

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu:

Modulácia funkčnosti a integrity črevnej bariéry aplikáciou probiotík a omega-3 polynenasýtených mastných kyselín v prevencii a terapii črevných zápalových chorôb

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3522/14-221

Kľúčové slová: kolitída, dextran sulfát sodný, *Lactobacillus plantarum*, ľanový olej, črevná bariéra

Účel projektu*:

Účelom projektu podľa § 4 nariadenia vlády je aplikovaný výskum zameraný na b) prevenciu a liečbu chorôb a poškodenia zdravia človeka a zvierat.

a1) Cieľ projektu:

Hlavným cieľom projektu je získanie nových poznatkov o účinku kmeňa *Lactobacillus plantarum* LS/07 samostatne a v kombinácii s n-3 PNMK na integritu a funkčnosť črevnej bariéry in vitro a in vivo na modeli intestinálneho zápalu a porovnanie jeho účinnosti so štandardnou liečbou ulceróznej kolitídy mesalazínom a probiotickým kmeňom *L. plantarum* 299v, u ktorého bol potvrdený protektívny účinok voči IBD. Získané výsledky budú využité v rámci prevencie a podpornej terapie nešpecifických črevných zápalových chorôb.

a2) Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu a stupeň krutosti

Charakteristika postupu	Vplyv na zvieratá	Stupeň krutosti
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.	Slabý
Krátkodobá fixácia a perorálna aplikácia (1x denne) probiotika, ľanového oleja a mesalazínu	Krátkodobý mierny stres. Bolesť žiadna. Trvanie 1-2 minúty.	Slabý
Umiestnenie zvierat	Izolácia potkanov zo sociálneho kmeňa po 2 zvieratá v klietke počas 15 dní. Bolesť žiadna.	Slabý
Aplikácia DSS	Bolesť žiadna. 5% DSS v pitnej vode.	Slabý

Detekcia rektálneho krvácania	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou, obmedzením pohybu. Bolesť slabá, zvieratá môžu pociťovať krátkodobý diskomfort v dôsledku výteru z rekta. Trvanie 30 sekúnd.	Slabý
Rozvoj kolitídy v dôsledku príjmu DSS	Po aplikácii 5% roztoku DSS dochádza u zvierat spravidla na 4 až 5 deň k rozvoju zápalu v hrubom čreve, dôsledkom čoho je úbytok hmotnosti, výskyt hnačiek, vznik ulcerácií hrubého čreva a krvácanie.	Stredný
Krátkodobá fixácia a aplikácia anestetík pri ukončení postupu	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.	Slabý
Torakotómia a následná punkcia srdca v celkovej anestézii	Postup bude prevedený v stave hlbokého bezvedomia, keď zvieratá majú ešte zachované vitálne funkcie, avšak už nereagujú na akékoľvek podnety, nepociťujú žiadnu bolesť a pred uhytnutím nenadobudnú vedomie.	Slabý

Najväčšou ujmu pre zvieratá bude negatívny účinok príjmu 5% roztoku DSS na sliznicu hrubého čreva v pozitívnej kontrolnej skupine. Dĺžka trvania postupu je navrhnutá, tak aby sme minimalizovali vystavenie zvierat krutej alebo dlhotrvajúcej strednej bolesti. Keďže zmiernenie bolesti podávaním analgetík v pozitívnej kontrolnej skupine nie je možné z dôvodu ovplyvnenia sledovaných parametrov a naplnenia cieľov projektu, zvieratá budú humánne usmrtené pri objavení sa príznakov spojených s krutou alebo dlhotrvajúcou strednou bolesťou „human end-point“ (20% strata hmotnosti, masívne krvácanie z rekta). V ostatných skupinách budú podávané látky s očakávaným protektívnym účinkom.

a3) Prínos z vykonaného projektu

Predpokladaným hlavným prínosom projektu budú nové poznatky o mechanizmoch pôsobenia probiotického kmeňa *L. plantarum* LS/07 na črevnú bariéru, s potenciálom zvýšiť tento účinok jeho kombináciou s n-3 PNMK. Uvedené účinky tohto kmeňa doposiaľ neboli študované a objasnenie týchto mechanizmov môže prispieť k rozšíreniu jeho potenciálneho využitia predovšetkým v prevencii a adjuvantnej terapii črevných zápalových chorôb. Objasnenie molekulárnej podstaty pôsobenia spomínaného bakteriálneho kmeňa samostatne alebo v kombinácii s n-3 PNMK in vitro a v animálnom experimente môže napomôcť k ich cielenému klinickému testovaniu u pacientov s črevnými zápalovými ochoreniami. V klinickej praxi by tieto substancie mohli predstavovať súčasť naturálnych prípravkov užívaných ako súčasť liečby ulceróznej kolitídy s cieľom dosiahnuť remisiu ochorenia respektíve dosiahnutie čo najdlhšieho obdobia bez relapsov ochorenia.

a4) Druh použitých zvierat a ich predbežné počty

Potkan laboratórny, kmeň Sprague-Dawley, 102 jedincov

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia (3R)

1. Nahradenie

Pre hľadanie alternatívnej metódy sme použili medzinárodne registre pre overené a uznávané alternatívne metódy (ECVAM, AltTox, NC3Rs). Aj keď existujú alternatívne metódy, tieto nemôžu nahradiť komplexnosť živého organizmu a preto neprestávajú plnohodnotnú alternatívu pre vykonanie všetkých štúdií v našom projekte. Zohľadnením požiadavky nahradenia zvierat v projekte je prvá fáza experimentov, ktorá bude realizovaná výlučne na bunkových líniách simulujúcich črevnú bariéru, na ktorej budú realizované testy funkčnosti a integrity epitelovej bariéry. Avšak v uvedených in vitro modely nie sme schopný simulovať interakcie črevný epitel – imunitný systém – mikrobióta, ktoré predstavujú dôležitý faktor pri vzniku a rozvoji IBD a pre to je nevyhnutné využitie animálneho modelu. Animálny model je nevyhnutný pre potvrdenie in vitro účinku testovaných výživových doplnkov a následnú možnú aplikáciu u ľudí. Zvolený model DSS-indukovanej kolitídy u potkanov je všeobecne akceptovaný a manifestuje klinické, makroskopické a mikroskopické príznaky charakteristické pre ulceróznú kolitídu u ľudí.

