

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 4429/16-221 L

Vývoj nového transportného systému pre transport liečiv do mozgu.

Podrobný účel postupu:

Hematoencefalická bariéra (HEB) je bariéra tvorená endotelovými bunkami, ktoré lemujú mozgové mikrokapiláry. HEB predstavuje veľkú prekážku vo vývoji nových terapeutík pre centrálny nervový systém. Niektoré zdroje uvádzajú že až 100% liečiv s veľkou molekulovou hmotnosťou, ako sú peptidy, rekombinantné proteíny, monoklonálne protilátky, liečivá na báze RNA, či liečivá génovej terapie a až 98% liečiv s malou molekulovou hmotnosťou nie je schopné prechádzať cez HEB do mozgu. Tento fakt výrazne limituje možnosti farmakoterapie mozgu a vedie k intenzívnemu výskumu v danej oblasti.

Predložený projekt má ambície pripraviť nové systémy na báze proteínov použiteľné na transport terapeutík do mozgu. Zvieratá budú použité na testovanie prechodu týchto látok do mozgu a stanovenia základných farmakokinetických parametrov testovaných látok (mozog/plazma) ako sú napr. pomer koncentrácie plazma/mozgové tkanivo, plocha pod krivkou koncentrácie, plazmatický polčas, distribučný objem a iné. Na základe týchto parametrov bude možné vyselektovať látky, ktoré môžu byť v budúcnosti použité ako terapeutické systémy pre transport liečiv do mozgu.. Zvieratá budú uvedené do hlbkej anestézie, budú im jednorázovo intravenózne podané testované látky. Zvieratá budú rozdelené do skupín (4 skupiny po 6 zvierat, rôzny čas (napr. 5,10,30,60 min), ukončenie experimentu v čase 60 min). Následne sa im odoberie krv, a budú humanne usmrtené pomocou dekapitácie. Mozgové tkanivá a plazma budú použité na analýzu koncentrácie látok pomocou moderných analytických techník ako LC-MS/MS a vysokocitlivá imunochemická analýza.

Celkom bude použitých 60 samcov vo veku približne 16 týždňov.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v organizme, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané z farmakokinetických štúdií na zvieratách za tie, ktoré pochádzajú z in vitro experimentov.

Budeme testovať dve látky. V jednotlivých skupinách pre individuálne látky bude 30 zvierat.

Plánujeme 4 časové body po 6 zvierat (+6 zvierat ako záloha). V jednotlivých skupinách pre individuálne látky bude 30 zvierat. Počet zvierat zohľadňuje biologickú variabilitu a potrebu viacerých časových bodov pre stanovenie základných farmakokinetických parametrov.

	časový bod 1	časový bod 2	časový bod 3	časový bod 4	
Látka 1	6 zvierat	6 zvierat	6 zvierat	6 zvierat	rezerva 6 zvierat
Látka 2	6 zvierat	6 zvierat	6 zvierat	6 zvierat	rezerva 6 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 intraperitoneálna injekcia anestetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Intravenózne podanie látok do arteria femoralis	Štandardná metóda. Zvieraťu sa v celkovej anestéze nastrihne a odpreparuje koža na vnútornej strane zadnej končatiny. Sledovaná látka sa pomaly podá pomocou injekčnej striekačky do arteria femoralis.
Odber krvi z arteria carotis	Štandardná metóda. Zvieraťu sa v celkovej anestéze nastrihne spoločná karotída a odoberie sa niekoľko ml krvi. Následne sa zviera humánne usmrtí dekapitáciou.

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.

Nahradenie: Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v organizme, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané z farmakokinetických štúdií na zvieratách za tie, ktoré pochádzajú z in vitro experimentov

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, všetky odbory tkanív sa uskutočnia v hlbkej anestézii, a po odbere budú zvieratá humánne usmrtené. Výsledky získané z plánovaného experimentu môžu významne napomôcť pri vývoji nových terapeutických systémov pre transport liečiv do mozgu.

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.12 2016 a bude sa realizovať do 1.12. 2017.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Vytvorenie trojitého *in vitro* bunkového modelu pre štúdium transportu látok - 4429/16-221 m

Podrobný účel postupu:

Hematoencefalická bariéra (HEB) je bariéra zodpovedná za kontrolu transportu látok medzi periférnym prostredím organizmu a centrálnou nervovou sústavou. HEB predstavuje prekážku pre transport látok s veľkou molekulovou hmotnosťou ako sú peptidy, rekombinantné proteíny, monoklonálne protilátky, liečivá na báze RNA, či liečivá génovej terapie. Tento fakt limituje možnosti farmakoterapie mozgu a vedie k intenzívnemu výskumu v danej oblasti.

Aby bolo možné v podmienkach *in vitro* študovať mechanizmus transportu látok, proteínov, či krátkych peptidov medzi krvou resp. cerebrospinálnou tekutinou a centrálnou nervovou sústavou a zároveň nájsť účinný systém použiteľný pre transport terapeutík do mozgu, je potrebné vytvoriť vhodný bunkový model.

Z anatomického hľadiska je HEB tvorená tzv. neuro-vaskulárnou jednotkou, ktorá pozostáva z nervových, gliových a endotelových buniek. Nami vytvorený trojitý HEB bunkový model pre sledovanie transportu látok medzi krvou a mozgom bude pozostávať z primárnych gliových buniek, pericytov a endotelových buniek. Pre sledovanie transportu látok medzi cerebrospinálnou tekutinou a mozgom bude použitý bunkový model zhotovený z primárnych epitelových buniek.

Zvieratá v predkladanom projekte budú použité na prípravu primárnych bunkových kultúr, ktoré následne budú slúžiť na zhotovenie bunkových modelov. Vytvorený bunkový model bude použitý pre štúdium testovania prechodu látok do mozgu a stanovenia základných farmakokinetických parametrov testovaných látok. Na základe uvedených parametrov bude možné vyselektovať látky, ktoré môžu byť v budúcnosti použité ako terapeutické systémy pre transport liečiv do mozgu.

Zvieratá budú uvedené do hlbkej anestézie, humánne usmrtené pomocou dekapitácie a následne im bude odobraté mozgové tkanivo. Mozgové tkanivá budú použité na prípravu primárnych gliových, endotelových, epitelových a pericytových bunkových kultúr.

Počas trvania projektu bude každý týžden usmrených 8 1-dňových potkanov a 4 dospelé potkanie samice. Celkovo bude použitých 800 zvierat.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Za účelom štúdia transportu látok, proteínov a krátkych peptidov medzi krvou resp. cerebrospinálnou tekutinou a centrálnou nervovou sústavou je nevyhnutné vytvorenie funkčného *in vitro* bunkového modelu. Bunkový model bude pozostávať z gliových buniek, pericytov a endotelových buniek. Pre sledovanie transportu látok medzi cerebrospinálnou tekutinou a mozgom bude použitý model zhotovený z primárnych epitelových buniek.

V pravidelných týždňových intervaloch bude použitých 8 1-dňových zvierat a 4 dospelé samice. Počet zvierat zohľadňuje potrebu pravidelnej prípravy viacerých bunkových kultúr.

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 intraperitoneálna injekcia anestetík, dekapitácia	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd. Pred odobratím mozgového tkaniva sa zvieratá humánne usmrťujú dekapitáciou. V prípade 1-dňových potkanov budú zvieratá usmrtené rýchlo dekapitáciou.
---	--

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.

Nahradenie: Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v organizme, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané z farmakokinetických štúdií na zvieratách za tie, ktoré pochádzajú z in vitro experimentov

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, všetky odbery tkanív sa uskutočnia v hlbokej anestézii. Zvieratá budú humánne usmrtené. Výsledky získané z plánovaného experimentu môžu významne napomôcť pri vývoji nových terapeutických systémov pre transport liečiv do mozgu.

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.12. 2016 a bude sa realizovať do 1.12. 2017.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 4429/16-2212

Poškodenie mozgovo-cievnej bariéry v prostredí neurodegenerácie u transgénnych potkaních modelov pre tauopatie

Podrobný účel postupu:

Mozgovo-cievna bariéra (MCB) je tvorená vrstvou endotelových buniek, ktoré sa nachádzajú na povrchu mozgových ciev. Susedné endotelové bunky sú k sebe pevne pútané pomocou tzv. tesných spojov, ktoré medzi mozgovým tkanivom a krvným riečišťom tvoria fyzickú bariéru. Celistvosť MCB zaisťuje iónovú homeostázu, nevyhnutnú pre neuronálnu aktivitu, správny tok živín z krvi do mozgu a zároveň tiež chráni centrálny nervový systém (CNS) pred vniknutím potenciálne škodlivých látok (cirkulujúce makromolekuly, toxíny, patogény, a iné). Je všeobecne známe, že zoznam ochorení CNS zahŕňajúcich poškodenie MCB neustále narastá. Medzi tieto ochorenia zaradujeme aj neurodegeneratívne tuopatie, ako napríklad Alzheimerovu chorobu, Pickovu chorobu, frontotemporálnu demenciu, kortikobazálnu degeneráciu a ďalšie. Dostupnosť transgénnych potkaních modelov (SHR-72, SHR-24 a WISTAR-72) nám umožňuje pozorovať zmeny odohrávajúce sa v MCB v priebehu neurodegenerácie spôsobenej výhradne tau proteínom, bez ohľadu na amyloidovú zložku.

Cieľom projektu je charakteristika rozsahu poškodenia mozgovo-cievnej bariéry u transgénnych potkaních modelov (SHR-72, SHR-24 a WISTAR-72) v prostredí neurodegenerácie spôsobenej tau proteínom a porovnanie poškodení u jednotlivých línií transgénnych zvierat. Poškodenie MCB bude pozorované na viacerých úrovniach:

a, biochémia – sledovanie koncentrácií markerov prestupu v plazme a v mozgovom tkanive:

- pre malé molekuly (sodná soľ fluoresceínu)
- pre proteíny (Evansova modrá)

b, histológia – sledovanie prestupu sérových proteínov do jednotlivých častí mozgu

c, elektrónová mikroskopia – zmeny na úrovni ultraštruktúry neurovaskulárnej jednotky

d, transkriptomické štúdie buniek MCB

e, proteomická analýza buniek MCB

Celkom bude použitých 750 zvierat v rôznych vekových kategóriách

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v organizme, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané zo štúdií na zvieratách za tie, ktoré pochádzajú z in vitro experimentov.

Na charakterizáciu poškodenia MCB v jednotlivých transgénnych líniách bude použitých 750 zvierat. Počet zvierat zohľadňuje biologickú variabilitu a potrebu viacerých zvierat pre proteomické a transkriptomické experimenty (minimálne potrebné množstvo tkaniva).

Transgénna línia	Biochémia/WB	Histológia	Transkriptomická analýza	Proteomika
	TG/CT	TG/CT	TG/CT	TG/CT
SHR-24	15+15	5+5	100+100	5+5
SHR-72	15+15	5+5	100+100	5+5
W-72	15+15	5+5	100+100	5+5

Časť zvierat sa použije na analýzu prechodu markerov do mozgového tkaniva. V tejto časti sa zvieratám ip. aplikuje daný marker (fluoresceín, evansova modrá) a po 30 minútach sa zviera uvedie do celkovej anestézy a perfunduje. Následne sa odoberie mozgové tkanivo na analýzu.

Najväčšia časť zvierat (dokopy 600) sa použije na transkriptomické experimenty v ktorých plánujeme analyzovať veľké množstvo génov. Nakoľko budeme z mozgového tkaniva (z časti mozgu postihnutej tau patológiou) izolovať iba kapilárnu frakciu a následne z nej izolovať RNA, je nutné na takúto analýzu zhromaždiť veľké množstvo materiálu. Z našich predošlých skúseností vieme že RNA zo zvierat musíme zlučovať aby sme mali dostatok materiálu na jednotlivé PCR arrays. Pre každú transgénnu líniu použijeme 100 transgénnych zvierat a 100 kontrolných zvierat rovnakého veku.

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 intraperitoneálna aplikácia látok	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia anestetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Transkardiálna perfúzia	Štandardná metóda. Zviera sa v celkovej anestézii transkardiálne perfunduje štandardným roztokom.

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.

Nahradenie: Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v organizme, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané zo štúdií na zvieratách za tie, ktoré pochádzajú z in vitro experimentov.

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, všetky odbery tkanív sa uskutočnia v hlbokjej anestézii, a po odbere budú zvieratá humánne usmrtené. Výsledky získané z plánovaného experimentu môžu významne napomôcť pri vývoji nových terapeutík pre neurodegenerácie.

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 č. 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4430/16-221

Prenatálne a postnatálne účinky ligandov δ a μ opioidných receptorov na vývoj a funkciu hipokampu

Kľúčové slová v projekte: μ a δ opioidné receptory, hipokampálna excitabilita, napäťovo závislé iónové kanály, transportné proteíny, patch clamp, in vivo elektrofyziológia, hipokampálna plasticita, stres, depresia, aldosterón, dendritické trne, elektrónová mikroskopia

Účel projektu:

Hlavným cieľom projektu je nájdienie spoločných a rozdielnych črt mechanizmu, ktorým μ a δ opioidné receptory ovplyvňujú hipokampálnu excitabilitu a zistenie, ako sa účinky aktivácie a inhibície týchto receptorov líšia v kontrolných zvieratách a zvieratách, ktoré boli vystavené stresu alebo ktoré predstavujú zvierací model depresie.

Opísať ciele projektu:

Budeme analyzovať *in vitro* a *in vivo* (prenatálne a postnatálne) akútne a chronické účinky ligandov μ a δ opioidných receptorov na morfológiu a excitabilitu hipokampálnych neurónov potkanov. V primárnej kultúre neonatálnych hipokampálnych neurónov potkana budeme sledovať: i) zmeny v generovaní spontánnych i depolarizáciou aktivovaných sérií akčných potenciálov; ii) súvisiace zmeny aktivity napäťovo závislých iónových kanálov; iii) následné zmeny exprese transportných proteínov; iv) remodeláciu dendritických trňov. V intaktných mozgoch anestetizovaných zvierat budeme sledovať zmeny generovania akčných potenciálov jednotlivých hipokampálnych neurónov v prostredí zachovaných interakcií s inými časťami mozgu. Účinok ligandov δ opioidných receptorov pri zmene hipokampálnej plasticity vyvolanej depresii podobným stavom alebo chronickým stresom budeme analyzovať pomocou behaviorálnych testov a použitím špecifických neuroendokrinných markerov a markerov mozgovej plasticity.

Prínos z vykonaného projektu:

Jedná sa o základný výskum, ktorý v dlhodobom meradle môže byť ďalej využitý v klinickej praxi. Ligandy opioidných receptorov sú používané na liečbu silnej akútnej a chronickej bolesti. V súčasnosti používané lieky, ktoré sú ligandy μ opioidných receptorov, majú závažne nežiadúce vedľajšie účinky a sú návykové. Je predpoklad, že ligandy δ opioidných receptorov nebudú spôsobovať návyk a budú mať menej nežiadúcich účinkov. Pochopenie rozdielov v mechanizme pôsobenia týchto dvoch druhov ligandov prispeje k vývoju nových liečiv.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórny potkan – *Rattus norvegicus*, dospelé samce (160 ks) Wistar (Velaz, Praha, Česká republika). Laboratórny potkan – *Rattus norvegicus*, gravidné samice (120 kusov) + mláďatá cca 1200 ks (odhadujeme 10 mláďat/vrh), dospelé samce 480 ks, Wistar, Dobrá Voda, SR. Spolu 640 dospelých jedincov a cca 1200 mláďat zo 120 vrhov za celé obdobie trvania pokusu (4 roky). Dôvodom pre použitie potkanov rovnakého kmeňa z dvoch rôznych zdrojov je, že projekt bude riešený pracovníkmi z troch rôznych ústavov SAV, ktoré majú dlhoročné skúsenosti s použitím potkanov od daných dodávateľov (Velaz – UEE BMC SAV; Dobrá Voda - UEFT SAV a Centrum Biovied SAV. Z hľadiska reprodukovateľnosti postupov je žiaduce vykonávať experimenty na potkanoch od dodávateľov, na ktorých boli experimentálne prístupy validované.

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

Zvieratá až do začatia experimentálneho postupu nebudú vystavené žiadnym nepriaznivým vplyvom.

Pri skúmaní prenatalného vplyvu ligandov opioidných receptorov budeme paralelne sledovať vždy dve gravidné samice, ktoré budú vystavené subkutánnemu podávaniu buďto fyziologického roztoku (kontrola) alebo skúmaného ligandu opioidného receptora. Aplikáciu začneme pred gestáciou a bude trvať počas gravidity. Po narodení mláďat budeme sledovať a porovnávať správanie matiek a mláďat v oboch skupinách (kontrola – ligand OR). Časť mláďat bude vo veku 14 – 21 dní po uvedení do celkovej anestézie humánne usmrtená, bude im odobratý mozog na prípravu rezov, a metódou patch clamp bude zmeraná elektrofyziologická aktivita neurónov. Po ukončení experimentu budú zvieratá humánne usmrtené podaním nadmerného množstva anestetika.

Pred *in vivo* elektrofyziologickým meraním budú zvieratá podrobené celkovej anestézii. Po ukončení tohto merania budú humánne usmrtené podaním nadmerného množstva anestetika.

Model obmedzenia pohybu zvierat'a (tzv. restraint stress) predstavuje prevažne psychický stresový podnet, pri ktorom sa zvieratá umiestnia do špeciálnych priehľadných hypokinetických kliebok v tvare valca, ktoré znemožnia pohyb zvierat'a, ale nespôsobia bolesť. Zvieratá budú vystavené tomuto podnetu po dobu 2 hodín každý deň, a to 30 minút po aplikácii farmák. Po skončení hypokinézy budú potkany vrátené do svojich domácich kliebok. Kontrolné zvieratá ostanú bez akejkoľvek manipulácie. Model depresie je založený na vyvolaní hyperaldosteronizmu, teda zvýšenia koncentrácií aldosterónu v plazme potkanov. Aldosterón alebo vehikulum budú konštantne vylučované zo subkutánne implantovaných po dobu 2 týždňov. Zavedenie osmotických minipúmp prebehne v aseptických podmienkach, v celkovej inhalačnej anestézii pomocou izofluránu. Implantácia minipúmp trvá približne 2 minúty, na uzatvorenie incízie sa používajú 7 mm klipy (Alzet Wound Closure). Minipumpy sú implantované do oblasti medzi lopatkami (midscapular region), kde zvierat'u nijako neprekážajú v pohybe a nespôsobujú žiadnu bolesť alebo nepohodlie.

