

PRÍLOHA 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Vplyv endogénnej hladiny oxidu dusnatého a sírovodíka na tlak krvi, pulzovú vlnu, funkciu a štruktúru cievnej steny

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3973/14-221

Kľúčové slová: Oxid dusnatý, sírovodík, integrovaná tlaková odpoveď, inhibítor neuronálnej NO-syntázy, SHR

Účel projektu: Základný výskum s cieľom zabránenia, prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov zvierat alebo ich účinkov na zvieratá, stanovovania, odhaľovania, usmerňovania alebo úpravy posúdenia, zistenia, regulácie alebo zmeny fyziologického stavu alebo fyziologických procesov zvierat.

Pre účinnú prevenciu a liečenie vysokého krvného tlaku ako najčastejšej príčiny kardiovaskulárnych chorôb je nevyhnutné poznať príčiny jej vzniku. Oxid dusnatý a sírovodík sa podieľajúce veľkou mierou, ako samostatne tak vo vzájomnej interakcii, na ovplyvňovaní aktivity hladkosvalových buniek, arteriálnej stiffness, pulzovej vlny a štruktúry cievnej steny. Kým úlohe NO z endotelovej NO-syntázy je venovaná pozornosť, literárne údaje o účinku zvýšenej, alebo zníženej hladiny neuronálnej NO-syntázy a hlavne sírovodíka sú nedostatočné. Cieľom projektu je sledovať účinok týchto transmitterov pri akútnom a chronickom ovplyvňovaní ich endogénnej hladiny na tlak krvi, funkciu (arteriálnu stiffness, tvar a priebeh pulzovej vlny, aktivitu hladkosvalových buniek) a štruktúru cievneho systému u normotenzných a hypertenzných potkanov. Získanie nových poznatkov o pôsobení oxidu dusnatého a sírovodíka poskytne nové možnosti ako preventívne vstupovať do procesov vedúcim k patologickým zmenám v kardiovaskulárnom systéme.

Hlavným cieľom predloženého projektu bude hľadanie nových interakcií medzi jednotlivými regulačnými systémami podieľajúcimi sa na vzniku a rozvoji dvoch typov hypertenzií – NO-deficitnej a spontánnej hypertenzii. Budeme sledovať zmeny v štruktúre a funkcii arteriálnej steny vyvolané akútnym a dlhodobým zvýšením krvného tlaku. Zameriame sa predovšetkým na úlohu plyných transmitterov, oxidu dusnatého (NO) a sírovodíka (H₂S). Hlavnú pozornosť budeme venovať spresneniu nedostatočných a navyše často protichodných literárnych údajov o úlohe H₂S pri vzniku a rozvoji hypertenzie a s tým spojeným patologickým zmenám v kardiovaskulárnom systéme. Pre monitorovanie budeme využívať viaceré metodologické prístupy. Budeme monitorovať výsledky vzájomných interakcií (zmeny v produkcii NO, H₂S) prostredníctvom zmien ako v integrovaných (in vivo) odpovediach kardiovaskulárneho systému (tlak krvi, rýchlosť pulzovej vlny a zmeny v parametroch jej jednotlivých zložiek). Po chronickom podávaní látok budeme navyše hodnotiť aj zmeny v geometrii (vnútorný diameter, hrúbka a plocha cievnej steny, pomer hrúbky cievnej steny/vnútorný diameter) a ultraštruktúrálom zložení cievnej steny (percentuálne zastúpenie extracelulárnej matrix a hladkosvalových a endotelových buniek).

Prínos projektu

Hypertenzii a s ňou spojeným kardiovaskulárnym chorobám, ktoré sú najčastejšími príčinami úmrtí vo vyspelých krajinách je dlhodobu venovaná mimoriadna pozornosť. Dlhodobu zvýšený krvný tlak iniciuje vznik štrukturálnych a funkčných zmien v kardiovaskulárnom systéme, ktorými je spätne výrazne ovplyvňovaný. Napriek enormnej snahe vedeckých a klinických pracovníkov zostávajú mnohé otázky týkajúce sa príčin vzniku ako i rozvoja hypertenzie nezodpovedané. Literárne údaje o úlohe sírovodíka, ktorý patrí medzi novoobjavené plynné transmiery podieľajúce sa na modulácii cievného tonusu nie sú jasne stanovené. Na rozdiel od NO môže mať sírovodík, od závislosti na dávke ako vazokonstriktorický tak vazorelaxačný efekt. I keď NO a H₂S pôsobia rozdielnymi cestami môžu spolu kooperovať a navzájom si ovplyvňovať syntézu. Vzájomné vzťahy medzi vazorelaxačným a vazokonstriktorickým pôsobením, výsledok interakcií medzi NO a H₂S a štruktúrou cievnej steny určujú cievny tonus. Cieľom predloženého projektu, ktorý nadväzuje na naše predchádzajúce experimenty je s využitím viacerých metodologických prístupov získať:

- a) v akútnych pokusoch nové poznatky o účinkoch viacerých vazoaktívnych látok predovšetkým plynných transmirov (oxid dusnatý a sírovodík), ich donorov resp. inhibítorov ich syntézy na cievny systém
- b) znalosti o podiele sírovodíka pri vzniku a rozvoji NO-deficitnej a esenciálnej hypertenzii
- c) v chronických experimentoch poznatky o vaskulárnych odpovediach po zvýšení resp. znížení endogénnej hladiny NO a sírovodíka podávaním donorov, alebo inhibítorov ich tvorby
- d) ako sa mení rýchlosť a tvar pulzovej vlny v závislosti na rozdielnych hodnotách krvného tlaku v dôsledku zmenenej hladiny NO sírovodíka a pri podávaní vazoaktívnych látok

Počet a druh zvierat

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*) kmeň:

Wistar potkany: 72 ks

Spontánne hypertenzný potkan(SHR): 72 ks

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

V experimente sa použijú postupy, ktoré sa celé vykonávajú v celkovej anestézii, po ktorej zviera nenadobudne vedomie. Potkanom bude zavedená kanyla do karotickej artérie na meranie krvného tlaku a druhá kanyla do jugulárnej vény slúžiaci na podávanie farmák. Počas preparácie ako počas celej experimentálnej procedúry sa bude dbať na optimálnu telesnú teplotu použitím vyhrevnej podložky Počas experimentu bude podľa potreby (sledovanie záznamu a zvierat'a) v príslušných časových intervaloch aplikovaná intraperitoneálne dávka anestetika. V týchto postupoch je takto zabezpečené, aby zvieratá nepociťovali bolesť. Na konci experimentu budú zvieratá usmrtené aplikáciou letálnej dávky anestetika. Takto usmrtené zvieratá budú perfundované pod tlakom zodpovedajúcim fyziologickým hodnotám

a fixatívom a spracované pre transmisnú elektrónovú mikroskopiu. Vo svetelnom mikroskope budú hodnotené zmeny v hrúbke a ploche cievnej steny, vnútorný diameter, v elektrónovom mikroskope zmeny v ultraštruktúre cievnej steny. Súčasťou štúdie je týždenné meranie váhy tlaku krvi neinvazívnou metódou, čo môže byť spojené s krátkodobým strachom, ktorý sa časom znižuje.

Chronická aplikácia látok sa uskutoční buď perorálne (v pitnej vode) alebo intraperitoneálne (vo fyziologickom roztoku). Počas intraperitoneálnej aplikácie látok zvieratá budú krátkodobo fixované, čo predstavuje metódu vyvolávajúcu len mierny krátkodobý stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu zvierat (bolesť stredná, trvanie 1 minúta).

Krvný tlak budeme merať neinvazívnym spôsobom na chvoste pomocou manžety, tzv. pletyzmografickou metódou. Počas merania potkany budú umiestnené v meracej komôrke, kde bude čiastočne obmedzený ich pohyb, ale nebudú imobilizované (slabá krutosť). Táto metóda môže byť spojená s krátkodobým miernym stresom, ktorý sa po opakovaných meraniach znižuje. Metóda nenarušuje integritu potkana a bude sa prevádzať pri plnom vedomí potkana, pričom zvieratá nebudú vystavené bolesti.

Predpokladaná úroveň krutosti

Slabá krutosť:

- in vivo experiment - intraperitoneálne podanie celkovej anestézy, na konci experimentu usmrtenie aplikáciou letálnej dávky anestetika - bez možnosti zotavenia.

Stredná krutosť:

- chronická aplikácia látok - perorálne v pitnej vode, intraperitoneálne

Počas chronickej aplikácie látok budeme vykonávať klinické pozorovania zaznamenané do hárkov, podľa ktorých posudzujeme zdravotný stav a pohodu zvierat. Vypracujeme bodové skóre, na základe ktorého, podľa priradeného počtu bodov v jednotlivých sledovaných parametroch, budú zvieratá po konzultácii s veterinárnym lekárom vyradené (human end point) alebo liečené a ďalej použité v experimentoch. Parametre bodovacieho skóre:

- celkový vzhľad experimentálnych zvierat: telesný stav (úbytok/prírastok hmotnosti), stav srsti a kože (prítomnosť čistenia, strata ochlpenia, opuch, chrasta, vred), prítomnosť výtoku (z očí, z nosa), vzhľad očí (zatvorené/polozatvorené), prítomnosť slinenia a anomálie zhryzu,

- telesné funkcie: dýchanie, príjem potravy a tekutiny, resp. zmyslové funkcie (zhoršenie sluchu alebo rovnováhy),

- sociálne interakcie zvierat (bojazlivé/agresívne interakcie, zreteľné únikové reakcie, skrývanie sa), ich stereotypné správanie, držanie tela a pohyblivosť (krívanie, nekoordinovaný pohyb, tras, záchvaty),

- chovné prostredie zvierat (prítomnosť a hustota stolice, prítomnosť vývratkov alebo krvi).

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

In vivo experiment - počas experimentu sa po intraperitoneálnom podaní celkovej anestézy v bezvedomí zavedú 2 katétre - jeden intravenózne na podávanie látok a jeden intraarteriálne na zavedenie sondy, tlakomeru, katétre a podávané farmaká môžu

spôsobiť diskomfort, bezvedomie však bude po celý čas kontrolované a v prípade potreby sa podá anestetikum.

Chronická aplikácia látok – počas experimentu sa budú farmaká aplikovať v pitnej vode alebo intraperitoneálne látky, podávané farmaká môžu spôsobiť diskomfort, budeme kontrolovať bodovacie skóre a postupovať podľa odporúčení veterinára (podanie analgetík, antibiotík a pod.), pri intraperitoneálnom podávaní látok sa môže vyskytnúť zápal v mieste vpichu, čo ošetríme podaním antibiotík, každodenným pozorovaním a starostivosťou o rany.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

1. Nahradenie zvierat: Cieľom plánovaného pokusu je odhaliť účasť resp. podiel špecifického regulačného mechanizmu v etiopatogenéze hypertenzie a metabolického syndrómu. Pre sledovanie funkcie kardiovaskulárneho systému s hlavným zreteľom na reguláciu krvného tlaku a rozvoj hypertenzie je najvhodnejší model laboratórneho potkana. Zatiaľ neexistuje alternatívna metóda, ktorá by nahradila laboratórneho potkana. Dokumentuje to príloha Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód.

