transcervikálne do reprodukčného traktu náhradnej matky. Po transfere je samica umiestnená do čistej klietky a sledovaná počas celého obdobia gravidity. Po odstave mládat môže byť znovu použitá k reprodukcii.

- **Odber vzoriek na genotypizáciu**

Vo veku 5-7 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.

- **Udržiavanie transgénnych línii**

V pravidelných mesačných intervaloch sa bude pripúšťať dostatočné množstvo potomstva na udržiavanie jednotlivých transgénnych línii. U línii s problémovým pripúšťaním a odchovom mládat, budeme pripúšťať vyšší počet samic, aby sme zabezpečili dostatočný počet životaschopného potomstva. Zvieratá vyradené z chovu sa humánne utratia cervikálnou dislokáciou.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Moderné chovy transgénnych zvierat čoraz viac využívajú 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. V súčasnosti sa v biomedicínskom výskume využívajú predovšetkým SPF zvieratá, ktoré musia byť zbavené choroboplodných zárodkov. Embryo transfer tak predstavuje „zlatý štandard“ v produkcii SPF zvierat a rederivácii kontaminovaných chovov.

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
Detekcia pohlavného cyklu	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 30 sekúnd.
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia hormonálnych prípravkov u donoriek	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Krátkodobá fixácia recipientky a transvaginálne zavedenie katétra	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 30 sekúnd.
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. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám, vo vaniciach s obohateným prostredím.

Redukcia: Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a bol nastavený tak, aby sme v krátkom časovom horizonte boli schopní získať dostatočný počet embryí a následne aj dostatočný počet potomstva. Pripúšťanie zvierat (pochádzajúcich z darcovských embryí) sa bude vykonávať len v minimalizovanom množstve, nevyhnutnom pre udržiavanie línii.

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. Na prenos embryí bude zvolená nechirurgická technika, ktorá eliminuje stres a bolesť zvierat sprevádzajúce operačný zákrok. Rovnako aj použitie analgetík a anestetík pri tejto technike nie je potrebné. Príprava vazektomovaných samcov sa bude vykonávať v hlbokoj anestézii a bude im poskytnutá pooperačná starostlivosť. Na zmiernenie bolesti im budú podané analgetiká (ketoprofen).

Po ukončení projektu budú všetky zvieratá humánne usmrtené cervikálnou dislokáciou. Po získaní dostatočného množstva potomstva sa projekt ukončí. Zdravé zvieratá sú predpokladom pre úspešné experimenty a zárukou dôveryhodnosti získaných výsledkov.

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.).

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 4429/16 - 221 j

Charakterizácia počtu a aktivity dendritových buniek u transgénneho animálneho modelu Alzheimerovej choroby

Podrobný účel postupu:

Určenie počtu a aktivity dendritových buniek u transgénneho animálneho modelu Alzheimerovej choroby, ktoré sú tzv. profesionálne antigén prezentujúce bunky v imunitnom systéme, je dôležitým faktorom pre objasnenie ich úlohy v procese tohto neurodegeneratívneho ochorenia.

