

## Netechnické zhrnutia projektu

**Názov projektu:** Endogénna stimulácia a exogénna aplikácia neurotrofických faktorov na potlačenie sekundárnych zmien v modeli kompresného poškodenia miechy.

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 4238/15-221 *A - späté posúdenie*

**Kľúčové slová v projekte ( max 5 slov):** kompresia miechy, neurotrofické faktory, sekundárne poškodenie.

**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)

Neurotrofické faktory a ich príslušné receptory sú v mieste poškodenia úzko späté s potenciálom regenerácie. V mieste traumatického poškodenia je hladina neurotrofických faktorov znížená, z toho dôvodu sú liečebné prístupy v súčasnej dobe zamerané na zvyšovanie ich koncentrácie. Cieľom predloženého projektu bolo v experimentálnych podmienkach znížiť sekundárne poškodenie v mieche po traume, ktoré je kľúčové pre rozvoj paraplégie zadných končatín. Za účelom zistenia efektívnej terapie sa použili nové terapeutické prístupy 1) exogénna aplikácia neurotrofických faktorov, 2) endogénna stimulácia neurotrofických faktorov, 3) aplikácia biodegradovateľnej membrány pripravenej z chitosanu, 4) kombinovaná terapia (najúčinnnejšia exogénna/endogénna stimulácia rastových faktorov a biodegradovateľného kompozitu).

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

Naša pracovná hypotéza bola 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. Aplikácia trofických faktorov (endogénna a exogénna) v prvých hodinách po poškodení viedla k čiastočnej normalizácii metabolickej homeostázy. Výsledky našich analýz ukázali, že endogénna stimulácia neurotrofických faktorov signifikantne zvýšila obnovu neurologických funkcií a je účinnejšia ako opakovaná aplikácia neurotrofínov cez perforovanú dura mater. Porézná chitozanová matrica v kombinácii s kolagénom a rastovými faktormi premostila léziu, ale nezabezpečila riadené uvoľňovanie rastových faktorov.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

V experimentoch boli použité laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar, samice v počte 147ks na celú dobu riešenia.

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

Kompresia miechy bola uskutočnená z jej dorzálny strany, ale tlak na miechu vyvolal poškodenie, ktoré sa rozšírilo aj do okolia v rozsahu 2cm rostrálne a kaudálne. Tým sa porušili 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 boli po traumatickom poškodení miechy zachované iba čiastočne.

#### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

Na základe posudzovaných faktorov bola navrhnutá klasifikácia krutosti postupu označená ako „krutá“.

#### **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.

##### **2. Redukcia počtu zvierat:**

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

V porovnaní s pôvodne plánovaným počtom zvierat (160 ks) bolo v experimente celkovo použitých 147 zvierat. K zníženiu počtu použitých zvierat došlo z toho dôvodu, že bola získaná nízka variabilita výsledkov a daný počet zvierat bol postačujúci pre štatistické vyhodnotenie sledovaných parametrov.

##### **3. Zjemnenie:**

Všetky zákroky, ktoré boli uskutočnené na zvieratách, boli vykonávané pod celkovou anestézou, t.j. neboli pre zvieratá bolestivé. Za účelom zníženia bolesti sa experimentálnym zvieratám tesne po kompresii miechy, keď bolo zviera ešte pod vplyvom anestézie, podali analgetiká (Novasul, Richterpharma, 2ml/kg/i.m.) a antibiotiká (Amoksiklav, 30mg/kg, i.m.). Aby sa predišlo prípadnej bolesti a zápalovej reakcii, antibiotiká a analgetiká boli podávané spravidla po dobu 3 dní. Ukončenie liečby určoval podľa stavu experimentálnych zvierat operatér. Počas operačného zákroku ako aj po jeho ukončení boli zvieratá sledované zodpovednou osobou, ktorá včas poskytla potrebnú starostlivosť. Po operačnom zásahu boli zvieratá schopné prijímať vodu a krmivo. Keď sa u zvierat vyskytol problém so zdvíhaním hlavy ku napájadlu, pre zmiernenie ich utrpenia sa zvieratám prvé dni (2-3dni/2x denne) po zákroku aplikoval perorálne (injekčnou striekačkou), prípadne subkutánne fyziologický roztok. Rovnako kvôli dostupnosti potravy bola prvé dni po kompresii miechy potrava umiestnená priamo v kletke. Ukončenie podávania fyziologického roztoku určil operatér na základe pohybových schopností zvierat. Dôsledkom traumatického poškodenia miechy na úrovni Th9 bola okrem paraplégie zadných končatín aj dočasná strata funkcie (čiastočná, alebo úplná) vyprázdňovania močového mechúra, preto sa zvieratám močový mechúr vyprázdňoval mechanicky palpačne min. 2x denne, po dobu obnovenia funkcie (približne 2 týždne) vykonával a posudzoval operatér. Zvieratá, ktorým bola po kompresii miechy aplikovaná liečba (exogénna alebo endogénna stimulácia rastových faktorov, a aplikácia biodegradovateľného materiálu) vykazovali ihneď po zákroku rovnaké príznaky ako po kompresii. Neurologický stav sa u liečených experimentálnych skupín (signifikantne/nesignifikantne) zlepšil, a to prevažne od 3-5 týždňa po kompresii a liečbe.

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

Laboratórne potkany majú v porovnaní s inými laboratórnymi zvieratami dobre vyvinutú regeneračnú schopnosť, z toho dôvodu sú vhodné pre sledovanie obnovy regenerácie po traume miechy a následnej liečbe. Experimentálne zvieratá boli počas zákroku v celkovej anestéze. Zvieratám boli

podávané analgetiká a antibiotiká, aby sa predišlo prípadnej bolesti a zápalovej reakcii. Každodennú starostlivosť experimentálnych zvierat zabezpečovali zaškolení riešitelia projektu, ktorí majú prax s experimentami na zvieratách.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:    áno    nie

§ 40 Netechnické zhrnutie projektu 1635/14-221

**Názov projektu:** Nácvik merania ľavokomorovej katetrizácie a merania ľavokomorového tlaku u potkanov v celkovej anestézii

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:**

**Účel projektu:** vysokoškolské vzdelávanie alebo odborné vzdelávanie na účely získania, udržiavania si alebo zlepšenia zručností potrebných na výkon povolania

**Cieľ projektu**

Cieľom projektu je naučiť doktorandov a odborných pracovníkov výkon ľavokomorovej katetrizácie a meranie tlaku krvi v ľavej komore srdca v celkovej anestézii.