Zvieratá vystavené testu núteného plávania budú po ukončení testu dôkladne vysušené a vrátené do svojich kliebok. Na konci experimentov s použitím modelov chronického stresu a depresie budú zvieratá humánne usmrtené dekapitáciou bez predchádzajúcej anestézie.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Podľa prílohy č.4 k nariadeniu vlády Slovenskej republiky č.377/2012 Z.z. klasifikujeme krutosť našich postupov pre prípravu primárnych hipokampálnych kultúr, pre prípravu rezov z hipokampu a pre in vivo elektrofyziológické merania na úrovni „bez možnosti zotavenia“, v prípade zvierat vystavených tzv. „restraint“ modelu stresu na úrovni „stredná“, v prípade testu núteného plávania na úrovni „stredná“, v prípade testu vyvýšeného plusového bludiska na úrovni „slabá“, v prípade implantácie subkutánnych osmotických minipump na úrovni „stredná“, v prípade intraperitoneálnej aplikácie látok na úrovni „slabá“.

Uplatňovanie zásad 3R

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

2. **Redukcia počtu zvierat:** počty zvierat sú stanovené z hľadiska reprodukovateľnosti a validity projektu. Znižovanie počtov by ovplyvnilo validitu dosiahnutých výsledkov.

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

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: ☒ áno ☐ nie

Krutý postup - do Zmesiacov od ukončenia projektu
musí ísť každý výsledok na spätné posúdenie

Príloha č. 2 Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 4433/16-ZZ1/3

Cytoarchitektúra vápnikovej signalizácie srdcových myocytov vo vývoji hypertrofie myokardu

Kľúčové slová v projekte:

Vápniková signalizácia, komorový myocyt, srdce, hypertrofia, zlyhanie srdca

Účel projektu:

Objasniť vzťah vápnikovej signalizácie kardiomyocytov k maladaptívnemu vývoju počas hypertrofie srdca.

Opísať ciele projektu:

Rozvoj hypertrofie spôsobenej poškodením alebo preťažením srdca vedie k zlyhávaniu srdca, ktoré stráca svoju schopnosť pumpovať krv a zabezpečiť okysličenie tkanív v ľudskom organizme. Pritom hypertrofia srdca spôsobená tréningom naopak zvyšuje schopnosť srdca zabezpečiť dostatočné zásobenie organizmu okysličenou krvou. Jedným z mechanizmov, ktoré sa zhoršujú iba počas patologickej, nie však fyziologickej hypertrofie, je aj vápniková signalizácia v kardiomyocytoch. Keďže tento proces zohráva úlohu nielen pri regulácii kontrakcie srdca, ale aj v regulácii metabolizmu srdcových myocytov, nie je jasné, či je jeho zhoršovanie počas patologickej hypertrofie dôsledkom, alebo príčinou ostatných zmien. Cieľom tohto projektu je sledovať zmeny vo vápnikovej signalizácii počas rôznych foriem hypertrofie – patologickej, spôsobenej farmakologickým poškodením myokardu, fyziologickej, spôsobenej tréningom, a rastovej, spôsobenej rastom a dozrievaním myocytov počas rastu jedinca – a porovnať procesy, ku ktorým v tomto čase dochádza.

Prínos z vykonaného projektu:

Údaje získané na tkanive a izolovaných myocytoch troch experimentálnych modelov záťaže myokardu využijeme pre pochopenie pôsobenia fyziologických a patologických stimulov vyvolávajúcich hypertrofiu.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

1. potkan laboratórny, kmeň Han Wistar, samce, vek 1 – 6 mesiacov, hmotnosť 60-350g. 210 ks na celé obdobie trvania projektu.
2. potkan laboratórny, kmeň Han Wistar, gravidné samice. 43 ks na celé obdobie trvania projektu, očakávaný počet mláďat 340 ks (~8 mláďat na vrh).

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

Zvieratám v skupine farmakologického poškodenia myokardu bude jednorázovo podaná toxická dávka farmaka spôsobujúceho poškodenie srdca. Následkom podania farmaka môže dôjsť k úmrtiu zvieratá v priebehu niekoľkých hodín po zásahu. Smrť v týchto prípadoch nastáva ruptúrou alebo náhlou zástavou srdca. V oboch prípadoch je utrpenie zvieratá pred smrťou veľmi krátkodobé. Po prekonaní prvých hodín sa zviera rýchle zotavuje a po 24 hodinách nejaví známky diskomfortu. V prípade, že sa zviera do 24 hodín po aplikácii

farmaka nezotaví, bude následne vyradené z experimentálnej skupiny a ihneď humánne usmrtené.

Zvieraťám v skupine vehikula bude jednorázovo podané vehikulum (0,05% kyselina askorbová vo fyziologickom roztoku v objeme 0,3-0,75 ml). Vzhľadom na aplikáciu tenkou sterilnou ihlou, osobou, na ktorú sú zvieratá zvyknuté manipuláciou, bude miera ich diskomfortu slabá a krátkodobá.

Potkany v behacej skupine budú umiestnené v klietkach samostatne, aby bolo možné monitorovať ich pohybovú aktivitu. Potkany tak budú v sociálnom strese, no budú držané v priehľadných klietkach v miestnosti s inými potkanmi, takže s nimi budú môcť komunikovať prostredníctvom zraku, vokalizácie a pachov. Kontrolné potkany pre túto skupinu budú držané samostatne pre rozoznanie účinkov tréningu a čiastočnej sociálnej izolácie. Tieto však budú rovnako v priehľadných klietkach s možnosťou vizuálnej, vokálnej a pachovej komunikácie s jedincami v okolí. Potkany budú prechovávané v obohatenom prostredí s prístupom ku hračke (papierová rolka).

Potkany, ktorým bude vykonané meranie EKG a echokardiografia, budú na dobu merania (15 minút) podrobené izofluranovej inhalačnej anestézii.

Samiciam po pôrode budú postupne odoberané mláďatá. Strata mláďat je pre potkany stresujúca, no v prírode sa bežne vyskytuje. V prípade straty posledného mláďaťa pred odstavom bude samica humánne usmrtená, aby sa predišlo nadmernému stresu, prípadne komplikáciám spojeným s produkciou ale neodoberaním mlieka.

Mláďatám nebude spôsobená žiadna újma.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Podľa prílohy č.4 nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 377/2012 Z.z. klasifikujeme krutosť plánovaných postupov nasledovne:

Postup	Úroveň krutosti	Zdôvodnenie
Usmrtenie zvieraťa pre odber srdca	bez možnosti zotavenia	
Odoberanie mláďat samiciam	slabá	Samiciam bude odobrané jedno, maximálne dve mláďatá naraz. Pri odobratí posledných mláďat pred dobou odstavu bude samica humánne usmrtená.
Meranie EKG a echokardiografia	slabá	Meranie EKG a echokardiografie sa vykonávajú v celkovej izofluranovej inhalačnej anestézii.
Umiestnenie v klietke s behacím kolesom – dobrovoľné behanie	slabá	Jedinec musí byť umiestnený samostatne, čo spôsobuje sociálny stres, znížený možnosťou vizuálnej, sluchovej a pachovej komunikácie.
Samostatné umiestnenie v klietke	slabá	Samostatné umiestnenie jedincov spôsobuje sociálny stres, znížený možnosťou vizuálnej, sluchovej a pachovej komunikácie.
Intraperitoneálna aplikácia vehikula	slabá	Vehikulum je aplikované tenkou ihlou zvieraťám zvyknutým na manipuláciu.
Intraperitoneálna aplikácia farmaka za účelom poškodenia myokardu alebo ER stresu	stredná	Farmakum je podávané tenkou ihlou zvieraťám zvyknutým na manipuláciu. Zvolené farmaká spôsobujú krátkodobé (v hodinách) utrpenie s rýchlym zotavovaním, po 24 hodinách zvieratá neprejavujú známky diskomfortu.

Uplatňovanie zásad 3R

požiadavka nahradenia

Nakoľko predkladaný projekt je zameraný hlavne na rozriešenie štruktúry a funkcie srdca na úrovni tkaniva, buniek a subcelulárnej úrovni u potkanov s hypertrofiou srdca, nie je možné tieto nahradiť ani meraním na celých zvieratách (napr. magnetická rezonancia, sonografia celých zvierat v anestéze) kvôli nedostatočnému rozlíšeniu alternatívnych metód, ani na bunkových kultúrach, ktoré nezodpovedajú vlastnostiam buniek v živom orgáne. Rovnako nie je možné tieto metódy nahradiť počítačovou simuláciou.

požiadavka redukcie

Projekt bol optimalizovaný z hľadiska minimalizácie počtu použitých zvierat, pričom bude použitý minimálny počet zvierat potrebný na dosiahnutie štatisticky významných výsledkov, u ktorých je možná jednoznačná interpretácia, s prihliadnutím na úspešnosť izolácie myocytov a úspešnosť získavania dát kombinovanými molekulárno-biologickými, elektro-fyziologickými, mikroskopickými a morfometrickými metódami.