Alzheimerova choroba je ochorenie, ktoré je sprevádzané chronickým neurozápalom, preto aj samotná modifikácia procesov cez bunky imunitného systému môže poskytnúť vysoký terapeutický potenciál. Preto na vývoj takejto terapie je veľmi dôležité imunoprofilovať navrhnutý transgénny animálny model v porovnaní s kontrolným modelom. Predložený projekt má za úlohu charakterizovať ako neurodegenerácia spôsobená ľudským tau proteínom u transgénnych zvierat ovplyvňuje počet, aktivitu a funkčnosť tzv. dendritových buniek, ktoré majú kľúčovú úlohu v regulácii imunitnej odpovede počas neurodegenerácie a zároveň ich následne použiť ako potenciálny terapeutický nástroj. Po imunoprofilovaní animálneho modelu, budeme zo zvierat z kostnej drene následne pripravovať primárne dendritové bunky na testovanie tau peptidov ako potenciálny zdroj antigénov. Takto pripravené „vakcíny“, budeme subkutánne podávať v mesačných intervaloch transgénnym zvieratám. Zároveň budeme skupine zvierat aplikovať komerčné dendritové bunky obdobne stimulované tau-peptidmi. V pravidelných intervaloch bude zvieratám odobratá krv z očného splavu na testovanie protilátkovej imunitnej odpovede. Desať dní po poslednej dávke vakcíny, opäť odoberieme zvieratám krv a humánne ich usmrtíme. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieratá nebude prekračovať stanovené normy. Experimenty sú navrhnuté tak, aby spĺňali legislatívne a etické normy vzťahujúce sa na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Zanalyzovali sme všetky dostupné alternatívy, umožňujúce v navrhovaných experimentoch nahradiť zvieratá za iný biologický testovací systém. Na imunoprofilovanie transgénneho animálneho modelu Alzheimerovej choroby ako aj na následné určenie účinnosti vakcíny na báze dendritových buniek je však nevyhnutné použiť imunitný systém cicavcov. Na tento typ experimentov sa najčastejšie používajú malé laboratórne myši a potkany. Opísané experimenty sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami. Vzhľadom na skutočnosť, že ide o vývoj novej vakcíny na báze dendritových buniek a neskôr aj o fakt, že v súčasnosti nie je dovolené testovať imunogénnosť vakcín (tj. stanovenie hladín protilátok indukovaných vakcínou) na ľuďoch bez predchádzajúceho otestovania na animálnych modeloch, je použitie zvierat nevyhnutné.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Vázenie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia anestetik	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Krátkodobá fixácia	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou

a subkutánna injekcia (1x za mesiac) „vakcína“	a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Odber krvi (retroorbitálny plexus)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Podá sa polovičná dávka anestetík na utlmenie bolesti. V okamihu ako je zviera sedované sa sklenená kapilára jemne zasunie pod očné guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť stredná. Trvanie max. 1 minúta.

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. Niekoľko nezávislých štúdií preukázalo, že stres významne modifikuje imunitnú odpoveď, čo je v prípade nášho experiment nežiaduce. Starostlivosť zabezpečuje jedna osoba, na ktorú si zvieratá zvykli. Zvieratá sú chované v počte 5 zvierat na chovnú nádobu, aby sme zabezpečili sociálne interakcie medzi zvieratami. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám. Odber krvi sa vykonáva v čiastkovej anestézii, aby sme utlmili bolesť spôsobenú odberom krvi.

Redukcia:

V navrhovaných experimentoch budeme využívať zvieratá z vlastného chovu tak, aby sa minimalizoval počet pokusných zvierat. Transgénne myši budú krížené iba v počtoch nevyhnutných pre získanie potrebného množstva údajov nevyhnutných pre relevantné štatistické spracovanie výsledkov. Stanovený počet zvierat sa opiera o naše predchádzajúce experimenty na myšiach. Ukázalo sa, že počet zvierat v skupine menší ako 20 nie je dostatočne štatisticky relevantný, keďže aj u transgénnych zvierat sa vyskytuje variabilita daná mierou expresie transgénneho proteínu.

Nahradenie:

Vzhľadom na skutočnosť, že ide o charakterizáciu transgénneho animálneho modelu a následne o vývoj novej vakcíny na báze dendritových buniek, ktorej imunogénnosť nie je možné testovať na ľuďoch bez predchádzajúceho otestovania na animálnych modeloch, je použitie zvierat nevyhnutné.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