2. Redukcia počtu zvierat: V plánovanom experimente je zabezpečený čo najnižší počet experimentálnych zvierat, tak aby bol experiment štatisticky vyhodnotiteľný a závery všeobecne prijateľné. Zabezpečí sa, aby nedochádzalo k duplicite skupín. Zvieratá zaradené do chronických experimentov po in vivo experimente sa následne použijú na morfologické vyšetrenia redukujúc takto počet experimentálnych skupín. Jednotlivé skupiny bude tvoriť najnižší možný počet jedincov.

3. Zjemnenie: Pre dosiahnutie vedeckých cieľov projektu je najvhodnejší laboratórny potkan, ktorý predstavuje druh, ktorému navrhnuté postupy spôsobia minimálne utrpenie a strach. U experimentálnych skupín sa uskutoční meranie tlaku krvi invazívnym spôsobom preto bude intraperitoneálne aplikovaná anestéza. Počas preparácie ako počas celej experimentálnej procedúry sa bude dbať na optimálnu telesnú teplotu použitím vyhrevnej podložky. Počas experimentu bude podľa potreby v príslušných časových intervaloch aplikovaná intraperitoneálne dávka anestetika. Na konci experimentu budú zvieratá usmrtené aplikáciou letálnej dávky anestetika. Počas chronickej intraperitoneálnej aplikácie látok sa bude pravidelne sledovať, či nedochádza k zápalovej reakcii v miestach vpichu injekcie. V prípade prítomnosti zápalu sa použije liečba antibiotikami. Počas chronického podávania budeme vykonávať klinické pozorovania a zaznamenávať ich do hárkov, podľa ktorých sa bude posudzovať zdravotný stav a pohoda zvierat. Na základe dosiahnutého skóre bodov budú zvieratá po konzultácii s veterinárnym lekárom vyradené (human end point) alebo liečené a ďalej použité v experimentoch. V prípade zistenia akejkoľvek formy utrpenia budeme postupovať podľa odporúčení veterinárneho lekára (podanie analgetík, antibiotík a pod.). Po podaní injekcie sa zvieratá budú monitorovať. Ak sa spozoruje väčšia ako stredná prechodná bolesť alebo strach, zvieratá sa humánne usmrtia. Postupy chovu prispôbime tak, aby sa minimalizovalo riziko kontaminácie. Zvieratá budú mať dostatočne obohatené prostredie, aby sa znížil stres. V prípade úbytku hmotnosti podanie vysokoenergetických potravinových doplnkov (úbytok hmotnosti nesmie prekročiť 20%).

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

PRÍLOHA 5

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

a) Nové regulačné účinky oxidu dusnatého a ich úloha v rozvoji esenciálnej hypertenzie

b) Nitrózo-sulfidová signálna dráha - nové regulačné vazoaktívne účinky v rôznych modeloch artériovej hypertenzie

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3984/14-221

Kľúčové slová: Oxid dusnatý, sírovodík, cievny tonus, NO-deficitná hypertenzia, HTG, SHR

Účel projektu: Základný výskum s cieľom zabránenia, prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov zvierat alebo ich účinkov na zvieratá, stanovovania, odhaľovania, usmerňovania alebo úpravy posúdenia, zistenia, regulácie alebo zmeny fyziologického stavu alebo fyziologických procesov zvierat.

Poznávanie príčin hypertenzie je nevyhnutným predpokladom zavádzania nových preventívnych i terapeutických postupov. Aby však bolo možné podchytiť jednotlivé chorobné procesy, je nevyhnutné najskôr spoznávať základné mechanizmy a vzájomné vzťahy medzi nimi. Pochopením a preventívnym vstupovaním do jadra procesov vedúcich k vývinu hypertenzie by sa mohli prerušiť vyvíjajúce sa patologické procesy v kardiovaskulárnom systéme. Prioritným cieľom projektov je popis podielu endogénnych NO a H₂S systémov, resp. ich vzájomnej interakcie, v etiopatogenéze hypertenzie. Vyššie uvedené projekty priamo nadväzujú na výsledky predchádzajúcich projektov zameraných na výskum dvoch plyných transmitterov NO a H₂S, ich vzájomnú interakciu a úlohu v regulácii cievneho tonusu. Existenciu novej nitrózo-sulfidovej signálnej dráhy so špecifickými vazoaktívnymi účinkami sme potvrdili u normotenzných potkanov. Novým významným prínosom projektov pre poznanie originálnych regulačných dráh NO-H₂S interakcie a ich mechanizmov je ich sledovanie na viacerých animálnych modeloch hypertenzie súčasne (model esenciálnej hypertenzie - spontánne hypertenzný potkan, model metabolického syndrómu - hypertriglyceridemický potkan a model NO-deficitnej hypertenzie), nakoľko podobné sledovanie robené neboli. Vytýčená problematika - hľadanie a potvrdenie nových signálnych dráh - vychádzajúca z interakcie dvoch významných signálnych systémov: NO a H₂S a ich možného vplyvu na funkciu, trofiku a molekulárne zmeny v kardiovaskulárnom systéme je preto vysoko aktuálna.

Prínos projektu

Novým významným prínosom pre poznanie originálnych regulačných dráh NO-H₂S interakcie a ich mechanizmov je ich sledovanie na viacerých animálnych modeloch hypertenzie súčasne (SHR, HTG, NO-deficitná hypertenzia), nakoľko podobné sledovania robené neboli. Taktiež simultánne sledovanie a porovnanie základných signálnych dráh na rovnakých tkanivách zvieracieho modelu (normotenzný, hypertenzný, dyslipidemický potkan) a ľudského modelu (normotenzný, hypertenzný, dyslipidemický človek) predstavuje aktuálny a primeraný spôsob ako prepojiť poznatky základného výskumu s klinickou praxou. V jednotlivých krokoch očakávame nové informácie:

a)ktoré prispejú k objasneniu mechanizmov účinkov nových signálnych molekúl NO-H₂S interakcie v podmienkach normotenzie, hypertenzie a dyslipidémie,

b)ktoré prispejú k objasneniu úlohy jednotlivých častí cievnej steny (endotel, perivaskulárne tukové tkanivo, hladko-svalové bunky, perivaskulárne nervy atď.) v nitrózo-sulfidovej signalizácii,

c)ktoré potvrdia alebo vyvrátia pretrvanie kompenzačných mechanizmov zahrňajúcich NO-H₂S interakciu v podmienkach nedostatku NO,

d)ktoré umožnia asociovať mechanizmy nitrózo-sulfidovej signalizácie na animálnych modeloch a ľudských vzorkách.

Počet a druh zvierat

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*) kmeň:

Wistar potkany: 96 ks

Wistar Kyoto: 64 ks

Spontánne hypertenzný potkan: 64 ks

Hypertriglyceridemický (HTG) potkan: 60 ks

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

V experimente sa použijú postupy, ktoré sa celé vykonávajú v celkovej anestézii, po ktorej zviera nenadobudne vedomie. Potkanom bude zavedená kanyla do karotickej artérie na meranie krvného tlaku a druhá kanyla do jugulárnej vény slúžiaca na podávanie farmák. Počas experimentu bude podľa potreby (sledovanie záznamu tlaku krvi a správanie zvierat'a) v príslušných časových intervaloch aplikovaná intraperitoneálne dávka anestetika. V týchto postupoch je takto zabezpečené, aby zvieratá nepociťovali bolesť. Na konci experimentu budú zvieratá usmrtené aplikáciou letálnej dávky anestetika. Súčasťou štúdie je týždenné meranie váhy, tlaku krvi neinvazívnou metódou, čo môže byť spojené s krátkodobým strachom, ktorý sa časom znižuje. Pri in vitro postupoch zvieratá budú znecitlivené celkovou anestéziou do hlbokého bezvedomia účinkom oxidu uhličitého (CO₂) - slabá krutosť. Pri znecitlivení budú zvieratá umiestnené do špeciálne konštruovaných komôr až po dosiahnutí najvyššej možnej koncentrácie oxidu uhličitého v komore privádzaného zo zdroja 100%-ého CO₂ tak, aby sa vylúčilo poranenie zvierat a bolo možné ich vidieť. CO₂ sa aplikuje skúseným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Zvieratá budú humánne usmrtené tak, že najprv budú vystavené parám CO₂, až do straty vedomia, aby sa minimalizovala bolesť, utrpenie, úzkosť a strach, následne sa usmrtenie uskutoční dekapitáciou v celkovej hlbkej anestézii – kategória krutosti: bez možnosti zotavenia. Trvanie 1-2 min.

Chronická aplikácia látok sa uskutoční buď perorálne (v pitnej vode) alebo intraperitoneálne (vo fyziologickom roztoku). Počas intraperitoneálnej aplikácie látok zvieratá budú krátkodobo fixované, čo predstavuje metódu vyvolávajúcu len mierny krátkodobý stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu zvierat (bolesť slabá, trvanie 1 minúta).

Krvný tlak budeme merať neinvazívnym spôsobom na chvoste pomocou manžety, tzv. pletyzmografickou metódou. Počas merania potkany budú umiestnené v meracej komôrke, kde bude čiastočne obmedzený ich pohyb, ale nebudú imobilizované (slabá krutosť). Táto metóda môže byť spojená s krátkodobým miernym stresom, ktorý sa po opakovaných

meraniach znižuje. Metóda nenarušuje integritu potkana a bude sa prevádzať pri plnom vedomí potkana, pričom zvieratá nebudú vystavené bolesti.

Predpokladaná úroveň krutosti

Slabá krutosť:

- rutinná starostlivosť a váženie, neinvazívne meranie krvného tlaku a frekvencie srdca
- in vitro experiment - vystavenie pôsobeniu pár oxidu uhličitého v uzavretej nádobe, až do straty vedomia, usmrtenie dekapitáciou a vykrvácaním - bež možnosti zotavenia,
- in vivo experiment - intraperitoneálne podanie celkovej anestézy, na konci experimentu usmrtenie aplikáciou letálnej dávky anestetika - bez možnosti zotavenia.

Stredná krutosť:

- chronická aplikácia látok - perorálne v pitnej vode, intraperitoneálne

Počas chronickej aplikácie látok budeme vykonávať klinické pozorovania zaznamenané do hárkov, podľa ktorých posudzujeme zdravotný stav a pohodu zvierat. Vypracujeme bodové skóre, na základe ktorého, podľa priradeného počtu bodov v jednotlivých sledovaných parametroch, budú zvieratá po konzultácii s veterinárnym lekárom vyradené (human end point) alebo liečené a ďalej použité v experimentoch. Parametre bodovacieho skóre:

- celkový vzhľad experimentálnych zvierat: telesný stav (úbytok/prírastok hmotnosti), stav srsti a kože (prítomnosť čistenia, strata ochlpenia, opuch, chrasa, vred), prítomnosť výtoku (z očí, z nosa), vzhľad očí (zatvorené/polozatvorené), prítomnosť slinenia a anomálie zhryzu,
- telesné funkcie: dýchanie, príjem potravy a tekutiny, resp. zmyslové funkcie (zhoršenie sluchu alebo rovnováhy),
- sociálne interakcie zvierat (bojazlivé/agresívne interakcie, zreteľné únikové reakcie, skrývanie sa), ich stereotypné správanie, držanie tela a pohyblivosť (krívanie, nekoordinovaný pohyb, tras, záchvaty),
- chovné prostredie zvierat (prítomnosť a hustota stolice, prítomnosť vývratkov alebo krvi).

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

In vivo experiment - počas experimentu sa po intraperitoneálnom podaní celkovej anestézy v bezvedomí zavedú 2 katétre - jeden intravenózne na podávanie látok a jeden intraarteriálne na zavedenie sondy, tlakomeru, katétre a podávané farmaká môžu spôsobiť diskomfort, bezvedomie však bude po celý čas kontrolované a v prípade potreby sa podá anestetikum.

Chronická aplikácia látok – počas experimentu sa budú počas 4 týždňov aplikovať v pitnej vode alebo intraperitoneálne látky, podávané farmaká môžu spôsobiť diskomfort, budeme kontrolovať bodovacie skóre a postupovať podľa odporúčení veterinára (podanie analgetík, antibiotík a pod.), pri intraperitoneálnom podávaní látok sa môže vyskytnúť zápal v mieste vpichu, čo ošetríme podaním antibiotík, každodenným pozorovaním a starostlivosťou o rany.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

1. Nahradenie zvierat: Cieľom plánovaného pokusu je odhaliť účasť resp. podiel špecifického regulačného mechanizmu v etiopatogenéze hypertenzie a metabolického syndrómu. Pre sledovanie funkcie kardiovaskulárneho systému s hlavným zreteľom na reguláciu krvného tlaku a rozvoj hypertenzie je najvhodnejší model laboratórneho potkana.

Zatiaľ neexistuje alternatívna metóda, ktorá by nahradila laboratorátneho potkana. Dokumentuje to príloha Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód.

2. Redukcia počtu zvierat: V plánovanom experimente je zabezpečený čo najnižší počet experimentálnych zvierat, tak aby bol experiment štatisticky vyhodnotiteľný a závery všeobecne prijateľné. Zabezpečí sa, aby nedochádzalo k duplicite kontrolných skupín. Zvieratám použitým na in vitro experiment sa odoberie maximálne množstvo vzoriek na sledovanie fyziologických, biochemických prípadne histochemických parametrov. Jednotlivé skupiny bude tvoriť najnižší možný počet jedincov. V rámci akútneho in vitro experimentu bude sledovaný program spoločného využívania orgánov a tkanív usmrtených zvierat v rámci ÚNPF SAV, čo v prípade dostupnosti umožní získať potrebné orgány a tkanivá aj z iných schválených projektov ústavu a zabráni ďalšiemu navyšovaniu zvierat v týchto skupinách.

3. Zjemnenie: Pre dosiahnutie vedeckých cieľov projektu je najvhodnejší laboratórny potkan, ktorý predstavuje druh, ktorému navrhnuté postupy spôsobia minimálne utrpenie a strach. U skupiny zvierat, kde sa uskutoční meranie tlaku krvi invazívnym spôsobom bude intraperitoneálne aplikovaná anestéza. Počas experimentu bude podľa potreby v príslušných časových intervaloch aplikovaná intraperitoneálne dávka anestetika. Na konci experimentu budú zvieratá usmrtené aplikáciou letálnej dávky anestetika. U skupiny zvierat, kde budú sledované fyziologické parametre na izolovaných cievach potkana a súčasne budú odobraté potrebné orgány pre stanovovanie biochemických parametrov, budú zvieratá humanne utratené. 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 cievy a orgány. Počas chronickej intraperitoneálnej aplikácie látok sa bude pravidelne sledovať, či nedochádza k zápalovej reakcii v miestach vpichu injekcie. V prípade prítomnosti zápalu sa použije liečba antibiotikami. Počas chronického treatmentu budeme vykonávať klinické pozorovania zaznamenané do hárkov, podľa ktorých posudzujeme zdravotný stav a pohodu zvierat. Na základe dosiahnutého skóre bodov budú zvieratá po konzultácii s veterinárnym lekárom vyradené (human end point) alebo liečené a ďalej použité v experimentoch. V prípade zistenia akejkoľvek formy utrpenia budeme postupovať podľa odporúčení veterinárneho lekára (podanie analgetík, antibiotík a pod.). Po podaní injekcie sa zvieratá budú monitorovať. Ak sa spozoruje väčšia ako stredná prechodná bolesť alebo strach, zvieratá sa humanne usmrtia. Postupy chovu prispôbime tak, aby sa minimalizovalo riziko kontaminácie. Zvieratá budú mať dostatočne obohatené prostredie, aby sa znížil stres. V prípade úbytku hmotnosti podanie vysokoenergetických potravinových doplnkov (úbytok hmotnosti nesmie prekročiť 20%).

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU - 3949 / 17-221

Názov projektu: Stanovenie účinnosti Immodinu - E-rozetový test

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 (vyblokováná znecitlivením), potencionálne riziko zlyhania srdca po opakovanom vpichu ihly	stredné
Usmrtenie dislokáciou krčných stavcov v anestéze	Krátka fixácia, bolesť vyblokováná 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 prejaviť 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 ± 2) °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

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

Vzťah medzi telesnou adipozitou a funkčnými vlastnosťami artérií u potkana

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3942/14-221

2/0147/18 (Registračné číslo projektu)

Kľúčové slová:

telesná adipozita, perivaskulárne tukové tkanivo, artérie, cievna reaktivita, hypertenzia

Účel projektu:

Základný výskum

Ciele projektu:

Hlavným cieľom experimentov je sledovať vplyv zvýšenia množstva telesného tuku, vyvolaného nadmerným príjmom fruktózy a konzumáciou potravy s vysokým obsahom lipidov u mladých a dospelých potkanov, na ich krvný tlak, na funkčné prejavy artérií a na iné fyziologické a biochemické parametre súvisiace s metabolizmom a s funkciou kardiovaskulárneho systému.

Na základe výsledkov doterajších experimentov možno očakávať, že podávanie samotnej 10%-nej fruktózy vyvolá u potkanov mierne zvýšenie telesnej adipozity, kým v kombinácii s vysokotučnou diétou bude nárast telesného tuku výraznejší. Bude sa zisťovať, aký vplyv majú tieto dietetické faktory u mladých a u dospelých jedincov, kedy (v ktorom období) je ich lipogénny efekt výraznejší, ako pôsobia na vybrané ukazovatele funkcie kardiovaskulárneho systému a nakoľko interferujú s poškodením srdca a ciev u geneticky hypertenzných potkanov. Cieľom je tiež zistiť, či je možnosť navodiť tzv. paradox obezity (resp. nadváhy) v takýchto podmienkach, t.j. či zvýšené množstvo telesného tuku môže pôsobiť čiastočne protektívne pri vzniku kardiovaskulárnej dysfunkcie u hypertenzných jedincov, obdobne ako u ľudí.

Zvláštna pozornosť sa bude venovať vplyvu perivaskulárneho tukového tkaniva (PVTT) na reaktivitu artérií v in vitro podmienkach. Hodnotiť sa bude jeho antikontraktilný účinok – ako sa tento mení spolu s kvantitatívnou zmenou PVTT, nakoľko môže prispievať k spomínanému paradoxu obezity (alebo naopak – kedy sa zhoršuje) a nakoľko koreluje so zmenami v krvnom tlaku resp. inými meranými parametrami. Použitím rôznych blokátorov a antagonistov sa bude sledovať, akými mechanizmami je sprostredkovaný vazorelaxačný účinok PVTT, resp. ako je tento modifikovaný u mladých a dospelých normotenzných a hypertenzných potkanov po dietetickom zásahu.

Prínos z vykonaného projektu:

Napriek tomu, že experimenty plánované v tomto projekte sa radia do oblasti základného výskumu, je pravdepodobné, že v dlhšom časovom horizonte – za predpokladu ich pokračovania a rastúceho prelnania sa s klinickým výskumom – môžu priniesť i významné praktické aplikácie pre zvyšovanie kvality života a zdravia u ľudí. Ako zvýšené hodnoty BMI, telesnej hmotnosti a adipozity, tak i kardiovaskulárne ochorenia sú dnes u mnohých ľudí vysoko aktuálnymi skutočnosťami a ich tesná vzájomná prepojenosť je logická a evidentná, a to i v rámci takých klinických jednotiek, ako je metabolický syndróm, ktorého incidencia má tiež stúpajúci trend. Napriek rozsiahlemu výskumu v tomto smere, stále zostáva otvorených množstvo otázok a problémov a tiež dopyt po účinnejších postupoch liečby a najmä prevencie týchto komplexných metabolicko-kardiovaskulárnych porúch. Navyše, potvrdenie paradoxne pozitívneho účinku telesnej nadváhy na prežívanie a prognózu

kardiovaskulárnych pacientov, ktoré je dokumentované výsledkami viacerých klinických štúdií, otvára tiež nový pohľad na „už známe“ vzťahy medzi BMI a kardiovaskulárnym rizikom.

Výsledky predkladaného projektu by mali aspoň čiastočne prispieť k ozrejmieniu tohto vzťahu a zodpovedať niektoré kritické otázky ohľadom vplyvu telesnej adipozity na krvný tlak, cievne funkcie a vazomodulačné vlastnosti perivaskulárneho tuku. Významným prínosom by mohlo byť tiež riešenie dietetických otázok týkajúcich sa zvýšenej konzumácie tukov a jednoduchých cukrov, špeciálne fruktózy, ktorá sa v priebehu posledných 50 rokov stala významnou súčasťou potravy človeka v dôsledku nadmerného používania prídavných sladidiel a často je spájaná práve s rozvojom obezity a metabolického syndrómu. Poznané súvislosti medzi konzumáciou týchto zložiek stravy v rôznych štádiách vývinu jedinca, množstvom telesného tuku a jeho vplyvom na funkcie srdca a ciev by mohli byť dôležitým výstupom predkladaného projektu, prinášajúcim ďalšie možnosti prevencie kardiovaskulárnych ochorení.

Projekt nadväzuje tiež na už dosiahnuté výsledky týkajúce sa perivaskulárneho tukového tkaniva (PVTT) a jeho vplyvu na cievnu reaktivitu, pričom snahou bude skúmať, do akej úrovne svojho rastu môže PVTT pôsobiť ešte protektívne, a kedy sa jeho vazomodulačné vlastnosti už menia a začínajú prevládať jeho negatívne vplyvy. Ďalším z prínosov by malo byť zistenie, čo je podstatou tejto zmeny – teda doplnenie schémy mechanizmov dysfunkcie PVTT o niektoré konkrétne údaje o zmenách v produkcii rôznych vazoaktívnych, proinflamačných látok v PVTT. Takéto poznatky by mohli viesť k obohateniu liečebných postupov pri kardiovaskulárnych ochoreniach sprevádzajúcich stav obezity.

V neposlednom rade by malo riešenie projektu priniesť aspoň parciálne odpovede na otázku, či protektívny vplyv zvýšenej adipozity u kardiovaskulárnych pacientov je možný len u tých, ktorí majú trvalo / dlhodobo (od mladého veku) zvýšený BMI, alebo je tento účinok možné dosiahnuť aj dodatočným zmnožením telesného tuku u jedincov s už rozvinutým kardiovaskulárnym poškodením. Táto otázka bude riešená postupom, kedy bude fruktóza a vysokotučná potrava podávaná potkanom s rôznou genetickou záťažou pre vznik hypertenzie (normotenzné, hranične hypertenzné, spontánne hypertenzné potkany), a to v juvenilnom období – pred rozvojom hypertenzie, ako aj v dospelosti – po dosiahnutí zvýšených hodnôt krvného tlaku spojených s kardiovaskulárnou dysfunkciou.

Počet a druh zvierat:

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*):

- potkan Wistar-Kyoto, samec – 60 ks
- spontánne hypertenzný potkan, samec – 60 ks
- hranične hypertenzný potkan (potomok kríženia spontánne hypertenznej matky a normotenzného Wistar-Kyoto otca), samec – 60 ks

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

Nepredpokladá sa nepriaznivý vplyv na zvieratá pri vykonávaní projektu. So zvieratami sa zaobchádza šetrne, avšak počas merania hemodynamických parametrov môže dochádzať ku krátkodobej miernej nepohode a strachu, ktorý sa po opakovaných meraniach znižuje.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Slabá.

Uplatňovanie zásad 3R:**1. Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)**

Cieľom plánovaného pokusu je posúdiť vzťah medzi nárastom množstva telesného tuku (adipozitou) a funkciou kardiovaskulárneho systému, a detailne sa pritom zamerať na štúdium modulačného účinku perivaskulárneho tukového tkaniva (PVTT) na reaktivitu artérií a tiež na jeho štruktúrno-funkčné interakcie s ostatnými zložkami cievnej steny. Hlavným prínosom experimentov by malo byť posúdenie účasti vplyvu PVTT na zmenách kardiovaskulárnych funkcií pri rozvíjajúcej sa genetickej hypertenzii a pri metabolických alteráciách navodených dietetickým zásahom. Preto sa plánujú v pokusoch použiť rôzne genotypy potkanov, vyznačujúce sa odlišnou genetickou predispozíciou k hypertenzii (Wistar-Kyoto, spontánne hypertenzné a hranične hypertenzné potkany), a to v dvoch rôznych vekových štádiách (u hypertenzných jedincov pred a po vzostupe krvného tlaku). Týmto jedincom bude vyvolávaný metabolický syndróm podávaním nadmerného množstva fruktózy, prípadne v kombinácii s vysokotučnou stravou, pri ktorom dochádza k zvýšeniu ich telesnej adipozity, krvného tlaku, a súčasne aj ku kvantitatívnym i kvalitatívnym zmenám PVTT. Na základe doterajších údajov z literatúry možno usúdiť, že uvedené typy potkanov predstavujú najvhodnejšie modely na sledovanie vyššie uvedených javov a na dosiahnutie nami vytýčených cieľov. Zatiaľ neexistuje žiadna alternatívna metóda, ktorá by dostatočne nahradila komplexné podmienky *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 použitým na *in vitro* experiment sa odoberie maximálne množstvo vzoriek na sledovanie ďalších fyziologických, biochemických prípadne morfológických 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)

V experimente nebudú použité žiadne bolestivé invazívne metódy; potkany počas pokusu prežívajú iba mierny stres, ktorý budeme minimalizovať šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia predmetmi na hru a ohryzovanie. Po ukončení chronického experimentu, t.j. v štrnástom alebo v dvadsiatom prvom týždni života, budú potkany humanne utratené. Usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii. Najskôr sa vystavia pôsobeniu oxidu uhličitého v uzavretej nádobe až do straty vedomia. V hlbokom bezvedomí budú následne dekapitované, nechajú sa vykrváčať a po otvorení hrudnej a brušnej dutiny budú odobraté príslušné cievy a orgány.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

Nie.

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Pilotná štúdia – posúdenie profylaktického účinku esenciálnych olejov v prevencii kliešťami prenášaných rickettsiôz

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4143/14-221

Kľúčové slová v projekte: esenciálne oleje, kliešťami prenášané ochorenia, rickettsie, patogény, prevencia, profylaxia

Účel projektu: Základný výskum

Ciele projektu:

Esenciálne oleje sú látky prírodného pôvodu zaradené spolu s alkaloidmi, trieslovinami, horčinami medzi sekundárne rastlinné metabolity. Vznikajú v špecializovaných bunkách a sekrečných štruktúrach v orgánoch zástupcov niektorých rastlinných čeľadí, ako sú napríklad Hluchavkovité a Astrovité. Najčastejší spôsob ich získania je destilácia čerstvého alebo čiastočne vysušeného rastlinného materiálu vodnou parou. Esenciálne oleje sú používané najmä v potravinárskom, kozmetickom, parfumérskom a farmaceutickom priemysle, ale i v tradičnej čínskej medicíne, ajurvéde, aromaterapii z dôvodu širokého spektra terapeutických účinkov na ľudský organizmus. V databáze Web of Science sa nachádza niekoľko tisíc vedeckých článkov potvrdzujúcich antimikrobiálne vlastnosti esenciálnych olejov voči širokému spektru patogénov, ako sú baktérie, vírusy, mikromycéty a mnohobunkové parazity. Mnohé štúdie sú venované alimentárnym, multirezistentným či nozokomiálnym patogénom a využitiu esenciálnych olejov pri spracovaní, výrobe a skladovaní potravín, prevencii alimentárnych nákaz, či liečbe život ohrozujúcich ochorení spôsobených multirezistentnými kmeňmi mikroorganizmov.

Kliešťami prenášané rickettsiôzy patria medzi najstaršie známe vektormi prenosné zoonotické ochorenia. Ich pôvodcami sú obligátne intracelulárne gram-negatívne baktérie z rodu *Rickettsia*, ktoré sa množia len vo vnútri živých buniek ich rezervoárov a hostiteľov. Mnohé druhy rickettsií vyvolávajú závažné až život ohrozujúce ochorenia. *Rickettsia slovaca* je pôvodcom ochorenia, tzv. SENLAT syndrómu (v staršej literatúre pod názvami TIBOLA – kliešťami prenášaná lymfadenopatia a DEBONEL – kliešťami rodu *Dermacentor* prenášaný nekrotický erytrém a lymfadenopatia), ktoré sa najčastejšie prejavuje únavou, bolesťami hlavy, bolestivým zväčšením lymfatických uzlín, bolestivou léziou v mieste kde bol pricicaný kliešť, niekedy aj zvýšenou teplotou, vyrážkou alebo opuchom tváre. Vektorom *R. slovaca* sú najmä kliešte druhu *Dermacentor marginatus*, v menšej miere i *D. reticulatus*.

Cieľom pilotnej štúdie je stanoviť protektívny účinok esenciálnych olejov a inhibíciu množenia pôvodcu SENLAT syndrómu pri infekcii živého organizmu.

Prínos z vykonaného projektu:

V pilotnej štúdii overíme, či esenciálne oleje s *in vitro* stanovenými antirickettsiálnymi vlastnosťami ovplyvňujú množenie *R. slovaca* pri infekcii živého organizmu, ktorý je na túto baktériu vnímavý. Vďaka postupom získame unikátne výsledky, ktoré nám umožnia objektívne, zo štatistického i biologického hľadiska posúdiť profylaktické pôsobenie esenciálnych olejov a ich využitie ako alternatívneho spôsobu ochrany pred kliešťami prenášanými patogénmi.

Získané výsledky budeme prezentovať na vedeckých podujatiach a publikovať vo vedeckých a odborných časopisoch.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Ako modelový organizmus na sledovanie účinkov esenciálnych olejov po experimentálnej infekcii *R. slovaca* použijeme morčatá, o ktorých je známe, že sú vnímavé na infekciu týmto druhom rickettsie. Maximálny plánovaný počet zvierat je 200 ks. V prípade, že nebude potrebné opakovať alebo optimalizovať postupy, budeme počty použitých zvierat minimalizovať.

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

Laboratórne zvieratá budú počas celého pokusu chované za štandardných podmienok podľa platnej normy EÚ, pričom sa budú rešpektovať základné etické princípy požadované pri zaobchádzaní s pokusnými zvieratami.

Morčatá sú pre *R. slovaca* vnímavým hostiteľom, plánujeme použiť infekčnú dávku, ktorá u chorých jedincov pri subkutánnej infekcii spôsobí vznik kožného prejavu ochorenia - escharu, ale nemôžeme vylúčiť ani závažjšie prejavy. Preto budeme denne vizuálne sledovať zdravotný stav zvierat aby sme včas zaznamenali prejavy zhoršeného zdravotného stavu (znížený príjem potravy a tekutín, znížená aktivita, apatia).

Pri výskyte bolestivých stavov bude zvieratám podaný prípravok na zníženie bolesti.

Pri aplikácii esenciálnych olejov na okolie miesta vpichu/infekcie neočakávame žiadny nepriaznivý účinok esenciálnych olejov. V prípade neočakávaného výskytu kožnej alergickej reakcie na niektorú zložku esenciálneho oleja bude zvieratám po konzultácii s veterinárom podaný prípravok na zmiernenie a liečbu dermatitídy. Ani v jednom štádiu pokusu nebudú mať zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prísun potravy a vody. Na konci experimentov budú zvieratá humánne usmrtené.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti jednotlivých postupov, celkovú krutosť postupov projektu je možné zaradiť do kategórie „stredné“.

Jednotlivé postupy zaradíme do kategórie:

jednorázová subkutánna infekcia s <i>Rickettsia slovaca</i>	„slabé“
umiestnenie zvierat po jednom v kletke	„stredné“
denná aplikácia esenciálneho oleja	„slabé“
meranie rektálnej teploty chorých jedincov	„slabé“
prežívanie infikovaných zvierat po dobu maximálne 21 dní	„stredné“
podanie anestézie pri ukončení pokusu	„slabé“

celková klasifikácia: „stredné“

Uplatňovanie zásad 3R:

V súlade so zásadami 3R sa počas celého pokusu budú dodržiavať postupy maximálne zjemňujúce pokus. Pre laboratórne zvieratá budú počas pokusov vytvorené dobré životné podmienky, obmedzí sa ich bolesť, utrpenie, ako aj prípadná trvalá ujma na minimum.

Nahradenie zvierat

Podľa zoznamu registra alternatívnych metód (<https://norecopa.no>) analýza interferencie esenciálneho oleja s množením rickettsii a priebehom ochorenia vo vnímavom živom organizme nie je možná bez modelového systému a je nevyhnutné použiť vhodný zvierací model. V tomto prípade je možné použiť morča. Vzhľadom na nevyhnutnosť použitia laboratórnych zvierat sa v projekte sleduje a uplatňuje najnovšia legislatíva v súvislosti so smernicami o použití zvierat na vedecké účely, ktorú uzákonil Európsky parlament vo forme revidovanej smernice 2010/63/EU o zvieratách používaných na vedecké účely, ktorá nadobudla účinnosť 1. januára 2013, ako aj Nariadenie Vlády Slovenskej republiky zo 14. novembra 2012, ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely (Zbierka zákonov č. 377/2012) a Vyhláška 436 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky zo 14. decembra 2012, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o požiadavkách na ochranu zvierat používaných na vedecké alebo vzdelávacie účely.

Redukcia počtu použitých zvierat

Jedná sa o pilotnú štúdiu, takže je plánované minimálne množstvo zvierat. Výsledky sa budú priebežne vyhodnocovať a posudzovať, a v prípade preukázania štatisticky významného účinku v jednotlivých čiastkových postupoch, alebo v prípade zistenia závažnej výskumnej skutočnosti, dôjde k zníženiu počtu experimentálnych zvierat. Počet použitých zvierat chceme zredukovať aj opätovným použitím zvierat, ktoré v pokuse slúžia ako kontrola na neočakávaný výskyt kožnej alergickej reakcie na esenciálny olej. Nakoľko účinky esenciálnych olejov na organizmus sú krátkodobé a na zvieratách z tejto skupiny okrem aplikácie esenciálneho oleja nie sú plánované iné postupy, je ich (v prípade že alergická reakcia nebola pozorovaná) možné opätovne použiť.

Zjemnenie

Zvieratá v období od dodania až do zaradenia do postupov (vrátane obdobia karantény) budú umiestnené v miestnosti /zverinci/ schválenej na tento účel a kontrolované osobou zodpovednou na starostlivosť o zvieratá a ich dobré životné podmienky. Nádoby na zvieratá budú umiestnené pri sebe, tak aby boli morčatá v kontakte s ostatnými jedincami, postup sa zjemní vytvorením obohateného prostredia t. j. pridaním hračiek (senové gule, paličky, tyčinky na obhrýzanie, kúsky mrkvy, jablko). Zvieratá budú handlované. V postupe plánujeme použiť subkutánnu infekciu namiesto infekcie prostredníctvom niekoľkodňového cicania infikovaných kliešťov na hostiteľovi, čo považujeme za významné zjemnenie.

Pri výskyte bolestivých stavov bude zvieratám podaný prípravok na zníženie bolesti. V prípade neočakávaného výskytu kožnej alergickej reakcie na niektorú zložku esenciálneho oleja bude zvieratám po konzultácii s veterinárom podaný prípravok na zmiernenie a liečbu dermatitídy. Ani v jednom štádiu pokusu nebudú mať zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prísun potravy a vody.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno - jedná sa o pilotnú štúdiu, na základe ktorej predpokladáme podanie žiadosti o schválenie projektu

4449/14-221

Netechnické zhrnutie projektu podľa § 40 Nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.

Názov projektu: Účinok kombinácie rôznych koncentrácií antioxidantov s chitosanom a hyaluronanom sodným na hojenie ischemických rán u králikov

a) Informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, počte a typoch zvierat.

Cieľom štúdií je určiť a porovnať efekt liečby membránami obsahujúcimi chitosan (CH), hyaluronan sodný (HA) spolu s antioxidantom (MitoQ, ergotioneín, hercynín, dodecyltrifenylylfosfónium bromid) v dvoch koncentráciách na proces hojenia chronických ischemických rán u králikov.

Králiky sa podrobia operácii v celkovej i lokálnej anestézii, ktorá je nutná pre indukciu modelu chronickej ischemickej rany a vychádza z predpokladaného spôsobu užívania zdravotníckeho prípravku pri liečbe vulnusov. Pri preväzovaní a meraní rán budú experimentálne jedince v čiastočnej anestézii (Zoletil 25 mg/kg a xylazín 16 mg/kg). Pooperačný stav a doba pozorovania 15 dní sú optimálne pri eliminácii nepriaznivých vplyvov na zdravie zvierat denným podávaním analgetika. Testované látky budú podávané priamo na indukované vulnusy.

Predpokladáme, že ujma na použitých králikoch bude len v prvých dvoch dňoch po operácii, kedy sa hojí incízne poranenie kože. Počas všetkých úkonov sa bude eliminovať stres a utrpenie podaním čiastočnej, resp. celkovej anestézie a dennou aplikáciou analgetika. Z hľadiska bezpečnosti budúceho zdravotného prostriedku pre človeka prínos projektu výrazne prevyšuje ujmu u experimentálnych zvierat.

Očakávaným prínosom projektu bude vývoj nových a bezpečných zdravotníckych prostriedkov z účinných látok farmakologicky využiteľných v liečbe ľudí na hojenie chronických ischemických rán. Navyše sa získajú nové originálne poznatky o účinku testovaných látok v kombinovanej liečbe ťažko sa hojajúcich vulnusov u králikov.

V projekte sa použije celkom 96 zvierat (dospelé králiky vo veku 15 – 16 týždňov), s telesnou hmotnosťou v rozsahu 2000 – 3000 g. Počet 96 jedincov postačuje pre stanovenie účinnosti testovaných látok na hojenie ischemickej rany a porovnanie ich terapeutických vlastností s negatívnou kontrolou. Experimentálnym králikom pred usmrtením nebudú aplikované žiadne cudzorodé látky.

Experimentálny model u králikov sa vyvolá vytvorením hypoxického prostredia v ušnici sekciou vybraných ciev s následnou indukciou excizionálnych rán. Po 15 dňoch sa budú sledovať zmeny v procese hojenia poškodeného tkaniva. Testované látky sa budú vymieňať každý tretí deň pracovníkom s dlhodobou praxou.

Celkovo v postupe budú vykonávané práce na zvieratách pri strednej úrovni krutosti podľa klasifikácie krutosti postupov. Váženie zvierat, aplikácia anestézie, analgetika, antibiotika intramuskulárne sa hodnotia ako slabo kruté. Operácia, pooperačný stav, vyberanie stehov po zákroku, preväzovanie rán v celkovej anestézii budú na strednej úrovni krutosti.

a) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

Animálny model chronických rán sa štandardne používa pri sledovaní účinkov potenciálnych látok ovplyvňujúcich proces hojenia. V medzinárodných databázach (ECVAM, NC3R) sa zisťovali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatívna metóda testovania hojacich vlastností látok na modeli chronickej ischemickej rany. Preto sa používa klasická *in vivo* metóda. Králik domáci je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre posúdenie účinkov zdravotníckeho produktu v mieste jeho podania.

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych králikov tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť i validita postupu pre fyzikálne, makroskopicko-morfologické a histologické analýzy, ako aj ich štatistické vyhodnotenie. Zvieratá budú samčieho pohlavia, rovnakého veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom. Osem zvierat v skupine je optimálny počet potrebný pre zistenie terapeutической efektivity testovaných látok, porovnanie ich účinkov navzájom a nemôže byť redukovaný. Z dôvodu šetrenia zvierat nebudú zaradené zvieratá v monoterapii, pretože tieto údaje nie sú nutné pre hodnotiaci proces v tomto projekte.

Zásada zjemnenia (refinement)

Zvieratá budú po presunutí z chovného zariadenia v aklimatizácii a počas experimentu po jednom v dostatočne veľkých klietkach (rozmery 60×70×45cm, plocha 4200 cm²) za stanoveného svetelného, tepelného a kŕmneho režimu. Po operačnom zásahu sa ustajnia individuálne, aby sa zamedzilo vytrhnutiu stehov, narušeniu hojaceho procesu i prijímania krmiva. Na zabránenie vzniku pooperačných zápalových reakcií sa použije antibiotikové krytie počas prvých troch dní. Operačné zákroky budú vykonávané skúseným odborným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Králiky počas postupu prežijú výraznejší stres v operačnom a pooperačnom období, ktorý sa bude minimalizovať podaním anestetík a analgetík. So zvieratami sa bude zaobchádzať šetrne a prostredie klietky sa obohatí predmetmi na hru a ohryzovanie. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

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

Názov projektu:

Mechanizmy pruritu rezistentného voči liečbe

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4471/14 - 221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): pruritus, mastocyty, nervové vlákna, Mrg receptory

Účel projektu: Základný výskum, translačný

Opísať ciele projektu:

Naším dlhodobým cieľom je lepšie pochopenie mechanizmov pruritu, najmä histamín-nezávislých signálnych dráh, ktoré reprezentujú potenciálne nové ciele pre vývoj liečiv a teda aj zefektívnenie liečby. Kľúčovým krokom k aktivácii neurónov vlákien sprostredkujúcich pruritus (NVSP) je aktivácia mastocytov. Granuly mastocytov obsahujú, okrem histamínu, množstvo mediátorov vrátane peptidov, ktoré môžu stimulovať nervové zakončenia NVSP. Pôsobenie histamínu môže byť zablokované použitím antihistaminík, avšak na prurite, ktorý je rezistentný voči liečbe sa podieľajú práve histamín-nezávislé mechanizmy. V rámci projektu budeme skúmať úlohu nedávno objavených receptorov špecificky exprimovaných na NVSP, Mrg receptorov, vo vzájomnej komunikácii medzi NVSP a mastocytmi.

Cieľ. Stanoviť kľúčové signálne kroky histamín-nezávislej aktivácie NVSP.

Predpokladáme, že aktivácia NVSP je sprostredkovaná Mrg receptormi, konkrétne MrgC11. Budeme študovať expresiu Mrg receptorov v nervových vláknach sprostredkujúcich pruritus pomocou jednobunkovej RT-PCR a aktiváciu NVSP mediátormi mastocytov prostredníctvom elektrofyziológie. Použijeme náš unikátny *ex vivo* preparát inervovanej kože z myši, Mrg „knockout“ zvieratá (Mrgpr-cluster $\Delta^{-/-}$), selektívne inhibítory a shRNA na génový „silencing“ Mrg receptorov u zdravých zvierat aj v zvieracom modeli atopickej dermatitídy. Keďže keratinocyty predstavujú najpočetnejší druh buniek v koži, budeme skúmať ich schopnosť aktivovať NVSP alebo iné vlákna inervujúce kožu.

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

V rámci tohto projektu chceme prispieť k lepšiemu pochopeniu mechanizmov histamín-nezávislej aktivácie nervových vlákien sprostredkujúcich pruritus a popísať kľúčové kroky vo vzájomnej komunikácii mastocytov a NVSP. Predpokladáme, že identifikácia a popísanie týchto procesov poskytne poznatky dôležité pre vývoj efektívnejších liečiv so špecifickým zameraním na pruritus rezistentný voči antihistaminikám. Hypotézy, ktoré predkladáme v tomto návrhu neboli nikdy doteraz skúmané a predstavujú nový zdroj poznatkov.

Očakávame, že histamín-nezávislá aktivácia NVSP je vo veľkej miere sprostredkovaná Mrg receptormi. Na základe doteraz publikovaných štúdií (12) a našich predbežných výsledkov predpokladáme, že konkrétne MrgC11 hrá kľúčovú úlohu v procese aktivácie. Očakávame, že objasníme hlavné kroky intracelulárnej signálnej dráhy nasledujúcej po aktivácii MrgC11 receptora tak ako sme to nedávno ukázali v prípade MrgA3 (1). Budeme testovať našu hypotézu, že aktivácia MrgC11 aktivuje fosfolipázu C, čo vedie k otvoreniu chloridových kanálov a efluxu chloridových aniónov do extracelulárneho priestoru. Výsledkom je depolarizácia membrány nervového vlákna a generácia akčných potenciálov.

Očakávame, že blokovanie histamínového receptora H1 a špecifický génový "silencing" kľúčového Mrg receptora zabráni aktivácii NVSP sprostredkovanej aktiváciou mastocytov.

Budeme používať zvierací model atopickej dermatitídy, kde očakávame zvýšenú odpoveď v prípade priamej aktivácie kľúčového Mrg receptora použitím agonistov, ale aj v prípade nepriamej stimulácie aktiváciou mastocytov. Predpokladáme, že Mrg receptory budú hrať kľúčovú úlohu vo vzájomnej komunikácii medzi mastocytmi a NVSP aj v modeli atopickej dermatitídy. Sme presvedčení, že realizáciou navrhnutých experimentov ponúkneme niekoľko unikátnych cieľov na vývoj nových liečiv so zameraním na pruritus rezistentný voči liečbe antihistaminikami. Naša metodika umožňuje identifikáciu molekúl v aferentných nervových vláknach, vhodných na topické použitie (priamo na kožu), čo môže byť v budúcnosti prospešné pre pacientov, keďže nebude dochádzať k interakcii s tráviacim alebo centrálnym nervovým systémom. Pruritus rezistentný voči liečbe antihistaminikami

sa vo veľkej miere vyskytuje u pacientov trpiacich atopickou dermatitídou, naše výsledky pomôžu k lepšiemu pochopeniu patologických procesov, stanovia mechanizmy interakcie mastocytov a nervových vlákien spotreďkujúcich pruritus a tým pomôžu k identifikácii nových molekulárnych cieľov na vývin efektívnych liečiv.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Myš laboratórna (Mus musculus), C57BL/6J, samce, celkový počet: 296/4roky

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

Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobu a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Tieto metódy zahŕňajú: senzitivizácia ovalbumínom (intraperitoneálna injekcia ovalbumínu), zvierací model atopickej dermatitídy (opakovaná expozícia ovalbumínu na sterilnej gáze pripevnenej na kožu), retrográdne značenie spinálnych neurónov inervujúcich kožu (v krátkodobej anestéze bez porušenia/poškodenia kožnej bariéry), transfekcia spinálnych ganglií AAV vírusovým vektorom (minimálny chirurgický zákrok v krátkodobej anestéze, ktorým sa exponuje spinálne ganglion a injektuje AAV vírusový vektor). Uvedené experimenty sú z našej skúsenosti dobre tolerované, zvieratá sa po krátkodobej anestéze dobre zotavujú, po prebudení rýchlo nastupuje motorická aktivita a po hodine sú úplne čulé so záujmom o krmivo a vodu. V prípade zvieracieho modelu atopickej dermatitídy očakávame u zvierat pocit dyskomfortu, ktorý sa prejavuje škrabaním. Tomuto fenoménu však nemôžeme predchádzať podaním liečiv na zmiernenie svrbenia, keďže by sme tým mohli ovplyvniť výsledky plánovaných experimentov.

V prípade experimentov bez možnosti zotavenia zvierat'a (disekcia kože a/alebo ganglií za účelom: extracelulárnej elektrofyziológie individuálnych nervových vlákien, jednobunkovej RT-PCR) bude usmrtenie vykonané humánnym spôsobom - inhaláciou CO₂ a následne sa vykonáva disekcia na prípravu preparátu tkaniva, kedy sa prestrihne srdce a zviera vykrváca (tkanivo je tak očistené od krvi).

Experimenty 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. Veľká pozornosť bude zameraná na adaptáciu s personálom a laboratórnym prostredím.

Keďže v rámci projektu uvažujeme s metodikami, ktoré spadajú pod strednú mieru krutosti, zvieratá budú po podstúpení takéhoto zákroku monitorované a o human end point bude rozhodnuté na základe nasledujúceho skóre:

Human end point skóre

vzhľad	Normálny	0
	Absencia čistenia srsti	1
	Piloerekcja, chvilenie sa	2
príjem potravy a vody	Normálny	0
	Prílišná telesná hmotnosť > 10-15 %	1
	Neoríjima potravu, ani vodu	2
prírodné správanie	Normálne	0
	Menej pohyblivé a pozorne, izolované	1
	Vokalizácia, sebamrzačenie, nepokojné, alebo nehybné	2
provokované správanie	Normálne	0
	Zmeny v očakávanom správaní	1
	Reaguje prudko, alebo veľmi slabou a prekomatúznou	2
	SPOLU	0-8

Podľa hodnotenia skóre:

0 - 2	norma
3 - 5	vzhľadom na názor veterinárneho lekára
6 a viac	autoneziis

Predpokladaná úroveň krutosti:

Experimenty, ktoré budú v rámci projektu vykonávané na zvieratách spadajú podľa prílohy 4 Nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.do nasledovných kategórií:

slabé:

- retrográdne značenie spinálnych neurónov inervujúcich kožu (zvieratám sa v krátkodobej anestéze sprístupní epidermis za použitia holiaceho strojčeka bez najmenšieho poranenia/poškodenia kožnej bariéry. Exponovaná epiderma sa potiera fluorescenčnou farbičkou Dil)

stredné:

- senzitivizácia ovalbumínom (opakovaná intraperitoneálna injekcia ovalbumínu)
- zvierací model atopickej dermatitidy (opakovaná expozíciou ovalbumínu na sterilnej gáze pripievanej na kožu zvierat)
- transfekcia AAV vírusovým vektorom (v krátkodobej anestéze sa vykoná minimálny chirurgický zákrok, ktorým sa exponuje spinálne ganglium a injektuje AAV vírusový vektor)

bez možnosti zotavenia:

- disekcia kože a/alebo ganglií za účelom: extracelulárnej elektrofyziológie individuálnych nervových vlákien, jednobunkovej RT-PCR

Uplatňovanie zásad 3R

Nahradenie:

Alternatívne metódy na štúdium excitability neurónov sprostredkujúcich pruritus neexistujú. Nie je možné použiť iný laboratórny živočíšny druh, pretože práve u myši boli vytvorené jedinečné geneticky modifikované kmene, ktoré sú kľúčové pre náš výskum, ale aj pre porovnanie výsledkov s inými vedeckými tímami. Prieskum databáz ukázal, že vzhľadom na komplexnosť podtypov spinálnych neurónov nie je možné použiť modelovanie ani jednoduchšie systémy (bunkové kultúry a pod.)

Redukcia:

Počet zvierat je zredukovaný na najnižší počet, potrebný na validáciu a reprodukciu výsledkov. Počet zvierat je tiež maximálne redukovaný logistikou experimentov, t.j. použitím minimálnej možnej (jednej) kontrolnej skupiny pre všetky skupiny s testovanými látkami. Ďalšie znižovanie počtu experimentov je spojené s rizikom falošne negatívnych alebo falošne pozitívnych výsledkov, ktoré by potenciálne viedli k neopodstatneným experimentom na ďalších zvieratách. Ak však v čiastkových experimentoch priebežnou štatistickou analýzou dosiahneme relevantné výsledky, je v našom najlepšom záujme znižovať plánovaný počet zvierat.

Zjemnenie:

Metodiky na elektrofyziológické, RT-PCR štúdie a značenie neurónov sa vyvíjali a vylepšovali (refinement) v období posledných 20 rokov na základe a v súlade s najnovšími poznatkami z oblasti neurofyziológie. Náš výskum sa opiera o najmodernejšie metódy štúdia nervovej aktivity, ktoré sa používajú na najprestížnejších výskumných pracoviskách na svete.

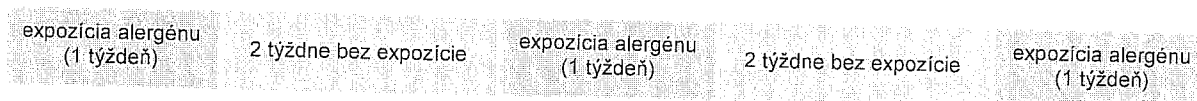
Senzitizácia ovalbumínom

Myši sú aktívne senzitivizované ovalbumínom (75µg, Sigma) s hydroxidom hlinitým (2.6 mg, Sigma) v roztoku PBS (celkový objem: 200µl). Roztok je i.p. injektovaný 3 krát (1., 3. a 5. deň) (1, 20). Senzibilizované myši sú potom umiestnené do centrálneho zverinca so štandardnou starostlivosťou v súlade s platnou legislatívou. Podávaná dávka alergénu je nízka (75µg ovalbumínu/ 1 injekciu / 1 zviera) preto neočakávame anafylaktickú reakciu. Prežívajú dobre, nestrácajú chuť do jedla, analgetiká nie sú potrebné. Zvieratá sú pre účely experimentu usmrtené týždeň od poslednej injekcie ovalbumínu.

Zvierací model atopickej dermatitídy

Budeme používať osvedčený model atopickej dermatitídy u myši. V stručnosti, patologické zmeny sú indukované opakovanou expozíciou alergénu (ovalbumínu). 100 mg ovalbumínu v 100 ml fyziologického roztoku (kontrola - len 100ml fyziologického roztoku) sú umiestnené na sterilnú gázu a pripevnené na oholenú kožu zvieraťa v celkovej anestéze (Zoletil 50). Gáza sa na kožu pripevňuje páskou, ktorá dobre prilieha na kožu. Presah pásky nad gázou je dostatočný, aby sa zaistilo dobré priliehanie a zviera si ju nestrhlo.

Expozícia alergénu prebieha počas 3 jednotýždňových intervalov, ktoré sú od seba oddelené dvojtyždňovými intervalmi bez expozície alergénu. Časový priebeh senzitizedácie znázorňuje nasledujúci obrázok:



Senzibilizované myši sú umiestnené v centrálnom zverinci so štandardnou starostlivosťou v súlade s platnou legislatívou. Zvieratá pociťujú dyskomfort v podobe svrbenia a na koži sa im objavajú prejavy atopickej dermatitídy (vazodilatácia-začervenanie kože). Spôsobený dyskomfort nie je možné znižovať podávaním liečiv, keďže by to mohlo ovplyvniť výsledky experimentu. Chuť do jedla je nezmenená, hmotnosť sa neznižuje, prežívanie zvierat nie je skrátené. Na štúdium mechanizmov nervovej činnosti nie je našim zámerom maximalizovať dráždivosť nervov, práve naopak, cieľom je jemné zvýšenie aktivity, preto neočakávame zmenu chuti do jedla, znižovanie hmotnosti alebo skrátené prežívanie. Stav myši však bude v Centrálnom zverinci denne monitorovaný a bude sa hodnotiť skóre pre human end point. Názov modelu „atopická dermatitída“ sme zvolili v projekte, aby evokoval podobnosť v humánnej medicíne.

Retrográdne značenie spinálnych neurónov inervujúcich kožu

Myšiam sa v krátkodobej anestéze (Zoletil50) v oblasti trupu oholí koža (cca 3x3cm) holiacim strojčekom. Fluorescenčná farbička Dil (0.1%) v roztoku PBS (celkový objem: 200µl) sa nanesie na vatový tampón, ktorým sa potiera obnažená epiderma. Používaná fluorescenčná farbička (Dil) je inertná - netoxická, nedochádza teda k funkčnému poškodeniu neurónov, ktoré túto farbičku do seba prijímajú endocytózou. Zvieratá sú na 2 týždne umiestnené do zverinca, kde prežívajú s najväčšou starostlivosťou. V tomto období fluorescenčná značka difunduje aferentnými axónmi z kože do spinálnych ganglií. Zvieratá sú usmrtené 2 týždne po zákroku, avšak z vlastných skúseností vieme, že prežívajú normálne, nedochádza k zhoršeniu zdravotného stavu alebo chudnutiu. Analgetiká nie sú potrebné.

Transfekcia AAV vírusovým vektorom

AAV vektory s shRNA selektívnu pre jednotlivé Mrg receptory budú počas celkovej anestézy (Zoletil 50) injektované do chirurgicky prístupných ganglií - dorsal root ganglia (T9 alebo T8), čím sa dosiahne selektívna inhibícia expresie jednotlivých subtypov Mrg receptorov. Naše doteraz publikované štúdie ukazujú, že táto metóda umožňuje selektívny a efektívny "knock-down" cieľných receptorov (23-24). Po ukončení procedúry sú zvieratá umiestnené na 8 týždňov do zverinca, kde prežívajú s najväčšou starostlivosťou. V tomto období fluorescenčná značka difunduje aferentnými axónmi zo spinálnych ganglií do nervových zakončení v koži. Keďže pre účely experimentov je potrebné, aby značenie nepoškodzovalo funkciu neurónov, chemikálie použité pre značenie sú inertné-netoxické a neinteragujú s inými zložkami v neuróne-nepoškodzujú ho - zvieratá nepociťujú bolesť - nie sú potrebné analgetiká a dobre prežívajú.

Experimenty bez možnosti zotavenia zvieraťa:

V prípade experimentov bez možnosti zotavenia zvieraťa (disekcia kože a/alebo ganglií za účelom: extracelulárnej elektrofyziológie individuálnych nervových vlákien, jednobunkovej RT-PCR) bude usmrtenie vykonané humánnym spôsobom - inhaláciou CO₂ a následne sa vykonáva disekcia na prípravu preparátu tkaniva, kedy sa prestrihne srdce a zviera vykrvára (tkanivo je tak očistené od krvi).

Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o laboratórne 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 osvedčili sa 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 pokusných zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Netechnické zhrnutie projektu - 4555/17-221

Názov projektu: Analýza bioaktívnych látok asociovaných s Myším herpetickým vírusom s antiproliferatívnymi a imunomodulačnými vlastnosťami v podmienkach *in vitro* a *in vivo*.

Kľúčové slová:

gamaherpesvírusy, MHV-68, rastový faktor asociovaný s MHV-68, nádorové bunkové línie

Účel projektu:

Základný výskum

Cieľ projektu:

Protinádorová terapia je v centre záujmu vedcov a klinikov neustále, pretože nedostatočná odpoveď niektorých typov nádorov na súčasnú liečbu je pretrvávajúcim problémom. Hľadanie nových liečebných modalít, najlepšie biologického pôvodu, je preto nevyhnutnosťou. Cieľom plánovaného projektu je charakterizovať *in vivo* profylakticko-inhibičný a terapeutický účinok bioaktívnych látok asociovaných s MHV-68 na tvorbu nádorov.

Prínos projektu:

Doteraz boli bioaktívne látky asociované s MHV-68 študované najmä v podmienkach *in vitro*, na nádorových bunkových líniách. Tieto modely však nedokážu úplne simulovať podmienky v nádorovom tkanive, ktoré okrem nádorových buniek obsahuje aj rôzne bunkové a molekulové komponenty nádorovej strômy, heterogénnu bunkovú hustotu a rôzne gradienty nutričných látok, iónov a kyslíka. Pre potvrdenie hypotézy o antiproliferačných účinkoch bioaktívnych látok asociovaných s MHV-68 je nevyhnutné študovať ich funkciu a terapeutické pôsobenie aj *in vivo*, na modeli myši s nádorovými alograftami alebo xenograftami. Tento model umožňuje dosiahnuť relatívne štandardné podmienky rastu nádorov v myšiach a sledovať terapeutický efekt rôznych látok.

Očakávame, že výsledky projektu poskytnú dôležité predklinické údaje nevyhnutné na racionálny dizajn a zdokonalenie klinických pokusov.

Počet a druh použitých zvierat:

Používať budeme myš laboratórnu, kmene BALB/c alebo NMRI.

Plánovaný počet zvierat počas pokusu je 190 ks myší.

Zvieratá budú pochádzať od schválených dodávateľov a chovateľov: ANLAB s.r.o; Vídeňská 1083; 142 20 Praha, Česká republika; 15526/2017-MZE-17214; Masarykova univerzita Brno, Kamenice č. 5, 62 500 Brno 25, číslo schválenia zariadenia / CZ -62760157/61.

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

Použité zvieratá podstúpia neinvazívne zákroky, akými sú: subkutánne podanie nádorových buniek, odoberanie moču, meranie rastu nádorov, meranie hmotnosti zvierat, humánne usmrtenie zvierat. Z invazívnych zákrokov podstúpia opakované intravenózne podávanie bioaktívnych látok, v prípade kontrolných myší opakované intravenózne podávanie placebo (fyziologického roztoku).

Nepredpokladáme, že by rast nádorov spôsobil ujmu na použité zvieratá, lebo nádory ne-metastazujú a nechajú sa dorásť maximálne do 1 cm³. Opakované intravenózne podanie bioaktívnych látok však zvieratám môže spôsobiť stres a ujmu.

Zdravotný stav myší sa bude denne kontrolovať aj v skupine kontrolných myší, aj v skupine myší s nádorom. U myší s vyvinutým nádorom budeme sledovať ich správanie, či majú zhrbený postoj,

zmenu výrazu tváre, stratu hmotnosti a u BALB/c myši aj naježenie srsti. Za human end point budeme považovať zmenu výrazu tváre podľa publikácie (Dale J Langford *et al.*, 2010: Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse, NATURE METHODS| VOL.7 NO. 6 JUNE 2010; doi:10.1038/nmeth.1455), pri získaní minimálne 4 bodov v zmene výrazu tváre bude myš utratená. Rovnako bude myš utratená v prípade straty hmotnosti nad 10 %. Myši sa usmrtia cervikálnou dislokáciou pri celkovej anestézii. Usmrtenie zvierat na konci pokusu je nevyhnutné pre získanie nádorového tkaniva a iných orgánov.

Predpokladaná úroveň krutosti: celková úroveň krutosti postupov v projekte je **stredná**.

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie:

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov. Experimentom na zvieratách predchádzali štúdie v *in vitro* podmienkach.

Obmedzenie:

Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Projekt je rozdelený do dvoch častí, pričom každá časť je zložená zo 6 čiastkových pokusov. Výsledky jedného čiastkového pokusu budú využité na optimalizáciu ďalšieho čiastkového pokusu (najmä čo do dávkovania a koncentrácie skúmanej látky). Žiaden z čiastkových pokusov nebude bezdôvodným opakovaním predchádzajúceho čiastkového pokusu. Ak získame signifikantné dáta z menšieho počtu čiastkových pokusov, nebudeme realizovať všetkých 6 plánovaných čiastkových pokusov.

Zjemnenie:

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Budú mať obohatené prostredie materiálom na stavbu hniezd a úkrytov. Podľa našich skúseností a údajov z literatúry, subkutánne nádory tohto typu, do veľkosti 1 cm³ nespôsobujú myšiam významnú zdravotnú ujmu, nakoľko nádory neprerastajú tkanivá a nemetastazujú. Neinvazívne a invazívne postupy, ako sú napr. subkutánna aplikácia nádorových buniek a intravenózna aplikácia bioaktívnych látok, predstavujú skoro bezbolestné úkony. Máme vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizáciu zvierat počas injekčných aplikácií. Zdravotný stav zvierat bude denne kontrolovaný. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. Zvieratá s vážne zhoršeným zdravotným stavom budú eutanazované.

Spätné posúdenie projektu:

Áno

Príloha č. 2
Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: *Biocementy na regeneráciu chrupkového tkaniva.*

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4650/14-221

Kľúčové slová v projekte: osteochondrálne defekt, ošipaná, biopolymérny substrát, implantácia, regenerácia, *in vivo* testovanie, biokompatibilita

Účel projektu: Základný výskum

Ciele projektu:

Cieľom postupu je sledovanie procesu regenerácie osteochondrálneho defektu kĺbovej chrupky a sledovanie biologickej integrácie inovatívneho biocementového substrátu (kalcium fosfátový samotuhnúci biocement) implantovaného do miesta osteochondrálneho defektu s okolitým, nepoškodeným tkanivom. Jedná sa o hlboké defekty, ktoré prestupujú cez hyalínnu chrupku smerom do subchondrálneho kostného tkaniva. Implantovaním fyziologicky prijateľného materiálu je možné korigovať a terapeuticky riešiť rôzne typy osteochondrálnych defektov. Použijeme spomínaný typ biocementu na riešenie osteochondrálnych defektov u ošipáných, ktoré sú funkčne, štrukturálne, klinicky aj patologicky najbližšie traumatickým poškodeniam u ľudí. Cieľom projektu je aplikácia inovatívneho biokompatibilného materiálu, ktorý bude schopný nahradiť poškodené tkanivo a ovplyvniť proces regenerácie. Zabezpečí nielen obnovu poškodeného segmentu osteochondrálneho tkaniva, ale aj navodí tvorbu štruktúrne a kvalitatívne plnohodnotnej hyalínnej chrupky. Finálnym cieľom bude redukcia symptómov vyplývajúcich z poškodenia osteochondrálneho tkaniva, zlepšenie kongruencie kĺbu rekonštrukciou kĺbového povrchu a prevencia ďalšej degenerácie kĺbovej chrupky a subchondrálneho kostného tkaniva.

Prínos z vykonaného projektu:

V oblastiach medicíny, v ktorých je potrebné implantovať do ľudského tela fyziologicky prijateľný materiál (maxillofáciálnej, regeneratívnej a rekonštrukčnej chirurgie), ako aj korigovať a terapeuticky riešiť rôzne typy osteochondrálnych defektov, sa výskum sústreďuje na prípravu materiálov s vysokou biokompatibilitou s ľudskými tkanivami. Medzi materiály spĺňajúce vyššie uvedenú charakteristiku, a ktoré majú aj ďalšie priaznivo pôsobiace vlastnosti na proces hojenia tvrdých tkanív ako sú osteoindukcia, osteokondukcia, netoxickosť patria progresívne materiály na báze kalcium fosfátov, ktoré budú použité v našich postupoch. V súčasnosti nie sú známe priame aplikácie kalcium fosfátových cementov v komplexnom

spracovaní hlbokých defektov a najmä ich vplyv na tvorbu štruktúrnej a kvalitatívnej plnohodnotnej hyalínnej chrupky. Použitý bioaktívny finálny produkt, tak ako aj jednotlivé zložky cementovej zmesi, svojimi vlastnosťami umožňujú formovanie plastickej pasty a tým je predurčený na efektívne zapĺňanie osteochondrálnych defektov vzniknutých rôznym spôsobom (úrazom, patologické zmeny atď.). Výhodou cementovej pasty na báze tetrakalcium fosfát/nanomonetit je vynikajúca viskozita a konzistencia na plnenie kostných defektov alebo foriém akýchkoľvek tvarov, čo prináša výrazný progres v riešení nerovných povrchov. Predkladaný prínos bude spočívať v dosiahnutí nových, singulárnych poznatkov týkajúcich sa terapie osteochondrálnych defektov pomocou inovatívnych biocementov a ich biokompatibility, s očakávanou plnohodnotnou regeneráciou osteochondrálneho kostného tkaniva v mieste vytvorených defektov. Tento model vzhľadom na špecifickosť a originálnu prípravu biomateriálu nie je celosvetovo dostupný a poskytne nové a unikátne poznatky v procese regenerácie osteochondrálneho tkaniva u ošípaných. Naším výskumom v predklinickom *in vivo* testovaní na zvieracom modeli ošípanej prispejeme k vytváraniu nových, excelentných terapeutických postupov v regeneračnej medicíne s následným strategickým prínosom pre humánnu klinickú prax.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V postupoch budú použité ošípané (slovenská biela ušľachtilá), v počte 20 ks na celú dobu riešenia projektu.

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

V priebehu projektu sa budú na zvieratách vykonávať zákroky, ktoré si vyžadujú anestéziu a použitie analgetík. Ošípaným vo veku 4-5 mesiacov sa navodí defekt kĺbovej chrupky v kolennom kĺbe. Ľavý kolenný kĺb bude chirurgicky sprístupnený z ľavej laterálnej strany, rez bude vedený od mediálneho patelárneho väzu distálne k tibiálnej drsnatine. Kolenný kĺb bude sprístupnený nad záťažovou plochou mediálneho kondylu stehrovej kosti. Poruší sa subkutánne väzivo a povrchová fascia. Osteochondrálne defekty budú vykonané v oblasti distálnej epifýzy (ľavý mediálny kondyl) o priemere 8 mm a hĺbke 10 mm. Miesto vytvoreného defektu sa následne vyplní novou, originálne pripravenou biocementovou pastou. Organizmus sa vyznačuje schopnosťou resorbovať a remodelovať kalcium fosfáty, najmä s nanokryštalickým až amorfným charakterom prakticky bez akýchkoľvek sekundárnych účinkov alebo lokálnych zápalových procesov po implantácii. Navyše výrazné zníženie hodnoty pH v počiatočných fázach tuhnutia zabezpečuje dostatočne vysokú hodnotu z hľadiska antimikrobiálneho pôsobenia po aplikácii a zároveň znižuje intenzitu dráždenia okolitých tkanív. Po celú dobu vykonávania operačného zákroku budú zvieratá monitorované. Po jeho ukončení sa podajú analgetiká a zvieratám bude poskytnutá veterinárna starostlivosť v súlade s podmienkami vedenia anestézie a starostlivosti o pacientov v pooperačnom období.

Proces regenerácie osteochondrálneho tkaniva bude sledovaný počas 3 mesiacov po implantácii. Zároveň sa bude v pravidelných intervaloch analyzovať stupeň funkčného vylepšenia. Čas prežívania zvierat zaradených do postupu sa upraví v závislosti od ich

aktuálneho funkčného stavu. V priebehu postupu sa zvieratám nebude spôsobovať zbytočný strach, bolesť a utrpenie. So všetkými zvieratami sa bude manipulovať, budú umiestnené a poskytnú sa im starostlivosti v súlade s požiadavkami uvedenými v nariadení vlády SR č. 377/2012.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Na základe posudzovaných faktorov navrhujeme krutosť postupov označiť ako „strednú“.

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Vázenie zvierat	Krátkodobý stres spôsobený manipuláciou zvierat. Bolesťivosť žiadna. Dĺžka úkonu 1-2 min.
Intravenózna aplikácia liečiv	Štandardná metóda. Krátkodobý, minimálny stres. Bolesť slabá, minimálna, dĺžka úkonu 30-60 sekúnd.
Intramuskulárna aplikácia liečiv	Štandardná metóda. Krátkodobý stres spôsobený manipuláciou s obmedzením pohybu. Bolesť slabá, dĺžka úkonu 10-30 sekúnd.
Odber krvi	Štandardná metóda. Pre odber krvi sa použije žila v. <i>cava cranialis</i> . Je to krátkodobý stres spôsobený manipuláciou s obmedzením pohybu. Bolesť stredná, dĺžka úkonu 30-60 sekúnd.
RTG vyšetrenie	Krátkodobý stres spôsobený manipuláciou s obmedzením pohybu. Bolesť vzhľadom na aplikáciu sedatívnych látok i.m. - stredná, dĺžka úkonu 10 minút.
Palpačné vyšetrenie kolenného kĺbu	Krátkodobý stres spôsobený manipuláciou s obmedzením pohybu. Bolesť slabá, dĺžka úkonu 1,5-2 minúty.
Chirurgický zákrok	Krátkodobá anestézia v trvaní maximálne do 20 minút. Artrotomicky bude sprístupnený ľavý kolenný kĺb a po navodení traumatického poškodenia kĺbovej chrupky bude/nebude defekt chrupky vyplnený biocementom. Bolesť vzhľadom na aplikáciu sedatívnych látok i.m. – stredná, pri aplikácii anestézie slabá.
Monitorovacie obdobie	Každých 24 hodín po dobu 7 dní po zákroku budú zvieratám podávané antibiotiká a protizápalové lieky. V postoperačnom a monitorovacom období (3-mesačné prežívanie po zákroku) bude do 1. mesiaca 2x denne zaznamenávané hodnotenie celkového zdravotného stavu, telesná teplota, konzistencia trusu, hodnotenie bolestivosti a hodnotenie stupňa krívania. Vzhľadom na prevedenie a dĺžku úkonov je bolestivosť stredná

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Vykonalí sme *in vitro* testovanie cytotoxicity pripraveného biocementu pomocou chondrocytov a osteocytov, ako alternatívy k zvieracím modelom. Výsledky štúdia *in vitro* cytotoxicity na uvedených cementoch jasne preukázali necytotoxickosť cementov a ich extraktov v zmysle normy STN EN ISO 10993-6 ako aj zvýšenie biologickej aktivity osteoblastov. V projekte sa ale jedná o technicky nové riešenie a väčšia časť postupov by bola použitím alternatívnych metód nehodnotiteľná, pretože závisí na mnohých endogénnych aj exogénnych faktoroch. Vzhľadom k týmto skutočnostiam a nevyhnutnému finálnemu testovaniu fyziologických a patofyziologických účinkov, nie je možné vykonať experimenty zamerané na analýzu procesov hojenia osteochondrálnych defektov alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat. Zvažovali sme použitie malých hlodavcov a kráľíka ako zvieracieho modelu, avšak zloženie a štruktúra osteochondrálneho tkaniva, veľkostné parametre, hrúbka chrupky, spôsob a rýchlosť regenerácie, fyziologické pomery (charakter rastovej platničky), ako aj záťaž v oblasti kolenného kĺbu nezodpovedajú podmienkam zvieracieho modelu s ohľadom na vlastnosti osteochondrálneho tkaniva u ľudí. Z týchto dôvodov bola ako modelové zviera zvolená ošípaná, ktorá vykazuje podobnú štrukturálnu charakteristiku a rýchlosť regenerácie ako osteochondrálne tkanivo u človeka.

2. Redukcia počtu zvierat:

Postup je naplánovaný tak, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov maximalizované množstvo výstupných informácií s použitím minimálneho počtu zvierat. V postupe bude použitých 20 ks zvierat. Budú zostavené a testované 2 skupiny (experimentálna skupina – 15 ks a kontrola – 5 ks), čo je minimálny počet zvierat pre štatistické vyhodnotenie a získanie štatisticky relevantných výsledkov. Zároveň musíme prihliadnuť na úspešnosť modelu, ktorá sa môže znižovať počas dlhodobého prežívania (3 mesiace).

3. Zjemnenie:

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

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie