

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Predklinické testovanie nových látok určených na liečbu posttraumatickej stresovej poruchy (PTSD). 3054/14-221/3

Kľúčové slová v projekte:

Post traumatická stresová porucha (PTSD), *in vivo* elektrofyziológia, hipokampus, hypotalamus, serotonín (5-HT), noradrenalin (NE), dopamín (DA), glutamát (GLU), kyselina gama-aminomaslová (GABA), oxytocín (OXY), arginín-vazopresín (AVP), β -endorfín (BEN), neuropeptide-Y (NPY), pyrimidín, "trace amine associated receptor one" (TAAR1).

Účel projektu:

Hlavným cieľom projektu bude skúmať patofyziológiu posttraumatickej stresovej poruchy (PTSD) s využitím animálneho modelu zodpovedajúceho tejto poruche a testovať nové potenciálne účinné látky využiteľné pri liečbe PTSD.

Opísať ciele projektu:

Špecifickými cieľmi projektu budú:

- 1) Zavedenie animálneho modelu PTSD založeného na vystavení potkanov pachu predátora;
- 2) Objasnenie neuronálnych dráh aktivovaných počas PTSD, pričom sa budeme zameriavať na 5-HT, NE, DA, GLU, GABA, OXY, AVP, BEN, a NPY neuróny;
- 3) Zisťovanie mechanizmu účinku a efektivity derivátov pyrimidínu a agonistov TAAR1 pri liečbe PTSD.

V našom laboratóriu zavedieme animálny model PTSD, založený na vystavení potkanov laboratórnych pachu predátora (piesok obsahujúci mačací moč). Kontrolným aj stresovaným potkanom budeme aplikovať fyziologický roztok, deriváty pyrimidínu, alebo agonistov TAAR1. Následne budeme pomocou behaviorálnych testov zisťovať úroveň stresu, anxiety alebo depresiu pripomínajúce správanie a *in vivo* elektrofyziológické testy použijeme na skúmanie excitability 5-HT, NE, DA, GLU, GABA, OXY, AVP, BEN, a NPY neurónov u kontrolných aj stresovaných skupín zvierat.

Prínos z vykonaného projektu:

Posttraumatická stresová porucha, pod ktorú spadá niekoľko ochorení mozgu vyvíjajúcich sa po smrteľnom ohrození jedinca, po vážnom zranení alebo po akte sexuálneho násillia, ktoré jedinec zažil, alebo ktorých sa zúčastnil ako svedok je charakterizovaná pretrvávajúcím prežívaním traumatických udalostí. Táto porucha je častá u vojenských veteránov, utečencov z oblastí postihnutých vojenským konfliktom, u obetí a svedkov fyzického a sexuálneho násillia, a taktiež u ľudí, ktorí prežili teroristické útoky alebo environmentálne katastrofy.

Posttraumatická stresová porucha závažne ovplyvňuje rodinný a sociálny život postihnutých a môže viesť ku komorbidným somatickým (kardiologickým, autoimunitným či onkologickým) poruchám, ktoré sú často sprevádzajú PTSD, alebo až ku samovražde [1]. Avšak patofyziológia samotnej PTSD doposiaľ nebola objasnená. Existujúce liečivá používané u tohto ochorenia (antidepresíva, atypické antipsychotiká, sedatíva alebo stabilizátory nálady) pomáhajú skôr pri liečbe depresie a anxiety pridružených k PTSD, než PTSD samotnú. Keďže žiadna doposiaľ používaná liečba nepreukázala schopnosť liečby samotnej PTSD, predkladaný projekt bude mať významný prínos k pochopeniu patofyziológie PTSD a možnosti jej priamej liečby.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórny potkan – *Rattus norvegicus*, dospelé samce (480 ks počas štyroch rokov alebo 120 ks ročne), Wistar, Dobrá Voda, SR a/alebo Sprague-Dawley, Velaz s.r.o., Únětice, ČR.

Na test FST bude použitých 120 a na iný behaviorálny testy a *in vivo* elektrofyzilogické experimenty bude použitých 360 zvierat, tak ako popisuje tabuľka 1a 2. Celkový počet zvierat bude 480. Aby sme znížili počet zvierat všetky behaviorálne testy (OFL, EPM a FST) budú robené na tých istých zvieratách. Akútny účinok látok pri elektrofyzilogických experimentoch bude sledovaný na zvieratách, ktorým bol predtým podaný fyziologický roztok

Príchod zvierat Deň 1, n=120											
Karanténa Deň 1-7, n=120											
Stresované zvieratá Vystavenie zvierat piesku s mačacím močom, 10 min denne, deň 9-17, n=60						Kontrolné zvieratá Vystavenie zvierat čistému piesku, 10 min denne, deň 9-17, n=60					
Podávanie látok Deň 18-31, n=60						Podávanie látok Deň 18-31, n=60					
Fyziologický roztok n=10	RO5256390 n=10	RO526339 n=10	EFT104 n=10	EFT143 n=10	EFT144 n=10	Fyziologický roztok n=10	RO5256390 n=10	RO526339 n=10	EFT104 n=10	EFT143 n=10	EFT144 n=10
FST test Deň 32-33 n=10	FST test Deň 32-33 n=10	FST test Deň 38-39 n=10	FST test Deň 38-39 n=10	FST test Deň 38-39 n=10	FST test Deň 38-39 n=10	FST test Deň 38-39 n=10	FST test Deň 38-39 n=10	FST test Deň 38-39 n=10	FST test Deň 38-39 n=10	FST test Deň 38-39 n=10	FST test Deň 38-39 n=10
Eutanázia Deň 34 n=10	Eutanázia Deň 40 n=10	Eutanázia Deň 40 n=10	Eutanázia Deň 40 n=10	Eutanázia Deň 40 n=10	Eutanázia Deň 40 n=10	Eutanázia Deň 40 n=10	Eutanázia Deň 40 n=10	Eutanázia Deň 40 n=10	Eutanázia Deň 40 n=10	Eutanázia Deň 40 n=10	Eutanázia Deň 40 n=10

Tabuľka 1: Návrh testu FST

Príchod zvierat Deň 1, n=360											
Karanténa Deň 1-7, n=360											
Stresované zvieratá Vystavenie zvierat piesku s mačacím močom, 10 min denne, deň 9-17, n=180						Kontrolné zvieratá Vystavenie zvierat čistému piesku, 10 min denne, deň 9-17, n=180					
Podávanie látok Deň 18-31, n=180						Podávanie látok Deň 18-31, n=180					
Fyziologický roztok n=30	ROS256390 n=30	ROS26339 n=30	EFT104 n=30	EFT143 n=30	EFT144 n=30	Fyziologický roztok n=30	ROS256390 n=30	ROS26339 n=30	EFT104 n=30	EFT143 n=30	EFT144 n=30
EPM test Deň 32, n=30	EPM test Deň 32, n=30	EPM test Deň 32, n=30	EPM test Deň 32, n=30	EPM test Deň 32, n=30	EPM test Deň 32, n=30	EPM test Deň 32, n=30	EPM test Deň 32, n=30	EPM test Deň 32, n=30	EPM test Deň 32, n=30	EPM test Deň 32, n=30	EPM test Deň 32, n=30
OFL test Deň 33, n=30	OFL test Deň 33, n=30	OFL test Deň 33, n=30	OFL test Deň 33, n=30	OFL test Deň 33, n=30	OFL test Deň 33, n=30	OFL test Deň 33, n=30	OFL test Deň 33, n=30	OFL test Deň 33, n=30	OFL test Deň 33, n=30	OFL test Deň 33, n=30	OFL test Deň 33, n=30
E.Phys. Deň 34 5-HT neuróny: n=5 NE neuróny: n=5 DA neuróny: n=5 GLU/GA BA neuróny: n=5 OXY/AVP neuróny: n=5 BEN/NPY neuróny: n=5 Spolu: n=30	E.Phys. Deň 34 5-HT neuróny: n=5 NE neuróny: n=5 DA neuróny: n=5 GLU/GA BA neuróny: n=5 OXY/AVP neuróny: n=5 BEN/NPY neuróny: n=5 Spolu: n=30	E.Phys. Deň 34 5-HT neuróny: n=5 NE neuróny: n=5 DA neuróny: n=5 GLU/GA BA neuróny: n=5 OXY/AVP neuróny: n=5 BEN/NPY neuróny: n=5 Spolu: n=30	E.Phys. Deň 34 5-HT neuróny: n=5 NE neuróny: n=5 DA neuróny: n=5 GLU/GA BA neuróny: n=5 OXY/AVP neuróny: n=5 BEN/NPY neuróny: n=5 Spolu: n=30	E.Phys. Deň 34 5-HT neuróny: n=5 NE neuróny: n=5 DA neuróny: n=5 GLU/GA BA neuróny: n=5 OXY/AVP neuróny: n=5 BEN/NPY neuróny: n=5 Spolu: n=30	E.Phys. Deň 34 5-HT neuróny: n=5 NE neuróny: n=5 DA neuróny: n=5 GLU/GA BA neuróny: n=5 OXY/AVP neuróny: n=5 BEN/NPY neuróny: n=5 Spolu: n=30	E.Phys. Deň 34 5-HT neuróny: n=5 NE neuróny: n=5 DA neuróny: n=5 GLU/GA BA neuróny: n=5 OXY/AVP neuróny: n=5 BEN/NPY neuróny: n=5 Spolu: n=30	E.Phys. Deň 34 5-HT neuróny: n=5 NE neuróny: n=5 DA neuróny: n=5 GLU/GA BA neuróny: n=5 OXY/AVP neuróny: n=5 BEN/NPY neuróny: n=5 Spolu: n=30	E.Phys. Deň 34 5-HT neuróny: n=5 NE neuróny: n=5 DA neuróny: n=5 GLU/GA BA neuróny: n=5 OXY/AVP neuróny: n=5 BEN/NPY neuróny: n=5 Spolu: n=30	E.Phys. Deň 34 5-HT neuróny: n=5 NE neuróny: n=5 DA neuróny: n=5 GLU/GA BA neuróny: n=5 OXY/AVP neuróny: n=5 BEN/NPY neuróny: n=5 Spolu: n=30	E.Phys. Deň 34 5-HT neuróny: n=5 NE neuróny: n=5 DA neuróny: n=5 GLU/GA BA neuróny: n=5 OXY/AVP neuróny: n=5 BEN/NPY neuróny: n=5 Spolu: n=30	E.Phys. Deň 34 5-HT neuróny: n=5 NE neuróny: n=5 DA neuróny: n=5 GLU/GA BA neuróny: n=5 OXY/AVP neuróny: n=5 BEN/NPY neuróny: n=5 Spolu: n=30

Tabuľka2: Návrh testov EPM, OFL, a elektrofyziologických (E.Phys.) experimentov.

2

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

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

Posttraumatická stresová porucha bude u potkanov navodzovaná pomocou pachu predátora (piesok obsahujúci mačací moč). Vzorky mačacieho moču budú získané od dvoch domestikovaných mačiek. Mačky nemajú prístup k iným zvieratám, sú zdravé, očkované a pod pravidelnou veterinárnou starostlivosťou. Očkovacie preukazy oboch mačiek sú priložené v prílohe predkladanej žiadosti. Pred samotným odberom moču budú zvieratá podrobené kontrole realizovanej veterinárnym lekárom. Experimentálne potkany budú umiestnené do klietok obsahujúcich piesok znečistený mačacím močom po dobu desiatich minút počas desiatich za sebou nasledujúcich dní. Tento proces spôsobí emočný diskomfort zvierat, ale nie fyzické utrpenie. Avšak zvieratá vystavené tomuto typu stresu budú dôsledne sledované. Ak bude zaznamenaný významný pokles váhy, pokles príjmu vody a potravy, alebo bude zaznamenané nadmerné agresívne správanie zvierat, experiment bude prerušený a zvieratá budú humánne usmrtené.

Pyrimidínové deriváty a agonisti TAAR1 budú počas subchronických a chronických experimentov podávané subkutánne. Tento spôsob podávania spôsobuje potkanom len mierny diskomfort. Deriváty pyrimidínu aj agonisti TAAR1 už boli potkanom podávané

v predchádzajúcich experimentoch ,počas ktorých nebol zaznamenaný žiadny negatívny účinok týchto látok na welfare zvierat. Avšak zvieratá vystavené týmto látkam budú dôsledne sledované. Ak bude zaznamenaný významný pokles váhy, pokles príjmu vody a potravy, alebo bude zaznamenané nadmerné agresívne správanie zvierat experiment, bude prerušený a zvieratá budú humánne usmrtené.

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 s predchádzajúcou anestéziou.

Pred *in vivo* elektrofyzilogickým meraním budú zvieratá podrobené celkovej anestézii.

Po ukončení elektrofyzilogického alebo behaviorálneho experimentu, budú humánne usmrtené podaním nadmerného množstva anestetika.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Všetky manipulácie so zvieratami a očakávaná miera krutosti je popísaná v tabuľke 3:

Manipulácia	Úroveň krutosti
Handlovanie potkanov	Slabá
Váženie potkanov	Slabá
Expozícia zvierat na čistom piesku po dobu 10min	Slabá
Expozícia zvierat na piesku obsahujúcom mačací moč po dobu 10 min	Stredná
Subkutánna injekcia fyziologického roztoku	Stredná
Subkutánna injekcia testovanej látky	Stredná
Test vyvýšeného bludiska	Slabá
Test otvoreného poľa	Slabá
Test núteného plávania	Stredná
Intraperitoneálna aplikácia anestetika	Stredná
Elektrofyzilogické merania	Bez možnosti oživenia

Celková krutosť projektu označená ako krutá.

Uplatňovanie zásad 3R

1. **Nahradenie zvierat:** v projekte budú sledované účinky stresu, derivátov pyrimidínu a ligandov TAAR1 receptorov na excitabilitu 5-HT, NE, DA, GLU, GABA, OXY. AVP, BEN, a NPY 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. Na zníženie diskomfortu zvierat, ktoré budú exponované na čistom piesku, piesku obsahujúcom mačací moč alebo zvieratám, ktorým budú podávané testované látky a fyziologický roztok, a ktoré podstúpia behaviorálne testy budú slúžiť obohatené domáce kliecky. Obohatenie bude spočívať v umiestnení plastových rúrok a domčekov do domácich klieck. Zvieratá, ktoré podstúpia behaviorálne testy alebo budú exponované na piesku budú čo najskôr umiestnené naspäť do domácich klieck. Zvieratá, ktoré podstúpia test núteného plávania budú čo najskôr dôkladne osušené uterákom a infračervenou lampou špeciálne adaptovanou na tento účel. 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, 3 mesiace od ukončenia projektu

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

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

Názov projektu: CHARAKTERIZÁCIA ANXIOLYTICKÝCH A ANTIDEPRESÍVNYCH VLASTNOSTÍ PYRIDOINDOLOVÝCH DERIVÁTOV

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4248/15-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): pyridoindoly, potkan, antidepresíva, anxiolytiká, správanie

Účel projektu*: Základný výskum, (translačný)

Vedecké ciele

Cieľom projektu bude zistiť mieru anxiolytických a antidepresívnych účinkov derivátov pyridoindolu stobadínu. Potenciál týchto derivátov budeme hodnotiť neinvazívnymi metódami etologickej analýzy v testoch prispôbených na zisťovanie miery motorickej aktivity, emocionality a úzkosti v kombinácii s biochemickou detekciou hladín biogénnych amínov pomocou HPLC-ED vo vybraných štruktúrach mozgu. Keďže stobadín je derivát neuroleptika Karbidínu, predpokladáme výrazné anxiolytické, respektíve antidepresívne vlastnosti týchto derivátov.

Stručný stav problematiky

Podľa WHO na svete trpí duševnými poruchami viac ako 450 miliónov ľudí a len napríklad s depresiou je viac ako 350 miliónov ľudí všetkých vekových kategórií. Práve depresia je najrozšírenejším duševným ochorením a hlavnou príčinou invalidity vo svete. Medzi ďalšie najčastejšie mentálne poruchy v EU patria úzkostné ochorenia. Depresia je charakterizovaná smútkom, stratou schopnosti pociťovať radosť, pocitmi viny a narušeným cyklom spánku a príjmu potravy, ako aj stratou koncentrácie. Úzkosť je definovaná ako stav neočakávaného a neprimeraného nepokoja, často spojeného s nervozitou, napätím, rozptýľovaním, podráždenosťou a poruchami spánku, ktoré spôsobujú somatické prejavy úzkosti (dýchavičnosť, potenie, nevoľnosť, zrýchlenie srdcovej činnosti a zvýšenie tlaku krvi (Sandford a spol., 2000). Podľa odhadov WHO bude v roku 2020 depresia spolu so srdcovo-cievnymi ochoreniami najčastejším ochorením a neliečená môže viesť až k samovražde. Podľa Národného centra zdravotníckych informácií patrili v roku 2012 k ochoreniam s najvyšším výskytom v psychiatrických ambulanciách na Slovensku afektívne poruchy prejavujúce sa neprimeranou dlhodobou emočnou reakciou organizmu na stres. Ďalej to boli neurotické, stresom podmienené a somatoformné poruchy.

Pred viac ako 40-timi rokmi sa benzodiazepíny (BZ) rýchlo stali najpoužívanejšími psychotropnými liečivami. Avšak v súčasnej dobe sa prístup k týmto látkam výrazne zmenil z dôvodu návykovosti, abstinenčných príznakov po vysadení a krátko- a dlhodobými vedľajšími nežiaducimi účinkami po dlhodobom užívaní (Basile a spol., 2004). Z tohto dôvodu sa výskum zameriava na hľadanie látok, ktoré by neboli chemicky príbuzné BZ so špecifickejšim terapeutickým účinkom bez sprievodných nežiaducich účinkov. U látok s pyridindolovou štruktúrou ako napr. [6-Fluoro-9-metyl-2-fenyl-4-(pyrolidin-1-ylkarbonyl)- 2,9-dihydro-1H-pyridol[3,4-b]indol-1-one] bolo dokázané, že sú agonisti GABA_{A2} receptorov a mohli by byť klinicky využité ako anxiolytiká a myorelaxanciá (Licata a kol., 2005). Pyridoindol stobadín (STO) [(-)-cis-2,8-dimetyl-2,3,4,4a,5,9b-hexahydro-1Hpyrido[4,3-b]indol] je derivát gama-

karbolínového antidepresíva a neuroleptika Karbidínu ako jeho aktívny (-)-enantiomér. Originálnymi syntetickými postupmi sa pripravila rozsiahla séria nových derivátov antioxidantu STO so zvýraznenými antiradikálovými a protektívnymi vlastnosťami, ako napríklad schopnosť inhibovať enzým aldózareduktázu, vstupovať do oxidoredukčných procesov, vychytávať voľné radikály (Štefek a kol., 2008). Pri návrhu nových molekúl sa vychádzalo z kvantovochemických výpočtov ich vlastností (Račková a kol., 2006). Popri zvýraznení ich ochranných účinkov sa podarilo u nových látok obmedziť niektoré nežiadúce účinky pôvodnej látky a znížiť akútnu toxicitu. Cielená modifikácia molekuly STO viedla nielen k zvýšeniu jeho antioxidačných vlastností, ale aj ku zvýšeniu jeho neuroprotektívnych účinkov (Štolc a kol., 2008). Dokázalo sa to pri poškodení centrálného nervového systému akútnym nedostatkom kyslíka a traumou. Podobný účinok sa zistil aj u chemicky príbuzného nového antioxidantu 2,3- dihydromelatonínu (Gáspárová a kol., 2006). Jedným z nových derivátov, substituovaný metoxy-skupinou na aromatickom jadre a etoxykarbonyl-skupinou v polohe gama na pyrimidínovom dusíku, 2-etoxykarbonyl-8- metoxy-2,3,4,4a,5,9b-hexahydro-1H- pyrido-[4,3b] indolinium chlorid (SMe1EC2). Doterajšie výsledky poukazujú na jeho účinné antioxidačné a neuroprotektívne vlastnosti (Štolc a kol., 2008). Nové pyridoindolové deriváty možno pokladať za alternatívne farmaká na prevenciu a liečbu ochorení spojených s prítomnosťou oxidačného stresu. K ich antioxidačným vlastnostiam sa pridružuje aj ich možný anxiolytický resp. antidepresívny účinok. Predbežné experimenty poukazujú na anxiolytickú aktivitu SMe1EC2 v teste vyvýšeného bludiska v tvare plus, ako aj v diskriminačnom teste light/dark boxu (Mach a kol., 2009). Ak zoberieme do úvahy nízku toxicitu týchto látok (LD₅₀ u väčšiny je viac ako 2500 mg/kg) (Štolc a kol., 2008) a vynikajúce antioxidačné vlastnosti, tieto deriváty by mohli byť vhodnými kandidátmi na podrobné preskúmanie.

Literatúra

- BASILE, A.S. a kol. Anxiolytic drugs: can less be more?. In *Eur J Pharmacol*, 2004, vol. 500, no. 1-3, p. 441-51.
- GÁSPÁROVÁ, Z. a kol. In vitro physiological evidence of enhanced neuroprotective and antioxidant action of 2,3-dihydromelatonin: a melatonin analogue. In *Pharmacol Res*, 2006, vol. 53, no. 1, p. 22-27.
- LICATA, S.C. a kol. Contribution of GABAA receptor subtypes to the anxiolytic-like, motor, and discriminative stimulus effects of benzodiazepines: studies with the functionally selective ligand SL651498 [6-fluoro-9-methyl-2-phenyl-4-(pyrrolidin-1-ylcarbonyl)- 2,9-dihydro-1H-pyridol[3,4-b]indol-1-one]. In *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, vol. 313, no. 3, p. 1118-1125.
- MACH, M. a kol. Behaviorálne hodnotenie anxiolytických vlastností pyridoindolového derivátu SMe1EC2. In *Aktuality súčasného biomedicínskeho výskumu IV*. Bratislava : Asklepios, 2009. ISBN 978-80-7167-148-0, s. 54-58.
- RAČKOVÁ, L. a kol. Free radical scavenging and antioxidant activities of substituted hexahydropyridoindoles. Quantitative structure-activity relationships. In *J Med Chem*, 2006, vol. 49, no. 8, p. 2543-2548.
- SANFORD, J.J. a kol. The psychobiology of anxiolytic drugs Part 1: basic neurobiology. In *Pharmacol Ther*, 2000, vol. 88, no. 3, p. 197-212.
- ŠTEFEK, M. a kol. Carboxymethylated pyridoindole antioxidants as aldose reductase inhibitors: Synthesis, activity, partitioning, and molecular modeling. In *Bioorg Med Chem*, 2008, vol. 16, no. 9, p. 4908-4920.
- ŠTOLC, S. a kol. New pyridoindoles with antioxidant and neuroprotective actions. In *Bauer, V. Trends in pharmacological research*. Bratislava : Institute of Experimental Pharmacology, 2008. ISBN 978-80-970003-7-0, s. 118-136.

Predpokladaný prínos

Zistenie anxiolytických resp. antidepresívnych vlastností nových pyridoindolových derivátov stobadínu, ktoré vychádzajú z molekuly neuroleptika Karbidínu by mohol prispieť k rozšíreniu poznatkov o ich využití v psychofarmakológii a tak pomôcť v liečbe a prevencii úzkostných a depresívnych stavov, ktoré sú závažným problémom súčasnej populácie. Keďže tieto deriváty majú osobitné antioxidačné vlastnosti a nízku toxicitu, v prípade výrazných

anxiolytických/antidepresívnych vlastností by bolo využitie v praxi ako náhrada benzodiazepínov v liečbe a prevencii úzkostných stavov veľmi dôležité.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

potkan kmeň Wistar/DV, predbežne 840/5 rokov

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

Uvedené behaviorálne testy u potkanov sú štandardné testy podľa Current Protocols In Neuroscience: Behavioral Neuroscience, Supplement 28, Jonh Wiley & Sons, Inc. 2004, sú neinvazívne, vychádzajú z hodnotenia ich spontánneho správania a za žiadnych okolností nespôsobujú zvieratú bolesť ani utrpenie. Nepredpokladáme nepriaznivé účinky testovaných látok v nami stanovených dávkach.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Slabé – všetky typy použitých postupov zaradíme podľa prílohy č.4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z.

Použitý postup v rámci modelu chronického nepredvídateľného stresu	Oddiel III – Klasifikácia krutosti postupov
Predátorský stres	Stredné
Nútené plávanie	Stredné
Nadpočet zvierat vo vanici	Slabé
Mokrú podstielku	Slabé
Odobratie potravy	Slabé
„Air puff“ stres	Slabé

V rámci chronického nepredvídateľného stresu ani jeden stresor samotný neprekračuje úroveň slabšej krutosti podľa prílohy č.4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z. Avšak z dôvodu opakovania môže byť diskomfort a welfér zvierat zhoršený, čo je aj účelom postupu. Preto sme sa na základe konzultácie rozhodli preklasifikovať úroveň krutosti ChNS na slabá/stredná.

Použitý postup/experiment	Oddiel III – Klasifikácia krutosti postupov
i.p. aplikácia skúmaných látok	Slabé
Modifikovaný Irwinov test	Slabé
vyvýšené budisko v tvare plus	Slabé
explorácia v tmavom/svetlom prostredí	Slabé
exploračné správanie v otvorenom poli	Slabé
test vynúteného plávania (Porsoltov test)	Stredné
Morrisovo vodné bludisko	Slabé
Učenie aktívnym vyhýbaním	Stredné
Hypertermia spôsobená stresom (HSS)	Slabé
Humánne utratenie	bez možnosti zotavenia

Uplatňovanie zásad 3R

Replacement (nahraditeľnosť zvierat)

Postup nie je možné vykonať bez použitia animálnych modelov zvierat na štúdium potenciálnych anxiolytických a antidepresívnych vlastností nami vybraných derivátov, ktoré boli navrhnuté *in silico* pomocou programu DRAGON na základe deskriptorov „drug-likeness“. Pokus nie je možné realizovať v podmienkach *in vitro*, je potrebné ho uskutočniť *in vivo*. Rovnako nie je možné pokus vykonať na systematicky nižšom druhu živočíchov. Pri tomto plánovanom postupe neexistujú alternatívne metódy.

Reduction (znižovanie počtu zvierat)

Reprodukovateľné výsledky je možné získať len pri spracovaní dostatočného počtu zvierat. Počet zvierat je zredukovaný na najnižší možný počet v jednotlivých skupinách, potrebný na validáciu a reprodukciu výsledkov a štatistické hodnotenie (10 na skupinu). K ovplyvneným zvieratám je nutné priradiť aj kontrolnú skupinu zvierat ako aj pozitívnu kontrolnú skupinu, takže celkový počet použitých zvierat bude 840 ks v priebehu celého trvania projektu. Ďalšie znižovanie počtu zvierat v postupe je spojené s rizikom falošne negatívnych alebo falošne pozitívnych výsledkov, ktoré by potenciálne viedli k neopodstatneným postupom na ďalších zvieratách.

Refinement (zjemnenie pokusu)

S cieľom minimalizovať stres u zvierat, budú pri experimente prítomné len osoby nevyhnutné na vykonanie samotného pokusu, ktoré budú k zvieratám pristupovať veľmi šetrne. Počas celého priebehu experimentu bude o zvieratá náležite postarané, budú ošetrované odbornými pracovníkmi zverinca a pravidelne kontrolované vedúcim experimentu. Zdravotný stav zvierat bude denne monitorovaný. Zvieratá budú pri použitých testoch minimálne vystavené stresu a bolesti. Po ukončení experimentu a humánnom usmrtení zvierat sa už ďalej bude pracovať len s tkanivom.

Spätné posúdenie: nie

Netechnické zhrnutie projektu podľa §40 nariadenia vlády SR č. 377/2012Z.z. 3107/14-221

Názov projektu: Príprava modelovej subcelulárnej vakcíny z manooligomérnych štruktúr kvasinky *Candida albicans*

Kľúčové slová: manooligoméry *Candida albicans*, glykokonjugáty, humorálna a bunková imunita, prežívanie myši

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom projektu je príprava manooligosacharid-proteínových konjugátov, ktoré budú indukovať imunitný systém myši k tvorbe žiaduceho množstva protektívnych anti-manánových protilátok, a tak ich ochrániť pred infekciou patogénom *C. albicans*. Na posúdenie ochranného účinku testovaných glykokonjugátov budú imunizované myši podrobené experimentálnej infekcii letálnou dávkou *C. albicans*. Vplyv infekcie na správanie a zdravotný stav myši sa bude sledovať prostredníctvom ich prežívania, ako aj diseminácie patogénu *C. albicans* do vnútorných orgánov (slezina, obličky, pečeň). U vybraného manooligomérneho glykokonjugátu, ktorý bude mať najlepšie antifungálne vlastnosti, sa budú posudzovať jeho imunomodulačné vlastnosti z hľadiska humorálnej odpovede organizmu v krvných vzorkách zvierat (IgG, IgM, cytokíny). V tomto projekte sa po prvýkrát použijú manooligoméry, pripravené z natívneho manánu, ktorý sa nachádza na povrchu bunkovej steny patogénu *C. albicans*.

Čiastkové ciele:

1. Imunizácia jednotlivých skupín myši: a) glykokonjugátmi, v ktorých sú manooligomérne antigény; b) glykokonjugátmi, v ktorých sú sacharidovými antigénmi polymérne manány dvoch sérotypov *C. albicans*; c) samotnými manooligomérmi ako aj samotnými manánmi; d) manooligoméry-BSA; e) Hwp-peptidom a BSA; f) kontrolná skupina (schémy 1 a 2).

2. V 1. etape sa myši budú imunizovať subkutánne tromi dávkami testovaných látok, s odstupom troch týždňov, v tejto etape imunizácie sa nebude myšiam odoberať krv.

Po uplynutí 28 dní od poslednej imunizácie sa myši infikujú letálnou dávkou *C. albicans* do laterálnej chvostovej žily, bude sa sledovať ich zdravotný stav a prežívanie. Myši, ktoré budú javiť známky nepohody v dôsledku vyvolanej kandidózy, sa nenechajú prežívať až po uhynutie v dôsledku infekcie, ale budú usmrtené dislokáciou krčných stavcov. Kritériá pre usmrtenie myši budú nasledovné: a) strata 20-25% telesnej hmotnosti -kontrolu zabezpečíme pravidelným prevažovaním zvierat; b) Body condition score (BSC): 2 a menej v spojení s úbytkom hmotnosti, inapetenciou a pod. (inapetencia - úplná anorexia 24 hodín a viac (u malých hlodavcov), čiastočná anorexia (menej ako 50% kalorického príjmu) po dobu 3 dní (u malých hlodavcov); c) slabosť/ neschopnosť získať vodu a potravu - neschopnosť alebo extrémna neochota vstať po dobu 24 hodín a viac; d) infekcia - môže postihnúť rôzne orgánové systémy (prítomnosť výtokov, začervenanie, opuchov, neprirodzeného zápachu, bolesti, zvýšenej telesnej teploty alebo hodnôt WBC). Príznaky ťažkej orgánovej dysfunkcie: RS: dyspnea, cyanóza, CVS: strata krvi, anémia (hodnoty hematokritu pod 20%), GIT: ťažké zvracanie alebo hnačka, obštrukcia GIT, intususcepcia, peritonitída (prejavujú sa ako ťažké abdomenalgie), eviscerácia, UGS: renálne zlyhanie (prejavuje sa zvýšenými hodnotami BUN, kreatinínu), uroperitoneum, NS: depresia CNS, záchvaty, paralýzy, parézy.

Pred usmrtením sa myšiam odoberie krv z infraorbitálneho plexu. V priebehu infekcie sa aktuálne určí časová os, podľa ktorej sa budú myši utracať. Z usmrtených myši budú odobraté

orgány (slezina, obličky, pečeň), v ktorých sa bude sledovať rozsah diseminácie *C. albicans*.

3. V 2. etape sa myši budú imunizovať vybraným konjugátom, ktorý sa vyberie podľa výsledkov z 1. etapy, rozhodujúcim kritériom bude najdlhšie prežívanie, a malá alebo žiadna diseminácia *C. albicans* do orgánov. Postup sa ukončí po 90 dňoch od podania letálnej dávky *C. albicans*. Môže to byť aj v skorších termínoch, aktuálne stanovených podľa priebehu infekcie. Myši budú usmrtené dislokáciou krčných stavcov.
4. Ochranný účinok najlepšieho glykokonjugátu s charakterizovanými fyzikálno-chemickými vlastnosťami sa bude sledovať prežívaním imunizovaných myši, ktoré budú podrobené experimentálnej infekcii patogénom *C. albicans*, ako aj jeho disemináciou do orgánov (mikrobiologicky stanovením počtu kolónií, CFU). V tejto etape sa bude myšiam priebežne pri každej imunizácii odoberať krv z infraorbitálneho plexu, ktorá sa použije na stanovenie imunomodulačných vlastností testovaných glykokonjugátov - kvantifikáciou hladín indukovaných špecifických anti-manánových protilátok (IgG a IgM) metódou ELISA, a na určenie polarizácie pro-Th1, pro-Th2 a pro-Th17 odpovede na základe produkcie cytokínov (ELISA).

Schémy postupu

V priebehu plánovaného postupu budú myšiam aplikované glykokonjugáty, pripravené z dvoch polymérnych manánov *C. albicans* (sérotyp A a B), a z troch rozdielnych manooligomérov. Tieto antigény budú konjugované na HWP peptid a BSA nosič podľa nasledovnej schémy 1:

Schéma 1: január 2018 - jún 2018

Názov skupiny	Počet skupín	Počet myši
1. Kontrola bez aplikácie antigénu - Placebo	2 skupiny	15 myši
2. Trimér sér. A	2 skupiny	15 myši 1) 1. imunizácia 2) 2. imunizácia 3) 3. imunizácia 4) infikovanie myši 5) po usmrtení myši odoberanie orgánov
3. Trimér sér. A-peptid-BSA	2 skupiny	15 myši
4. Trimér sér. A-peptid	2 skupiny	15 myši
5. Trimér sér. A - BSA	2 skupiny	15 myši
6. Hexamér sér. A	2 skupiny	15 myši
7. Hexamér sér. A-peptid-BSA	2 skupiny	15 myši
8. Hexamér sér. A-peptid	2 skupiny	15 myši
9. Hexamér sér. A-BSA	2 skupiny	15 myši
10. Hexamér sér. B	2 skupiny	15 myši
11. Hexamér sér. B-peptid-BSA	2 skupiny	15 myši
12. Hexamér sér. B-peptid	2 skupiny	15 myši
13. Hexamér sér. B-BSA	2 skupiny	15 myši
14. Manán sér. A-peptid-BSA	2 skupiny	15 myši
15. Manán sér. B -peptid-BSA	2 skupiny	15 myši
16. BSA-peptid	2 skupiny	15 myši
17. Manán sér. A	2 skupiny	15 myši
18. Manán sér. B	2 skupiny	15 myši
Spolu:		270 myši

Predpokladáme, že myši v kontrolných skupinách budú prežívať kratšie v porovnaní s myšami, imunizovanými testovanými konjugátmi. Jednotlivé myši nenecháme prežívať až po uhynutie v dôsledku infekcie, ale utratíme ich skôr, aby sme predišli zbytočnému utrpeniu zvierat v dôsledku vyvolanej kandidózy (indikácia pre usmrtenie - v odstavci Čiastkové ciele 2). Myši sa usmrtia dislokáciou krčných stavcov, a následne im budú odobraté orgány (slezina, obličky, pečeň) na sledovanie diseminácie *C. albicans*. V prípade dlhšie prežívajúcich myší sa aktuálne určí časová os, podľa ktorej sa budú myši utracať.

V 2. etape sa z vybraného manooligoméru, ktorý vykazoval najlepší ochranný účinok voči *C. albicans*, pripravia látky, ktoré sa budú podávať podľa schémy 2:

Schéma 2: september 2018 – december 2019

Názov skupiny	Počet skupín	Počet myší
1. Kontrola bez aplikácie antigénu-Placebo	2 skupiny	15 myší
2. Manooligomér	5 skupín	50 myší
3. Manooligomér-peptid-BSA	5 skupín	50 myší
4. Manooligomér-peptid	5 skupín	50 myší
5. Manooligomér - BSA	5 skupín	50 myší
	Spolu:	215 myší

V 2. etape sa myši budú imunizovať vybraným konjugátom, obsahujúcim manooligomér rovnako ako v 1. etape. Glykokonjugát sa vyberie podľa výsledkov z 1. etapy, rozhodujúcim kritériom bude najdlhšie prežívanie, a malá alebo žiadna diseminácia *C. albicans* do orgánov. Glykokonjugát sa bude podávať myšiam subkutánne v troch dávkach, pred každou imunizáciou sa bude jednej skupine myší odoberať krv z infraorbitálneho plexu, po 28 dňoch sa infikujú letálnou dávkou *C. albicans* a bude sa sledovať prežívanie (viď čiastkové ciele, body 4,5).

Pred infikovaním sa odváži každá skupina myší, a po infikovaní sa budú skupiny prevažovať v pravidelných intervaloch (sledovanie hmotnosti celej skupiny, vyjadríme ju ako priemernú hodnotu na skupinu). Okrem váženia sa bude sledovať vzájomné správanie myší a ich celková kondícia.

Predpokladáme, že myši v kontrolných skupinách budú prežívať kratšie v porovnaní s

myšami, imunizovanými konjugátmi. Jednotlivé myši nenecháme prežívať až po uhynutie v dôsledku infekcie, ale utratíme ich skôr, aby sme predišli zbytočnému utrpeniu zvierat v dôsledku vyvolanej kandidózy (indikácia pre usmrtenie - v odstavci Čiastkové ciele 2). Pred utratením sa myšiam odoberie krv z infraorbitálneho plexu. Po odobratí krvi sa myši usmrtnia dislokáciou krčných stavcov, a následne im budú odobraté orgány (slezina, obličky, pečeň) na sledovanie diseminácie *C. albicans*.

V prípade dlhšie prežívajúcich myší sa aktuálne určí časová os, podľa ktorej sa budú myši utrácať.

Predpokladaný prínos projektu:

Predkladaný projekt je orientovaný na oblasť ľudského zdravia, konkrétne na profylaxiu organizmu proti fungálnej infekcii, ako aj na terapiu už infikovaného organizmu. V súčasnosti sa v lekárskej praxi na liečbu kandidóz bežne používajú antifungálne liečivá, najmä zo skupiny echinokandínov, azolových a polyénových derivátov. Napriek dostupnosti širokého spektra antifungálnych liečiv je ich účinnosť stále nedostatočná, majú nežiaduce vedľajšie účinky a ich častým používaním dochádza v organizme k rozvoju rezistencie a často k rekurentným infekciám. Pre organizmus imonokompromitovaných a imonodeficientných jedincov predstavujú často vysoké dávky liečiv nežiaducu záťaž. Ideálnym riešením tohto problému by bola univerzálna antifungálna vakcína. Táto by bránila vstupu alebo množeniu cieľového patogéna a zároveň by nemala nepriaznivý účinok na organizmus. V prípade imunodeficientných jedincov prichádza do úvahy tzv. pasívna imunizácia, pri ktorej sa do organizmu vnesú špecifické protilátky alebo imunokompetentné bunky, vytvorené v inom jedincovi. Pasívne získaná imunita by mohla byť priaznivou formou imunoterapie, ktorá zabezpečí jedincovi s oslabeným imunitným systémom priamu, aj keď iba dočasnú ochranu. Naopak, jedinci imunokompetentní, ale náchylní ku kandidóze, by sa mohli stať cieľovou skupinou pre aktívnu imunizáciu, pri ktorej by sa navodila imunitná odpoveď s dlhodobým ochranným účinkom podaním vhodnej vakcínovej formulácie. Ak výsledky predkladaného projektu potvrdia, že glykokonjugát s natívnym definovaným manooligomérom ako sacharidovým antigénom bude v organizme myší indukovať dostatočnú produkciu protektívnych protilátok s kandidacidnými vlastnosťami, ktoré ochránia myši pred infekciou *C. albicans*, mohli by tieto poznatky významnou mierou ovplyvniť smerovanie vývoja subcelulárnej antifungálnej vakcíny pre humánne použitie.

Druh použitých zvierat a ich predbežný počet:

Druh: laboratórne myši, 6-8 týždňové samice, hmotnosť v čase začiatku experimentu 20-25 g

Kmeň: Balb/c

Dodávateľ: Chovné a dodávateľské zariadenie Velaz s.r.o., Praha, ČR.

Plánovaný počet myší: 485 kusov

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

V rámci vykonávania projektu budú myši podrobené viacerým výkonom:

1. opakované podávanie testovaných látok subkutánne v oblasti chrbta: v pilotnom postupe nejavili myši žiadne nepriaznivé účinky na podávanie testovaných glykokonjugátov;
2. odber krvi z infraorbitálneho plexu: odkrvenie myší navodí stav nezlučiteľný so životom, preto budú myši po odbere okamžite usmrtené dislokáciou krčných stavcov;
3. intravenózna aplikácia letálnej dávky *C. albicans*: samotná aplikácia letálnej dávky patogénu do chvostovej vény nespôsobí myšiam dlhotrvajúci stres;
4. následný rozvoj kandidózy a prežívanie zvierat s kandidózou: v kontrolnej skupine myší dôjde k rýchlemu nástupu ochorenia, v imunizovaných zvieratách sa choroba rozvinie pomalšie. Obe skupiny myší budú vystavené utrpeniu. Na základe pilotného projektu vieme do istej miery predpokladať priebeh postupu, a teda obmedziť toto utrpenie na najmenšiu

možnú mieru. Po zvážení výsledkov pilotného projektu sme maximálny čas prežívania v kontrolnej skupine určili na 30 dní (50 % prežívanie), avšak v závislosti od zdravotnej situácie a správania myši môže byť postup ukončený skôr.

Ochranný účinok potenciálnej antifungálnej vakcíny, sledovaný *in vivo*, dáva odpoveď na viaceré otázky, súvisiace s rozvojom kandidózy, napr. vzťah medzi množstvom indukovaných anti-manánových protilátok triedy IgG a ich protektivitou, trvanie ochranného účinku testovaných konjugátov, ako aj otázky, súvisiace s konštruovaním vakcíny - vlastnosti manooligomérneho antigénu, význam peptidu a samotného BSA ako vysokomolekulového nosiča.

Predpokladaná úroveň krutosti:

POSTUP	KRUTOSŤ
opakované subkutánne podávanie testovaných látok (tri dávky v trojtýždňových intervaloch)	stredná
odber krvi z infraorbitálneho plexu pred usmrtením myši	stredná
intravenózna infekcia živou kultúrou <i>C. albicans</i> do laterálnej chvostovej žily a následné prežívanie	krutá
usmrtenie dislokáciou krčných stavcov	stredná

Navrhovaná klasifikácia krutosti postupov:

V zmysle klasifikácie krutosti postupu Oddiel I: a Oddiel II: Kritériá zaradenia do kategórií podľa zákroku a manipulácie so zvieratom v prílohe č.4 nariadenia vlády SR č. 37/2012 Z.z. Navrhujeme klasifikáciu podľa krutosti – krutá.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

V tomto projekte sa budú po prvýkrát testovať glykokonjugáty z manooligomérov, získaných z natívneho manánu *C. albicans*, prítomného v bunkovej stene patogénu. V uvedenom postupe budeme testovať schopnosť viacerých pripravených glykokonjugátov indukovať v organizme myši imunologickú odpoveď na úrovni ich ochrany pred infekciou patogénom *C. albicans*. Podľa doby trvania prežívania infikovaných imunizovaných myši v jednotlivých skupinách určíme, ktorý glykokonjugát má najlepšie predpoklady pre konštruovanie účinnej antifungálnej vakcíny, a tým bude hlavný cieľ projektu splnený. V nasledujúcich citovaných prácach (1-5) sú výsledky, týkajúce sa použitia glykokonjugátov pripravených z polymérneho manánu. V týchto prácach boli navrhnuté postupy, v ktorých sa použili zvieratá (myši, králiky, potkany). V tomto projekte sme zvolili manooligomér, ktorý má definované vlastnosti – veľkosť, zloženie, a jeho príprava je reprodukovateľná. Použitie zvierat v navrhovaných postupoch je nevyhnutné pre sledovanie prežívania infikovaných zvierat, pre monitorovanie špecifických protilátok, indukovaných testovanými látkami, taktiež pre monitorovanie diseminácie patogénu do jednotlivých orgánov. Výsledky hľadania alternatívnej metódy *in vitro* v medzinárodne uznaných databázach sú predmetom Prílohy č. 4.

Z uvedených dôvodov nie je možné realizovať postup v podmienkach *in vitro*, je potrebné uskutočniť ho *in vivo*.

Citácie

1. Han, Y., Ulrich, M. A., Cutler, J. E. *Candida albicans* Mannan Extract-Protein Conjugates Induce a Protective Immune Response against Experimental Candidiasis. *J Infect Dis*;179:1477- 84, 1999

2. Wu, X., Lipinski, T., Carrel, F. R., Bailey, J. J., Bundle, D. R. Synthesis and immunochemical studies on a *Candida albicans* cluster glycoconjugate vaccine. *Org. Biomol. Chem.*, 5, 3477-3485, 2007
3. Xin, H., Dziadek, S., Bundle, D. R., Cutler, J. E. Synthetic glycopeptide vaccines combining -mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. *PNAS* 105: 13526-13531, 2008
4. Liu, M., Machová, E., Neščáková, Z., Medovarská, I., Clemons, K.V., Martinez, M., Liu, M., Clemons, K.V., Bigos, M., Medovarska, I., Brummer, E., Stevens, D. A. Immune responses induced by heat killed *Saccharomyces cerevisiae*: A vaccine against fungal infection. *Vaccine* 29:1745-1753, 2011
5. Chen, V., Bystrický, S., Stevens, D.A. Vaccination with Mannan Protects Mice against Systemic Aspergillosis. *Med Mycology*, 50(8), 818–828, 2012

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počty myší sú upresnené v nasledujúcich etapách projektu:

1. etapa postupu: január 2018 – jún 2018

Pre uskutočnenie 1. etapy postupu (február 2018 – jún 2018) je navrhovaný počet zvierat 270 ks (schéma 1), každá látka bude testovaná na 15 myšiach. Tento počet je postačujúci, ďalšie znižovanie počtu zvierat v skupinách by bolo rizikové, jednak z hľadiska štatistického vyhodnotenia, ako aj falošne pozitívnych alebo negatívnych výsledkov. Predpokladáme, že takto získané výsledky budú priekazné a budú spĺňať kritériá, kladené na postup pre prípravu účinnej antifungálnej vakcíny.

2. etapa postupu: september 2018 – december 2019

Pre uskutočnenie 2. etapy postupu (september 2018 – december 2019) je navrhovaný počet zvierat 215 ks (schéma 2). Každá látka bude testovaná na 50 myšiach, tento počet je postačujúci jednak z hľadiska štatistického vyhodnotenia, ako aj na elimináciu falošne pozitívnych alebo negatívnych výsledkov. Zvýšený počet zvierat v tejto etape odôvodňujeme tým, že u týchto zvierat budeme odoberať krv aj v priebehu imunizácie (3 imunizácie po 8 myšiach = 24 myši), takže po samotnej imunizácii sa zníži ich počet na 26. Tento počet myší bude infikovaný *C. albicans* a podrobený ďalšiemu skúmaniu. Predpokladáme, že takto získané výsledky budú priekazné a budú spĺňať kritériá, kladené na prípravu účinnej antifungálnej vakcíny.

Tento počet, naplánovaný pre obe etapy, spĺňa požadované kritériá reprodukovateľnosti postupu z hľadiska štatistického vyhodnotenia. Na hľadanie alternatívnej metódy, ktorou by sme nahradili použitie myší, sme použili registre medzinárodne overených a uznaných metód (ECVAM, NC3Rs, AltTox, . V týchto registroch sme nenašli žiadnu alternatívnu metódu, ktorou by sme mohli nahradiť použitie myší v plánovanom postupe.

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.)

Na tento postup bola vybratá myš laboratórna Balb/c, ktorá spĺňa požiadavky na úspešný priebeh navrhnutého postupu. Myši budú pod každodenným dohľadom odborných pracovníkov, ktorí im zabezpečia požadovaný komfort počas trvania postupu. Všetky aktivity, ktoré súvisia s realizáciou postupu, sa budú vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o zvieratá. Ešte pred samotným vykonávaním postupu sa myši v priebehu dvojtyždňovej karantény adaptujú na nové prostredie a kontakt s veterinárnou lekárkou ako aj s osobami spôsobilými na tento výkon – s ošetrovateľským personálom. Myši budú traumatizované minimálne, aplikácia testovaných látok bude vykonaná subkutánne bez anestézie. Aplikácia patogénu *C. albicans* sa

uskutoční intravenózne do laterálnej chvostovej žily. V priebehu postupu budú myši usmrtené dislokáciou krčných stavcov podľa plánovaného protokolu. Zjemnenie postupu - v prípade zhoršeného zdravotného stavu v dôsledku postupujúcej kandidózy nebudú myši vystavené nadmernému utrpeniu pri čakaní na smrť, ale budú usmrtené.

4. Utrpenie verzus prínos

V plánovanom postupe nebudú myši vystavené zbytočnému utrpeniu, v prípade zhoršeného zdravotného stavu v dôsledku postupujúcej kandidózy budú myši usmrtené. Výsledky z projektu môžu významne ovplyvniť navrhnutie a následnú konštrukciu účinnej antifungálnej vakcíny, ktorá by sa v budúcnosti mohla využiť ako pre imunokompromitovaných pacientov, postihnutých kandidózou, tak aj pre pacientov s chronickou kandidózou.

Začiatok postupu je plánovaný na 5.1. 2018 a bude sa realizovať do 31.12.2019.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: ÁNO (podľa nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.)

Bratislava, 11. 8. 2017

Spätné posudzovanie: zmluva do 30.03.2020

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Vplyv inhibície O(6)- metylguanín-DNA metyltransferázy a DPP-4 na doxorubicínom indukovanú predčasnú bunkovú senescenciu aorty

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

3108/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): senescencia, oxidačný stres, benzyguanín, doxorubicín

Účel projektu: Translačný alebo aplikovaný výskum

Opísať ciele projektu:

Doxorubicín patrí medzi cytotoxické antibiotiká zo skupiny antracyklínov, ktoré sú používané pri terapii nádorových ochorení. Závažným nežiadúcim účinkom tohto liečiva je jeho toxicita na kardiovaskulárny systém, ktorá by mohla byť spôsobená vznikom predčasnej stresom vyvolanej bunkovej senescencie (SIPS). Ako ukazujú naše preliminárne dáta, doxorubicín vyvoláva SIPS na potkanoch a na bunkových kultúrach VSMCs (vascular smooth muscle cells). Naše preliminárne dáta ďalej ukázali, že BG vyvoláva SIPS *in vitro* na izolovaných VSMCs, čo bolo dokázané β -galaktozidázovou esejou. BG sa používa ako doplnková terapia pri liečbe rakoviny (napr. pankreasu), preto je nutné preskúmať efekt na SIPS *in vivo* u potkana a to samostatne ale aj v kombinácii s doxorubicínom, ktorý sám o sebe vyvoláva poškodenie KVS a táto kombinácia liečiv by mohla byť oveľa škodlivejšia pre pacienta. Vildagliptín je selektívny inhibítor dipeptidyl peptidázy-4, ktorý inhibuje rýchle odbúravanie endogénneho GLP-1 (glucagon-like peptide 1), používa sa na kontrolu glykémie u pacientov s DM 2. typu, taktiež pôsobí protektívne na KVS v rôznych modeloch ochorení KVS u pokusných zvierat. Ako vyplýva z našich preliminárnych výsledkov, vildagliptín má protektívny účinok na oxidačným stresom indukovanú predčasnú senescenciu a taktiež má pozitívny vplyv na SASP (so senescenciou asociovaný sekrečný fenotyp).

Cieľom projektu bude:

1. Pozorovať vplyv iMGMT na bunkovú senescenciu u potkana
2. vplyv iMGMT na bunkovú senescenciu v kombinácii s doxorubicínom
3. Vykonať β -galaktozidázovú esej a následné stanovenie počtu senescentných buniek na aorte
4. Izolácia a identifikácia markerov SIPS a SASP, zápalových cytokínov u potkanov
5. U potkanov budeme sledovať tlak krvi a cievne funkcie.
6. Objasniť molekulárny mechanizmus pôsobenia inhibície MGMT na SIPS.

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

Výsledky tejto práce by mohli byť užitočné pre pacientov trpiacich nádorovým ochorením, ktorým je podávaný doxorubicín, zmierniť jeho toxické nežiadúce účinky na KVS a zefektívniť terapiu.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan (*Rattus norvegicus*), druh Wistar, samce.

Počet na celú dobu trvania experimentu (5 rokov): 330

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

Vyhodnotenie celkového dyskomfortu: úbytok hmotnosti (znížený príjem potravy), zmeny v správaní (apatia), zmeny vo vzhľade (naježená sršť, nedostatočná starostlivosť o sršť).

Doxorubicín spôsobuje poškodenie KVS a obličiek u potkana, čo by sa mohlo prejavíť u niektorých jedincov výrazným úbytkom váhy. Podávanie benzyguanínu nebolo doteraz v literatúre popisované s nijakým nepohodlím, preto po podávaní benzyguanínu neočakávame prime škodlivé účinky, ktoré by boli spojené s diskomfortom zvierat. Podobná situácia je pri vildagliptíne, kde neočakávame účinky spojené s diskomfortom. Taktiež kombinácia oboch látok teda pravdepodobne nebude vyvolávať žiaden diskomfort. Pri metabolických kliebkach dochádza k sociálnej izolácii zvierat, čo je považované za nepriaznivý vplyv na zvieratá. Pri metóde tail cuff sú zvieratá fixované vo valci po dobu 10 minút, čo im spôsobuje diskomfort, ale zvieratá sú na túto metódu trénované, aby vo valci zotrvali po tú dobu a teda tým sa diskomfort výrazne redukuje.

Human endpoint:

Ak dôjde k veľkej strate hmotnosti (viac ako 10% hmotnosti) budú potkany utratené.

benzylguanín a vildagliptín: nie je nutné, keďže látky nemajú tak toxické účinky, aby si ich aplikácia vyžadovala určenie human end pointu

Doxorubicínový model je veľmi dobre charakterizovaný, čo sa týka dyskomfortu zvierat. Nie je spájaný s bolestivosťou, skôr s dyskomfortom v dôsledku poškodenia obličiek, či kardiovaskulárneho systému (KVS). Zlyhanie obličiek sa prejavuje urémiou, dôsledkom čoho zvieratá budú prijímať menej potravy a taktiež sa to prejaví na výzore a správaní zvierat. Podobne to je s poškodením KVS. Preto hodnotenie hmotnosti (zníženie príjmu potravy), správania sa (apatia), a výzoru (zvieratá sa nestarajú o srst', je naježenejšia, neupravená) je dostatočné na charakterizovanie dyskomfortu zvierat po jednorazovom podaní doxorubicínu.

Vildagliptín nemá toxické účinky, preto u zvierat nebude pozorovaný žiaden dyskomfort.

Benzylguanín (BG) nemá natoľko toxické účinky, ktoré by sa prejavili výrazným dyskomfortom – v štúdií (Lijinsky 1994) podávali p.o. BG 52 týždňov, a všetky potkany boli na konci štúdie živé a bez známok väčšieho dyskomfortu. Preto aj v tomto prípade pozorovanie hmotnosti, správania a výzoru by mali byť dostatočné na posúdenie dyskomfortu zvierat.

Keďže látky budú podávané v kombinácii a doxorubicín má zo všetkých podávaných látok najvýraznejší účinok, pozorovanie hmotnosti, správania a výzoru by malo byť dostatočným hľadiskom vyhodnotenia dyskomfortu a aj human endpointu. Keď dôjde k 10% úbytku hmotnosti, bude to považované za human endpoint a zvieratá budú utratené.

Predpokladaná úroveň krutosti:

celkové - b) stredné

čiasťkové:

výmena podstielky – slabé, váženie – slabé, aplikácia látok – slabé, metabolické klieťky – slabé, tail cuff – slabé, rozvoj poškodenia po podaní doxorubicínu – stredné, celková anestézia pri utrúcaní – slabé

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Nahradenie zvierat nie je možné, keďže oxidačným stresom indukovaná predčasná senescencia u ľudí/potkanov má komplexný charakter.

Experimenty na bunkových kultúrach sú v tomto projekte plánované, ale keďže sa jedná hlavne o sledovanie vplyvu liečiv na organizmus ako celok, z hľadiska fyziológie/farmakológie, tento druh štúdií ani nie je úplný. Jedná sa o zistenie účasti možných regulačných proteínov a preto v tomto type projektu nie je možné použiť ani počítačové simulácie.

2. Redukcia počtu zvierat:

Plánujeme použiť 10 potkanov na skupinu. Doxorubicínový model sa prejavuje veľkou variabilitou, čo znamená, že niektoré potkany po podaní doxorubicínu nevyvinú poškodenie. Preto je nutné použiť 10 potkanov na skupinu.

Budú sa používať nasledovné skupiny zvierat:

Na skúmanie protektívneho účinku liečiv je potrebných 8 experimentálnych skupín v dvoch časových intervaloch experimentu (5 a 7 týždňov):

vysvetlenie skratiek: BG: benzyलगуанін

1. kontrola
2. doxorubicín
3. doxorubicín + BG
4. BG
5. doxorubicín + vildagliptín
6. doxorubicín + BG + vildagliptín
7. BG + vildagliptín
8. vildagliptín

3. Zjemnenie:

Aplikácia skúmaných látok môže vyvolávať u potkanov diskomfort, preto budú potkany handlované pred začiatkom podávania látok. Týmto by sa mal zjemniť prípadný stres. Iné zjemnenie nie je v tomto pokuse nutné.

Pred meraním tlaku metódou tail cuff budú potkany na toto meranie tréňované, a to tak, že najprv sa nechajú prejsť voľne valcom, v ktorom budú umiestnené počas merania a nakoniec budú vo valci fixované s predlžujúcou sa dobou, až pokým nebudú na toto fixovanie zvyknuté.

Projekt bude podliehať opätovnému schvalovaniu: ☐ áno ☒ nie

Príloha č. 2
Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: *Štúdium biologických účinkov produktov H_2S/NO interakcie a molekulárne mechanizmy ich pôsobenia*

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3123/14-221

Kľúčové slová v projekte:

krvný tlak, hemodynamické parametre, regulačné mechanizmy, potkan, aorta, membránové kanály, sírovodík (H_2S).

Účel projektu: základný výskum

Opísať ciele projektu:

Poznávanie príčin vysokého krvného tlaku pomáha v hľadaní nových preventívnych i terapeutických postupov na liečenie vysokého krvného tlaku. Aby však bolo možné zachytiť jednotlivé chorobné procesy, je potrebné najskôr spoznávať základné mechanizmy a vzájomné vzťahy medzi reguláciou a funkciou srdcovo-cievneho systému. Príkladom sú nedávne štúdie zamerané na riešenie nových postupov pri liečbe vysokého krvného tlaku, v ktorých sa uvádza ako farmakologicky perspektívnou cestou liečby vývin liečiv na báze uvoľnenia H_2S . Avšak mechanizmy, akými uskutočňuje H_2S svoje signálne úlohy v srdcovo-cievnom systéme sú popísané nedostatočne a ako sa ukázalo, chýba aj jasná koncepcia zohľadňujúca prepojenie signálnej dráhy oxidu dusnatého (NO) a H_2S . Ciele projektu sú zamerané na získanie detailnejších poznatkov o regulačnom pôsobení H_2S v srdcovo-cievnom systéme, s dôrazom kladeným na identifikáciu mechanizmov tohto pôsobenia, vrátane identifikácie možného zapojenia NO cesty. Účelom je nielen rozvinúť poznanie H_2S ako fyziologickej signálnej molekuly, ale skúmaním vlastností H_2S a jeho kombinácie s NO vytvoriť predpoklady budovania stratégie pre výber do organizmu dodaných látok uvoľňujúcich H_2S . V hľadaní molekulárneho mechanizmu účinku H_2S , porovnáme jeho účinok s ďalšími látkami, ktoré ovplyvňujú kardiovaskulárny systém, ako: acetylcholín, adrenalin, L-NAME, nifedipín, ML-218, glibenklamid a kaptopril. Stanovené ciele chceme dosiahnuť komplexnejšou charakterizáciou biologického účinku H_2S ako systémovej odpovede - sledovaním hemodynamických parametrov, tkanivovej - sledovaním kontrakčno-relaxačnej svalovej odpovede aorty, molekulárnej - sledovaním reakcie iónových kanálov, predovšetkým mikrozómov (membránové vezikuly endoplazmatického retikula).

Prínos z vykonaného projektu:

Prínos projektu vidíme v poskytnutí detailnejšieho popisu regulačného pôsobenia H_2S v srdcovo-cievnom systéme, ktorý spolu s charakterizáciou účinku H_2S vo vzťahu k pôsobeniu/spolupôsobeniu NO, môže prispieť k vytvoreniu kritérií pre návrh vhodnej látkovej štruktúry, vyznačujúcou sa fyziologickou relevanciou. Výsledky môžu viesť

k aplikačným štúdiám použitia H₂S derivátov, prípadne ich kombinácie s NO donormi, ako liečiv.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*), kmeň Wistar, v navrhovanom počte 130 jedincov na obdobie riešenia projektu /3 roky/.

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

Pred vykonaním postupov na experimentálnych zvieratách bude užívateľom sledovaný zdravotný stav a komfort zvierat, nebude im spôsobená zbytočná bolesť, strach ani utrpenie. Postupy použité na získanie orgánov sú ukončené dislokáciou krčných stavcov, ktoré je vykonávané v celkovej anestézii, navodenej intraperitoneálnym podaním anestetika. Postup zameraný na kontinuálne sledovanie hemodynamickej odpovede prebieha v celkovej anestézii, navodenej intraperitoneálnym podaním anestetika a po jeho ukončení je zviera usmrtené predávkovaním anestetikom.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Podľa klasifikácie krutosti postupov ustanovenej § 14 príslušného predpisu* sú postupy vykonávané v projekte zahrnuté do kategórie "Bez možnosti zotavenia".

Uplatňovanie zásad 3R

Projekt je navrhnutý a bude vykonávaný v súlade so zásadami o uplatňovaní požiadaviek "zásady 3R", a to konkrétne:

1. Nahradenie zvierat:

Pretože projekt je postavený z veľkej časti na sledovaní špecifických ukazovateľov spojených so zložitým biologickým systémom, integrujúcim viacero faktorov, nie je možné pristúpiť k nahradeniu za teoretický alebo nižší biologický experimentálny model. V prípade štúdie iónových kanálov nie je možné vykonať charakterizáciu na *in vitro* modely, pretože bunkové kultúry nemajú typovo potrebnú expresiu iónových kanálov a modulačných proteínov, a preto je nutné ich získať v originálnej podobe zo živého organizmu.

2. Redukcia počtu zvierat:

Navrhnutý počet laboratórnych potkanov na celé obdobie riešenia projektu zodpovedá náročnosti experimentálnych postupov a špecifickým potrebám zadaných cieľov. Jednotlivé protokoly sú posudzované a optimalizované pre požiadavku redukcie počtu zvierat na minimum v súlade s nenarušením cieľov projektu a poskytnutím dôveryhodnej výpovednej hodnoty štúdie. Výsledky sa budú priebežne vyhodnocovať a posudzovať, v prípade preukázania štatisticky významného účinku v jednotlivých postupoch alebo zistenia závažnej výskumnej skutočnosti, dôjde k úprave počtu experimentálnych zvierat, t.j. nebude dochádzať k zvyšovaniu zbytočných experimentálnych výsledkov.

3. Zjemnenie:

Laboratórny potkan je štandardný objekt, ktorý sa celoplošne využíva pri štúdiu štruktúrnych a funkčných vlastností srdcovo-cievneho systému, čo vytvára predpoklady pre náležité porovnávanie výsledkov medzi laboratóriami. Z proporčných vlastností dobre vyhovuje technickým požiadavkám použitia našich experimentálnych metód, ako aj poskytuje možnosť vyššieho výťažku vzorky pre štúdium iónových kanálov. Zvieratá v období od dodania až do zaradenia do stanovených postupov (vrátane obdobia karantény) budú umiestnené v, na tento účel schválenej, klimatizovanej miestnosti /zverinci/ a kontrolované osobou zodpovednou na starostlivosť o zvieratá a ich dobré životné podmienky.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

* Nariadenie vlády Slovenskej Republiky č. 377/2012

PRÍLOHA Č. 2

Netechnické zhrnutie projektu podľa §35 ods. 2 písm. b) a § 40 nariadenia vlády SR č. 377/2012

NÁZOV PROJEKTU:

PRENATÁLNE PROGRAMOVANIE CHORÔB V DOSPELOSTI: SUBCHRONICKÁ PRENATÁLNA ASFYXIA U POTKANOV AKO VHODNÝ MODEL NA ŠTÚDIUM MECHANIZMOV EMBRYO-FETÁLNEHO PROGRAMOVANIA NEUROBEHAVIORÁLNYCH ZMIEN V DOSPELOSTI

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4246/15-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

úzkosť, depresia, asfyxia, prenatálne programovanie, zvieracie modely

Účel projektu: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

Použitím modelu subchronickej prenatálnej asfyxie u potkanov budeme zisťovať skoré príčiny a mechanizmy, ktoré sa môžu stať podkladom pre zvýšenú citlivosť organizmu na vznik a rozvoj neurobehaviorálnych a kardiovaskulárnych porúch v dospelosti. Skorá detekcia týchto mechanizmov na základe hodnotenia molekulárno-biologických, biochemických a behaviorálnych ukazovateľov môže prispieť k terapeutickému zásahu v skorých štádiách vývinu a tým znížiť alebo eliminovať výskyt týchto ochorení v neskoršom živote. Cieľom projektu bude hodnotenie kľúčových epigenetických faktorov, zohrávajúcich významnú úlohu pri vzniku psychických porúch využitím molekulárno-biologických metód ako aj metód etologickej analýzy animálnych modelov. Výsledky tohto experimentu prispedia k ochrane ľudského zdravia a možných aplikácií aj do humánnej medicíny.

Konkrétne:

- 1) Získajú sa nové poznatky o mechanizmoch vzniku úzkosti a depresie na zavedených animálnych modeloch asfyxie v priebehu gravidity a perinatálnom období.
- 2) Získajú sa detailnejšie informácie o kritických fázach pôsobenia prenatálnej asfyxie na vznik chorôb v dospelosti.
- 3) Využitie modelu prenatálnej asfyxie umožní nielen štúdium mechanizmov rozvoja neurobehaviorálnych, ale aj kardiovaskulárnych a metabolických porúch u dospelých zvierat s dôrazom na úzkosť a depresiu podobné správanie, kognitívne disturbance, ako aj sociálny konflikt.
- 4) Výsledky jednotlivých experimentálnych štúdií prispedia k lepšiemu poznaniu príčin a mechanizmov, ktoré sú podkladom pre zvýšené riziko vzniku psychiatrických porúch (najmä afektívnych porúch a úzkosti) v dospelosti a ich možnej skoršej detekcie na základe hodnotenia molekulárno-biologických, biochemických a behaviorálnych ukazovateľov.

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

Prenatálny vývin plodu je zložitý proces, ktorý je determinovaný nielen genetickou konfiguráciou jedinca, ale aj dostupnosťou nutritívnych látok, kyslíka, rastových faktorov a hormónov pre matku a vyvíjajúci sa plod [1,2]. Vyvíjajúci jedinec sa musí v záujme svojho prežitia na prenatálne prostredie adaptovať. Táto tzv. fetálna adaptácia nazývaná tiež "fetálne programovanie" [3] významne ovplyvňuje nielen rast, metabolizmus a fyziologické procesy, ale aj formovanie samotných behaviorálnych odpovedí [4,5]. Programovanie je teda proces, pri ktorom má podnet pôsobiaci počas kritického obdobia dlhotrvajúci alebo celoživotný vplyv na organizmus, jeho správanie a výskyt chorôb [6].

Kritická perióda je definovaná epochami rapídneho bunkového rastu v orgáne, pričom rôzne orgány sa vyvíjajú rôznym tempom a v rôznom čase [6]. Dostupnosť živín a kyslíka ovplyvňuje endokrinný systém a úloha hormónov, ako programovacích signálov, bola študovaná ako u ľudí tak aj u experimentálnych zvierat [7]. Prenatálne programovanie je teda po genetickom profile jedinca ďalším modulačným vplyvom, ktorý determinuje zdravý vývin, ale aj zvýšenú náchylnosť k neskorším ochoreniam v dospelosti [2,8].

Nepriaznivé podmienky prostredia, ktorým je jedinec počas skorého vývinu vystavený, ako je napríklad gestačná hypoxia, môžu mať vplyv na vznik neurologických porúch v neskoršom živote [9]. V rozvinutých krajinách je incidencia ťažkej perinatálnej asfyxie (spôsobujúcej smrť alebo vážne neurologické poškodenia) asi 1/1000 živonarodených detí. V rozvojových krajinách je to oveľa častejšie, pričom nemocničné štúdie naznačujú jej výskyt až u 5-10/1000 živo narodených detí [10]. Na „účet“ pôrodnej asfyxie, definovanej ako neschopnosť novorodenca dýchať po narodení, je pripisovaných podľa odhadov každoročne 900 000 úmrtí a pôrodná asfyxia je považovaná za jednu z hlavných príčin skorej neonatálnej úmrtnosti [11].

Veľké množstvo údajov naznačuje, že o postnatálnom vzniku depresie a úzkosti môže byť rozhodnuté už v období pred narodením. Tieto údaje podporujú hypotézu celoživotnej zvýšenej citlivosti na vznik úzkosti a depresie, pričom mechanizmy vzniku podliehajú ako genetickej tak aj environmentálnej kontrole. V úzkostných ochoreniach zohráva dôležitú úlohu interakcia medzi serotonínovým, GABA-ergným a glutamátovým systémom. U jednotlivcov môžeme pozorovať skôr konzistentnú úroveň úzkostného správania počas celého života, čo naznačuje že hladina úzkostného správania pretrváva po dlhú dobu a odzrkadľuje základné odlišnosti v kompozícii a sieťovaní mozgu [12]. Úzkostné poruchy sú považované za čoraz častejšie a spolu s afektívnymi poruchami a závislosťami patria medzi psychopatologické znaky s najväčším výskytom. Predpokladá sa, že do roku 2030 bude najvýznamnejšou príčinou chorôb rozvinutých krajín depresia.

V našich predchádzajúcich experimentoch sme zistili, že nepriaznivé zásahy do vývinu jedinca majú nezvratné následky na prejavy správania súvisiace so zvýšenou úzkosťou a depresii podobným stavom. Asfyxia v perinatálnom období mala za následok vznik neurobehaviorálnej poruchy (hyperaktivita počas opakovaného testovania zvierat) pripomínajúcej niektoré prejavy ADHD u detí [13]. Taktiež sme zistili, že prenatálna asfyxia v období krátko pred pôrodom má väčší dopad na programovanie neurobehaviorálnych porúch v dospelosti [14] a ovplyvnenie v skoršom vývinovom období pôsobí viac na kognitívnu zložku [15].

Literatúra

[1] Bezek et al. (2008) Asklepios, Bratislava, pp. 3-6.; [2] Galjaard et al. (2013) J Perinat Med, 41(1):101-105.; [3] Godfrey, Barker (2001) Public Health Nutr. 4(2B):611-624.; [4] Smotherman, Robinson (1990) Psychol Sci, 1:97-106.; [5] Smotherman, Robinson (1996) Dev Psychol, 32:425-434.; [6] Sandman et al. (2011) Int. J. Pept. 2011, Article ID 837596.; [7] Fowden, Forhead (2004) Reproduction. 127(5):515-526.; [8] Langley-Evans (2013) Proceedings of the Nutrition Society 72: 317–325.; [9] Ma (2014) Drug Discov. Today. 19(12):1883-1896.; [10] McGuire (2007) BMJ. Clin. Evid. Pii:0320.; [11] Lawn (2007) Health Res. Policy Syst. 5:4.; [12] Kagan a Snidman (1999) Biol. Psychiatry 46: 1536-41.; [13] Dubovický et al. (2007) Acta Physiologica 191 (Suppl. 658), 57; [14] Sedláčková et al. (2014) Neuro Endocrinol Lett. 35(Suppl 2):214-217.; [15] Krajčiová (2015) Rigorózna práca. Univerzita Komenského Bratislava, 60p.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkany kmeňa Wistar, samce a samice, predbežne 120 samíc + 40 samcov (parentálna generácia); cca 800 mláďat a 240 samíc + 240 samcov (filiálna generácia po 21. dni *post partum*) na obdobie 5 rokov.

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

Model subchronickej prenatalnej asfyxie (SPA), ktorý použijeme pri realizácii projektu je u gravidných samíc dobre znášaný. Z historických dát neevidujeme nepriaznivé účinky asfyktického inzultu na gravidné samice. Znížené množstvo parciálneho kyslíka, môže u zvierat spôsobiť diskomfort v podobe malátnosti, zvýšenej srdcovej činnosti, zvýšenej dýchavičnosti. Po celú dobu pôsobenia inzultu a minimálne hodinu po jeho skončení je sledovaný zdravotný stav zvierat. V prípade výskytu nežiaducích príznakov bude postup asfyktického inzultu prerušený. Po skončení pôsobenia inzultu nastupuje motorická aktivita zvierat a po hodine sú úplne čulé so záujmom o krmivo a vodu. 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 z prenatalného programovania.

Predpokladaná úroveň krutosti:

- celkovo slabá -

POSTUP	KRUTOSŤ
priparovanie	slabá
SPA	slabá
postnatálne hodnotenia do obdobia odstavu:	
<i>Righting reflex</i>	slabá
<i>Negatívna geotaxia</i>	slabá
<i>Startle reflex</i>	slabá
<i>Air-Righting</i>	slabá
<i>Odstav</i>	slabá
<i>Rotarod</i>	slabá
behaviorálne testy od obdobia odstavu:	
<i>Juvenilný test otvoreného poľa</i>	slabá
<i>Morrisovo vodné bludisko bludisko</i>	slabá
<i>Vyvýšené bludisko v tvare plus</i>	slabá
<i>Učenie aktívnym vyhýbaním</i>	slabá
<i>„Light/dark“ test</i>	slabá
<i>5-dňový test otvoreného poľa</i>	slabá
<i>Hypertermia spôsobená stresom</i>	slabá
<i>Test anhedónie</i>	slabá
<i>Test sociálnej interakcie</i>	slabá
<i>Porsoltov test</i>	slabá
celkovo	slabá

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

V uvedenom postupe je potrebné získať komplexnejšie informácie o možných nepriaznivých účinkoch pôsobenia asfyktického inzultu v senzitívnom období prenatálneho programovania. Prostredníctvom hodnotenia kľúčových epigenetických faktorov, zohrávajúcich významnú úlohu pri vzniku psychických porúch využitím molekulárno-biologických metód ako aj metód etologickej analýzy animálnych modelov. Tento postup nie je možné vykonať nahradením animálneho experimentálneho modelu alternatívnym modelom v podmienkach *in vitro*.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Z našich predchádzajúcich štúdií, kde sme použili uvedenú metodiku SPA sme zistili, že počty postupov tak ako sú špecifikované v protokole sú nevyhnutné (minimálne) na hodnoverné (štatisticky signifikantné) zachytenie predpokladaných efektov na dosiahnutie našich cieľov. Ďalšie znížovanie počtu zvierat v postupe je spojené s rizikom falošne negatívnych alebo falošne pozitívnych výsledkov, ktoré by potenciálne viedli k neopodstatneným postupom na ďalších zvieratách. Inými slovami, počty zvierat pri jednotlivých postupoch sú vybraté tak, aby minimalizovali celkový počet postupov nevyhnutných na dosiahnutie cieľov projektu. Počet zvierat je tiež maximálne redukovaný logistikou pokusov. S ohľadom na kvalitu života zvierat, ale aj limitované financovanie a časovú náročnosť postupov v projekte a ich analýza je v našom najlepšom záujme vykonať čo najmenej postupov na získanie interpretovateľných výsledkov a použiť čo najmenej zvierat na získanie validovaných dôležitých poznatkov nevyhnutných pre hodnotenie kľúčových epigenetických faktorov, zohrávajúcich významnú úlohu pri vzniku psychických porúch. Výsledky tohto experimentu prispievajú k ochrane ľudského zdravia a možných aplikácií aj do humánnej medicíny.

3. Zjemnenie:

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

So zvieratami sa bude šetrne zaobchádzať po celú dobu projektu a budú pod každodenným dohľadom skúsných pracovníkov. Počas postupov je zabezpečený komfort zvieratá, minimálna manipulácia, takže zvieratá nie sú traumatizované a prípadná bolesť (diskomfort) je len dočasná a minimálna. Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o zvieratá, aby sme zabezpečili humánne zaobchádzanie so zvieratami, v záujme odbúravania stresu zvieratá budú adaptované na personál a laboratórne podmienky ešte pred samotným vykonávaním postupov. 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. 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 efektívnej farmakoterapii.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Bratislava, 08. 12. 2015