Pre hľadanie alternatívnej metódy sme použili nasledovné registre medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód (ECVAM, Pubmed, 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. Transgénnym zvieratám budú aplikované dávky vakcíny pripravenej na báze dendritových buniek, ktoré nespôsobujú žiadnu nebezpečnú imunitnú odpoveď poškodzujúcu organizmus zvierat. Subkutánna aplikácia vakcíny trvá niekoľko sekúnd. Odber krvi sa vykonáva na sedovaných zvieratách. Po odbere budú zvieratá humánne usmrtené. Príčina Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatií zostáva neznáma. Dôsledkom tohto stavu je absencia účinnej liečby. Získané informácie z predkladaného experimentu významne napomôžu pochopiť úlohu dendritových buniek v procese neurodegenerácie, objasniť nakoľko je možné tento patologický proces modifikovať čím

v konečnom dôsledku prispeje k vývoju efektívnej vakcíny na báze dendritových buniek, zameranej na liečbu ľudských neurodegeneračných ochorení.

Začiatok pokusu je plánovaný na 01.12.2016 a bude sa realizovať v priebehu dvoch rokov, do 31.12.2018.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu: 4062/16-221a - spätné priradenie

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:

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, febrilné kŕče a následnej silnej antivakcinačnej lobby. Vyvíjaná celobunková vakcína proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu, ktorá bola aplikovaná v tomto projekte, obsahovala geneticky detoxifikované a chemicky usmrtené bunky baktérie *Bordetella Pertussis* a bola formulovaná pomocou hydroxidu hlinitého ako nosiča tak, aby poskytovala maximálnu imunogenicitu a minimalizovala nežiaduce účinky typu zvýšenie teploty.

Účelom skúšky bolo 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 použila RALDITEPERA. Pre porovnanie s vyvíjanou očkovacou látkou boli pri skúškach použité 3 skupiny kontrolných zvierat: zvieratá vakcinované nemodifikovanou celobunečnou vakcínou proti DTP, zvieratá, ktorým bol podaný adjuvans, teda hydroxid hlinitý a fyziologický roztok.

Cieľom projektu bolo 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 bol umiestnený kontralaterálne za lopatku. Králiky boli v celkovej anestéze. Anestézu vykoná zmluvný veterinárny lekár. Pri návrhu

skúšky sme vychádzali 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 celej doby bolo zabezpečené jemné zaobchádzanie a manipulácia so zvieratami so stálym vyškoleným personálom. Zvieratá mali štandardné umiestnenie, potravu a starostlivosť. Po ukončení postupu boli všetky zvieratá usmrtené podľa NV č. 377/2012, § 5, Príloha č.2, Králiky – Nadmerná dávka anestetík - Zoletil (podáva zmluvný veterinárny lekár), Náraz/úder do hlavy.

Prínosy z vykonaného projektu:

Novo vyvíjaná celobunková vakcína proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu, ktorá bola aplikovaná v tomto projekte, obsahovala geneticky detoxifikované a chemicky usmrtené bunky baktérie *Bordetella pertussis* a bola formulovaná pomocou adjuvansu hydroxidu hlinitého tak, aby poskytovala maximálnu imunogenicitu a minimalizovala nežiaduce účinky typu zvýšenie teploty.

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

Predpokladaná ujma na použité zvieratá v rámci vykonaného postupu:

Králikom boli aplikované podkožné snímače telesnej teploty a parenterálne aplikované testované a kontrolné prípravky podľa aplikačnej schémy. V prvých dňoch po aplikácii podkožných snímačov, bolo pozorované mierne začervenanie v mieste aplikácie podkožných

meračov, ktoré do 5 dní vymizlo. Počas trvania rekonvalescencie boli králikom podávané ATB a analgetiká. Po aplikácii testovaných a kontrolných prípravkov, sme pozorovali mierne zvýšenie telesnej teploty o maximálne 1 °C, ktorá sa do 24 hodín vrátila do pôvodných hodnôt.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná

Počet a druh pokusných zvierat

Králik domáci kmeňa HIL, samice, 40 ks zvierat na otestovanie jednorázovej aplikácie testovaných a kontrolných prípravkov.

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.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie:

Test na zvieratách sa nedá nahradiť alternatívnymi metódami *in vitro* z dôvodu potreby reakcie živého organizmu na podanie látok a možnou reakciou v mieste podania, ako aj systémové pôsobenie. Králik je vhodný a dostatočne citlivý zvierací model pre testovanie pyrogénnych látok v humánnych prípravkoch, preto sa nenahrádza iným druhom. Pri testovaní látok zanechávajúcich dlhodobú imunitnú stopu ako vakcíny, nie je možné použiť takéto zviera na testovanie týchto látok opakovane.

2. Obmedzenie:

Počet zvierat vybraných do postupu je považovaný za minimálny a nevyhnutný. Znižovanie počtu zvierat sa môže prejaviť negatívnym vplyvom na reprodukovateľnosť výsledkov a validitu postupov.

3. Zjemnenie:

Zásada zjemnenia bola dodržiavaná v plnej miere odo dňa dodávky zvierat do zvieratníka. Počas karantény prešli zvieratá procesom handlingu. Pri štandardnej dennej jemnej manipulácii si zvykli na prítomnosť človeka a na bežné denné procedúry (čistenie, kŕmenie, napájanie, kontrola zdravotného stavu). Zvieratá boli chované v štandardných podmienkach, ktoré nevyvolávajú stres. Králiky boli ustajnené individuálne v označených kovových klietkach s roštovou podlahou a dupákom v monitorovanom a klimatizovanom prostredí s teplotou (15 – 21) °C a relatívnou vlhkosťou ≥ 45 %. Počas postupu mali králiky svetelný režim s prirodzeným striedaním – svetlo/tma. Čistenie nádob a okolitého priestoru sa realizoval podľa 280-001-OBP Prevádzkový poriadok vypracovaný s ohľadom na zdravie a pohodu zvierat v Zvieratníku.

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu: Akútna dermálna toxicita - 3114/15-221 a - spätné posúdenie

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu postupu, predpokladaná ujma a prínosy:

STAFAL sol. loc. je antistafylokokový bakteriofág na lokálne použitie, ktorý obsahuje vysoko účinné virulentné fágové častice so silným a rýchlym lytickým a polyvalentným účinkom. Účinkuje cielene ako lokálny antimikrobiálny prípravok u všetkých foriem stafylokokových infekcií. Je určený k fágovej deštrukcii multirezistentných stafylokokových buniek výhradne v mieste prebiehajúcej chronickej infekcie. Bakteriofág má letálny účinok na cielenú bunku, kumuluje sa v mieste infekcie, dokáže sa replikovať, parazituje na infekčnom médiu, kde lyzuje a zabíja stafylokoky deštrukciou. Polyvalentný fág reprezentuje kompletný stafylokokový antigén a je schopný stimulovať u pacientov aj aktívnu imunizáciu. Pri lokálnom použití súčasne čiastočne preniká aj do krvného obehu a tkanív, indukuje systémovú reakciu imunitnej sústavy a môže prípadne ovplyvniť aj vzdialené stafylokokové zásobárne v organizme. Jeho perzistencia v krvi a tkanivách je závislá od prítomnosti hostiteľského stafylokoka.

Antistafylokokový fágový lytický enzýmový roztok je určený výhradne na miestnu aplikáciu u infekcií vyvolaných stafylokokovými kmeňmi. Je zameraný na deštrukciu stafylokokových buniek v mieste prebiehajúcej infekcie, na elimináciu pôvodcov stafylokokových infekcií z ložísk infekcie (hnisavé procesy kože, podkožných a kožných adnex), aj z potenciálnych zásobární (predovšetkým horné cesty dýchacie - nos, nosohltan, a prínosové dutiny, sekundárne aj črevný a močový trakt). Účinný pri komplexnej liečbe chronických foriem stafylokokových infekcií (hnisavé rany a afekcie kože a podkožia, infekcie postihujúce hlboko uložené mäkké tkanivo), ktorý zabraňuje ich vyústeniu do septického stavu. Je tiež dôležitou súčasťou preventívnych opatrení, zabraňuje vzniku superponovaných pyogénnych stafylokokových komplikácií po operačných intervenciách.

Cieľom projektu bolo overenie farmakologickej spôsobilosti pripravených prípravkov z hľadiska bezpečnosti a neškodnosti na zvieracích modeloch; overenie akútnej dermálnej toxicity. Bola dokázaná neškodnosť (akútna dermálna toxicita- negatívna) u všetkých testovaných aj kontrolných látok uvedených v aplikačnej schéme.

Aplikačná schéma

Prípravok (skupina)	Dávka/Aplikácia	Počet zvierat
Testovaný prípravok– STAFAL Lyo sol.loc. 10 ⁹ (fag. častíc/ml)	á 0,5 ml /dermálna aplikácia	5 samcov 5 samíc
Testovaný prípravok – STAFAL Lyo sol.loc. 10 ⁵ (fag. častíc/ml)	á 0,5 ml /dermálna aplikácia	5 samcov 5 samíc
Kontrolný prípravok – Fyziologický roztok (9g/l)	á 0,5 ml /dermálna aplikácia	5 samcov 5 samíc
Testovaný prípravok – F1 Endolysin 200 µl/ml	á 0,5 ml /dermálna aplikácia	5 samcov 5 samíc
Testovaný prípravok – F1 Endolysin 100 µl/ml	á 0,5 ml /dermálna aplikácia	5 samcov 5 samíc
Kontrolný prípravok – Fosfátom tlmenný fyziologický roztok- PBS	á 0,5 ml /dermálna aplikácia	5 samcov 5 samíc

Morčatám sa počas postupu neodoberal žiadny biologický materiál. Po ukončení postupu boli všetky zvieratá usmrtené podľa NV č. 377/2012, § 5, Príloha č.2, Morčatá – Nadmerná dávka anestetík (podáva zmluvný veterinárny lekár) a následná dislokácia krčných stavcov.

Prínosy z vykonaného projektu:

Poznatky získané riešením projektu prispievajú k overeniu možnej toxicity prípravkov účinkujúcich cielene ako lokálny antimikrobiálny prípravok u všetkých foriem stafylokokových infekcií. Sú určené k fágovej deštrukcii multirezistentných stafylokokových buniek výhradne v mieste prebiehajúcej chronickej infekcie.

Predpokladaná ujma na použité zvieratá v rámci vykonaného postupu:

Nebola pozorovaná žiadna kožná reakcia v mieste aplikácie prípravku.

Predpokladaná úroveň krutosti: slabá

Počet a druh pokusných zvierat

Morča domáce - outbredné, TRIK, samec a samica, 60 ks

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Stanovený počet zvierat predstavuje limit, ktorý je nevyhnutný pre získanie dostatočného počtu vzoriek pre validné štatistické vyhodnotenie výsledkov po dermálnej aplikácii oboch prípravkov. Nie je možné nahradiť postup na zvieratách *in vitro* testami na bunkových líniiach. So zvieratami manipulovali zaškolené osoby s dlhoročnými praktickými skúsenosťami a platnými osvedčeniami o absolvovaní akreditovaného vzdelávacieho programu ďalšieho vzdelávania.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie:

Test na zvieratách sa nedá nahradiť alternatívnymi metódami *in vitro* z dôvodu potreby reakcie živého organizmu na podanie látok a možnou reakciou v mieste podania, ako aj systémové pôsobenie. Morča je vhodný a dostatočne citlivý zvierací model pre testovanie takýchto prípravkoch.

2. Obmedzenie:

Počet zvierat vybraných do postupu je považovaný za minimálny a nevyhnutný. Znižovanie počtu zvierat sa môže prejaviť negatívnym vplyvom na reprodukovateľnosť výsledkov a validitu postupov.

3. Zjemnenie:

Zásada zjemnenia bola dodržiavaná v plnej miere odo dňa dodávky zvierat do zvieratníka. Počas karantény prešli zvieratá procesom handlingu. Pri štandardnej dennej jemnej manipulácii si zvykli na prítomnosť človeka a na bežné denné procedúry (čistenie, kŕmenie, napájanie, kontrola zdravotného stavu). Zvieratá boli chované v štandardných podmienkach, ktoré nevyvolávajú stres. Morčatá boli ustajnené v označených umelohmotných nádobách v monitorovanom a klimatizovanom prostredí s teplotou (22 ± 2) °C a relatívnou vlhkosťou (45 - 65) %. Počas postupu mali morčatá prirodzený svetelný režim.

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu: Stanovenie účinnosti Immodinu - E-rozetový test - 4437/16-221

Cieľ projektu pokusu, predpokladaná ujma a prínosy:

Správne fungovanie jednotlivých zložiek imunitného systému u ľudí je predpokladom väčšej odolnosti voči onkologickým, infekčným, alergickým a ďalším ochoreniam, ktorých počet narastá. Imunitný systém je tvorený bunkovou zložkou a veľkým počtom bunkami produkovaných mediátorov, ktoré regulujú imunitné reakcie pri každom zo spomínaných skupín ochorení špecificky. Pri poškodení niektorej zložky je narušená celková homeostáza imunitného systému, pričom táto imunologická supresia môže viesť k vzniku vážnych ochorení. Podávanie vhodného imunomodulačného prípravku môže preto významne pozitívne ovplyvniť celkový výsledok liečby pacientov u ktorých je zistená znížená funkcia imunitného systému. Jedným z takýchto prípravkov je IMMODIN (Transfer faktor). Ide o dialyzovaný homogenát leukocytov (DHL) periférnej krvi zdravých jedincov, ktorý obsahuje nízkomolekulové látky s veľkosťou do 10 kDa.

Azathioprin je chemická látka (purínový analóg) používaná na antigénovo-nešpecifickú imunosupresiu u ľudí a to hlavne pri ochoreniach ako sú autoimúnne ochorenia a transplantácie orgánov. Jeho mechanizmus účinku na všetky proliferujúce bunky, teda aj imunitné bunky, (napr. T a B lymfocyty) je inhibícia enzýmu, ktorý je potrebný pre syntézu DNA.

Cieľom projektu je stanoviť rozsah imunostimulačného účinku Immodinu (Transfer faktora) u morčiat po supresii vyvolanej látkou Azathioprin. Špecifickým cieľom bude zistiť stimulačný účinok Immodinu (Transfer faktora) na proliferáciu T- lymfocytov. E-rozety z krvi sa budú vyhodnocovať pomocou fluorescenčnej mikroskopie pred aplikáciou imunosupresíva, po aplikácii imunosupresíva a po aplikácii imunomodulátora. Odoberie sa 2 ml krvi kardiálnou punkciou do heparínu. Po navrstvení odobratej krvi na separačnú zmes sa po gradiendnej centrifugácii oddelia lymfocyty od erytrocytov a ďalších leukocytov. Po pridaní premytých králičích erytrocytov k morčacím lymfocytom v pomere 1:1 objemových jednotiek sa začnú po krátkej dobe vytvárať E-rozety (naviazane králičie erytrocyty na morčacích T-lymfocytoch). Po ofarbení sa mikroskopicky stanovuje počet takto vytvorených E-roziet.

Počas experimentu a počas podávania látok sa zabezpečí jemné zaobchádzanie a manipulácia so zvieratami. Neočakáva sa riziko bolesti ani utrpenia. Zvieratá budú mať štandardné umiestnenie, potravu a starostlivosť.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredné

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Zaradenie podľa krutosti
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres	slabé
Krátka fixácia pri aplikácii	Krátkodobý mierny stres	slabé
Jednorázová s.c.aplikácia	Krátkodobé obmedzenie, bolesť slabá	slabé
Jednorázová p.o.aplikácia	Krátkodobé obmedzenie, bolesť slabá	slabé
Krátka fixácia a i.m. podávania anestetika	Krátkodobé obmedzenie, bolesť slabá	slabé
Opakovaný odber krvi kardiálnou punkciou v anestézii	Krátkodobé obmedzenie, bolesť vyblokováná znecitlivením	stredné
Usmrtenie dislokáciou krčných stavcov v anestéze	Krátka fixácia, bolesť vyblokováná znecitlivením	slabé
Celkové hodnotenie krutosti postupu		stredné

Počet a druh pokusných zvierat

Morča domáce kmeňa TRIK/ Dunkin Hartley, bez rozdielu pohlavia, 10 ks na 1 šaržu testovaného prípravku. Králik domáci, Hill, bez rozdielu pohlavia 1 ks na celú dobu trvania projektu.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Stanovený počet zvierat predstavuje limit, ktorý je nevyhnutný pre získanie dostatočného počtu vzoriek pre validné štatistické vyhodnotenie výsledkov. Tento test účinnosti vychádza plne zo štátnou autoritou schválenej registračnej dokumentácie prípravku IMMODIN. Tento prípravok je určený pre pacientov s rôznymi druhmi imunodeficientných ochorení, u ktorých sa očakáva imunorešauračný účinok a normalizácia imunitnej odpovede. Pri overení komplexného účinku prípravku je nutná cirkulácia (lymfatická, krvná) a interakcie s mnohými zložkami imunity, čo sa nedá simulovať v podmienkach in vitro. Z tohto dôvodu nie je možné nahradiť pokus na zvieratách in vitro testami na bunkových líniiach. So zvieratami budú zaobchádzať zaškolené osoby s dlhoročnými praktickými skúsenosťami.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie:

Test na zvieratách sa nedá nahradiť alternatívnymi metódami *in vitro* z dôvodu potreby reakcie živého organizmu na podanie látok a možnou reakciou v mieste podania, ako aj systémové pôsobenie.

2. Obmedzenie:

Používanie zvierat je stále potrebné na ochranu zdravia ľudí, z pohľadu testovania bezpečnosti, neškodnosti a kvality liekov.

Štatistické hodnotenie validity postupu si vyžaduje reprezentatívny súbor zvierat (uvedený vyššie). Znižovanie počtu zvierat sa môže prejaviť negatívnym vplyvom na reprodukovateľnosť výsledkov a validitu postupu.

3. Zjemnenie:

Zásada zjemnenia bude dodržiavaná v plnej miere odo dňa dodávky zvierat do zvieratníka. Počas karantény prejdú zvieratá procesom handlingu. Pri štandardnej dennej jemnej manipulácii si zvyknú na prítomnosť človeka a na bežné denné procedúry /čistenie, kŕmenie, napájanie, kontrola zdravotného stavu). Zvieratá budú chované v štandardných podmienkach, ktoré nevyvolávajú stres. Morčatá v postupe budú ustajnené v označených umelohmotných nádobách v monitorovanom a klimatizovanom prostredí s teplotou $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$ a relatívnou vlhkosťou (45 - 65) %. Počas postupu budú mať morčatá prirodzený svetelný režim. Čistenie nádob a okolitého priestoru sa bude vykonávať raz za týždeň podľa 280-001-OBP Prevádzkový poriadok vypracovaný s ohľadom na zdravie a pohodu zvierat v zvieratníku. Fľaše s vodou sa budú meniť každý deň. Ako podstielka budú použité hobliny. Starostlivosť o zvieratá počas ustajnenia a pokusu sa bude riadiť NV č. 377/2012 a 280-001-OBP Prevádzkový poriadok vypracovaný s ohľadom na zdravie a pohodu zvierat v zvieratníku.

Projekt bude podliehať opätovnému schváleniu: áno nie

21.12. 2016

Názov projektu:

Testovanie účinnosti protilátok na transgénnych modeloch v pokročilom štádiu vývoja neurofibrilárnej patológie - 4433/16-221

Podrobný účel postupu:

Alzheimerova choroba patrí do kategórie nevyliciteľných neurodegeneratívnych ochorení. V neuronálnych bunkách pacientov s týmto ochorením sa nachádzajú abnormálne formy proteínov, ktoré spôsobujú degeneráciu a následnú dysfunkciu neurónov. Podľa súčasných štatistík trpí Alzheimerovou chorobou 24 miliónov ľudí a každý rok pribúda 4,5 milióna nových prípadov. Súčasné liečebné postupy spočívajú najmä v symptomatickej a podpornej terapii avšak terapia kauzálna zatiaľ neexistuje. Aj preto sa v súčasnosti hľadajú nové spôsoby terapie, ktoré by dokázali ovplyvniť molekulárne zmeny vedúce k prepuknutiu ochorenia.

Predložený projekt má za úlohu testovať účinnosť protilátok v podmienkach in vivo u transgénnych zvierat s pokročilým vývojom neurofibrilárnej patológie. Zvieratám budú aplikované intraperitoneálne protilátky s cieľom potlačiť neurodegeneračné zmeny v centrálnej nervovej sústave v štádiu rozvinutých neuropatologických zmien. Po ukončení experimentu, zvieratám odoberieme krv z očného splavu, humánne usmrtime a odoberieme vzorky mozgu na biochemické a imunohistochemické vyšetrenie. Preštudovali sme všetky dostupné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili nahradiť zvieratá za bunkové systémy. Komplexnosť sledovaných molekulárnych procesov si však vyžaduje použiť cicavčí model. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Testovanie schopnosti protilátok terapeuticky ovplyvniť neurodegeneračné zmeny v centrálnej nervovej sústave animálnych modelov pre Alzheimerovu chorobu nie je možné vykonať na bunkových kultúrach, keďže in vitro systémy nie sú schopné vytvoriť plnú formu neurodegeneračných zmien. Vzhľadom na skutočnosť, že v súčasnosti nie je dovolené tieto metódy skúmať na ľudských pacientoch bez predchádzajúceho otestovania na zvieratách, je použitie animálnych modelov nevyhnutné.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolest' žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia (1x za týždeň)	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolest' slabá. Trvanie 1 minútu.
Odber krvi (retroorbitálny plexus)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Podá sa polovičná dávka anestetík na utlmenie bolesti. V okamihu ako je zviera sedované sa sklenená kapilára jemne zasunie pod očnú guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolest' stredná. Trvanie 1 minútu.

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné ŠPP. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám.

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov. Stanovený počet zvierat sa opiera o naše predchádzajúce experimenty na potkanoch. Ukázalo sa, že počet zvierat v skupine menší ako 18-20 nie je dostatočne štatisticky relevantný, keďže aj u transgénnych zvierat sa vyskytuje variabilita daná mierou expresie transgénneho proteínu.

Nahradenie:

Súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje testovať protilátky v in vitro podmienkach. Z legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať priamo na humánnych pacientoch, bez predchádzajúceho otestovania na laboratórnych zvieratách.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

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

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu, všetky odbery tkanív sa uskutočnia v hlbokoj anestézii, a po odbere budú zvieratá humánne usmrtené. Odber krvi trvá len pár sekúnd a vykonáva sa na sedovaných zvieratách. Intraperitoneálna aplikácia trvá niekoľko sekúnd. Zvieratá dostávajú nízke dávky netoxických protilátok, ktoré nespôsobujú žiadnu nebezpečnú imunitnú odpoveď, ktorá by viedla k poškodeniu organizmu. Získané informácie z predkladaného experimentu významne napomôžu pochopiť mechanizmus šírenia neurofibrilárnej degenerácie a jej prípadného zastavenia prostredníctvom imunitnej odpovede.

Začiatok pokusu je plánovaný na 3.4.2017 a bude sa realizovať do konca roka 2017.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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