2. Obmedzenie

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom zvierat tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu, bola zabezpečená reprodukovateľnosť a validita postupu pre imunologické, fyziologické, biochemické a morfológické analýzy a ich štatistické vyhodnotenie. Počet zvierat v jednej skupine bol stanovený na 10 jedincov v experimentálnych skupinách a 6 jedincov v kontrolnej skupine, kde sa nepredpokladá žiadny negatívny účinok na zvieratá. Uvedené počty zvierat zohľadňujú štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov. Dostatočný počet zvierat v skupine je dôležitý na to, aby sme sa vyhli opakovaniu experimentu. Keďže naše doposiaľ získané výsledky z predchádzajúcich postupov poukazujú na značnú mieru individuálnej variability predovšetkým v imunologických parametroch počet zvierat menší ako 10 v skupine nie je štatisticky dostatočne relevantný pre uvedený postup.

3. Zjemnenie:

Potkany v priebehu experimentu prežívajú stres, súvisiaci s dočasnou izoláciou zvierat v pároch, ktorý bude minimalizovaný obohatením prostredia kletky predmetmi na hru a ohryzovanie a zabezpečením vizuálneho a zvukového kontaktu s ostatnými potkanmi ich umiestnením v priehľadných vaničkách. Keďže zvieratá si na bežné krátkodobé manipulačné techniky rýchlo privykajú, mierny diskomfort spôsobený manipuláciou a fixáciou zvierat počas váženia a podávania látok per os (probiotikum, ľanový olej, mesalazín) bude minimalizovaný šetrným a ohľaduplným zaobchádzaním školeným personálom. K rozvoju zápalu hrubého čreva a narušeniu črevnej bariéry v dôsledku prijímania 5% roztoku DSS v pitnej vode dochádza spravidla až na 5 deň a dotedy u zvierat nie sú viditeľné klinické príznaky ochorenia, ale dochádza k postupnému úbytku hmotnosti. Na 5 až 7 deň sa u zvierat začínajú prejavovať aj ďalšie príznaky kolitídy a to hnačky, krvácanie, úbytok hmotnosti, ktoré budú riešené v spolupráci so zmluvným lekárom. V prípade objavenia sa známok ťažkého poškodenia zdravia spojené s bolesťou, masívnym krvácaním z rekta a úbytkom hmotnosti o viac než 20% budú zvieratá

humánne usmrtené. Manifestácia týchto príznakov minimálne u troch zvierat bude predstavovať „human endpoint“ a v tomto bode bude projekt ukončený. Usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v celkovej hlbkej anestézii vyvolanej kombináciou Zoletil/Xylazín. Postupy sú navrhnuté tak, aby sa minimalizovalo utrpenie, bolesť a strach zvierat. Počas celého postupu budú zvieratá pod dohľadom skúsených a školených pracovníkov, ktorí budú dodržiavať humánne postupy v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o zvieratá.

Projekt bude podliehať spätnému posúdeniu:

~~ÁNO~~

NIE

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu:

Indukcia ischemickej tolerancie v mieche kráľíka vzdialeným perkondicionovaním a postkondicionovaním: štúdium mechanizmov endogénnej ochrany.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3524/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): ischemia, králik, perkondicionovanie, postkondicionovanie, miecha

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)

Navrhovaný projekt bude zameraný na riešenie možnosti efektívneho spolupôsobenia mechanizmov ischemickej tolerancie vyvolanej neinvazívnym spôsobom vzdialeného kondicionovania (remote conditioning) aplikáciou turniketu na predných končatinách kráľíka počas 20 minútovej ischemie abdominálnej aorty (perkondicionovanie - PerC) alebo v čase reperfúzie (postkondicionovanie - PostC).

Je dôležité poznať možnosti ako môžeme ovplyvniť účinky ischemie, tak, aby sa čo najmenšie množstvo buniek ocitlo v pásme nekrózy a zároveň aby nedošlo k zníženiu schopnosti buniek vytvoriť si vlastnú toleranciu. Aplikáciou vzdialeného per- a postkondicionovania predpokladáme vyvolanie tolerancie vulnerabilných neurónov miechy voči inak letálnej ischemii. Účinok stresu na organizmus sa pohybuje v závislosti od dávky, v prípade ischemie od dĺžky jej trvania. V našom experimente predpokladáme, že subletálnym stresom (vzdialeným PerC a PostC) vyprovokujeme obranné mechanizmy v organizme, ktoré ochránia neuróny pred letálnou ischemiou a zároveň zachovajú ich funkčnosť. Cieľom projektu je aj overenie vhodnosti časovej aplikácie (terapeutické okno) nami zvoleného stresora.

Základným parametrom na štúdium tolerancie bude sledovanie výskytu a početnosti degenerovaných neurónov v sivej hmote miechy, ktoré sa znázornia pomocou fluorescenčného markera Fluoro Jade B. U prežívajúcich neurónov (detekcia NeuN) budeme hodnotiť aktivitu látok podieľajúcich sa na reparačných procesoch v bunkách, ako je ubikvitín alebo HSP-72 a prítomnosť enzýmov oxidačného stresu. Neurologické prejavy funkčného

postihnutia panvových končatín experimentálnych zvierat budeme hodnotiť pomocou skóre podľa Tarlova v škále (0-5).

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

Vzhľadom na to, že sa v našich predošlých experimentoch potvrdil priaznivý účinok farmakologického prekondicionovania pred 20 minútovou ischémiou a následnou reperfúziou (zvýšenie počtu prežívajúcich motoneurónov, ale hlavne zachovanie ich funkčnosti), chceme si overiť aj účinok opačného usporiadania kondicionovania, čo bude mať väčší význam pre aplikáciu do klinickej praxe. V našom experimente predpokladáme, že subletálnym stresom (vzdialeným PerC a PostC) vyprovokujeme obranné mechanizmy v organizme, ktoré ochránia neuróny pred letálnou ischémiou a zároveň zachovajú ich funkčnosť. Súčasťou projektu bude zavedenie inovatívnej metódy, zameranej na aplikáciu aktivovanej plazmy donora (králik) na recipienta (králik podrobený ischémiu abdominálnej miechy).

Ak sa zistí vhodné terapeutické okno pre časovú aplikáciu druhého stresu v mieche, môže to prispieť k možnosti správneho načasovania ich aplikácie. Poznatky získané skúmaním molekulových mechanizmov ischemickej tolerance môžu slúžiť ako biochemické markery ischemickej tolerance u ľudí s cievnymi príhodami a môžu významne prispieť k vývoju nových terapeutických postupov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

králik domáci, novozélandský biely, dospelé samce, 132 kusov (na 2 roky trvania experimentu)

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

Počas celého postupu bude monitorovaný zdravotný stav zvierat. Chirurgický zákrok výsledkom, ktorého je vyvolanie ischémiu miechy bude vykonaný v celkovej anestéze, analgetiká na zníženie bolestivosti sú súčasťou anestézy. Zdravotný stav zvierat a prejavy bolestivosti budú monitorované po prebudení z anestézy a podľa potreby zvieratám budú podávané analgetiká počas celej doby reperfúzie (48 alebo 72 hodín) tak, aby bola zabezpečená najnižšia miera bolestivosti. Pre zabránenie nožnej infekcie po operačnom zásahu budú zvieratám preventívne podávané antibiotiká pred chirurgickým zásahom a počas reperfúznej fázy.

V skupine zvierat po 20 minútovej ischémiu očakávame tremor a zhoršenie hybnosti panvových končatín. Tieto zvieratá budeme intenzívne monitorovať a sledovať, či prijímajú potravu a tekutiny. Z doterajších skúseností vieme, že zvieratá nestrácajú apetít a dokážu sa presunúť prednými končatinami ku krmivu a vode. V izolačnej miestnosti, kde sú zvieratá uložené v samostatných klietkach sledujeme či zviera močí a má stolicu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Podľa klasifikácie krutosti postupov NV č. 377/2012

Kategória krutosti - slabá (1)

Počas postupu na zvieratách budeme vykonávať: intramuskulárne podávanie anestetík, analgetík, antibiotík. Odber krvi vykonáme z vena auricularis marginalis neinvazívnym spôsobom pomocou kanyly v množstve neprekračujúcom 10% celkového objemu krvi podľa hmotnosti zvierat a intravenózne jednorazové podanie plazmy kanylou o objeme primeranom pre veľkosť a druh zvierat. 16 hodín pred zákrokom bude králikom odobraná potrava.

Kategória krutosti stredná (2) – jednorazový chirurgický zásah (20 minútová ischémia) vykonaný v celkovej anestézii a s primeranou analgéziou spojený s pooperačnou bolesťou, utrpením alebo zhoršením celkového stavu. Spôsob usmrcovania zvierat: predávkovaním anestetikom (thiopental, i.v.)

Na základe uvedených posudzovaných faktorov navrhujeme celkovú klasifikáciu krutosti postupov označiť ako „strednú“.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Vybrané stavy vyskytujúce sa v klinickej medicíne nie možné inak, ako s použitím experimentálnych zvierat verifikovať. Vybraný experimentálny model sa snaží do určitej miery simulovať zmeny, ktoré prebiehajú v nervovom tkanive následkom jeho poškodenia. V súčasnosti nie je možné tento model inak verifikovať iba v experimentálnom modeli. Iné alternatívne modely (bunkové kultúry) nie sú vhodné, pretože nesimulujú priamo stav akými prebiehajú jednotlivé mechanizmy v živom organizme. Preto je použitie experimentálnych zvierat nevyhnutné na opísanie nových mechanizmov vzniku ischemickej tolerance neurónov vyprovokovanej stresom aplikovanom počas alebo po 20 minútovej ischémii v mieche králika.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Z hľadiska experimentálneho výskumu je nutné zabezpečiť dostatočný počet experimentálnych zvierat so snahou o redukcii chýb v priebehu spracovania výsledkov, ako aj na zabezpečenie štatisticky spracovateľných údajov. V našom experimente skúmame histopatologické zmeny v sivej hmote miechy po ischémii a postkondicionovaní (5 kusov zvierat v rámci každej skupiny), kde odobratý, zafixovaný materiál bude spracovaný pre účely svetelnej mikroskopie. Cieľom nášho projektu je aj odhalenie možných mechanizmov účinku postkondicionovania. Zameriame sa na sledovanie aktivity endogénnych antioxidantných enzýmov, ktoré je možné dokázať len z čerstvo odobratého materiálu hneď po ukončení doby reperfúzie (7 kusov zvierat v rámci každej skupiny). Redukcia počtu zvierat bola uskutočnená už pri vytvorení počtu zvierat v skupinách. V rámci každej skupiny (histologicky

a biochemicky spracovaných) spolu získame štatisticky významný súbor 12 ks zvierat aj pre vyhodnotenie funkčnosti panvových končatín.

Navrhované experimenty a výsledky získané na modelových zvieratách by mali byť postačujúce a opakovaná realizácia tých istých postupov je neodôvodnená.

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)

Výber druhu laboratórneho zvierat'a sa opiera o mnohé vedecké práce z odboru experimentálnej chirurgie, ktorý detailne aplikuje poznatky o rozvoji a patogenéze zmien prebiehajúcich pri jednotlivých chorobných stavoch. Simulácia stavov z klinickej medicíny do experimentálnych podmienok umožňuje skúmanie protektívnych postupov a ich zavádzanie do praxe a tiež hľadanie možných mechanizmov na zlepšenie stavu.

V postupe bude použitý Novozélandský králik, ktorý má metamérne usporiadanie ciev odstupujúcich z aorty, čo zaručuje vznik takmer úplnej ischémie lumbálnej časti miechy. Iné alternatívne modely (bunkové kultúry) nie sú vhodné, pretože nesimulujú priamo stav ako v živom organizme.

Králiky budú uložené v individuálnych klietkach s plošinou, ktorá umožňuje zvieratám pohyb, prirodzenú možnosť úkrytu, ale aj výskoku na plošinu. Klietky budú vybavené krmítkom a napájačkou, zvieratá majú prístup k vode a krmivu ad libitum. Poslednú dávku krmiva dostanú 16 hodín pred operáciou (slabý stupeň krutosti). Prostredie bude obohatené hryzacími drevenými valčekmi s možnosťou prirodzeného hľadania a pohybom za valčekom.

Počas celej dĺžky trvania karanténnej fázy pre redukciiu strachu a stresu počas postupov zavedieme každodenný handling,

Zvieratá nebudú zbytočne vystavované utrpeniu, chirurgický zákrok vedúci k navodeniu ischémie miechy bude uskutočnený v hlbokoj anestéze. Celková hlboká anestéza počas chirurgického zákroku bude navodená injekčne v kombinácii zoletil/xylazin (i.m.), pred operáciou je preventívne podaná dávka ATB cefalotin (i.m.). Antibiotiká budú podávané aj po 24 a 48 hodinách po operácii. Pred anestéziou bude každé zviera vyšetrené a zhodnotí sa jeho zdravotný stav. Počas stanovenej doby reperfúzie (48 alebo 72 hodín) budú zvieratá monitorované a pri prejavoch bolestivosti im budú podávané analgetiká (Tramal, i.m.). Priebežne budeme sledovať schopnosť príjmu krmiva a vody. Z doterajších skúseností vieme, že aj zvieratá s poruchou hybnosti panvových končatín sa presúvajú ku krmítku a napájadlu prednými končatinami. Zvieratá budú v neustálej starostlivosti zaškolených pracovníkov. Pri manipulácii so zvieratami počas priebehu celého postupu bude dodržiavaná každá z piatich slobôd uvádzaných pri definícii welfare zvierat. Vo všetkých postupoch budeme počas celej doby reperfúzie každodenne sledovať neurologický status králikov so zameraním na pohyblivosť panvových končatín. Neurologické prejavy funkčného postihnutia panvových končatín experimentálnych zvierat budeme hodnotiť pomocou skóre podľa Tarlova v škále (0-5). Na základe dosiahnutého skóre podľa Tarlova budeme zjemňovať poškodenie. Miera asistencie človeka závisí samozrejme od miery postihnutia zvierat'a.: **0- kompletná**

paraplégia panvových končatín – v prípade, že králik nie je schopný zmeniť polohu sám, budeme ho polohovať každých 8 až 9 hodín, a to striedavo na pravý i ľavý bok. Starostlivosť o vyprázdňovanie bude spočívať v kontrole močenia a vyprázdňovania. Ak nie je schopný sa sám močiť, umožníme mu to našou asistenciou. Priebežne budeme sledovať schopnosť príjmu krmiva a vody. Z doterajších skúseností vieme, že aj zvieratá s poruchou hybnosti panvových končatín sa presúvajú ku krmítku a napájadlu prednými končatinami. V čase doznievania anestézie, budú zvieratá ešte pod vplyvom analgézie, zabráni sa tak prípadnej bolestivosti. Ak zaznamenáme prejavy bolesti, ako neprimerané vydávanie zvukov (pišťanie, kvílenie) zjeme ich bolesť a utrpenie primeranou analgéziou.

1- postrehnutelný pohyb panvových končatín- v prípade, že králik nie je schopný zmeniť polohu sám, budeme ho polohovať každých 8 až 9 hodín, a to striedavo na pravý i ľavý bok. Starostlivosť o vyprázdňovanie bude spočívať v kontrole močenia a vyprázdňovania. Ak nie je schopný sa sám močiť, umožníme mu to našou asistenciou. Priebežne budeme sledovať schopnosť príjmu krmiva a vody. Zvieratá s týmto stavom hybnosti panvových končatín sa presúvajú ku krmítku a napájadlu samostatne. V čase doznievania anestézie, budú zvieratá ešte pod vplyvom analgézie, zabráni sa tak prípadnej bolestivosti. Ak zaznamenáme prejavy bolesti, ako neprimerané vydávanie zvukov (pišťanie, kvílenie) zjeme ich bolesť a utrpenie primeranou analgéziou.

2- aktívny pohyb panvových končatín bez schopnosti samostatného sedu- zvieratá s týmto stavom hybnosti panvových končatín sa presúvajú ku krmítku a napájadlu samostatne. Majú zvyčajne problém udržať sa v sede, ale to im nebráni v samostatnom močení a vyprázdňovaní. Ku krmítku a napájadlu sa presúvajú samostatne. V čase doznievania anestézie, budú zvieratá ešte pod vplyvom analgézie, zabráni sa tak prípadnej bolestivosti. Ak zaznamenáme prejavy bolesti, ako neprimerané vydávanie zvukov (pišťanie, kvílenie) zjeme ich bolesť a utrpenie primeranou analgéziou.

3- schopnosť samostatného sedu, bez schopnosti skákať – zvieratá sú zvyčajne pohyblivé a aktívne, nie sú však schopné skoku. Ku krmítku a napájadlu sa presúvajú samostatne. Nemajú problém s vyprázdňovaním a ani močením. Ak zaznamenáme prejavy bolesti, ako neprimerané vydávanie zvukov (pišťanie, kvílenie) zjeme ich bolesť a utrpenie primeranou analgéziou.

4- náznak skoku- zvieratá sú pohyblivé a schopné aktívneho skoku. Ku krmítku a napájadlu sa presúvajú samostatne. Nemajú problém s vyprázdňovaním a ani močením. Ak zaznamenáme prejavy bolesti, ako neprimerané vydávanie zvukov (pišťanie, kvílenie) zjeme ich bolesť a utrpenie primeranou analgéziou.

5- kompletná motorická funkčnosť panvových končatín- nepredpokladáme problémy s príjmom potravy a vody. Ak zaznamenáme prejavy bolesti počas pooperačnej starostlivosti, napr. neprimerané vydávanie zvukov (pišťanie, kvílenie) zjeme ich bolesť a utrpenie primeranou analgéziou. V našich všetkých postupoch predpokladáme Tarlovo skóre od 3-5. Počas celej dĺžky trvania príslušnej reperfúzne fázy pre redukciu strachu a stresu budeme pokračovať v opatrnom každodennom handlingu, Aplikáciou anestetík a analgetík v predoperačnom, operačnom ako aj v pooperačnom období, chceme v najvyššej miere redukovať stres a utrpenie zvierat. Zvieratám budú preventívne aplikované aj antibiotiká. Zvieratá budú pod kontrolou veterinárneho lekára počas celého postupu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Príloha II**Netechnické zhrnutie projektu****Názov projektu:**

Interakcia metabolických faktorov a neurogénnej signalizácie pri experimentálnych modeloch depresie

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3411/14-221

Kľúčové slová:

depresia, mozgový neurotrofický faktor, oxid dusnatý, nukleárny faktor kappa B, vysokotuková diéta

Účel projektu:

Základný výskum

Ciele projektu:

Metabolické ochorenia, akými sú diabetes a obezita, sú bežne sprevádzané neurologickými a psychiatrickými ochoreniami. Najnovšie vedecké štúdie naznačujú, že bunkové metabolické faktory ovplyvňujú neurogenézu a majú modulačné účinky na neurodegeneratívne poruchy a závažné psychiatrické ochorenia, vrátane depresie. BDNF, mozgový neurotrofický faktor, sa ukazuje ako kľúčový proteín, ktorý by mohol objasniť súvislosť medzi metabolickými a psychiatrickými ochoreniami, keďže hrá významnú úlohu ako vo vývine mozgu a regulácii synaptického prenosu, tak aj v regulácii energetického metabolizmu a kontrole príjmu potravy. Naším cieľom je sledovať účinky podávania vysokotukovej diéty na rozvoj ochorenia u dvoch experimentálnych modelov depresie. Budeme tiež skúmať, či je možné navodené neurobiologické, behaviorálne a biochemické zmeny pozitívne ovplyvniť podávaním agonistu TrkB receptorov, 7,8-dihydroxyflavónu, keďže boli dokázané nízke hladiny BDNF u pacientov s depresiou. Výsledky tohto projektu prispejú k objasňovaniu patogenézy depresie a odhalia nové terapeutické možnosti.