**Prínos z vykonaného projektu:**

Potreba zručnosti pre túto metódu je dôležitá pre dlhodobú samostatnú realizáciu postupov u doktorandov a odborných pracovníkov pri experimentoch s problematikou diabetes mellitus riešených na našej katedre. Osvojenie si metodických zručností pred využitím postupov dlhodobo a kontinuálne zaručí, že experimentálne zvieratá budú využité odborne a získané výsledky budú validné a využiteľné pre vedeckú komunitu a, ako dúfame, budú mať dopad aj na humánnu diagnostickú a terapeutickú prax.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty :** Potkany, samce rodu Wistar, 75 jedincov

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

V postupoch sa plánuje intraperitoneálna aplikácia Avertínu. Zvieratá môžu pri intraperitoneálnej aplikácii látok pociťovať krátkodobú bolesť, ktorá však nebude významne narušovať pohodu, ani celkový stav zvierat. Pri následnom meraní ľavokomorového tlaku a aplikácii dobutamínu, ktoré nie je bolestivé, budú zvieratá vystavené len minimálnej záťaži. Samotné experimenty zamerané na zistenie funkcie srdca budú vykonávané v hlbokjej celkovej anestézii, po ktorej zvieratá nenadobudnú vedomie a budú humánne utratené.

### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

slabé – intraperitoneálna aplikácia Avertínu

bez možnosti zotavenia – katetrizácia ľavej komory a meranie tlaku v ľavej komore v anestézii, s následným utratením v CO<sub>2</sub>.

***Pri práci so zvieratami budú dodržané všetky predpísané predpisy a smernice pre chov a zaobchádzanie s laboratórnymi zvieratami podľa zásad 3 R.***

### **Replacement**

Nakoľko ide o experimentálne postupy, v ktorých sa bude hodnotiť bazálna a beta adrenergicky stimulovaná funkciu ľavej komory in situ, nie je možné pokus vykonať bez použitia zvierat. Počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako „in vitro“ pokusy, keďže na bunkových kultúrach nie je možné relevantne posúdiť funkciu kardiomyocytov, najmä v rámci ľavej komory ako celku.

### **Reduction**

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat potrebný pre osvojenie si metodických zručností. 15 zvierat na jedného experimentátora je minimálny počet, keďže sa jedná o precíznu a náročnú metodiku a je potrebné zaistiť, aby budúce experimenty zahŕňajúce meranie ľavokomorového tlaku boli prevedené bezchybne, s validnými a reprodukovateľnými výsledkami.

### **Refinement**

Osvojovanie si postupov bude prebiehať pod dohľadom skúsených experimentátorov. Hemodynamické merania a EKG budú vykonávané v celkovej anestézii, zvieratá budú humánne utratené oxidom uhličitým. V prípade zistenia nevhodných neočakávaných udalostí (napr. závažná porucha prístroja na meranie hemodynamiky) bude experiment ukončený a následne predložený nový projekt tak, aby sa znížil počet používaných zvierat.

---

**Predkladaný projekt nepodlieha spätnému posúdeniu.**

**Spôsob spoločného využívania orgánov a tkanív z usmrtených zvierat tohto programu**

Po usmrtení zvierat sa ich tkanivá a orgány, ktoré nebudú potrebné na účely predkladaného projektu, v prípade záujmu ponúknu pracovníkom katedry Farmakológie a toxikológie UK, za vedeckým prípadne edukačným účelom.

§ 40 Netechnické zhrnutie projektu

**Názov projektu:**

Farmakoterapia kardiorenálneho syndrómu v experimentálnom modeli diabetes mellitus

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1636/17-221

**Účel projektu:** základný výskum

**Cieľ projektu**

Cieľom projektu je farmakologickou liečbou predísť chronickým komplikáciám alebo aspoň zmierniť poškodenie srdca a obličiek v experimentálne navodenom diabetes mellitus.

**Očakávaný prínos a ujma**

Na základe získaných výsledkov by sme mohli prispieť k objaveniu vhodnej kombinácie liečiv zmierňujúcej chronické komplikácie spojené s diabetes mellitus. Diabetes mellitus je nevyliciteľné ochorenie, ktoré môže vyústiť až do rozvoja kardiorenálneho zlyhania a následnej mortality. V prípade priaznivých výsledkov by bol prínos pre humánnu prax veľký, nakoľko by umožnil lepšie predchádzanie či kompenzovanie komplikácii diabetu a tým skvalitnenie života diabetickým pacientom. Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa budú hodnotiť fyziologické, patologické parametre a vhodnosť terapie, je potrebné, aby sa experimenty vykonali „*in vivo*“ na celom zvierati, poprípade na izolovanom orgáne „*in vitro*“ (cievy, srdce, obličky). Keďže ide o hodnotenie účinku liečiv na chronické komplikácie diabetu, je potrebné aby sa aplikovali aspoň 6 týždňov. V našom experimente sa budú liečivá aplikovať perorálne žalúdočnou sondou. Experimenty, kde budeme sledovať funkciu srdca a ciev bude vykonávať v hlbkej anestézii, pri ktorej zvieratá nebudú pociťovať žiadnu bolesť spojenú s vykonávaním pokusu. Za dostatočnú anestéziu, budeme považovať stav, keď po stlačení zadnej labky („toe pinch“) nedôjde k jej reflexnému stiahnutiu. Po skončení pokusu, zviera nenadobudne vedomie.

**Počet a typ zvierat**

Potkany, samce rodu Wistar , 210 jedincov

***Pri práci so zvieratami budú dodržané všetky predpísané predpisy a smernice pre chov a zaobchádzanie s laboratórnymi zvieratami podľa zásad 3 R.***

**Replacement**

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa budú hodnotiť fyziologické, patologické parametre a efekt terapie na molekulárnej a funkčnej úrovni, je žiaduce aby sa experimenty vykonali „*in vivo*“ na celom zvierati a na izolovaných orgánoch „*in vitro*“ namiesto bunkových kultúr. Podobne počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom.

### **Reduction**

V experimentoch bude použitý taký počet experimentálnych zvierat, ktorý potrebný pre štatistické vyhodnotenie použitím ANOVA testu. Ako post hoc test v prípade, že budeme mať rovnomerné rozdelenie hodnôt, použijeme test LSD, v prípade nerovnomerného rozdelenia hodnôt použijeme Kruskal Wallis test. Bude používaná iba jedna kontrolná skupina a zvieratá budú objednávané v rovnakom časovom intervale, aby sa predišlo sezónnym zmenám a potrebe ďalších opakovaní. Taktiež homogénne geneticky rovnaké skupiny zvierat budú zahrnuté v experimentoch.

### **Refinement**

Výsledky jednotlivých častí štúdie budú približne vyhodnocované a v prípade zistenia nevhodných neočakávaných udalostí bude experiment ukončený a následne predložený nový projekt tak aby sa znížil počet používaných zvierat.

## **Klasifikácia krutosti postupov**

### **Kategórie krutosti**

#### **Bez možnosti zotavenia**

Postupy, ktoré sa celé vykonávajú v celkovej anestézii, po ktorej zviera nenadobudne vedomie.

- odoberanie vzoriek krvi, srdca, aorty a obličiek pre potreby molekulárnej analýzy a histologického hodnotenia, izolácia a perfúzia srdca podľa Langendorffa, meranie EKG v celkovej anestézii a katéterizácia ľavej komory v anestézii, s následným utratením v CO<sub>2</sub>.

#### **Slabé**

Postupy vykonávané na zvieratách, pri ktorých je pravdepodobné, že v ich dôsledku budú zvieratá pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach, a postupy, ktoré vo významnej miere nenarušajú pohodu ani celkový stav zvierat.

- intraperitoneálna aplikácia streptozotocínu, Thiopentalu, Avertínu, krátkodobé umiestnenie v metabolickej klietke, neinvazívne meranie tlaku krvi „tail cuff“ metódou.

#### **Stredné**

Postupy, ktoré zreteľne narušia pohodu a celkový zdravotný stav zvierat bez výrazných následkov. Krátkodobá stredná bolesť alebo dlhotrvajúca slabá bolesť, utrpenie a strach

- podávanie liekov perorálne žalúdočnou sondou

Predkladaný projekt nepodlieha spätnému posúdeniu.

### **Spôsob spoločného využívania orgánov a tkanív z usmrtených zvierat tohto programu**

Po usmrtení zvierat sa ich tkanivá a orgány, ktoré nebudú potrebné na účely predkladaného projektu, v prípade záujmu ponúknu pracovníkom katedry Farmakológie a toxikologie UK, za vedeckým prípadne edukačným účelom.



## Vzor na vyplnenie netechnického zhrnutia projektu:

**Názov projektu:** Hodnotenie protinádorových účinkov rastlinných funkčných potravín použitím ortotopického syngeneického modelu karcinómu prsníka

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1640/14-221

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** karcinóm prsníka, myši Balb/c, ortotopický model, fytoterapia

**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:

V posledných rokoch sa zvýšil záujem o látky prírodného pôvodu pre ich predpokladaný protinádorový efekt v organizme. Cieľom projektu je analyzovať antitumorovú aktivitu prirodzených substancií (*Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis*, *Cinnamomum cassia*) použitím syngeneických modelových štúdií mamárnej karcinogenézy u samíc myší. V experimentoch bude hodnotený rast objemu inokulovaných 4T1 buniek adenokarcinómu mliečnej žľazy myší, mechanizmus účinku podávaných substancií - markery nádorových kmeňových buniek, epigenetiky, proliferácia, apoptóza, angiogenéza, či antioxidačný efekt substancií.

Pri pitve odoberieme krv, nádory vypitveme a vyhodnotíme prípadné makroskopické zmeny na sledovaných orgánoch. V jednotlivých skupinách štatisticky vyhodnotíme základný parameter mamárnej karcinogenézy - objem nádorov. Vykonáme histologickú typizáciu nádorov a ich grading. Stanovíme vybrané parametre plazmatického lipidového a sacharidového metabolizmu (predpokladané sú preventívne účinky fytosubstancií aj u kardiovaskulárnych ochorení) a vplyv prírodných látok na telesnú hmotnosť a príjem potravy. Budeme hodnotiť mechanizmus účinku použitých substancií (Western blot analýza markerov v mamárnych nádoroch). Vyhodnotíme parametre apoptózy (Bcl-2, Bax, kaspáza-3, príp. iné), angiogenézy (VEGF, VEGFR-2, FGFb), proliferácie (Ki67), nádorových kmeňových buniek a epigenetiky (metylácia acetylácie hytónov, či vybraných promótorov). Stanovíme parametre oxidačného poškodenia v nádorových

bunkách (malondialdehyd, dityrozín, konj.lyzín). Súčasťou postupu bude mimoriadne dôležitá analýza prežívania zvierat.

Z overovania cez najprestížnejšiu vedeckú databázu Web of Science je zrejmé, že ešte neexistujú výsledky z takéhoto výskumu. Z hľadiska vedy preto existuje nutnosť jeho vykonania, aj z dôrazom na závažnosť problematiky karcinómu prsníka u žien, kde fytoterapia môže zohrávať vysoko prínosnú úlohu aj preto, že rastlinné funkčné potraviny sú ľahko a aj cenovo dostupné pre širokú populáciu.

### Prínos z vykonaného projektu

Na základe protinádorových vlastností môžu fytochemikálie v prirodzených substancích priniesť pre klinickú onkológiu nové prístupy v či už v chemoprevencii alebo v liečbe nádorového ochorenia. Na našom pracovisku sa problematikou experimentálnej mamárnej karcinogenézy zaoberáme 20 rokov, pričom analýze protinádorového účinku fytofarmák/fytosubstancií sa venujeme posledných 6 rokov.

Výhody diéty bohatej na rastlinné zložky spočívajú v komplexnom pôsobení veľmi širokého spektra fytochemikálií. Práve aditívne a synergické pôsobenie fytochemikálií zodpovedá za ich antioxidačné a protinádorové účinky. Táto skutočnosť vysvetľuje fakt, prečo samostatne aplikovaný antioxidant nemôže nahradiť kombinované pôsobenie desiatok rôznych fytochemikálií prítomných v rastlinných produktoch a nemôže dosiahnuť s nimi porovnateľné účinky na zdravie človeka (Liu, 2004).

V experimentálnej rakovine prsníka *in vivo* a *in vitro* doteraz neboli hodnotené antineoplastické účinky ani jednej z prirodzených substancií, ktoré plánujeme testovať. **Tymián** je zaujímavý obsahom fenolických látok, saponínov a steroidných látok (Bozkurt et al., 2012). **Šalvia** sa vyznačuje vysokým zastúpením hlavne flavonoidov, zvlášť alfa-tujon, kamfor, borneol, gamma-murolen (Russo et al., 2013). **Škorica** je bohatá na anthokyaníny, cinamaldehyd, eugenol, cineol, cinamyl acetát.

Chceme zdôrazniť, že riešením tohto projektu získame prvotné experimentálne výsledky, ktoré môžu byť veľmi prínosné zvlášť pre klinickú prax. Plánované použitie ortotopického syngeneického modelu umožní analyzovať nielen liečebné možnosti ale aj prežívanie laboratórnych myší, čím získame veľmi hodnotné výsledky v rámci vedného odboru onkológie, konkrétne pre liečbu karcinómu prsníka. V projekte budeme analyzovať základné parametre tumorového rastu a určíme histologickú typizáciu nádorov. Budeme hľadať mechanizmus účinku očakávaného liečebného pôsobenia použitých fytosubstancií. Vyhodnotíme celkové vedľajšie účinky látok na organizmus zvierat, stanovíme parametre lipidového a sacharidového metabolizmu. V rámci terapeutického hodnotenia vyhodnotíme prežívanie zvierat, čo významne prispeje kvalidite výsledkov a teda aj vedeckej hodnote celej štúdie.

### Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V projekte použijeme panenské samice laboratórnych myší kmeňa Balb/c v celkovom počte 234 kusov.

Predpokladaná doba riešenia projektu – **2 roky (1. 8. 2017 - 31. 7. 2019)**, počas ktorých uskutočníme **3 čiastkové experimenty**, pričom v každom použijeme do 78 zvierat.

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

V štúdií analýzy liečebného efektu ide o modely s vyvolanými nádormi u myší, pri ktorých sa očakáva, že spôsobia maximálne strednú bolesť alebo strach, alebo že budú stredne prekážať normálnemu správaniu.

V štúdií analýzy prežívania ide modely s vyvolanými nádormi alebo so spontánne vzniknutými nádormi, pri ktorých sa očakáva, že spôsobia progresívnu letálnu chorobu spojenú s dlhotrvajúcou strednou bolesťou, strachom alebo utrpením. Napríklad nádory spôsobujúce kachexiu, invazívne nádory kostí, nádory s metastatickým rozširovaním a nádory, ktoré môžu vytvárať vredy.

Zvieratá budú denne monitorované za účelom hodnotenia prežívania. Krivka prežívania zvierat je najlepším obrazom toho ako terapia účinkuje, je veľmi žiadaná vo výsledkoch všetkých onkologických štúdií. Každá klinická onkologická štúdia porovnáva prežívanie ľudí bez terapie a s terapiou, analogicky je potrebné postupovať aj u animálnych štúdií pre získanie vedecky hodnotných výsledkov.

**Predpokladaná úroveň krutosti:** v závislosti od jednotlivých postupov - slabá, stredná až krutá

## **Uplatňovanie zásad 3R**

### **1. Nahradenie zvierat:**

K metóde použitej v predkladanom projekte nie je možné využiť alternatívne metódy, pretože fyto-substancia sa musí testovať aj na celistvom organizme, nestačí iba testovanie *in vitro* na bunkových líniiach, vzhľadom na to, že pri týchto experimentoch nie je možné sledovať komplexný vplyv všetkých parametrov a súčinnosti v celistvom organizme. Tymián, škoric a šalvia neboli doteraz testované v uvedenom ortotopickom 4T1 modeli mamárnej karcinogenézy u myší (viď priložené výpisy z Web of Science; kľúčové slová: orthotopic mouse model, breast cancer, thyme resp. sage resp. cinnamon).

### **2. Redukcia počtu zvierat:**

V každom postupe používame **minimálny počet zvierat** ( $n=78$ ; 3 experimentálne skupiny po 26 zvierat sú ešte rozdelené na 2 podskupiny štúdie terapie resp. prežívania po 13 zvierat).  $n=13$  je počet zvierat potrebný na získanie signifikantných výsledkov po štatistickom hodnotení a ktorý je ešte akceptovateľný vedeckou komunitou (zachovanie validity a reprodukovateľnosti experimentu).

### **3. Zjemnenie:**

Najpoužívanjšími **laboratórnymi modelovými zvieratami** sú hlodavce, pretože majú mnohé jedinečné vlastnosti, ktoré ich predurčujú k získavaniu a hodnoteniu všeobecných princípov experimentálnej onkológie. Myš a potkan je najnižším druhom živočíchov, ktorý vyhovuje danému typu experimentov, t.j. nie je nahraditeľný iným druhom. Hlavnou výhodou použitia myší je to, že ich nádory mliečnej žľazy sa veľmi podobajú ľudským, tak v etiológii ako aj v patológii (Medina et al., 1982). Veľmi dôležitým kritériom v experimentálnej onkológii na definovanie terapeutických

možností alebo karcinogénnej aktivity farmaka je spontánny výskyt tumorov. Vďaka spontánnemu vzniku nádorov pri dlhodobých štúdiách sú vybrané kmene myší a potkanov vhodným modelom pre imitáciu situácie u ľudí (Anderson, 1992). Myš je nevhodná pre štúdium chemoprevencie avšak je vhodná pre realizáciu ortotopického (syngeneického resp. xenograftového) modelu s použitím subkutánne inokulovaných buniek karcinómu (Ito et al., 1996).

Spôsob manipulácie so zvieratami a starostlivosť o zvieratá počas postupu bude v súlade s požiadavkami uvedenými v Nariadení vlády SR č. 377/2012 Z.z. a Vyhláške Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR č. 436/2012 Z.z. Čo sa týka zásady **zjemňovania postupu**, charakter postupu minimalizuje stres u zvierat, keďže počas celej dĺžky experimentu sa okrem subkutánnej inokulácie buniek karcinómu (slabý stupeň krutosti) nerealizujú na zvieratách žiadne bolestivé výkony, iba palpácie a váženie predstavujúce tiež iba slabý stupeň krutosti. Počas celého priebehu postupu nebudú zvieratá vystavené bolestivým zákrokom. V štúdiu terapeutického hodnotenia sa preto nevyžaduje použitie anestézy ani analgetík (nádory budú malé, bez nekrózy max. do 0,7 cm<sup>3</sup> a po troch týždňoch od aplikácie aj bez metastáz). Použitie analgetík sa predpokladá v štúdiu prežívania, kde možno očakávať u zvierat strednú až krutú bolesť. Zmluvný veterinár odporúča podávanie Carprofenu v dávke 5 mg/kg/deň, liečivo patrí do skupiny nesteroidných protizápalových látok (NSAID), bude podávané perorálne denne do pitnej vody (vypočíta sa priemerná spotreba vody v jednej kletke na deň, stanoví sa priemerná hmotnosť zvierat na kletku a následne sa stanoví množstvo liečiva rozpusteného v jednej fľaši). Zvieratám bude analgetikum aplikované kontinuálne, čím sa zabezpečí jeho maximálny účinok. Carprofen v uvedenej dávke je osvedčeným analgetikom u hlodavcov, aplikáciou tohto analgetika dokázateľne zmiernime utrpenie zvierat, navyše kletky budú vybavené hračkami - enrichmentom (tunely, iglu domčeky). Stupeň bolesti bude posudzovaný na základe posúdenia vitality zvierat, prípadne výskytu nekrotizujúceho nádoru (vzhľadom na rozmery nádoru sa však nekróza neočakáva). Kritériom pre human endpoint bude nekróza mamárneho nádoru, druhým kritériom pre humánny endpoint bude pokles vitality zvierat, ktorý je u trpiacich hlodavcov neprehliadnuteľný. Štúdia prežívania je najhodnotnejším ukazovateľom účinku testovanej liečby, predstavuje najvalidnejší parameter terapie. Čo sa týka pomeru ujmy a prínosu, Etická komisia JLF UK došla k záveru, že celospoločenská hodnota výsledkov riešenia tohto projektu prevyšuje ujmu zvierat spôsobenú utrpením, bolesťou a strachom a s ohľadom na etické aspekty, môžu byť výsledky projektu v konečnom dôsledku prospešné ľuďom.

Projekt bude podliehať opätovnému posúdeniu:

áno -

výsledky sa zasílají do  
31.10.2019

## Aktualizované netechnické zhrnutie projektu 4124/13-221 A

Názov projektu: „Metastatické nádory umožnené hypoxickým mikroprostredím v nádore“ – SPÄTNE POSÚDENIE

**Kľúčové slová:** hypoxia, nádorové mikroprostredie, rádioterapia

### Účel projektu:

#### 1. Cieľ projektu:

Cieľom projektu bolo sledovať vplyv nízkych dávok externého žiarenia na citlivosť resp. rezistenciu zdravého tkaniva na následné vysoké terapeutické dávky žiarenia. Myši boli vystavené nízkej (0,3Gy) a/alebo vysokej (3,0Gy) dávke žiarenia a bol sledovaný vplyv na prežívanie.

#### 2. Prínos z vykonaného projektu

Získané výsledky môžu pomôcť ku skvalitneniu liečby onkologických pacientov. Rádioterapia je jednou zo základných liečebných modalít v terapii nádorového ochorenia. Jej nedostatkom je poškodenie aj zdravého tkaniva a nedostatočná dávka v závislosti od lokality a citlivosti nádoru. Získané výsledky projektu by mali prispieť k optimalizácii rádioterapie onkologických ochorení. Ich overenie v predklinických štúdiách na zvieratách je nevyhnutné

#### 3. Počet a druh použitých zvierat:

Myš laboratórna kmene DBA/2 a C57/bl6

Plánovaný počet: 288 jedincov

Skutočne použitý počet: 205 jedincov

#### 4. Nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:

Ako sme predpokladali, ožarovanie nízkou dávkou nemalo negatívny vplyv na zvieratá. Expozícia myší nízkej dávke žiarenia mala ochranný účinok pred vysokou dávkou žiarenia. Vysoká dávka žiarenia sa u niektorých zvierat (približne 20%) prejavila lokalizovaným vypadávaním srsti. U väčšiny zvierat sme nepozorovali sme výrazné zhoršenie zdravotného stavu. Závažnejšie príznaky sme pozorovali približne u 15% zvierat. U zvierat s výraznou stratou hmotnosti (>10%) alebo prejavmi bolesti (naježená srst', zhrbené držanie tela) sme pristúpili k humánnemu ukončeniu experimentu (letálna dávka tiopentalu).

#### 5. Predpokladaná úroveň krutosti:

Ako krutý sa projekt prejavil približne u 15% použitých zvierat.

#### 6. Súlad s požiadavkami „3R“

##### Nahradenie

Pred začatím experimentov na laboratórnych zvieratách boli vykonané experimenty *in vitro* a boli nastavené základné parametre postupov.

**Obmedzenie:**

Počet zvierat v skupinách bol minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Nakoľko sme získali štatisticky signifikantné výsledky už pri použití menšieho počtu zvierat ( $n=205$ ), nebolo potrebné použiť plánovaný počet zvierat ( $n=288$ ).

**Zjemnenie:**

Myši boli držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Na projekte sa podieľali len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. V klietkach, kde sa nachádzali zvieratá s vypadávaním srsti sme zvýšili množstvo podstielky a papierovej vaty, aby sme umožnili ukrývanie zvierat. Zvieratá so zhoršeným zdravotným stavom mali potravu k dispozícii priamo vo vanici, pri strate hmotnosti vyššej ako 10%, alebo pri prejavoch bolesti (zhrozené držanie tela, naježená srst', znížená pohybová aktivita sme pristúpili k humánnemu ukončeniu postupu.

**7. Spätné posúdenie projektu:**

Vzhľadom k tomu že postupy boli klasifikované ako kruté, projekt sme spätne posúdili do 30.4.02017. Ako krutý projekt hodnotíme pre 15% použitých zvierat. Jedná sa hlavne o zvieratá, ktoré neboli exponované nízkej dávke žiarenia pred expozíciou vysokej dávke.

## **Netechnické zhrnutie projektu** 1465/14-221

**Názov projektu:** Lokalizácia a úloha endotelovej syntetázy oxidu dusnatého v neurogénnej oblasti potkana v postnatálnej období

**Kľúčové slová v projekte:** postnatálna neurogenéza, eNOS, proliferácia, migrácia, imunohistochemia

**Účel projektu\*:** Základný výskum

### **Ciele projektu:**

Postnatálna neurogenéza je zložitý proces pozostávajúci z viacerých dejov (proliferácia, migrácia, diferenciácia, integrácia do nervových okruhov), ktoré sú regulované mnohými faktormi. Mechanizmy regulácie postnatálnej neurogenézy nie sú napriek intenzívnemu výskumu a pribúdajúcim poznatkom doposiaľ dostatočne vysvetlené. Jedným z regulátorov je aj oxid dusnatý, ktorý môže byť produkovaný tromi typmi enzýmov- syntetáz NO (NOS), pričom jeho účinok závisí od typu syntetázy, ktorou je produkovaný. V regulácii postnatálnej neurogenézy bola doposiaľ zistená iba úloha neuronálnej NOS. Cieľom tohto projektu je získať originálne poznatky v oblasti regulácie postnatálnej neurogenézy na základe zisťovania distribúcie endotelovej NOS (eNOS) a jej úlohy v neurogénnej oblasti mozgu (subventrikulárna zóna - rostrálna migračná dráha - bulbus olfactorius) juvenilných a dospelých potkanov. Distribúciu eNOS budeme zisťovať na rezoch mozgu pomocou imunohistochemickej metódy a metódou *in situ* hybridizácie. Úlohu eNOS v neurogénnej oblasti budeme sledovať na základe jej inhibície.

### **Prínos z vykonaného projektu**

Prínosom tohto projektu by malo byť zmapovanie expresie enzýmu eNOS v neurogénnej oblasti, a zistenie účinku NO produkovaného týmto enzýmom na procesy neurogenézy a angiogenézy v postnatálnom období.

Je známe, že NO participuje na regulácii neurogenézy v systéme subventrikulárna zóna (SVZ)- rostrálna migračná dráha (RMS) – bulbus olfactorius (BO). Predpokladá sa, že jeho zdrojom sú nNOS pozitívne bunky nachádzajúce sa priamo v RMS a v jej blízkom okolí. Doposiaľ však nie je známa distribúcia eNOS pozitívnych buniek v SVZ-RMS-BO, o ktorých predpokladáme, že by mohli regulovať nielen neurogenézu, ale aj angiogenézu v danej

oblasti. Keďže neurogénna oblasť SVZ-RMS-BO sa vyznačuje vyššou hustotou ciev a ich špecifickým usporiadaním tvoriacim tzv. migračný skelet pre neuroblasty putujúce zo SVZ do BO, predpokladáme, že zastúpenie eNOS pozitívnych buniek v tejto oblasti by mohlo byť výrazné. Zmapovanie expresie eNOS v SVZ-RMS-BO u juvenilných a dospelých potkanov by mohlo byť základom pre ďalšie štúdium jej regulačných účinkov.

Prínosom tohto projektu by malo byť tiež zistenie úlohy eNOS v SVZ-RMS-BO na základe selektívnej inhibície eNOS. Selektívna inhibícia eNOS by nám mala dať odpoveď na otázku, či NO produkované eNOS ovplyvňuje proliferáciu buniek v RMS, a teda či neurogenézu stimuluje alebo inhibuje. Očakávame, že inhibícia eNOS by mohla ovplyvniť nielen neurogenézu ale aj angiogenézu. Vzhľadom na známe pro-angiogénne účinky eNOS sa domnievame, že jej inhibícia v skorom postnatálnom období, by mohla negatívne ovplyvniť vytváranie migračného skeletu, čo by mohlo mať za následok narušenie migrácie neuroblastov zo SVZ do BO.

Pochopenie regulačných mechanizmov postnatálnej neurogenézy je dôležité pre prípadné terapeutické využitie neurálnych prekursorov ako endogénneho zdroja náhrady poškodených a degenerovaných nervových buniek mozgu.

### **Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

V experimente budú použité potkany kmeňa Wistar albino oboch pohlaví v počte 94 ks

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

Všetky zákroky, ktoré by mohli spôsobiť bolesť zvieratám budú robené v izofluranovej narkóze.

V jednej časti experimentu budeme potkanom s.c. podávať inhibítor eNOS. NO produkované cievami (eNOS) sa podieľa na regulácii krvného tlaku. Z tohto dôvodu budeme experimentálnym zvieratám merať krvný tlak, nepredpokladáme však, že by inhibícia eNOS negatívne ovplyvnila celkový zdravotný stav zvierat. Zvieratá budeme denne monitorovať, budeme sledovať miesto vpichu, v prípade lokálneho zápalu budeme dané miesto chladiť. Budeme sledovať správanie sa zvierat, ak by sme pozorovali výraznejšie zhoršenie zdravotného stavu, zviera humanne usmrtíme ešte pred ukončením doby prežívania.

### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

Postupy, ktoré budeme na zvieratách vykonávať budú bez možnosti zotavenia, slabé a stredné podľa Klasifikácie krutosti postupov - prílohy č. 4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z. z.



## Uplatňovanie zásad 3R

### 1. Nahradenie zvierat:

Po zadaní kľúčových slov tohto projektu nebola v databáze European Centre for Validation of Alternative Methods (<http://altweb.jhsph.edu/news/current/ecvamdb-alm.html>) nájdená žiadna alternatívna metóda.

### 2. Redukcia počtu zvierat:

V experimentálnych skupinách použijeme minimálny počet zvierat (5-7). Tento počet je nevyhnutný, aby bolo možné štatisticky vyhodnotiť výsledky.

### 3. Zjemnenie:

So zvieratami budú ohľaduplne manipulovať skúsení vedeckí pracovníci a doktorandi (prírodovedci, veterinári lekári). Prípadnú bolesť budeme zvieratám minimalizovať podaním analgetík.

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

## Príloha 2

### Netechnické zhrnutie projektu 2184/14-221

**Názov projektu:** Charakterizácia expresného profilu napäťovo riadených sodíkových kanálov NaV1.1-NaV1.9 v aferentných nervoch sprostredkujúcich viscerálnu bolesť metódou single cell RT-PCR

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** EK 1896/2016

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** viscerálna bolesť, NaVs, single cell RT-PCR, retrográdne značenie

**Účel projektu :** Základný výskum

#### Opísať ciele projektu:

Cieľom predkladaného projektu je definovať expresný profil alfa podjednotiek NaVs (NaV1.1 – NaV1.9) vo viscerálnych aferentných nervových typoch inervujúcich pažerák morčatá. Expresný profil NaVs vo viscerálnych aferentných nervoch zatiaľ nie je známy. Na základe vedeckých publikácií predpokladáme, že nociceptívne C-vlákná exprimujú inú kombináciu NaVs ako mechanosenzitívne A-vlákná. Túto hypotézu plánujeme v projekte overiť. Táto informácia dopomôže k vývinu nových terapeutických stratégií na ovplyvnenie viscerálnej bolesti.

#### Prínos z vykonaného projektu

Ide o nové poznatky získané analýzou expresie génov pre alfa podjednotky napäťovo riadených sodíkových kanálov vo viscerálnych aferentných nervových typoch – mechanosenzory a nociceptory, ktoré inervujú pažerák. Informácie prispievajú k vývinu nových liečebných postupov zameraných na inhibíciu špecificky exprimovaných génov pre napäťovo riadené sodíkové kanály v nociceptoroch a tak ovplyvniť viscerálnu bolesť bez negatívneho ovplyvnenia fyziologických funkcií. Ako model bude použité morča (kmeň Dunkin Hartley), hlavne kvôli podobnosti v anatomickej organizácii a farmakologickým vlastnostiam s vyššími cicavcami a človekom.

#### Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Na celú dobu trvania projektu a na dosiahnutie stanovených cieľov projektu je celkový plánovaný počet zvierat 15 morčiat, samcov, kmeň Dunkin Hartley. Zvieratá budú rozdelené do 3 skupín po 5 zvierat:

I.skupina (5 morčiat): použité na analýzu expresie génov *NaV1.1*, *NaV1.2*, *NaV1.3*

II.skupina (5 morčiat): použité na analýzu expresie génov *NaV1.4*, *NaV1.5*, *NaV1.6*

III.skupina (5 morčiat): použité na analýzu expresie génov *NaV1.7*, *NaV1.8*, *NaV1.9*, kontroly

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

Pri metóde retrográdneho značenia pažeráka pomocou farbičky Dil budú zvieratá v celkovej anestézii (zoletil). Počas tohto malého chirurgického zásahu sa exponuje horná časť pažeráka a mikropipetou sa injektuje veľmi malé množstvo farbičky, 2 vpichy po 1 – 2  $\mu$ l, max. spolu 5  $\mu$ l. Malá rezná rana je zašitá (2 stehy) a ošetrová (framykoin, septonex). Zviera je po odznení anestézie už po hodine čulé s dobrou motorickou aktivitou, prísunom vody a potravy. Zviera je prenesené do zverinca, kde bude držané ešte minimálne 2 týždne a potom usmrtené vykrvácáním po inhalácii CO<sub>2</sub> s postupne zvyšujúcim prietokom.

## **Predpokladaná úroveň krutosti:**

V rámci predkladaného projektu budú prebiehať postupy, ktoré spadajú podľa prílohy 4 nariadenia vlády 377 do kategórie

*Slabé* – retrográdne značenie neurónov inervujúcich pažerák – jedná sa o malý chirurgický zákrok v krátkodobej anestézii zoletil (cca 1 cm kožná incízia v krčnej oblasti na exponovanie horného pažeráka – injekcia Dil mikropipetou do steny pažeráka, 2 vpichy, max. 5  $\mu$ l). Pozn. aj napriek tomu, že chirurgický zákrok je klasifikovaný ako stredný stupeň krutosti, v našom prípade nejde o závažný chirurgický výkon ako je popísané v bode 2. Stredné – písmeno c (zvieratá sú už po hodine čulé s dobrou motorickou aktivitou a príjmom vody a potravy).

*Bez možnosti zotavenia* – zvieratá pre nasledujúce metodiky *single cell* RT-PCR sú po 2 týždňoch od retrográdneho značenia usmrtené vykrvácáním po inhalácii CO<sub>2</sub> s postupne zvyšujúcim prietokom. Potom sa pracuje už iba s tkanivom (nodózne, jugulárne a DRG gangliá).

## **Uplatňovanie zásad 3R**

### **1. Nahradenie zvierat:**

Pokus nie je možné vykonať bez použitia týchto špecifických zvierat na štúdium neurónov z periférnych nervových ganglií. Morča domáce je jeden z najrelevantnejších modelov aferentnej inervácie vnútorných orgánov človeka. Neurofyziológické a neurofarmakologické parametre u morčiat sú ideálne pre vykonanie translačných štúdií s validáciou dát priamo u človeka. Pri tomto plánovanom pokuse neexistujú alternatívne metódy, pretože na pokus nie je možné použiť nižší druh laboratórnych zvierat (napr. myš), pretože nižšie laboratórne zvieratá majú inú anatomickú organizáciu a farmakologické vlastnosti vágového systému v porovnaní s vyššími cicavcami (Brain Res Rev. 2009 Apr;60(1):171-186.). Prieskum databáz ukázal, že vzhľadom na komplexnosť jednotlivých typov aferentných vágových dráh nie je možné použiť modelovanie ani jednoduchšie systémy (bunkové kultúry a pod.).

### **2. Redukcia počtu zvierat:**

Jednotlivé postupy na anestézovaných zvieratách budú vykonané na najnižšom počte jedincov tak, aby bol výsledok pokusu štatisticky hodnotiteľný a dáta získané z pokusu relevantné. Maximálny počet zvierat použitých v celom projekte bude n=15 jedincov, ktoré budú rozdelené do 3 skupín po 5 zvierat.

### 3. Zjemnenie:

Plánovaný pokus je minimálne traumatizujúci pre zvieratá. V krátkodobej celkovej anestézii (zoletil) sa za sterilných podmienok malým kožným rezom (1 cm) exponuje pažerák a fluorescenčná retrográdna farbička Dil (0,2%, 2 vpichy x 1,5 µl, max. 5 µl) sa pomocou mikropipety injektuje do svalovej vrstvy exponovaného pažeráka. Rana bude zašitá (2 stehy) a štandardne ošetrená (septonex, framykoin), zvieratá sa sleduje a po odznení anestézie sa premiestni do zverinca, kde bude udržiavané najväčšou starostlivosťou do dvoch týždňov. Zvieratá sú už hodinu po zákroku čulé s dobrou motorickou aktivitou a príjmom vody a potravy.

Podľa protokolu a časového harmonogramu pred použitím metodiky *single cell* RT-PCR budú zvieratá usmrtené vykrvácанím po inhalácii CO<sub>2</sub> s postupne zvyšujúcim prietokom a v pokuse sa bude ďalej pracovať už len s tkanivom (nodózne, jugulárne a DRG gangliá).

Počas experimentu je zabezpečený komfort zvieratá, minimálna manipulácia, kožný rez je minimálny (2 stehy), rýchle hojenie, takže zvieratá nie sú traumatizujúce. Po zákroku nie je nutné podávať analgetiká (kožný rez má 2 stehy), v prípade potreby máme na našom pracovisku k dispozícii analgetikum Butomidol (butorfanol).

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:    nie

**Príloha č. 2**  
**Netechnické zhrnutie projektu**

**Názov projektu:** *Regenerácia poškodeného tkaniva pomocou biopolymérnych kompozitov*

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 2220/14 - 22 1

**Kľúčové slová v projekte:** kĺbová chrupka, biopolymérny substrát, implantácia, regenerácia, *in vivo* testovanie, ovca

**Účel projektu:** Základný výskum

**Ciele projektu:**

Cieľom postupu je sledovanie biologickej integrácie biopolymérneho substrátu v mieste defektu kĺbovej chrupky s okolitým, nepoškodeným tkanivom chrupky. Postup je zameraný na zadefinovanie terapeutického účinku po implantácii pripraveného biopolymérneho substrátu v mieste defektu kĺbovej chrupky. Bude potrebné pripraviť také biokompatibilné materiály, ktoré budú schopné nahradiť poškodenú kĺbovú chrupku v procese jej regenerácie. Chirurgická terapia defektov kĺbovej chrupky má za úlohu obnovu poškodeného segmentu kĺbovej chrupky. Jej základným cieľom bude redukcia symptómov, zlepšenie kongruencie kĺbu rekonštrukciou kĺbového povrchu a prevencia ďalšej degenerácie kĺbovej chrupky.

**Prínos z vykonaného projektu:**

Výskum v oblasti regenerácie kĺbovej chrupky predstavuje z medicínskeho hľadiska vysoko aktuálnu problematiku. Predkladaný prínos bude spočívať v dosiahnutí nových poznatkov týkajúcich sa terapie kĺbových defektov pomocou biopolymérnych substrátov, ako aj ich biokompatibility. Očakávame regeneráciu kolenného kĺbu v mieste defektov kĺbovej chrupky s rýchlou postupnou obnovou pohyblivosti. Kombinácia zvieracieho modelu s funkčným biopolymérnym substrátom, kvalitatívnou makroskopickou zobrazovacou analýzou, histologickým a molekulovo-biologickým vyšetrením predstavuje svetový štandard v oblasti vývoja nových terapií po úraze resp. poškodení kĺbovej chrupky. Tento model vzhľadom na špecifickosť a originálnu prípravu biopolymérnych substrátov nie je celosvetovo dostupný a prinesie nové a jedinečné poznatky v procese regenerácie kĺbovej chrupky.

### **Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

V postupoch budú použité ovce (merino/zošľachtená valaška) v počte 20 ks na celú dobu riešenia projektu.

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

V priebehu projektu sa budú na zvieratách vykonávať zákroky, ktoré si vyžadujú krátkodobú anestéziu (do 20 minút) a použitie analgetík. Ovciam vo veku 1,5 - 4 roky sa navodí defekt kĺbovej chrupky v kolennom kĺbe. Ľavý kolenný kĺb bude chirurgicky sprístupnený z ľavej laterálnej strany, rez bude vedený od mediálneho patelárneho väzu distálne k tibiálnej drsnatine. Kolenný kĺb bude sprístupnený nad záťažovou plochou mediálneho kondylu stehnovej kosti. Poruší sa subkutánne väzivo a povrchová fascia. Defekty kĺbovej chrupky budú vykonané v oblasti distálnej epifýzy (1x kladka a 1x ľavý mediálny kondyl) o veľkosti v priemere 6 mm. Miesto vytvoreného defektu sa následne vyplní originálne pripraveným, novým biopolymérnym substrátom. Podajú sa analgetiká. Po celú dobu vykonávania operačného zákroku budú zvieratá monitorované a po jeho ukončení im bude poskytnutá veterinárna starostlivosť v súlade s podmienkami vedenia anestézie a starostlivosti o pacientov v pooperačnom období.

Proces regenerácie chrupky bude sledovaný počas 6 mesiacov po implantácii. Zároveň sa bude v pravidelných intervaloch analyzovať stupeň funkčného vylepšenia. Čas prežívania zvierat zaradených do postupu sa upraví v závislosti od ich aktuálneho funkčného stavu. V priebehu postupu sa zvieratám nebude spôsobovať zbytočný strach, bolesť a utrpenie. So všetkými zvieratami sa bude manipulovať, budú umiestnené a poskytne sa im starostlivosť v súlade s požiadavkami uvedenými v nariadení vlády SR č. 377/2012.

### **Predpokladaná úroveň krutosti: stredná**

### **Uplatňovanie zásad 3R**

#### **1. Nahradenie zvierat:**

S ohľadom na pripravené biopolymérne kompozity, bolo vykonané *in vitro* a *in vivo* testovanie cytotoxicity a biokompatibility pomocou chondrocytov, osteocytov, kuracieho a prepeličieho embrya, ako alternatívnych zvieracích modelov. V projekte sa však jedná o technicky nové riešenie a väčšia časť postupov by bola použitím alternatívnych metód nehodnotiteľná, pretože závisí na mnohých endogénnych aj exogénnych faktoroch. Z týchto

dôvodov nie je možné uskutočniť dané experimenty iba alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat. Ovca bola zvolená pre postup ako najmenšie hospodárske zviera, na ktorom možno vykonať chirurgickú terapiu defektov kĺbovej chrupky bez možných rizík pre zdravie zvierat'a. Zvažovalo sa použitie králika ako zvieracieho modelu, avšak zloženie, štruktúra chrupky, ako aj záťaž v oblasti kolenného kĺbu nezodpovedajú podmienkam zvieracieho modelu s ohľadom na vlastnosti humánnej kĺbovej chrupky.

## **2. Redukcia počtu zvierat:**

Postup je naplánovaný tak, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov maximalizované množstvo výstupných informácií s použitím minimálneho počtu zvierat. V postupe bude použitých 20 ks zvierat. Budú zostavené a testované 2 skupiny po 10 zvieratách, čo je minimálny počet zvierat pre štatistické vyhodnotenie a získanie štatisticky relevantných výsledkov. Zároveň musíme prihliadnuť na úspešnosť modelu, ktorá sa môže znižovať počas dlhodobého prežívania (6 mesiacov).

## **3. Zjemnenie:**

Všetky zákroky, ktoré budú na zvieratách uskutočnené, budú vykonávané pod celkovou anestézou, t.j. nebudú pre zvieratá bolestivé. Po ukončení chirurgického úkonu budú zvieratám v pravidelných intervaloch a v príslušnej dávke podávané analgetiká. Počas sledovaného obdobia budú splnené všetky štandardy na umiestnenie, chov a veterinárnu starostlivosť podľa platnej legislatívy.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno    nie