Pokiaľ to bude možné, srdcia, respektíve izolované myocyty z potkanov plánovaných pre optimalizáciu budú použité v ďalších experimentoch. Získané experimentálne dáta priebežne vyhodnocujeme, čím predchádzame zbytočnému navrhovaniu počtu experimentov. Keďže experimentálne zvieratá spracúvame priebežne v menších skupinách (max. 4 za deň, max 16 za týždeň), môžeme zber dát z každej skupiny ukončiť ihneď po dosiahnutí štatisticky relevantnej skupiny.

požiadavka zjemnenia

Ako zdroj srdcových myocytov sme zvolili menších cicavcov – laboratórne potkany, ktorých hrudný kôš sa dá rýchlo otvoriť, čo umožňuje rýchlu excíziu srdca a zníženie rizika degradácie srdcových buniek. Dozrievanie a rastová hypertrofia srdcových myocytov potkanov sa navyše odohráva v skorých postnatálnych štádiách, čo umožňuje ich štúdium po narodení a znižuje tak počet usmrtených mláďat pri zachovaní náhodného výberu jedincov z viacerých vrhov.

Na minimalizáciu bolesti zvierat pri injekčnej aplikácii farmák a anestetika používame tenké, sterilné ihly s rozmermi 0,3 x 12mm (priemer x dĺžka). Aplikáciu farmák a anestetík vykonáva vždy osoba, na ktorú sú zvieratá zvyknuté pomocou manipulácie. Excízia srdca sa vykonáva až po navodení celkovej hlbokéj anestézie, ktorá je kontrolovaná testovaním utlmenia sluchového a očného reflexu a reakcie na bolestivý podnet.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: ☐ áno ☒ nie

Podľa § 46 nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 377/2012 Z.z. ods. (2) opätovné posúdenie projektu nevyžaduje, nakoľko je podaný po 31. decembri 2012.

Netechnické zhrnutia projektu

Názov projektu: Aplikácia kombinovanej terapie na potlačenie sekundárneho poškodenia miechy po traume

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: APVV-15-0766 - 4434/16-221/3
Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): kompresia miechy, zápal, inhibičné molekuly, rastové faktory, elektrostimulácia.

Účel projektu*:

Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

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

Cieľom predloženého projektu je redukovať sekundárne poškodenie v mieche po traume. Zvýšené uvoľňovanie dvoch skupín rastových inhibítorov – inhibítorov spojených s myelínom (MAIs) a inhibítorov spojených s extracelulárnou matrix (ECM) v okolí lézie výrazne limituje funkčnú obnovu a anatomické znovu-usporiadanie štruktúr v experimentálnych modeloch poškodenia miechy. Dôvodom pre využitie navrhovaného prístupu je skutočnosť, že obmedzenie vplyvu inhibítorov spojených s MAIs alebo ECM genetickou deléciou alebo farmakologickou inhibíciou sítě umožní obmedzený rast axónov, ale nie je schopný zabezpečiť ich regeneráciu na väčšiu vzdialenosť. Plánujeme podporiť regeneráciu axónov a zlepšiť funkčný stav po traume miechy blokovaním signálnych dráh pre tieto rastové inhibítory v kombinácii s terapeutickým pôsobením biodegradovateľného materiálu, t.j. chitozan-kolagénu obohateného o vybrané trofické faktory a elektrostimuláciou. Navyše, experimentálne bolo dokázané, že vytrvalostný tréning (beh) spôsobuje pretrvávajúci nárast BDNF hladiny v krvnom obeh. Keďže BDNF prechádza cez hematoencefalickú bariéru v oboch smeroch, jeho zvýšená hladina v krvi môže predstavovať potenciálny rezervoár pre potreby mozgu za kľudových podmienok. Naše predchádzajúce výsledky ukázali, že 6-týždňov trvajúci vytrvalostný tréning má dva dni po ukončení posledného cvičenia za následok signifikantné zvýšenie hladiny BDNF a TrKB mRNA v striate, strednom mozgu a hipokampe (o 58%, 89% a 62%) (62). Navyše, fyzický tréning (dobrovoľné, aktívne krokové cvičenie v kombinácii s pasívnymi pohybmi predných a zadných končatín) účinne zvyšuje posttraumatickú úroveň BDNF, NT-3 a NT-4, čím podporuje vhodné prostredie pre rast axónov. Predpokladáme, že 6-týždňový vytrvalostný tréning (beh) pred samotným poškodením miechy zvýši úroveň neurotrofických faktorov a ich receptorov v motoneurónoch miechy, ovplyvní regeneračnú kapacitu neurónov a v konečnom dôsledku aj samotnú kompenzačnú schopnosť miechy voči poškodeniu.

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

Naša pracovná hypotéza je založená na poznatkoch, že vývin lokálneho edému a výsledná sekundárna ischémia v epicentre poškodenia miechy vedie k narastajúcej degenerácii axónov, ktoré sú inak morfológicky neporušené. Predpokladáme, že potlačenie zápalovej reakcie a lokálna liečba s biodegradovateľným materiálom, ktorý bude uvoľňovať výživné substancie počas 1 mesiaca, v kombinácii s inhibítormi spojenými s myelínovými fragmentmi a tvorbou gliovej jazvy + elektrostimuláciou by mohlo mimoriadne pomôcť pri vypracovaní optimálnej stratégie na reparáciu. Ak sa podarí udržať regeneračný potenciál zreých neurónov a úspešnú regeneráciu axónov aj po skončení liečby, malo by to znamenať klinicky významné zlepšenie neurologických funkcií v porovnaní s neliečenými zvieratami.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch budú použité laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar, samice v počte 525 ks na celú dobu riešenia (02/2017-06/2020).

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

Kompresia miechy spôsobí trvalú paraplégia dolných končatín s čiastočne zachovanými miechovými reflexmi. Kompresia bude uskutočnená z dorzálnej strany miechy, ale tlak na miechu vyvolá poškodenie, ktoré sa rozšíri aj do okolia. Tým sa porušia základné motorické reflexy, ktoré zabezpečujú stálu adaptáciu dĺžky svalu na pohyb, ďalej polysynaptické reflexy, ktoré ukončujú kontrakcie vyvolané napínavým reflexom a exteroceptívne reflexy, ktoré vznikajú dráždením receptorov uložených predovšetkým v koži. Tieto reflexy budú po traumatickom poškodení miechy zachované iba čiastočne. Motorická funkcia paraplégicky postihnutých zvierat sa spontánne obnovuje. V priebehu prvých dní po traume miechy sa zvieratá premiestňujú pomocou predných končatín, avšak tento stav je prechodný. K plantárnemu položeniu tlapiek dochádza až v druhom týždni po operačnom zásahu.

Zvieratá po zákroku bývajú apatické. Prvé 2-3 dni po zákroku dostáva zviera orálne vodu pomocou injekčnej striekačky, alebo subkutánne 2x denne fyziologický roztok (1-2ml), aby sa predišlo dehydratácii, keďže zviera môže mať problém so zdvíhaním hlavy ku napájadlu. Takisto má dostupnú potravu priamo v klietke. Ukončenie podávania fyziologického roztoku určuje operátor na základe pohybových schopností zvierat. Bolesť, ktorú zvieratá pociťujú je spôsobená operačným zákrokom. Za účelom zníženia bolesti sa experimentálnym zvieratám tesne po kompresii miechy, keď je zviera ešte pod vplyvom anestézie, podávajú analgetiká (Novasul, Richterpharma, 2ml/kg) do *m. gastrocnemicus*. Analgetiká sa štandardne podávajú raz denne po dobu 3 dní po zákroku. Dôsledkom traumatického poškodenia miechy na úrovni Th9 je okrem paraplégie zadných končatín aj dočasná strata funkcie (čiastočná, alebo úplná) vyprázdňovania močového mechúra, preto sa zvieratú močový mechúr vyprázdňuje mechanicky palpačne min. 2x denne, po dobu obnovenia funkcie (približne 2 týždne), vykonáva a posudzuje operátor.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Existujúce alternatívne metódy nemôžu poskytnúť komplexnú odpoveď, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov. Počet zvierat použitých v kontrolnej a experimentálnej skupine je obmedzený na možné minimum. Zvieratá budú uspaté Isofluranom, po zásahu sa im podajú analgetiká (Novalgin). Odber na biochemické analýzy sa vykoná v hlbkej thiopentálovej anestéze, na histochemické analýzy výlučne po eutanázii zvierat'a; odoberie sa torakálna a lumbosakrálna miecha.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet experimentálnych zvierat (525 ks) bol stanovený vzhľadom k tomu, že (1) predpokladáme veľkú individuálnu variabilitu výsledkov, z tohto dôvodu plánovaný počet 5-10 kusov zvierat v skupine je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný počet pre získanie štatisticky významných výsledkov; (2) experimentálne skupiny uvedené v prílohe č. 1 sú potrebné na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie poškodenia miechy a určenie protektívneho vplyvu; (3) traumou poškodená miecha nemôže byť použitá zároveň na biochemické ako aj histologické a imunohistochemické analýzy.

3. Zjemnenie:

Všetky zákroky, ktoré budú na zvieratách uskutočnené, budú vykonávané pod celkovou anestézou, t.j. nebudú pre zvieratá bolestivé.

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

Experimentálne zvieratá budú počas zákroku v celkovej anestéze, budú im podávané analgetiká (Novasul, 2ml/kg, i.m.) a antibiotiká (Amoksiklav, 30mg/kg, i.m.), aby sa predišlo prípadnej bolesti a zápalovej reakcii. Každodenná starostlivosť experimentálnych zvierat sa člení medzi vysokoškolsky vzdelaných riešiteľov projektu, ktorí majú prax s experimentami na zvieratách. Experimentálne zvieratá budú po zásahu označené na chvoste a následne budú umiestnené individuálne v klietkach s uvedením čísla zvierat'a.