Prínos z vykonaného projektu:

V projekte prinesieme nové poznatky o tom, ako môžu vzájomne interagovať metabolické faktory (dráhy) a neurogénna signalizácia a prejaviť sa vo výslednom fenotype ochorenia. Zameriame sa predovšetkým na úlohu BDNF, NO (oxid dusnatý) a TLR4/NF-kappa B. Keďže NFkB je transkripčný factor, ktorý reguluje transkripciu mnohých génov, vrátane génov pre BDNF a nNOS (neuronálna NO syntáza), v projekte objasníme jeho úlohu v patofyziológii depresívnej poruchy nepriaznivo ovplyvnenej podávaním vysokotukovej diéty (HFD). Zistíme, či môže podávanie HFD negatívne ovplyvniť nielen metabolické parametre (premenné), ale aj ako môže zasiahnuť do rozvoja depresie. Vplyv podávania HFD budeme sledovať u dvoch animálnych modelov depresie. Použijeme model depresie vyvolanej vplyvom prostredia (dospelé potkany chované v sociálnej izolácii) a genetický model depresie (FSL, Flinders sensitive line potkany). Napriek tomu, že niektoré štúdie poukazujú na zhoršenie depresívneho správania po HFD u FSL, našou snahou je objasniť úlohu BDNF, NO a TLR4/NF-kB a porovnať ovplyvnenie týchto signálnych dráh u genetického modelu s modelom depresie vyvolanej vplyvom prostredia. Ide preto o originálny a inovatívny prístup. Tento prístup je umocnený komplexnou analýzou na úrovni molekulovej biológie, biochémie a na úrovni behaviorálnych zmien. V projekte overíme hypotézu, či neurobiologické a behaviorálne zmeny navodené podávaním HFD u animálnych modelov depresie priaznivo ovplyvní podávanie 7,8-dihydroxyflavónu, agonistu TrkB receptora. V neposlednom rade, porovnanie účinkov podávania HFD spolu s 7,8-DHF u dvoch odlišných modelov depresie prinesie ďalšie nové zistenia. Výsledky tohto

projektu prispievajú k objasňovaniu etiopatogenézy depresie a ukážu do akej miery môžu metabolické faktory zasiahnuť do rozvoja ochorenia a tiež môžu odhaliť nové terapeutické možnosti.

Počet a druh zvierat:

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*):

- potkan Sprague-Dawley, samec - 96 ks
- potkan FSL (Flinders sensitive line) a kontroly (Flinders resistant line, FRL), samec - 96 ks

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

V projekte sa plánuje použiť animálny model depresie založený na chove potkanov v sociálnej izolácii. Nakoľko sú potkany sociálne žijúce zvieratá, predpokladáme nepriaznivý vplyv na dané zvieratá, ktorá je však pre tento model nevyhnutná, pretože je samotnou podstatou a zmyslom modelu psychickej poruchy. V jednotlivých postupoch budú zvieratá farmakologicky ovplyvnené. Pôjde o opakované i.p. podávanie farmák. V projekte sa taktiež plánuje vystavenie zvierat behaviorálnym testom (správanie v otvorenom poli, správanie vo vyvýšenom plusovom bludisku, test rozpoznávania nového objektu a test núteného plávania), kde najmä test núteného plávania predstavuje stresový podnet.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Stredná.

Súčasťou projektu je chov potkanov v čiastočnej izolácii. V izolovanom chove bude zviera v kletke osamote pričom bude mať možnosť vidieť, počuť a cítiť ostatné potkany v miestnosti, zabránené bude iba fyzickému kontaktu medzi zvieratami – stredná krutosť. Behaviorálne testovanie je spojené so situáciami diskomfortu a zahŕňa vyvolávanie vyvíjajúcich reakcií v podmienkach, v ktorých sa zviera podnetu nemôže vyhnúť. Tento postup sa klasifikuje ako stredne krutý.

Uplatňovanie zásad 3R:

1. Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

V biomedicínskom výskume, rovnako teda aj výskume depresie, je zatiaľ použitie laboratórneho potkana nevyhnutné a nenahraditeľné. Jedná sa o experiment, v ktorom bude chronicky podávaná vysokotuková diéta ako aj liečivo, preto pre dosiahnutie nami vytýčených cieľov nemáme inú možnosť ako použiť laboratórnych potkanov. Zatiaľ neexistuje žiadna alternatívna metóda, ktorá by dostatočne nahradila komplexné podmienky v *in vivo* modeloch. Dokumentuje to tiež Príloha IV. (Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznávaných alternatívnych metód).

2. Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

V plánovanom experimente sa zabezpečí čo najnižší počet experimentálnych zvierat tak, aby bol experiment štatisticky vyhodnotiteľný a závery všeobecne prijateľné. Zvieratám sa odoberie maximálne množstvo vzoriek na sledovanie ďalších biochemických a molekulárnych parametrov. Ak to bude možné, zabezpečí sa aj spolupráca medzi laboratóriami (ako v rámci ÚNPF SAV tak aj s ostatnými ústavmi), aby sa v rámci experimentov jednotlivých laboratórií dalo použiť čo najväčšie množstvo spoločných experimentálnych zvierat.

3. Zásada zjemnenia (refinement)

Potkany počas experimentu budú prežívať mierny stres, hlavne pri opakovanom i.p. podávaní farmák, ktorý budeme minimalizovať šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia predmetní na hru a ohryzovanie. Po ukončení chronického experimentu, budú potkany humánne utračené. Usmrtenie

bude prebiehať bezbolestne v hlbkej celkovej anestézii. Najskôr sa vystavia pôsobeniu oxidu uhličitého v uzavretej nádobe až do straty vedomia. V hlbokom bezvedomí budú následne dekapitované, nechajú sa vykrvacať a po otvorení hrudnej a brušnej dutiny budú odobraté príslušné orgány.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

Nie.

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 3726/14-221

Vývoj testu na monitorovanie účinnosti vakcíny-potency assay

Podrobný účel postupu:

Alzheimerova choroba je neurodegeneratívne ochorenie, ktorým trpí okolo 24 miliónov ľudí a každý rok sa toto číslo zväčší o 4,5 milióna nových prípadov. Podľa predpokladov počet pacientov do roku 2040 stúpne celosvetovo v priemere o 200 percent. Súčasné liečebné postupy spočívajú najmä v symptomatickej a podpornej terapii avšak terapia kauzálna zatiaľ neexistuje.

Projekt je zameraný na vývoj testu (tzv. potency assay), ktorý bude monitorovať integritu (konzistentnosť, stabilitu, kvalitu) a účinnosť (imunogenicitu) produkovanej peptidovej vakcíny určenej na klinické testovanie. Peptidová vakcína pozostáva z krátkeho syntetického peptidu a nosiča. Podľa nariadení regulačných orgánov EU (EU: Directive 75/318/EEC as amended, jul 1996; ICH: QUALITY OF BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS: STABILITY TESTING OF BIOTECHNOLOGICAL/BIOLOGICAL PRODUCTS (Q5C), potency assay monitorujúca kompaktnosť vakcíny musí byť schopná odražať aj minimálne poškodenie vakcíny, tj. zníženie účinnosť (imunogenicitu). Z tohto dôvodu budeme na jednej strane testovať rôzne nízke dávky vakcíny (4µg/myš, 2µg/myš, 1µg/myš), ktoré budú simulovať možné poškodenie vakcíny. Na druhej strane budeme analyzovať vplyv cieleného „arteficiálneho“ poškodenia vakcíny (napr. tepelne opracovanej vakcíny, mechanicky narušenej vakcíny) na vývoj hladín protilátok. Tieto experimentálne vakcíny budeme porovnávať s kontrolnou vakcínou (interný štandard). Ako interný štandard nám bude slúžiť konjugát (tj. peptid naviazaný na nosič, ktorý bude skladovaný pri teplote -80°C).

Test bude založený na imunizácii myší jednak rôznymi dávkami vakcíny a jednak cielené poškodenými vakcínami a na analýze kinetiky tvorby protilátok. Po podaní jednej dávky vakcíny budeme experimentálnym zvieratám v dvojtyždňových intervaloch (tj. 2, 4 a 6 týždňov po podaní vakcíny) odoberať krv a sledovať hladiny indukovaných protilátok.

Projekt prebehne v čiastkových experimentoch: 50 experimentov, 10 zvierat v experimente. Celkom bude použitých 500 myší C57 (samice) vo veku približne 6 týždňov. Po vstupnej karanténe a veterinárnom vyšetrení budú zvieratá priradené do príslušného experimentu.

- V deň 1 sa každej myške v experimente aplikuje testovaný imunogén subkutánnou injekciou v dávke 300 µl.
- V deň 14, 28, 42 sa odoberie krv z retroorbitálneho plexu v objeme asi 100-150 ul. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieratá neprekračuje stanovené normy.
- Následne budú zvieratá z experimentu vyradené a humánne usmrtené v súlade so zákonom: anestézia a dislokácia krčných stavcov.

Príloha 2: Netechnické zhrnutie

Testované dávky vakcíny	Intaktná vakcína	Teplo (-20°C)	Ultrazvuk	Počet zvierat spolu	Stupeň krutosti
4µg/myš	4x10- test. vakcína 1x10- kontr. vakcína	4x10- test. vakcína 1x10- kontr. vakcína	4x10- test. vakcína 1x10- kontr. vakcína	120 30	slabá až stredná
2µg/myš	4x10- test. vakcína 1x10- kontr. vakcína	4x10- test. vakcína 1x10- kontr. vakcína	4x10- test. vakcína 1x10- kontr. vakcína	120 30	slabá až stredná
1µg/myš	4x10- test. vakcína 1x10- kontr. vakcína	4x10- test. vakcína 1x10- kontr. vakcína	4x10- test. vakcína 1x10- kontr. vakcína	120 30	slabá až stredná
Optim. dávka/vs poškodenie (opakovateľnosť)	4x10- test. vakcína 1x10- kontr. vakcína			40 10	slabá až stredná

Kontrolná vakcína= interný štandard-konjugát peptidu na nosiči

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Preštudovali sme všetky dostupné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili v danom experimente nahradiť zvieratá za iný biologický testovací systém. Keďže kvalitu vakcíny (jej biologickú aktivitu) najkomplexnejšie odráža jej schopnosť indukovať imunitnú odpoveď, na monitorovanie konzistentnosti a efektívnosti vakcíny je nevyhnutné použiť imunitný systém zvierat. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia jedna dávka	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 1 minútu.
Stav zvierat po aplikácii	Zvieratá môžu byť mierne stresované v dôsledku aplikácie subkutánnej injekcie. Keďže sa budú aplikovať nízke dávky vakcíny, nepredpokladáme nepriaznivý vplyv. Bolesť slabá.
Odber krvi (3x v dvojtýždňových intervaloch) (retroorbitálny plexus)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Podá sa anestézia na utlmenie bolesti. V okamihu ako je zviera sedované sa sklenená kapilára jemne zasunie pod očné guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť stredná.

	Trvanie 1 minútu.
Stav zvierat počas obdobia prežívania	Zvieratám sa bude aplikovať jednorázovo nízka dávka vakcíny (4µg/myš alebo nižšia dávka). Vzhľadom na uvedenú skutočnosť nepredpokladáme nepriaznivé účinky. Odber z očného splavu sa vykonáva v sedácii a opakuje sa v 2 týždňových intervaloch, čo by mala byť dostatočne dlhá doba na regeneráciu a zotavenie zvierat. Navrhujeme krutosť slabú až strednú.
Usmrtenie v anestézii dislokáciou krčných stavcov	Štandardná metóda. Cervikálna dislokácia sa vykoná v anestézii. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné predpisy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Niekoľko nezávislých štúdií preukázalo, že stres významne modifikuje imunitnú odpoveď, čo je v prípade nášho experimentu nežiaduce. Starostlivosť zabezpečuje jedna osoba, na ktorú si zvieratá zvykli. Zvieratá sú chované v počte 5 zvierat na chovnú nádobu, aby sme zabezpečili sociálne interakcie medzi zvieratami. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám. Odber krvi sa vykonáva v čiastkovej anestézii, aby sme utlmili bolesť spôsobenú odberom krvi.

Pri spozorovaní nežiadúcich účinkov (triaška, apatia, ...), zviera oddelíme a klietku umiestnime na výhrevnú podložku až do zotavenia. V prípade vytvorenia rán v mieste vpichu ranu ošetríme prípravkom Betadine a v nasledujúcich dňoch pozorujeme. V prípade výskytu neočakávaných mokvajúcich rán, miesto vpichu ošetríme dermálnou masťou Kalcium Panthotenicum a izolujeme, aby sme zabránili ďalšiemu poraneniu zvieraťa ostatnými zvieratami.

Redukcia:

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

Nahradenie:

Súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje sledovať integritu (konzistentnosť, stabilitu, kvalitu) a účinnosť (imunogenicitu) vakcíny v in vitro podmienkach. Po imunizácii sa sleduje celková hladina vakcínou indukovaných protilátok. Z legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať na humánných pacientoch.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

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

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené nadmernému utrpeniu. Zo skúsenosti z našich predchádzajúcich projektov neočakávame výrazné nepriaznivé účinky na zvieratá. U niektorých zvierat však môže v krátkom čase po vpichu objaviť mierna apatia v dôsledku stresu z aplikácie subkutánnej injekcie, ktorá odznie v nasledujúcich hodinách. Subkutánna aplikácia trvá niekoľko

sekúnd. Odber krvi trvá len pár sekúnd a vykonáva sa na sedovaných zvieratách. Zvieratá dostanú jednu nízku dávku netoxického vakuínu, ktorá indukuje len miernu imunitnú odpoveď a nevedie k poškodeniu organizmu. Keďže príčina Alzheimerovej choroby zostáva neznáma a stále neexistuje účinná terapia, prínos projektu spočíva vo vývoji testu (potency assay) na monitorovanie komplexnosti, stability a účinnosti (biologickej aktivity) vakuínu pre pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou.

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.11.2017 a bude sa realizovať do 31.12.2019.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Úloha protilátok špecifických voči PB1-F2 proteínu počas chrípkovej infekcie *in vivo* 3932/14-221

Kľúčové slová: vírus chrípky, PB1-F2 proteín, monoklonové protilátky, pasívna imunizácia

Účel projektu: Základný výskum

Cieľ projektu: Cieľom projektu je zistiť funkciu a doposiaľ nepopísaný vplyv protilátok voči C-koncovej časti PB1-F2 na infekciu IAV. Výsledok by mohol rozšíriť výber účinných látok v boji proti pandemickým chrípkovým vírusom. Ďalším cieľom je prispieť k poznaniu molekulárneho mechanizmu internalizácie PB1-F2 v prítomnosti špecifických anti-PB1-F2 protilátok *in vitro* a porozumieť tak jeho vplyvu v patogenetickom procese chrípkovej infekcie.

Prínos projektu: V predkladanom projekte sa zameriame na vplyv monoklonovej protilátky špecifickej pre C-terminálnu časť PB1-F2 proteínu IAV na infekciu vírusom chrípky typu A. Prinesieme tak originálne výsledky v tejto oblasti. Tento projekt nadväzuje na predchádzajúce práce nášho kolektívu. Prispejeme k poznatkom o mechanizme internalizácie PB1-F2 v prítomnosti špecifických monoklonových protilátok voči PB1-F2. Vplyv monoklonových protilátok na priebeh infekcie na bunkovej úrovni budeme sledovať prostredníctvom vírusu chrípky exprimujúceho fluorescenčný proteín. Získané výsledky prinesú celosvetovo originálne poznatky, ktoré budú znamenať prínos nielen z hľadiska teoretického, ale aj v aplikačnej oblasti. Nadobudnuté poznatky umožnia zlepšiť a spresniť predikciu patogenity v prípade hroziacej chrípkovej pandémie v ľudskej populácii a rozšíriť protivírusovú terapiu na subpopuláciu biologicky aktívnych vírusových proteínov.

Počet a druh použitých zvierat: V projektoch sa ako modelový druh používa myš laboratórna. Maximálny počet zvierat, ktoré sa v pokusoch použijú za 4 roky je 1500 ks Balb/c, 500 ks C57BL/6 myši (samičky) a 30 ks morča domáce. Použitie dvoch kmeňov myši je zdôvodnený tým, že na identifikáciu cytotoxicity voči PB1-F2 sú C57BL/6 myši vzhľadom na svoj MHC haplotyp vhodnejším modelom ako Balb/c myši. V údajoch o plánovaných počtoch zvierat je zahrnutý aj počet potrebný pre opakovanie niektorých pokusov. Zdanlivo veľký počet myši je plánovaný na 4 roky. Opakovania pokusov sa však obmedzia na nevyhnutné minimum a budú slúžiť výlučne pre overenie sporných výsledkov a objektívne štatistické vyhodnotenia experimentov.

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

Počas sledovaného obdobia nebude bránené zvieratám v prirodzenom správaní. Budú dodržané štandardy chovu, umiestnenia a starostlivosti. Zvieratám bude poskytovaná všeobecná veterinárna starostlivosť. V priebehu experimentu budú mať zvieratá voľný prístup k vode a krmivu. V prípade zhoršenia stavu zvierat počas experimentu, budú z pokusu zvieratá vyradené a humánne usmrtené podaním vysokej dávky anestetika. Počas imunizačných postupov budú myši narkotizované, aby sa im znížil stres a bolesť. Pri príprave monoklonových protilátok budú myši humánne usmrtené

v celkovej anestéze po podaní anestetika tiletamin/zolazepam alebo tiopental dislokáciou krčných stavcov. Pri protektívnej štúdii s monoklonovými protilátkami budú myši imunizované intraperitoneálne a 2 hodiny po podaní monoklonovej protilátky budú myši narkotizované a infikované vírusom PR8, kde budeme sledovať zmenu hmotnosti a prežívanie, ak myši dosiahnu stratu 25% hmotnosti, budú humánne usmrtené v celkovej anestéze po podaní anestetika tiletamin/zolazepam alebo tiopental dislokáciou krčných stavcov. Imunizačné schémy myšiam nespôsobujú diskomfort, injekčné podanie antigénu spôsobí krátkodobý mierny stres. Pri infekcii vírusom môžeme u myši sledovať úbytok hmotnosti, apatickosť, zježenie srsti. Podobne aj pri koinfekcii myši vírusom chrípky a bioluminiscentnej baktérie. Pri stanovení LD₅₀ sa nepriaznivý účinok prejaví úhynom zvierat'a.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov je možné zaradiť ich do kategórie kruté.

Klasifikácia krutosti postupov

zárok	krtosť
váženie (počas infekcie raz denne)	slabá
intraperitoneálna imunizácia (opakované podanie)	stredná
odber krvi v celkovej anestézii (myši a morča domáce)	slabá
In vivo imaging v celkovej anestézii	slabá
infekcia myši	slabá
stanovenie LD ₅₀	slabá-krutá (v závislosti od dávky vírusu)
celková klasifikácia	krutá

Súladi s požiadavkami „3R“

Laboratórne zvieratá budú počas celého pokusu chované za štandardných podmienok podľa platnej normy EU, pričom sa budú rešpektovať základné etické princípy požadované pri zaobchádzaní s pokusnými zvieratami. V súlade s 3Rs zásadami sa počas celého pokusu budú dodržiavať postupy maximálne zjemňujúce pokus. Pre laboratórne myši budú počas pokusov vytvorené dobré životné podmienky, obmedzí sa ich bolesť, utrpenie, ako aj prípadná trvalá ujma na minimum. Nakoľko sa krv z morského prasiatka v narkóze získava odobraním zo srdca a odoberú sa 2 ml krvi, zviera prežíva a nejaví známky diskomfortu.

Nahradenie

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov, experimentom na zvieratách predchádzajú štúdie v *in vitro* podmienkach. Odosla organizmu na imunizáciu a infekciu vírusom chrípky, najmä ak sa sleduje imunitná odpoveď je komplexný proces, na ktorom sa podieľa veľa faktorov a práve preto sa v tomto prípade nedá *in vivo* nahradiť bunkovými kultúrami. Morča domáce potrebujeme ako zdroj erytrocytov,

pomocou ktorých sa stanovuje hemaglutinačný titer vírusu chrípky ako aj prítomnosť vírusu chrípky vo vzorke. Na hemaglutinačné titre je možné použiť kohútie erytrocyty, ale v súčasnosti nemáme na našom ústave podmienky pre chov kohúta. Podľa zoznamu registra alternatívnych metód z European Centre for the Validation of Alternative Methods, príprava monoklonových protilátok, sledovanie protektívneho účinku podaných protilátok ako aj analýza patogenézy infekcie spôsobenej vírusmi a baktériami nie je možná bez modelového systému a je nevyhnutné použiť vhodný zvierací model. V tomto prípade je možné použiť myš. Vzhľadom na nevyhnutnosť použitia laboratórnych zvierat sa v projekte sleduje a uplatňuje najnovšia legislatíva v súvislosti so smernicami o použití zvierat na vedecké účely 2010/63, Zbierka zákonov č. 377/2012 a Vyhláška 436.

Obmedzenie:

Na základe našich skúseností z predchádzajúcich projektov, údajov z vedeckej literatúry a našich *in vitro* štúdií sme schopní odhadnúť základné dávkovanie. Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Ak získame štatisticky významné dáta z menšieho počtu zvierat, nebude potrebné použiť celkový plánovaný počet. Použitie dvoch kmeňov myši je zdôvodnený tým, že na identifikáciu cytotoxicity voči PB1-F2 sú C57BL/6 myši vzhľadom na svoj MHC haplotyp vhodnejším modelom ako Balb/c myši.

V údajoch o plánovaných počtoch zvierat je zahrnutý aj počet potrebný pre opakovanie niektorých pokusov. Zdanlivo veľký počet myši je plánovaný na 4 roky. Opakovania pokusov sa však obmedzia na nevyhnutné minimum a budú slúžiť výlučne pre overenie sporných výsledkov a objektívne štatistické vyhodnotenia experimentov.

Zjemnenie:

Pri výskyte bolestivých stavov bude zvieratám podaný prípravok na zníženie bolesti (xylazín v koncentrácii 5/10 mg/kg, ketoprofen v koncentrácii 2-5 mg/kg).

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy, pitnej vody a budú mať väčšie množstvo podstielky a iného materiálu na stavbu úkrytov. Máme vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizáciu zvierat počas injekčných aplikácií. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. Zvieratá s vážne zhoršeným zdravotným stavom (ak strata hmotnosti bude 25%, zježenie srsti, strata pohyblivosti) budú eutanazované.

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

Spätné posúdenie projektu:

Áno, do troch mesiacov po ukončení projektu (do 31.3.2021)

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu: Stanovenie účinnosti Immodinu - E-rozetový test - 3949/14-22 1

Cieľ projektu pokusu, predpokladaná ujma a prínosy:

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

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

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

Predpokladaná ujma a prínosy

Počas experimentu a počas podávania látok sa zabezpečí jemné zaobchádzanie a manipulácia so zvieratami. Neočakáva sa riziko bolesti ani utrpenia. Nepredpokladá sa výrazné zhoršenie zdravotného stavu a ani nešpecifický úhyn vplyvom imunosupresívnej látky Imuran, ani prípravku IMMODIN. Zvieratá budú mať štandardné umiestnenie, potravu a starostlivosť.

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Zaradenie podľa krutosti
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres	slabé
Krátka fixácia pri aplikácii	Krátkodobý mierny stres	slabé
Jednorázová s.c. aplikácia IMMODINU	Krátkodobé obmedzenie, bolesť slabá	slabé
Jednorázová p.o. aplikácia Aratioprinu	Krátkodobé obmedzenie, bolesť slabá, mierne podráždenie pažeráka, vyššia predispozícia na vírusové, hubové a bakteriálne infekcie vplyvom imunosupresie	slabé
Krátka fixácia a i.m. podávania anestetika	Krátkodobé obmedzenie, bolesť slabá	slabé
Opakovaný odber krvi kardiálnou punkciou v anestézii	Krátkodobé obmedzenie, bolesť slabá (vyblokovaná znecitlivením), potencionálne riziko zlyhania srdca po opakovanom vpichu ihly	stredné
Usmrtenie dislokáciou krčných stavcov v anestéze	Krátka fixácia, bolesť vyblokovaná znecitlivením	slabé

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná

Humane endpoint nastane v prípade zhoršeného zdravotného stavu zvierat s prejavmi bolesti, prípadne úbytku hmotnosti o viac ako 15% u viac ako 3 zvierat v skupine. Postup bude ukončený a pod dohľadom zmluvného veterinárneho lekára zvieratá usmrtené.

Získaný prínos z tohto postupu bude ďaleko prevyšovať prípadnú ujmu u použitých zvierat. Používanie zvierat v imunologických skúškach je nevyhnutné z dôvodu veľmi komplexnej reakcie imunitného systému a nedá sa nahradiť *in vitro* testami na bunkových líniiach. Skúška uskutočnená na zvieratách umožní stanoviť imunologickú účinnosť, ktorá by sa mala prejavovať u pacientov s imunodeficientnými stavmi, pre ktorých je prípravok určený.

Počet a druh pokusných zvierat

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

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie:

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

2. Obmedzenie:

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

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

3. Zjemnenie:

Zásada zjemnenia bude dodržiavaná v plnej miere odo dňa dodávky zvierat do zvieratníka. Počas karantény prejdú zvieratá procesom handlingu. Pri štandardnej dennej jemnej manipulácii si zvyknú na prítomnosť človeka a na bežné denné procedúry /čistenie, kŕmenie, napájanie, kontrola zdravotného stavu). Zvieratá budú chované v štandardných podmienkach, ktoré nevyvolávajú stres. Morčatá v postupe budú ustajnené v označených umelohmotných nádobách v monitorovanom a klimatizovanom prostredí s teplotou $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$ a relatívnou vlhkosťou (45 - 65) %. Počas postupu budú mať morčatá prirodzený svetelný režim. Čistenie nádob a okolitého priestoru sa bude vykonávať raz za týždeň podľa 280-001-OBP

Prevádzkový poriadok vypracovaný s ohľadom na zdravie a pohodu zvierat v zvieratníku. Fľaše s vodou sa budú meniť každý deň. Ako podstielka budú použité hobliny. Starostlivosť o zvieratá počas ustajnenia a pokusu sa bude riadiť NV č. 377/2012 a 280-001-OBP

Prevádzkový poriadok vypracovaný s ohľadom na zdravie a pohodu zvierat v zvieratníku.

Projekt bude podliehať opätovnému schváleniu: áno nie