Nakoľko nepracujeme s infekčnými ani toxickým materiálmi, zvieratá budú štandardne umiestnené v pooperačnom oddelení zvieratníka.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Sprostredkujú galektíny ochranný vplyv estrogénov/fytoestrogénov na srdce po infarkte myokardu?

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 123/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): infarkt myokardu, fytoestrogény, galektíny

Účel projektu* : Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

1. porovnať glykofenotyp srdca po infarkte myokardu u ovariektomizovaných a neovariektomizovaných potkanov.
2. vyhodnotiť ochranný účinok (fyto)estrogénov na srdce po infarkte myokardu u ovariektomizovaných a neovariektomizovaných potkanov.
3. porovnať glykofenotyp srdca po (fyto)estrogénovej liečbe u ovariektomizovaných a neovariektomizovaných potkanov po infarkte myokardu.
4. vyhodnotiť ochranný účinok (fyto)estrogénov v kombinácii s blokačnými protilátkami proti vybraným galektínom na srdce po infarkte myokardu u ovariektomizovaných a neovariektomizovaných potkanov.

Infarkt myokardu je najčastejšou etiológiou smrti v celosvetovom meradle (Jian-guang, 2013). Tvorba fibrotického tkaniva v ložisku infarktu vedie k hemodynamickej instabilite a poruchám vedenia vzruchov, čo zodpovedá za komorové tachyarytmie (Kun-Li, 2011). Hojenie jazvou zahŕňa zosúladenie procesov na bunkovej úrovni zahrňujúcich migráciu (Woodley et al., 1993), proliferáciu (Usui et al., 2008) a diferenciáciu (Morasso and Tomic-Canic, 2005). Remodelácia extracelulárnej matrix (Clark, 1990) s následnou interakciou bunky a prostredia ako aj s komunikáciou medzi bunkami (Werner et al., 2007) riadia tento proces. Dôležitú úlohu v koordinácii týchto procesov s cieľom minimalizovať dôsledky poškodenia na molekulárnej úrovni zastávajú rôzne rastové faktory z radu chemo- a cytokínov (Barrientos et al., 2008).

Ďalšie objasnenie zložitej kaskády regulačných dráh v procese hojenia infarktu myokardu má okrem klinického aj ekonomicko-sociálny rozmer. Vytvorenie jazvy v ložisku infarktu vedie k poklesu ejekčnej frakcie srdca a vzniku práceneschopnosti pre pacienta. Za týmto účelom sme sa zaoberali novými informáciami o rôznych aspektoch biologických výmen informácií s rastúcou dôležitosťou. Náš záujem sme zamerali na glykány ako univerzálne biochemické signály a endogénne lektíny ako efektívne signál-transdukčné elementy, dané „cukrovým“ kódom (pre koncept a prehľad, prosím nahliadnite do Gabius, 2009)

Členovia rodiny galektínov sú účinnými regulátormi adhézie, rastu a migrácie buniek prostredníctvom interakcií proteín/glykán a proteín/proteín (Gabius, 2006). Sú známe svojou schopnosťou senzitívne rozpoznať medzi cukrami povrchovú štruktúru na kontaktnej strane ako aj mód prezentácie cukru modulovaný napríklad náhradou jadra molekuly (André et al., 2004; Wu et al., 2007). Na druhej strane bola pozorovaná taktiež negatívna regulácia galektínov, ktorých expresia bola indukovaná tumor supresormi a viedla k zníženiu rastu malígnych buniek a zasahovala do priebehu diferenciácie buniek. Táto negatívna regulácia bola taktiež pozorovaná v rámci komunikácie medzi normálnymi bunkami napr.: medzi T regulačnými a T efektorovými bunkami (Kopitz et al., 2001; Patsos et al., 2009).

Vzhľadom na zrejmy vplyv galektínov na migráciu buniek, ktorý bol preukázaný na rakovinových bunkách hrubého čreva alebo keratinocytoch (Hittlet et al., 2003; Gendronneau et al., 2008), a ich expresii v malignitách vrstevnatého epitelu, ktorá koreluje s progresiou tumorov (Plzák et al., 2004, Cada et al., 2009) je atraktívne vyšetriť prítomnosť galektínov pri hojení infarktu myokardu použitím neskrížene reaktívnych protilátok. Ako pomôcka na zobrazenie väzobných miest galektínov budú použité označené galektíny (práve skúmané), t.j. homodimerický galektín-1 a chimerický galektín-3 (Chovanec et al., 2004; Szabo et al., 2009). Expresiu testovaných galektínov budeme

porovnávať s expresiou dobre známych markérov diferenciácie a proliferácie buniek ako aj s komponentmi ECM.

Prínos z vykonaného projektu

Akútny infarkt myokardu je hlavnou príčinou úmrtnosti po celom svete. Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie v roku 2008 ischemická choroba srdca zapríčinila 7,25 milióna úmrtí na celom svete. Je dôležité vziať do úvahy nielen jej vplyv na úmrtnosť, ale aj zhoršenú kvalitu života pacientov prežívajúcich túto cievnu príhodu. Počas posledných desaťročí, nové terapeutické postupy preukázali významné zníženie úmrtnosti u pacientov s infarktom myokardu. Avšak, prínos týchto výsledkov je stále obmedzený, čo vedie k nutnosti výskumu nových možností terapie.

Výsledky získané počas tohto experimentu môžu byť nápomocné pre lepšie porozumenie regulácie a aktivity galektínov počas hojenia infarktu myokardu u potkana ako modelu. Z toho pohľadu môžu mať naše výsledky signifikantný vplyv na základný výskum hojenia infarktu myokardu a môžu taktiež slúžiť ako základ pre vypracovanie nových terapeutických metodík pre klinickú prax.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: v experimente budú použité samice potkana druhu Sprague-Dawley v počte kusov 180. V každej skupine bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat – 10 ks. Celkovo bude vytvorených 18 skupín, ktoré budú porovnávané vzájomne medzi sebou. Pri záverečnom vyhodnocovaní pokusu budú použité ako kvantitatívne tak aj semikvantitatívne parametre. Ako štatistické metódy budú použité metódy Kruskal-Wallis-ov test a analýza variácie nasledovaná Tukey-Kramer-ovým testom. Obe metódy sú štandardne používané vo vedeckých prácach hodnotiacich nami hodnotené parametre, pričom autori zaraďujú do jednotlivých skupín minimálne 10 zvierat.

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

Počas sledovaného obdobia nebude bránené zvieratám v prirodzenom správaní. Budú dodržané štandardy chovu, umiestnenia a starostlivosti. U zvierat bude realizovaný operačný zákrok v celkovej inhalačnej anestézii s adekvátnou analgéziou. Po výkone budú zvieratá vyrušované len z dôvodu aplikovania liekov. Dôsledne bude monitorovaný zdravotný stav zvierat.

Oba operačné zákroky (ovarektomia aj ligatúra ramus interventricularis anterior arteriae coronariae sin.) budú vykonávané v anestéze 3% Isofuránom a analgetickou terapiou Tramadol 5mg/kg. Peroperačne zvieratá nebudú pociťovať žiadnu bolesť. Pooperačná bolesť bude počas prvých troch dní po operácii tlmená ďalším podaním analgetík Tramadol 5mg/kg intramuskulárne. V ďalšom priebehu nie je predpokladaná bolestivosť operačných rán ani lôžiska vzniku infarktu myokardu, vzhľadom a predpokladaný rozsah lôžiska. Operačné výkony preto zaraďujeme do stredného stupňa krutosti.

Menšie zákroky na zvieratách ako je váženie, intramuskulárne podávanie liekov zaraďujeme do slabého stupňa krutosti.

V priebehu pokusu budú zvieratá podrobené bežeckému testu, pričom test bude prerušený pri prvej známke kardiálnej subkompenzácie – prvý kašeľ. Vzhľadom na nebolestivosť výkonu tento test zaraďujeme taktiež do slabého stupňa krutosti.

V závere pokusu budú zvieratá uvedené do celkovej anestézy a následne usmrtené intraperitoneálnym podaním Thiopentalu v dávke 375mg/kg. Túto fázu hodnotíme ako stupeň krutosti bez možnosti zotavenia.

Celkové zhrnutie krutosti projektu podľa oddielu 3: kategórie krutosti medzi stredné – D.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Podľa prílohy číslo 4 k nariadeniu vlády číslo 377/212 z.z. navrhovaná klasifikácia krutosti postupov realizovaných v našom projekte bude zaradená nasledovne:

- a.) Váženie – stupeň krutosti slabé
- b.) Intramuskulárne podávanie liekov – stupeň krutosti slabé
- c.) Bežecký test – stupeň krutosti slabé
- d.) Operačné výkony v celkovej anestéze – stupeň krutosti stredné
- e.) Záverečné usmrtenie zvierat – stupeň krutosti bez možnosti zotavenia

Celkové zhrnutie krutosti projektu podľa oddielu 3: kategórie krutosti medzi stredné – D.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Samotná myšlienka hojenia rán a hojenia infarktu myokardu obzvlášť nutne vyžaduje využitie experimentálneho animálneho modelu. Jedine na živom animálnom modeli možno hodnotiť neovaskularizáciu ložiska infarktu myokardu. Použitie zvierat je na takýto typ výskumu nutné.

2. Redukcia počtu zvierat:

Vzhľadom na rozloženie experimentálnych skupín bude použitý minimálny počet zvierat v každej skupine – n=10, ktorý ešte stačí pre štatistické vyhodnotenie.

3. Zjemnenie:

Výber druhu laboratórneho zvieratá sa opiera o mnohé vedecké práce z odboru experimentálnej chirurgie, ktorý detailne aplikuje poznatky o rozvoji a patogenéze zmien prebiehajúcich pri

jednotlivých chorobných stavoch. Aplikácia a translácia stavov z klinickej medicíny do experimentálnych podmienok predstavuje základnú jednotku výskumu v tejto oblasti. Redukcia stresu, utrpenia a bolesti bude zabezpečená na podklade aplikácie anestetík a analgetík v perioperačnom období ako aj pooperačnom období, aby bol čo v najvyššej možnej miere eliminovaný distress zvierat.

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

Príloha č. 2

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU
podľa §35 ods. 2 písm. b) a § 40 nariadenia vlády SR č. 377/2012

Názov projektu:

"Štúdium anatomicko-funkčných rozdielov v účinkoch antipsychotík s podobnými terapeutickými vlastnosťami, rozdielnym vplyvom na dopaminergické receptory a rôznymi vedľajšími účinkami, u experimentálnych zvierat"

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 310/14-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

mozog, antipsychotiká, imunohistochemia neuropeptidov, mapovanie Fos a FosB/DeltaFos aktivovaných neurónov, laboratórny potkan,

Účel projektu:

- a) základný výskum
- b) translačný alebo aplikovaný výskum
- c) regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z. z.)
- d) ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat
- e) ochrana druhov
- f) vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie
- g) zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch.

Vedecké ciele:

- A/ Sledovať akútny účinok vybraných antipsychotík na aktivitu neurónov v rôznych funkčných celkoch mozgu prostredníctvom imunohistochemickej vizualizácie Fos proteínu (marker krátkodobej aktivity buniek): a) v oblastiach, ktoré sú primárnym cieľom účinku antipsychotík (pre posúdenie ich primárneho efektu) a b) mimostriálnych štruktúrach mozgu, u dospelých samcov potkanov.
- B/ Sledovať chronický účinok vybraných antipsychotík (21 dní aplikovaných 2x denne) na aktivitu neurónov prostredníctvom imunohistochemickej vizualizácie FosB/DeltaFos proteínu (marker dlhodobej aktivity buniek): a) v oblastiach, ktoré sú primárnym cieľom účinku antipsychotík a b) mimostriálnych štruktúrach, u dospelých samcov potkanov.

- C/ Identifikovať fenotypový (chemický) charakter aktivovaných neurónov akútnym a chronickým podávaním vybraných antipsychotík v rôznych funkčných okruhoch mozgu dospelých samcov potkanov.
- D/ 4) Charakterizovať efektívnosť účinkov antipsychotík v podmienkach stresu. (pre detailnejší opis cieľov vid' Prílohu č. 1)

Prínos z vykonaného projektu:

Dnes je dostupných mnoho druhov antipsychotík a nové typy k nim neustále pribúdajú. Hoci sa jedná o výlučne klinicky používané lieky, ich účinky sú sledované a testované na zvieratách. Získané výsledky môžu poslúžiť pri odhaľovaní potenciálnych zdrojov vedľajších účinkov APs, k ucelenejšiemu pochopeniu funkčno-anatomickej biológie mozgu vo vzťahu k závažným psychickým poruchám a perspektívne prispieť ako vedecký podnet pri hľadaní nových terapeutických možností zameraných na znižovanie výskytu vedľajších účinkov antipsychotík.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórny potkan (*Rattus norvegicus*), samci kmeňa Sprague-Dawley, 835 ks na 5 rokov.

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

Podané antipsychotiká, vzhľadom na dávky blízke tým, ktoré sa používajú v humánnej medicíne, nebudú mať negatívny dopad na zdravie zvierat. Počas pokusov laboratórne potkany budú vystavené stresorom s ľahkou a strednou krutosťou (vid' doluuvedené tabeľky) ale nebudú vystavené účinkom iných stresorov a látok, ako sú plánované. Budeme veľmi citlivo monitorovať zdravotný stav zvierat počas všetkých experimentov.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Kategória stredná bez možnosti zotavenia

Použitý postup/experiment	Oddiel III – Klasifikácia krutosti postupov
Váženie zvierat	Slabá
i.p. aplikovanie skúmaných látok - jednorazovo	Slabá
s.c. aplikovanie skúmaných látok - jednorazovo	Slabá
i.p. aplikovanie skúmaných látok - opakovane	Stredná
s.c. aplikovanie skúmaných látok - opakovane	Stredná
Humánne utratenie	bez možnosti zotavenia

V rámci chronického nepredvídateľného stresu budú stresory slabej krutosti s výnimkou núteného plávania podľa prílohy č.4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z. Z dôvodu opakovania bude diskomfort a velfér zvierat zhoršený, čo je aj účelom postupu. Úroveň krutosti ChNS bude stredná.

Použitý postup v rámci modelu chronického nepredvídateľného stresu	Oddiel III – Klasifikácia krutosti postupov
Predátorský stres	Slabá
Nútené plávanie	Stredná
Nadpočet zvierat vo vanici	Slabá
Mokrý podstielka	Slabá
Chlad	Slabá
„Air puff“ stres	Slabá
Celkovo	Stredná

Uplatňovanie zásad 3R:

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

Odborné otázky predkladaného projektu je možné riešiť len na animálnom modeli a to najlepšie na mladých dospelých samcoch potkanov kmeňa Sprague-Dawley. Nakoľko cieľom projektu je sledovanie vplyvu antipsychotík na aktivitu neurónov v rôznych častiach mozgu potkana a to hlavne ich účinok v extrastriálnych štruktúrach mozgu, navyše s cieľom odhaľovania fenotypového charakteru aktivovaných neurónov, jedine potkan je po anatomickej a chemickej stránke tak dokonale anatomicky a chemicky preštudovaný a definovaný, že len pozitívom tohto experimentálneho zvieratá môže naša práca priniesť kvalitné, originálne a presne interpretovateľné výsledky. Aj experimenty v medzinárodnom merítku s podobnou tematikou sa prevádzajú hlavne na potkanoch. Výhodou týchto pokusov je aj tá skutočnosť, že v ohľade na takmer žiadnu úmrtnosť zvierat je možné dané počty zvierat minimalizovať, napríklad redukováním kontrolných skupín a experimentálne skupiny udržiavať na počtoch s reprodukovateľnými výsledkami a možnosťou publikovania výsledkov v kvalitných vedeckých časopisoch.

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

Počet zvierat je minimalizovaný na najmenšiu možnú hranicu tak, aby získané údaje mohli byť štatisticky spracované a mali serióznu vedeckú výpovednú hodnotu. No, z dôvodu

reprodukovateľnosti a validity pokusov a dôvodu, že existuje aj prirodzená individuálna variabilita v citlivosti potkanov na tie isté externé a interné podnety, je potrebné zaradiť do jednej experimentálnej skupiny priemerne 8-10 zvierat. V kontrolných skupinách niekedy postačia aj 5-6 zvierat.

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

Predchádzajúce experimenty použitím antipsychotík jasne naznačujú, že zvieratá by nemali trpieť ich jednorázovým alebo opakovaným podávaním. Dávky nepresahujú tie, ktoré sa používajú v humánnej medicíne. Zásady uvádzané pri definícii welfare zvierat budú čiastočne porušené vzhľadom na zámer projektu čo je vystavenie experimentálnych zvierat ľahkým a stredným stresorom a opakovanému podávaniu APs za účelom mimikovania bežných stresových podmienok vyskytujúcich sa v denno-dennom živote ľudí. No budeme prísne dbať na to aby zásady uvádzané pri definícii welfare zvierat boli porušované čo v najmešej miere. Všetky zásahy budú uskutočňované tak, aby zvieratá čo najmenej strádali. Zvieratá budú držané v klietkach maximálne po 4 za plynulého prísunu peletovanej stravy a vody ad libitum, čo im negatívne neovplyvní prirodzené formy správania, vrátane sociálneho. Zdravotný stav zvierat sa bude denne monitorovať a pri náznakoch nekonfortnosti zvierat, sa stav zvierat bude konzultovať veterinárnym lekárom. Ak by museli byť vyradené z pokusu, boli by usmrtené humánne.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno nie

Netechnické zhrnutie projektu

podľa § 40 nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.

Názov projektu: Vplyv krátkodobej a dlhodobej aplikácie Derinatu[®] na obranné mechanizmy dýchacích ciest hodnotený v experimentálnych podmienkach.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 596/17-221

Kľúčové slová: zápal, obranné mechanizmy dýchacích ciest

Účel projektu: základný výskum

Ciele projektu

Cieľom projektu je posúdiť vplyv – Derinátu[®] (sodnej soli DNA z lososa) na obranné mechanizmy dýchacích ciest po jeho akútnom a chronickom podaní zdravým zvieratám a zvieratám s experimentálne vyvolaným zápalom dýchacích ciest. Ako hodnotiace parametre budú použité zmeny citlivosti obranných reflexov dýchacích ciest bronchokonstrikcie (v podmienkach *in vitro*, aj *in vivo*) a kašľa (*in vivo*). Zároveň bude vyšetrená kinematika cilií riasinkového epitelu dýchacích ciest použitím unikátnej metodiky v podmienkach *in vitro*.

Časťou projektu je sledovanie a posudzovanie vplyvu jednorazovej a dlhodobej aplikácie Derinatu[®] na modeli zápalu dýchacích ciest. Experimentálny model zápalu dýchacích ciest bude pozostávať z koexpozície zvierat ovalbumínu (OVA) a bakteriálnemu lipopolysacharidu (LPS). LPS (hlavné zložky vnútornej strany bunkovej steny gram-negatívnych baktérií) sú endotoxíny všadeprítomné v environmentálnom prostredí, ktoré po vdýchnutí vykazujú silnú pro-zápalovú aktivitu. Uvedeným spôsobom dosiahneme posun zápalovej odpovede smerom k Th1 lymfocytom (uvedený typ zápalu bol doteraz najvýraznejšie ovplyvnený Derinatom[®]).

Na overenie bronchodilatačného, ciliomodulačného a antitusického účinku Derinatu[®] budú použité liečivá využívané v klinickej praxi: krátkodobo-pôsobiace beta₂ sympatomimetikum - salbutamol; dlhodobo-pôsobiace beta₂ sympatomimetikum- salmeterol; opioidné antitusikum- kodeín.

Prínos z vykonaného projektu

Riešenie projektu môže priniesť originálne výsledky týkajúce sa farmakodynamického pôsobenia Derinatu[®] v terapii ochorení respiračného traktu. Vzhľadom na jeho protizápalové vlastnosti prezentované v iných experimentálnych a klinických štúdiách, Derinat[®] môže priaznivo ovplyvniť reaktivitu dýchacích ciest, kašľový reflex a mukociliárny klirens.

Druh použitých zvierat a ich predbežné počty

Charakter postupov nedáva možnosť dosiahnuť požadovaný, reprodukovateľný a validný výsledok inou dostupnou metódou bez použitia zvierat. Na uvedené experimenty použijeme outbredné morčatá kmeň TRIK zbavené patogénov s hmotnosťou 200-350 g v celkovom počte 128 jedincov.

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

Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami ako aj medzinárodne zavedenými osvedčenými metódami v starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne a zodpovedné zaobchádzanie so zvieratami. Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované množstvom prác a prezentované na mnohých odborných fórach nielen doma, ale aj v zahraničí. Z hľadiska dodržiavania zásad práce so zvieratami neboli voči nim vznesené žiadne námietky, či už na odborných fórach v rámci diskusií alebo v oponentských posudkoch publikovaných článkov. Postupy sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov prispievajúcich k účelnej farmakoterapii.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Kontrolné nesenizitizované a experimentálne nesenizitizované skupiny zvierat (počet: 7 skupín, 56 zvierat) nebudú vystavené mnohopočetnej aplikácii injekcií, iba intranazálnemu resp. inhalačnému podaniu látok – navrhovaná **slabá** krutosť.

Ostatné skupiny zvierat (počet: 9 skupín, 72 zvierat) budú vystavené opakovanému podaniu ovalbumínu (i.p., s.c. a inhalačne) spolu s LPS (i.p.) a injekčnej aplikácii liečivá kodeínu – navrhovaná **stredná** krutosť.

Sledovanie reaktivity dýchacích ciest a kinematiky cilií v *in vitro* podmienkach bude realizované po transverzálnom prerušení miechy zvierat po predchádzajúcej intraperitoneálnej aplikácii Xylazínu v dávke 5-10 mg/kg, alebo usmrtení predávkovaním anestetika Thiopentalu - **bez možnosti zotavenia**.

Súlad s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Pri realizácii postupov sa budeme snažiť dodržiavať všeobecné zásady 3R: nahradenie, zníženie a zjemnenie (Replace, Reduce a Refine).

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

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

Zjemnenie (Refinement) – metódu *in vitro* považujeme pri tomto type postupu za vhodnú z toho dôvodu, že zviera nevystavujeme priamo pôsobeniu sledovaných látok a mediátorov, ktoré by mohli spôsobiť zvieraťu za určitých podmienok dyskomfort.

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

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Štúdium funkčných bio-implantátov a bunkovej terapie pre regeneráciu CNS u potkanov (APVV 15 0613)

Podrobný účel postupu: - 739/17-221

Cieľom projektu bude ovplyvnenie viacerých post-traumatických faktorov v segmentoch nad a pod poranením miechy (PM) a to pomocou bunkovej terapie mezenchýmovými kmeňovými bunkami-MSC samostatne alebo v kombinácii s alginátovými (ALG) biomateriálmi. Objasníme mechanizmy pôsobenia MSC a ich produktov za účelom: i) zníženia pro-zápalových cytokínov uvoľnených z mikrogliu/makrofágov v PM a ii) stimulácie prerastania nervových vlákien v in vivo systéme. Pomocou hmotnostnej spektrometrie, zobrazovacej analýzy a imunohistochemických techník získame globálnu mapu chemokínov, cytokínov a trofických faktorov pred a po aplikácii bunkovej terapie.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

V súčasnosti neexistuje žiadna účinná liečba pre poranenú miechu. Dlhodobá liečba pacientov s PM sa sústreďuje na rehabilitáciu, odstraňovanie bolesti, spasticity a prevenciu komplikácií.

Výskum v oblasti mechanizmov neuroprotektie sa teda zaoberá vysoko aktuálnou problematikou z medicínskeho hľadiska. Očakávame, že dôkladná proteomická analýza a mapovanie expresie proteínov v neurónoch a glii prinesú nové originálne poznatky o mechanizme neuroregenerácie a plasticity. Následná proteomická analýza výrazným spôsobom prispeje k odhaleniu podstatných aspektov týchto mechanizmov prostredníctvom cieľenej identifikácie látok proteínovej povahy, nachádzajúcich sa v proteóme nervových buniek v rostrálnom *versus* kaudálnom segmente miechy. Výsledky ohľadom zmeny proteómu po aplikácii bunkovej terapie budú kľúčovým faktorom k potvrdeniu neuroprotektívnych a imunomodulačných vlastností dospelých MSC.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálne podanie anestetika, subkutánne podanie analgetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Získavanie MSC z tukového tkaniva a kostnej drene	Izolácia kmeňových buniek MSCs z kostnej drene a tukového tkaniva prebehne u potkanov (21dňové) v terminálnej anestézii, preplachom KD zo stehennej kosti a tibie do odberového média (DMEM s heparinom). Bolesť slabá.
Príprava modelu	Do oblúka stavca Th10 vyvrtáme otvor, zavedieme 2F Fogartyho

traumatického poranenia miechy	katéter až na úroveň Th8-Th9 miechy. Epidurálne umiestnený balónik naplníme tekutinou (12,5µl) a necháme pôsobiť 5 minút. Z balónika odoberieme tekutinu a vytiahneme. Model spôsobí neurodegeneratívne zmeny v mieche a dôjde k paralýze končatín. Bolesť stredná.
Aplikácia MSC	MSC je možné aplikovať lokálne do miechy, alebo systémovo intravenózne, prípadne do CSF. Zárok prebehne v celkovej anestézii. Bolesť stredná.
Aplikácia biomateriálu	Biomateriál sa bude aplikovať cca 14 dní po traume, buď samostatne s trojčikými látkami alebo s MSC, lokálne do miechy. Zárok prebehne v celkovej anestézii. Bolesť stredná.
Prežívanie zvierat po vytvorení traumatického poranenia miechy	Po vytvorení modelu traumatického poranenia miechy dochádza u zvierat k paralýze zadných končatín. Každé 3-4 dni sú zvieratá 10 min sledované v open fiede, pričom sa hodnotí BBB skóre. Zvieratá sa nechávajú prežívať cca 2-3 mesiace. Bolesť krutá.
Hodnotenie BBB skóre	V týždňových intervaloch. zvieratá sa vložia do open fied na dobu cca 10 min, sleduje sa pohybová aktivita. Bolesť slabá.
Perfúzia zvierat s následným odberom vzoriek	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.

Zohľadnenie 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Traumatické poranenie miechy s následným prežívaním a transplantáciou adultných kmeňových buniek sú procesy dynamické, ťažko predvídateľné a závisiace na mnohých endogénnych a exogénnych faktoroch. Z týchto dôvodov nie je možné uskutočniť dané experimenty alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat. Okrem toho, pokus nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet 186 ks zvierat bol stanovený vzhľadom k tomu, že predpokladáme individuálnu variabilitu výsledkov, z tohto dôvodu plánovaný počet 5-8 kusov zvierat v experimentálnych skupinách je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný počet pre získanie štatisticky významných výsledkov s prihliadnutím na úspešnosť modelu, ktorú jeho autori odhadujú ako 70- 80%-nú (hlavne pri dlhodobom 60 dňovom prežívaní). Skupiny zvierat v postupoch, uvedených v prílohe č. 1 sú nevyhnutné na získanie relevantných výsledkov ako stavu poškodenia, tak aj

neuroprotektívnych účinkov podávania adultných kmeňových buniek, alebo ich produktov v komplexnom pohľade na mechanizmus účinku. Tkanivo z poranenej miechy nemôže byť použité na biochemicko-proteomické analýzy a zároveň aj na histologické a imunohistochemické analýzy.

3. Zjemnenie:

Všetky zákroky, ktoré budú na zvieratách uskutočnené, budú vykonávané pod celkovou anestéziou (získavanie a aplikácia MSC, tvorba modelu), t. j. nebudú pre zvieratá bolestivé. Zvieratá s traumatickým poranením miechy budú pravidelne monitorované, bude sa hodnotiť BBB skóre v týždňových intervaloch. Ihneď po zákroku dochádza k paralýze zadných končatín, hrudníkové končatiny sú bez paralýzy, zvieratá sú schopné pohybovať sa. V prípade spozorovania utrpenia alebo neprimeranej bolesti zvierat, zviera bude vyradené z experimentu a humánne usmrtené.

Zvieratá budú prežívať 3 mesiace, budú rozdelené do skupín s poranením miechy (PM), u ktorých sa bude hodnotiť BBB skóre a následne budú humánne usmrtené a budú z nich odobraté vzorky miechy a mozgového tkaniva. V ďalšej skupine s PM bude po 14 dňoch po traume aplikované MSC, alebo MSC s biomateriálom, alebo biomateriál s trofickými faktormi. Zvieratá budú taktiež monitorované a hodnotené BBB skóre, a po 2-3 mesiacoch od traumy budú humánne usmrtené a bude im odobraté tkanivo miechy a mozgu.

Zvieratá sú schopné pohybovať sa a prijímať krmivo a vodu. 2 krát denne sa zvieratám s poranením miechy bude manuálne vyprázdňovať močový mechúr, tento stav trvá cca jeden týždeň po vytvorení modelu. Zvieratá sú chované v klietkach s obohatením prostredím (domčeky, papierové rolky).

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

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

Utrpenie versus prínos

Navodenie traumatického poškodenia miechy podľa štandardného modelu SCI sa uskutočňuje chirurgickým zákrokom v celkovej anestéze. Anestetizovaným potkanom do oblúka stavca Th10 vyvrtáme otvor, cez ktorý zavedieme do epidurálneho priestoru 2F Fogartyho katéter až na úroveň Th8-Th9 miechy. Epidurálne umiestnený balónik naplníme vymedzeným objemom tekutiny (12,5µl) a necháme pôsobiť 5 minút. Po uplynutí časového intervalu z balónika odoberieme tekutinu a vytiahneme. Model spôsobí neurodegeneratívne zmeny v najcitlivejších bunkových populáciách v mieche v rostro- kaudálnom smere s tvorbou cýst, ktoré sa navonok odrazia v strate sivej a bielej hmoty a paralýze panvových končatín. Zvieratá dosahujú na 24hodín po poranení

BBB skóre 0, žiadna pohyblivosť panvových končatín, avšak v priebehu 7 dní dochádza ku spontánnej regenerácii, kedy dosiahnu BBB skóre maximálne 12-14.

Injekčná aplikácia MSC / dospelých mezenchýmových kmeňových buniek, alebo ich produktov - sekretómov, čo sú vlastne biologicky aktívne látky sa použijú na zvýšenie regeneračnej kapacity v poranených segmentoch miechy. Kompresný model poranenia miechy ako aj injikovanie kmeňových buniek, alebo ich produktov sa vykonáva v celkovej anestézii. Zvieratá po zákroku vykazujú prechodnú úplnú paralýzu panvových končatín. Zvieratá sú denne monitorované a v týždňových intervaloch testované na BBB skóre.

Začiatok pokusu je plánovaný na na 4.4.2017 a bude sa realizovať v priebehu troch rokov, do 31.12.2020.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

Projekt **vyžaduje** spätné posúdenie (podľa Nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z. z.), 3 mesiace od ukončenia projektu žiadateľ zašle výsledky projektu na spätné posúdenie.

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

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

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 431/17-221a

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

Zápaly spojovky, králiky, antibakteriálny účinok

Účel projektu*: v záujme dosiahnutia ktoréhokoľvek z cieľov uvedených v písmene b) pri vývoji, výrobe alebo testovaní kvality, účinnosti a bezpečnosti liekov, potravín, krmív a iných látok alebo výrobkov,

Ciele projektu a prínos z vykonaného projektu:

Zápal oka patrí medzi najčastejšie sa vyskytujúce ochorenia postihujúce oko a pomocné orgány oka. Zápaly očných spojoviek konjunktivitídy vznikajú najčastejšie preniknutím a zanesením mikroorganizmov (baktérie, vírusy, plesne, parazity atď.) do spojovkového vaku. Choroboplodné zárodky sa v spojovkovom vaku rozmnožia a takto vyvolajú zápalovú reakciu na spojovkách. Tento typ konjunktivitídy sa zvyčajne lieči antibiotickými očnými kvapkami alebo masťami.

Aj keď sú dostupné lieky na liečbu bakteriálnych konjunktivitíd, je nevyhnutné študovať ďalšie možnosti liečby, najmä nových skupín účinných liekov. Takouto kandidátnou látkou je i „Elektrochemicky aktivovaná voda“(EAW), pripravovaná originálnou patentovanou technológiou firmy AZAD so zámerom terapeutického využitia. Keďže nie sú dostupné *in vitro* metódy, ktoré by poskytovali reálny a komplexný obraz všetkých interakcií medzi infekčným agens a hostiteľom v procese vyvolania ochorenia, je nevyhnutné v rámci predklinického testovania použiť zvierací model. Potvrdenie efektu *in vivo* je preto v súlade s EU legislatívou (ICH Topic M 3 (R2) CPMP/ICH/286/95 Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals) podmienkou pre podanie žiadosti o prvé podanie človeku.

V *in vitro* experimentoch sme testovali antimikrobiálnu aktivitu prípravku Elektro chemicky aktivovaná voda na zbierkových a klinických kmeňoch. Antibakteriálny účinok bol stanovený na všetkých testovaných kmeňoch, vrátane meticilín rezistentných stafylokokov. Silný inhibičný účinok bol stanovený už pri krátkodobom pôsobení, po 15 a 30 min. pôsobenia bol rast všetkých testovaných kmeňov eliminovaný. Účinok bol porovnateľný avšak v nástupe účinku bola Elektro-chemicky aktivovaná voda efektívnejšia ako porovnávací prípravok Uniflox. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že Elektro chemicky aktivovaná voda by sa mohla používať na liečbu mikrobiálnych infekcií, akútnej a chronickej nehnisajúcej konjunktivitídy, blefaritídy a nehnisajúcej keratitídy. V štúdií (Ro -3705/16-221b) Elektro chemicky aktivovaná voda redukovala vývoj keratitídy vyvolanej kmeňom *Pseudomonas aeruginosa*.

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

Najčastejším modelom pre štúdium bakteriálnej konjunktivitídy je Novozélandský králik. Zvieratám je v podmienkach lokálnej anestézy (Benoxi 0.4 %) a miernom poškodení oka – skarifikácii – aplikované suspenzia mikroorganizmov. Následne sa sledujú účinky testovanej látky. Toto povrchové poškodenie -podráždenie- imituje klinické infekcie, pri ktorých primárne dôjde k podráždeniu (mechanickému, chemickému) a následne k infekcii.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Novozélandský biely králik, samice -27 ks

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

Plánované experimenty: Aplikácia skúšaného liečiva patrí do kategórie krutosti postupov „slabé“, lokálna aplikácia po jednej kvapke (40 µl) do spojkového vaku patrí do kategórie krutosti postupov „slabé“. Jediný invazívnejší zákrok, ktorý zvieratá podstúpia je navodenie infekcie – mierne podráždenie oka, skarifikácii, tento úkon bude robený v anestézii a preto by tento úkon nemal žiadnym závažným spôsobom zhoršiť zdravotný stav zvierat, bol klasifikovaný do kategórie krutosti postupov „stredné“. Samotný infekčný proces nie je mierny, s tendenciou spontánneho vyhojenia, kategória krutosti stredné.

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

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

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

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

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

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

2. Redukcia počtu zvierat:

Pre štatistickú reprodukovateľnosť výsledkov a na základe našich dlhoročných skúseností je potrebné, aby každá vyšetrovaná skupina obsahovala 8 ks králikov (24). Tri králiky budú použité na overenie inokula pred infikovaním zvierat v hlavnom pokuse.

Plánovaný počet zvierat je 27 ks.

Základný (minimálny) dizajn postupov: Budeme mať tri základné skupiny králikov: 1) králiky infikované kmeňom *Staphylococcus aureus*, 2) králiky infikované a liečené testovanou látkou Elektro-chemicky aktivovanou vodou, 3) králiky infikované a liečené referenčným produktom UNIFLOX. Každá skupina bude zložená z 8 králikov.

Pilotný pokus – overenie inokula - králiky infikované kmeňom *Staphylococcus aureus*, bez liečby

3. Zjemnenie:

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

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

Navodenie infekcie zaraďujeme do kategórie krutosti postupov slabé až stredné. Aplikácia skúšaného liečiva patrí tiež do kategórie „slabé“ krutosti postupov, keďže bude aplikovaná lokálne po jednej kvapke (40 µl) do spojivkového vaku. Lokálne podanie anestézie je tiež neinvazívny zásah do organizmu. Spomenutým invazívnym a neinvazívnym postupom sa pre úspešné splnenie cieľov navrhovanej štúdie nedá vyhnúť, ale sú minimalizované na najnižšiu možnú mieru tak, aby zvieratá neutrpeli žiadnu zdravotnú, fyzickú ani psychickú ujmu a preto je klasifikovaný do kategórie krutosti postupov stredné.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie