

Netechnické zhrnutie projektu – Aktualizované NXP

Názov projektu: Oxid dusnatý v mozgovej kôre: od génov k schizofrénii

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: Č.k. Ro-591/17-221

Kľúčové slová: oxid dusnatý, sociálna izolácia, prepulzná inhibícia

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu:

Cieľom projektu bolo prispieť k objasneniu úlohy signalizácie oxidom dusnatým (NO) v patofyziológii schizofrénie. V animálnom modeli schizofrénie založenom na chove potkanov v sociálnej izolácii bolo cieľom preskúmať súvislosť medzi tvorbou NO v mozgu, redoxnou rovnováhou v mozgovom tkanive, GABAergicou signalizáciou, a zmenami v správaní zvierat, ktoré sú podobné príznakom schizofrénie.

Prínosu projektu:

Projekt preukázal, že u zvierat chovaných v sociálnej izolácii odchádza k zníženiu tvorby NO avšak zvýšeniu oxidačného stresu, ktoré sú sprevádzané zmenami v správaní, predovšetkým zníženou efektivitou senzorimotorického gatingu, považovanou za endofenotyp schizofrénie. Biochemické a molekulárne-biologické analýzy potvrdili úlohu NO a porušenej redoxnej rovnováhy v procesoch vedúcim k patologickým behaviorálnym príznakom, ktoré sú relevantné pre výskum duševných porúch u človeka. Medzikmeňové rozdiely v efekte dĺžky izolácie poukazujú na význam tak konštitučnej vulnerability ako aj kumulatívneho pôsobenia negatívnych faktorov prostredia, predovšetkým chronického stresu, pre navodenie patologických zmien. Podotýkame, že vzorky získaných tkanív budú predmetom ďalších analýz aj v nasledujúcom období, pričom pevne veríme, že odhalíme ďalšie neurobiologické zmeny, relevantné pre patogenézu schizofrénie. Výsledky tohoto projektu prispievajú k pochopeniu patofyziológie schizofrénie a môžu byť v budúcnosti využité pri vývoji nových diagnostických a prognostických metód a hľadanií nových terapeutických možností.

Počet a druh zvierat

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*) kmeň Sprague – Dawley 80 ks, kmeň Wistar Kyoto 80 ks

Úroveň krutosti

stredná (10-týždňová izolácia), krutá (29-týždňová izolácia, 20 zvierat)

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Zatiaľ neexistuje alternatívna metóda, ktorá by nahradila experimentálne zvieratá. Dokumentuje to tiež Príloha IV. (Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznávaných alternatívnych metód). Pre sledovanie nami vytýčených cieľov bol najvhodnejším modelom laboratórny potkan. V projekte sme zvolili dva kmene potkanov s rozdielnou predispozíciou k behaviorálnym príznakom podobným schizofrénii. Porovnania kmeňov poskytli jedinečné informácie, ktoré je možné získať iba in vivo.

2. Redukcia počtu zvierat:

V experimente bol použitý optimálny počet experimentálnych zvierat tak, aby bol experiment štatisticky vyhodnotiteľný a závery všeobecne prijateľné.

3. Zjemnenie:

V experimente sme dbali na citlivú manipuláciu so zvieratami. Na konci chovu boli zvieratá humanne usmrtené. Najskôr sa vystavili pôsobeniu oxidu uhličitého v uzavretej nádobe až do straty vedomia a v hlbokom bezvedomí boli následne dekapitované, odkrvené a po otvorení lebky, hrudnej a brušnej dutiny boli odobraté príslušné orgány na biochemické a molekulárne biologické analýzy.

Netechnické zhrnutie projektu - *AKTUALIZÁCIA pri spätnom posúdení*

Názov projektu: Regenerácia špecifických regiónov mozgu dospelých spevavcov skúmaná pomocou in vivo magnetickej rezonancie

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1431/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): striatum, MRI, dopamínový D3 receptor, neurogenéza, BDNF

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:

Zistiť funkciu novovzniknutých neurónov v striatálnej vokálnej oblasti Area X:

1/ Otestovať a optimalizovať metódu MRI pre vizualizáciu vokálnej oblasti Area X v striate a pre jej vizualizáciu spolu s neurotoxickou léziou u samcov zebričky červenožltej. Otestovať rozlíšenie, dobu pobytu experimentálneho spevavca v magnetite spolu s optimalizáciou MR impulzných sekvencií a validovať presné opakovanie skenov v určenej oblasti mozgu v dlhšom časovom intervale. Porovnať s metódou lokalizovanej 1H MR spektroskopie (MRS; hlavne N-acetylaspartátu, glutamátu, glutamínu, taurínu, creatínu, cholínu a laktátu).

2/ Porovnať veľkosť lézie Area X nameranej pomocou MRI so skutočnými hodnotami až do 6 mesiacov. Vyhodnotiť MRI mapy v oblasti záujmu a validovať výsledky MRI pre výpočet veľkosti lézie (pomocou T2 máp aj pomocou difúzne vážených obrazov, DWI).

3/ Určiť úlohu regenerujúcej sa Area X pre spev u dospelých vtákov. Využiť MRI, prípadne aj MRS, pre kontinuálnu identifikáciu zmien v regenerovanej Area X a korelovať ich so zmenami v speve, hlavne v tempe a v opakovaní slabík.

4/ Určiť vplyv elektrolytickej lézie Area X bez následnej regenerácie na spev u dospelých vtákov.

Využiť MRI a MRS pre sledovanie regenerácie mozgu. Sledovať mechanizmus vplyvu dopamínových D3 receptorov (D3R) na regeneráciu mozgu po neurotoxickom poškodení:

1/ Zistiť vplyv lézie na expresiu BDNF, jeho receptorov TrkB a na expresiu D3R receptorov v neurogénnej subventrikulárnej zóne (SVZ) a v nepoškodenom striate.

2/ Zistiť vplyv farmakologickej manipulácie D3R na expresiu BDNF a TrkB receptorov v SVZ a v striate. Výsledky porovnať s MRI mapami a kvantifikáciou dôležitých mozgových metabolitov získaných z lokalizovanej 1H MRS.

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

Zvýšená neurogenéza v dôsledku lézie bola zistená u cicavcov aj u vtákov. U cicavcov však obnova striata po poškodení predstavuje maximálne 0,2-1 % v závislosti na type poškodených neurónov, zatiaľ čo podľa našich výsledkov je obnova Area X v striate spevavcov takmer úplná. Nahrádzovanie stratených alebo nefunkčných neurónov novými má potenciál v medicíne. Preto štúdium mechanizmov tejto obnovy u spevavcov môže byť prínosom pri hľadaní stratégií novej obnovy mozgu po poškodení.

Druhou nemenej dôležitou súčasťou tohoto projektu je spojenie sledovania regenerácie mozgu po poškodení prostredníctvom MRI a MRS spolu so sledovaním zmien v speve u toho istého jedinca. Technika in vivo zobrazovania magnetickej rezonancie MRI a MRS poskytuje veľmi cenné a kvalitné neurochemické, fyziologické, anatomické, štrukturálne a v posledných rokoch rozvojom funkčného zobrazovania fMRI aj funkčné informácie v živých systémoch. V závislosti od zvolených parametrov nastavených pri meraní dokáže MRI zviditeľniť rôzne vlastnosti meraného tkaniva, napríklad štruktúru orgánov, v našom prípade mozgu, na základe rôznych vlastností vody v ňom obsiahnutej (T1 a T2 vážené obrazy), perfúziu a difúziu tekutín (perfúzne a difúzne vážené obrazy – PWI a DWI), spojenie nervových dráh (traktografia) a mnohé iné. Ďalšou výhodou magnetickej rezonancie je jej nedeštruktívna povaha. To umožňuje opakované merania v čase na tom istom jedincovi, čo predstavuje novú dimenziu štúdia neurogenézy, ktorá sa vyvíja v dlhom časovom intervale. Veľký prínos predstavuje výskum magnetickej rezonancie in vivo na zvieracích modeloch, pretože umožňuje rôzne opakované merania, či už obrazové alebo spektroskopické, a tým dáva možnosť sledovať vývoj namodelovaného patologického stavu (v našom prípade lézie vytvorenej pomocou neurotoxínu) ako aj účinky zvolenej terapie. Už len samotná možnosť kontinuálnej kontroly obnovy mozgu predstavuje prínos z hľadiska technického (jednoznačné určenie polohy a veľkosti lézie od začiatku experimentu) aj etického (menšie množstvo použitých jedincov). V projekte sa nám podarilo optimalizovať a validovať metódu MRI pre vizualizáciu vokálnej oblasti Area X v striate u samcov zebričky červenozobej. V spojení s behaviorálnou analýzou tieto výsledky potvrdzujú hypotézu o funkcii Area X pre načasovanie spevu, a tiež o funkcii nových neurónov v Area X spevavcov pre kontrolu plynulého vokálneho prejavu.

Je známe, že neurotransmitter dopamín je jedným z modulátorov neurogenézy. V projekte sme sledovali mechanizmus vplyvu dopamínových D3 receptorov (D3R) na regeneráciu mozgu po neurotoxickej lézii Area X. Zistili sme, že oblasť regeneruje rýchlejšie po aktivácii D3R a blokovanie D3R naopak spomalilo regeneráciu. Neurotoxické poškodenie pritom zvýšilo expresiu D3R v neurogénnej subventrikulárnej zóne. Predpokladáme teda, že poškodenie mozgu zvýši hustotu D3R v neurogénnej oblasti, čo následne spôsobuje zrýchlenú regeneráciu. Tieto výsledky prispeli k objasneniu mechanizmu vplyvu dopamínergického systému na neurogenézu a obnovu mozgu po poškodení.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

zebrčka červenozobá (*Taeniopygia guttata*), 80 samcov a 15 samíc

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

Nepriaznivý vplyv operácie alebo umelého spánku počas MRI meraní na zvieratá sme nezistili. Zebričky sa po operácii aj anestéze pre MRI zotavili pomerne rýchlo, približne 5 min po odstavení od anestézy. Farmaká neovplyvnili správanie, okrem variability slabík piesne. Izolácia v zvuk izolujúcich boxoch obmedzila typy správania, ktoré mohol samec vykonávať, hlavne pohyb a sociálny kontakt. Frekvencia spievania nebola ovplyvnená časom stráveným v boxe.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Operácie, podávanie farmák a MRI budú vykonávané v celkovej anestézii, po ktorej zviera nadobudne vedomie, a klasifikujú sa ako „slabá krutosť“. Váženie, prežívanie s minipumpou, intramuskulárne podanie BrdU, prevoz na MRI a podanie letálnej dávky anestetika boli klasifikované ako „slabá krutosť“. Transkardiálna perfúzia sa klasifikuje ako „bez možnosti zotavenia“. Izolácia experimentálnych zvierat od ostatných zvierat bola klasifikovaná ako „krutá“.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Celý projekt bol zameraný na nahradzovanie a obmedzenie počtu zvierat v experimentoch. Metóda MRI umožňuje kontinuálne sledovanie lézie alebo obnovy mozgu u toho istého zvierat'a, a teda ich počet je v porovnaní s použitím len histologických metód značne redukovaný.

Keďže pokus bol primárne zameraný na sledovanie obnovy striatálnej časti mozgu po poškodení s perspektívou výstupu na človeka, nie je možné realizovať pokus na bunkových kultúrach, pretože u týchto sa mozog nevyskytuje. Alternatívne nahradenie vtáčieho modelu nižšími stavovcami alebo cicavcami tiež nie je možné, nakoľko zvýšená miera neurogenézy a obnova striata u týchto modelov nebola doteraz pozorovaná.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počty zvierat boli minimalizované na najmenšiu možnú hranicu, aby mali získané údaje akceptovateľnú výpovednú hodnotu a bolo možné štatisticky ich vyhodnotiť.

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)

Zebrička červenozobá je výhodná pri štúdiu naučenej vokálnej komunikácie kvôli veľkosti, rýchlemu dospievaniu a rozmnožovaniu v zajatí, typu naučenej piesne, a tiež kvôli tomu, že sú u nej výborne popísané mozgové okruhy kontrolujúce spev. Jej použitie v experimentoch je preto jasnou výhodou v porovnaní s použitím iných druhov učiach sa vokálne komunikovať, ako sú veľryby alebo papagáje (hlodavce túto schopnosť nemajú). Zvieratá počas samotného pokusu neboli vystavené strádaniu a utrpeniu. Vodu a potravu mali k dispozícii ad libitum. Boli chované v štandardných podmienkach. Počas operácie boli uspaté zmesou kyslíka a izofluránu, ktorý umožňuje rýchlejšie prebudenie po operácii a aj lepšiu rekonvalescenciu než iné anestetiká. Pred transkardiálnou perfúziou bola zvieratám podaná letálna dávka izofluránu, čím sa minimalizovalo ich utrpenie na najnižšiu možnú mieru. Počas izolácie samcov im bol dva razy za týždeň na dva dni umožnený kontakt so samičkou, čo pomohlo zmierniť negatívny dopad izolácie.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

AKTUALIZOVANÉ NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu:

Kombinovaná štúdia toxicity po opakovanom podaní so skríningovým testom reprodukčnej/vývojovej toxicity (OECD 422).

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: Ro-1751/17-221

Kľúčové slová v projekte:

Toxicita po opakovanom podaní, reprodukčná toxicita, REACH

Účel projektu: Aplikovaný výskum

Ciele projektu:

Cieľom projektu (štúdie) bolo poskytnúť podklady pre posúdenie bezpečnosti chemickej látky z hľadiska schopnosti vyvolať toxickú reakciu organizmu po opakovanom podaní látky a odhaliť potenciálne negatívne vplyvy na reprodukčné parametre podľa metódy OECD 422.

Prínos z vykonaného projektu:

Experiment poskytol v plnom rozsahu informácie, ktoré sú v tomto teste z hľadiska platnej legislatívy REACH pre látky produkované v množstve do 100 ton/rok požadované. Pokusná a pozorovacia stratégia boli jednoznačne dané metodikou OECD 422, ktorá je alternatívou pre testy Reprodukčnej skríningovej toxicity (OECD 421) a 28-dňovej toxicity (OECD 407) kde sa sledujú nielen reprodukčné parametre testovaných zvierat, ale robí sa aj hematologické a biochemické vyšetrenie krvi, vyšetrenie moču, patológia a histopatológia.

Na základe výsledkov štúdie boli stanovené hodnoty NOAEL pre reprodukčnú a systémovú toxicitu.

Prínosom tejto štúdie bolo včasné rozpoznanie toxicity skúšanej látky a zabránenie negatívnych vplyvov na organizmus.

Druhy použitých zvierat a ich počty:

Bolo použitých 70 samcov a 82 samíc potkanov Wistar a narodilo sa 364 mláďat

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

Bolo zabezpečené aby akékoľvek zhoršenie zdravotného stavu zvierat bolo konzultované s veterinárnym lekárom a tieto zvieratá v prípade ťažkých stavov by boli humánne utračené.

V pilotnom pokuse, v ktorom sa vyberali dávky pre hlavný pokus boli zaznamenané úhyny zvierat ako dôsledok podania testovanej látky. Keďže v štúdii s opakovaným podaním by minimálne jedna testovaná dávka mala spôsobiť toxické účinky aby sa dali indikovať potenciálne cieľové miesta pri intoxikácii, museli byť do pilotného pokusu zaradené aj dávky, ktoré sú letálne. Zaznamenané úhyny boli bez predchádzajúcich príznakov zhoršenia stavu.

Klinické príznaky pozorované pri nižších dávkach neboli dôvodom pre humánne usmrtenie nadmernou dávkou anestetika.

V hlavnom pokuse neboli zaznamenaný úhyn spôsobený testovanou látkou. Všetky zvieratá preživali bez akýchkoľvek príznakov toxicity, bez zmien zdravotného stavu a správania.

Úroveň krutosti:

Pokus bol pri plánovaní hodnotený ako stredne krutý až krutý vzhľadom na to, že išlo o doposiaľ netestovanú látku nedala sa vylúčiť systémová reakcia, ktorá by bola kategorizovaná ako krutá.

Vzhľadom na výsledky, experiment je možno vyhodnotiť ako stredne krutý, keď stredne kruté boli hodnotené úkony ako odber krvi a denná aplikácia gravidných samíc.

Uplatňovanie zásad 3R

V projekte boli zohľadňované zásady 3R. V pokuse neboli vykonané bolestivé zákroky, pri ktorých je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť.

Počty zvierat v pokuse boli primerané, redukované v maximálnej miere tak, aby sa nemohla ovplyvniť validita pokusu vychádzajúc z pravidiel OECD 422.

Netechnické zhrnutie projektu po spätnom posúdení

Názov projektu: Štúdium farmakokinetiky nového typu adjuvansu.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: Ro-660/17-221c

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): vakcína, adjuvans, imunogénna aktivita, protilátky

Účel projektu*: translačný alebo aplikovaný výskum v záujme dosiahnutia prevencie, chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka a zvierat pri vývoji a testovaní kvality, účinnosti a bezpečnosti liekov

Opísať ciele projektu: Projekt bol zameraný na overenie účinnosti antirabickej vakcíny s využitím nového typu adjuvansu proti besnote a ďalším lyssavirusovým infekciám, ako aj možnosti jej ovplyvnenia. Projekt bolo nevyhnutné vykonať v laboratórnych podmienkach na laboratórnych zvieratách, ktoré sú jediným modelom umožňujúcim sledovať detailný vývoj imunitnej odpovede na vpravený protekčný antigén, ktorý je potencovaný novým typom adjuvansu. Laboratórne myši sú najvhodnejším modelom na získanie relevantných štatisticky vyhodnotiteľných výsledkov.

Prínos z vykonaného projektu: V projekte bola overená účinnosť antirabickej vakcíny s využitím nového typu adjuvansu. Imunogénna aktivita vakcín bola hodnotená s v porovnaní s referenčnou antirabickou vakcínou o známej hodnote medzinárodných jednotiek. Výsledky projektu jednoznačne potvrdili, že vakcína s novým typom adjuvansu má vyššiu imunogénnu aktivitu ako iné porovnávané vakcíny. V praxi to znamená, že po testovaní na cieľových druhoch zvierat a patentovaní výsledku bude možné skvalitniť profylaxiu proti lyssavirusovým infekciám u hospodárskych a spoločenských zvierat.

Druhy použitých zvierat a ich počty: myši – outbredné, kmeň ICR, 10-12 gramové (4-6 týždňové), samice, 335 jedincov

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

1. časť projektu – Stanovenie protektívnej aktivity antirabických vakcín (metóda NIH na myšiach)

Zvieratá boli imunizované intraperitoneálne jednorazovou aplikáciou, čo je zákrok nebolestivý a nevyžadoval si použitie analgetík. Zvieratá na 14. deň po vakcinácii boli intracerebrálne čelenžované lyssavirusovým kmeňom, resp. kmeňom CVS; pri čelenži bola použitá krátkodobá sedácia s použitím ketamínu v dávke 80-100mg/kg intraperitoneálne. Aplikáciu vykonal zmluvný veterinárny lekár zariadenia. Po čelenži boli zvieratá pravidelne minimálne 2x denne kontrolované, posudzoval sa ich zdravotný stav a welfare. Príznaky sa zaznamenávali do tabuľky, ak sa objavili zježená srst', neistý pohyb, tras, chvenie, krčce, chudnutie a oddeľovanie sa od skupiny, bolo to považované za indikátorom letálneho výsledku besnoty. Takéto zvieratá boli okamžite humánne utratené cervikálnou dislokáciou, čím sa predišlo rozvinutiu ďalších príznakov besnoty, ako parézy a paralýzy a nástupu moribundného stavu. Ani jedno zviera nedospelo do 4. klinického štádia, čím sa predišlo silnému utrpeniu a bolesti. Zvieratá, ktoré prežili čelenž, boli humánne usmrtené cervikálnou dislokáciou na 28. deň po čelenži.

2. časť projektu - Sledovanie vplyvu beta-karoténu na antigénny účinok antirabickej adjuvantnej vakcíny

body humánneho ukončenia. Zvieratá s príznakmi parézy, paralýzy a/alebo krčv boli v našom experimente humánne utratené a považované za mŕtve v dôsledku besnoty. Tým sa výrazne obmedzila doba utrpenia a bolesti. Zjemnenie sa dosiahlo aj sedáciou pred aplikáciou technikou intracerebrálnej injekcie, ktorú vykonal veterinárny lekár v súlade so správnu praxou.

Myši v 2. časti projektu boli imunizované subkutánne jednorázovou aplikáciou, čo je zákrok nebolestivý a nevyžaduje si použitie analgetík. Na 7., 14., 21., 28., 60. a 90. deň po vakcinácii bola myšiam odoberaná krv na stanovenie hladiny špecifických protilátok. Zvieratá sa utratili rýchlou dekapitáciou (čo je v súlade s prílohou č.5 NV 377/2012) a boli vykŕvené na získanie séra.

Projekt bol spätne posúdený po skončení v súlade s § 37 bodom 2) NV 377/2012 z dôvodu využitia postupu klasifikovaného ako „krutý“. Dodržiavaním zásad 3R sa podarilo u väčšiny zvierat znížiť stupeň krutosti na slabú až strednú, iba u 50 zvierat bola krutosť hodnotená ako silná.

Príloha č. 5

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Vplyv experimentálne vyvolaného poškodenia pľúc na extrapulmonálne orgány

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4857/14-221

Kľúčové slová v projekte (max. 5 slov): poškodenie pľúc, zápal, protizápalová liečba, kardiomyopatia, hepatopatia

Účel projektu: Základný výskum s cieľom zabránenia, prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka alebo zvierat alebo ich účinkov na ľudí alebo zvieratá.

Informácie o cieľoch projektu:

Cieľom projektu je overiť hypotézu, že primárne poškodenie pľúc môže viesť aj k nežiaducim zmenám extrapulmonálnych orgánov (srdca a pečene), čo môže zhoršiť prognózu pacientov. Postihnutie srdca a pečene sa môže prejaviť zvýšením hladín špecifických markerov poškodenia v plazme ako aj zvýšením markerov poškodenia priamo v ich tkanive. Poruchy srdcovej činnosti určíme analýzou zmien tlaku krvi a frekvencie srdca. Prípadné morfológické zmeny v srdci a pečeni stanovíme imunohistochemicky. V projekte plánujeme použiť modely akútneho poškodenia pľúc vyvolané lavážou pľúc fyziologickým roztokom a podaním mekónia u králikov a model hyperreaktivity dýchacích ciest podobný bronchiálnej astme, ktorý navodíme senzibilizáciou ovalbumínom u morčiat. Po vytvorení experimentálnych modelov ochorení podáme protizápalovú liečbu, po ktorej očakávame zlepšenie nielen pľúcnych funkcií, ale aj pozitívny efekt na extrapulmonálne orgány.

Predpokladaný vlastný prínos projektu:

Závažné poškodenie pľúc, či už akútne alebo chronické, môže spôsobiť zápalové, apoptotické a nekrotické zmeny extra-pulmonálnych orgánov a tiež poruchu ich funkcie. Projekt prinesie nové informácie o zmenách zápalových, oxidačných a apoptotických markerov v pľúcnom tkanive, tkanive srdca a pečene vrátane analýzy plazmatických hladín liečiv apod. na modeloch akútneho poškodenia pľúc a modeli bronchiálnej astmy, ako aj informácie o zmenách súvislosti s podaním protizápalovej liečby. V prípade závažného poškodenia pľúc, ktoré môže byť samo osebe kritickým stavom, môže kardiálna, hepatálna alebo renálna insuficiencia predstavovať faktor bezprostredne ohrozujúci život. Včasná diagnostika týchto zmien a podanie vhodnej liečby tak priamo ovplyvňujú prognózu pacientov.

Počet a druh zvierat:

Králik domáci (*Oryctolagus cuniculus*, kmeň novozélandský biely), samec, 104 jedincov
Morča domáce (*Cavia porcellus*, kmeň TRIK), samec, 64 jedincov

Predpokladaná ujma na zvieratách:

Modely akútneho poškodenia pľúc: Po privezení zo zverinca a aklimatizácii na podmienky prostredia v laboratóriu je králikom šetrným spôsobom a bez vyvolávania zbytočného stresu intramuskulárne podaná kombinácia anestetík/analgetík, následkom čoho zviera v priebehu niekoľkých minút stratí vedomie. Všetky ďalšie výkony sú realizované v celkovej anestéze zvieraťa, ktorá je počas celého postupu zabezpečená kontinuálnym podávaním anestetika intravenózne injekčnou pumpou. Po skončení postupu zvieraťa v bezvedomí podáme i.v. letálnu dávku anestetika.

Model „bronchiálnej astmy“ navodíme opakovanou senzibilizáciou morčiat ovalbumínom. Kontrolným nesenzenzibilizovaným skupinám v uvedených časových intervaloch podáme sterilný fyziologický roztok zodpovedajúcich objemov. Po vytvorení modelu intraperitoneálne podáme liečbu, a to denne 15.-21. deň, na 21. deň opakovaná expozícia OVA a následné usmrtenie zvierat podaním letálnej dávky anestetika i.p. Senzibilizácia ovalbumínom, podanie liečby ako aj ukončenie postupu letálnou dávkou anestetika sa bude realizovať priamo v časti zverinca vyhradenej na takéto zákroky. Zvieratá neopustia známe priestory, čím budeme minimalizovať stres zvierat.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Modely akútneho poškodenia pľúc: Krutosť postupov v tejto etape projektu hodnotíme ako „slabú“/„bez možnosti zotavenia“, nakoľko zviera v bdelom stave je podrobené len jednému rýchlemu intramuskulárnemu vpichu tenkej injekčnej ihly pri podaní anestetika, ostatné výkony vrátane eutanázie sú realizované v celkovej anestéze zvieraťa.

Model „bronchiálnej astmy“: Krutosť postupov v tejto etape projektu hodnotíme ako „strednú“, nakoľko pri vyvolávaní modelu „bronchiálnej astmy“ sú zvieratá v bdelom stave podrobené opakovanému intraperitoneálnemu alebo subkutánnemu vpichu resp. inhalačnému podaniu ovalbumínu, ako aj intraperitoneálnemu podávaniu liečiv. Zároveň je potrebné zohľadniť zhoršený stav prežívajúcich zvierat s modelom „bronchiálnej astmy“. Vzhľadom na druh ujmy (vyvolanie respiračného ochorenia) je možné predpokladať, že zvieratá môžu reagovať zmenou správania (môžu byť izolované od skupiny, menej pohyblivé, nemať záujem o okolie), môžu mať nižší príjem potravy a vody, môže sa objaviť zježenie srsti a pod.

Klasifikácia krutosti postupov projektu celkovo: „stredná“.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Nahradenie (Replacement): Postupy projektu nie je možné vykonať bez použitia zvierat. Štúdium zmien po vytvorení modelov respiračného poškodenia a účinkov rôznych typov liečby sa v súčasnosti realizuje prevažne na králikoch, potkanoch a morčatách. Čiastkové výsledky je možné získať aj štúdiom zmien na myšiach, táto metodika však nie je pre nás vhodná, nakoľko je technicky a prístrojovo podstatne náročnejšia, dochádza pri nej k väčšiemu úhynu zvierat a výťažnosť výsledkov je neporovnateľne nižšia ako pri postupoch na králikoch, potkanoch alebo morčatách. Postupy nie je možné nahradiť ani *in vitro* metódami, ani použitím počítačových simulácií. Použitie králikov pre vytvorenie modelov akútneho poškodenia pľúc a morčiat pre vytvorenie modelu bronchiálnej astmy je optimálnym riešením pre dosiahnutie cieľov projektu.

Obmedzenie (Reduction): Na získanie validných výsledkov použijeme 8 zvierat v každej skupine, čo považujeme za najnižší možný počet tak z hľadiska reprodukovateľnosti, ako aj z hľadiska získania nevyhnutných údajov a objektívne hodnotiteľných výsledkov. Menší počet zvierat v jednotlivých skupinách by mohol zvýrazniť pôsobenie inter-individuálnych rozdielov s možnosťou spochybnenia objektívnosti výsledkov.

Zjemnenie (Refinement):

Príprava modelov akútneho poškodenia pľúc sa u králikov realizuje v celkovej anestéze, pričom bezvedomie zvierat'a je počas celého postupu zabezpečené kontinuálnym podávaním anestetika a stupeň bezvedomia je priebežne kontrolovaný. Po skončení postupu zvierat'u v bezvedomí podáme i.v. letálnu dávku anestetika. Všetky výkony vrátane podávania liečby a eutanázie sú realizované v celkovej anestéze zvierat'a.

Príprava modelu bronchiálnej astmy sa u morčiat v bdelom stave realizuje opakovaným podávaním ovalbumínu i.p., s.c. alebo inh. podľa protokolu postupu. Po vytvorení modelu podáme liečbu i.p., a to denne 15.-21. deň, na 21. deň opakovaná expozícia OVA a následné usmrtenie zvierat podaním letálnej dávky anestetika. Senzibilizácia ovalbumínom, podanie liečby ako aj ukončenie postupu letálnou dávkou anestetika sa bude realizovať priamo v časti zverinca vyhradenej na takéto zákroky. Zvieratá neopustia známe priestory, čím budeme minimalizovať stres zvierat.

Vzhľadom na druh ujmy (vyvolanie modelu bronchiálnej astmy) je možné predpokladať, že morčatá môžu reagovať zmenou správania (môžu byť izolované od skupiny, menej pohyblivé, nemať záujem o okolie), môžu mať nižší príjem potravy a vody, môže sa objaviť zježenie srsti a pod. Stav zvierat bude pravidelne monitorovaný vedúcim projektu alebo inou poverenou, odborne spôsobilou osobou. Za účelom hodnotenia welfare zvierat'a použijeme stupnicu hodnotenia vzhľadu, príjmu potravy a vody, klinických príznakov, prirodzeného a provokovaného správania. V prípade zhoršenia zdravotného stavu zvierat'a, ktoré presahuje mieru očakávaného zhoršenia stavu v súvislosti s vyvolávaným ochorením, počas realizácie postupu vedúci projektu na základe výsledného human end-point skóre a po konzultácii s veterinárnym lekárom rozhodne o humánnom ukončení postupu eutanáziou.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

„Vplyv stravy bohatej na tuky na fyziológiu neurónov CNS, funkciu synapsí a patologické procesy v neurodegenerácii“

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 105/18 - 221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): Alzheimerova choroba, obezita, synaptická porucha, tau proteín

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 ľudi alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Opísať ciele projektu:

Alzheimerova choroba (DAT) a iné tauopátie sú charakterizované akumuláciou abnormálnych foriem proteínu tau v neurónoch CNS.

Iniciátor patologických zmien tau proteínov v sporadickej forme DAT nie je známy. Štúdie za posledných pár rokov ukázali vplyv stravy bohatou na tuky a cholesterol na kognitívne funkcie a vývoj demencie. Jednou z príčin sa zdá byť priama modulácia neurofibrilárnej tau patológie. Molekulárne charakteristiky tohto vzájomného pôsobenia však nie sú zatiaľ známe.

Preto sme sa rozhodli analyzovať zmeny v synapsiách spôsobené vysokým príjmom tukov a cholesterolu použitím molekulárno-biologických, biochemických a proteomických techník. Budeme tiež sledovať vplyv vysokého príjmu tukov na postup neurofibrilárnej patológie tau použitím transgénneho modelu tauopátií. Štúdia tak poskytne možnosť objasniť ako môže strava bohatá na tuky (hlavne nasýtené mastné kyseliny) podporovať patologické zmeny tau proteínu a či zmeny synaptickej plasticity môžu mať trvalý charakter.

Hlavným cieľom postupu je charakterizovať vplyv stravy bohatej na tuky na funkciu a molekulárne zmeny synapsí vo zvieratách s vysokým príjmom nasýtených tukov a analyzovať ich vplyv na moduláciu tau patológie v transgénnom modeli tauopátie.

Prvá fáza projektu:

Identifikácia signálnych dráh ovplyvnených vysokým príjmom tukov alebo zníženým príjmom živín v modelových zvieratách

- Nastavenie experimentálnych podmienok na vytvorenie zvieracieho modelu s vysokým príjmom tukov a cholesterolu; Identifikácia molekulárnych znakov zvýšeného príjmu tukov sledovaním zmien v obsahu lipidov a cholesterolu v krvi
- Analýza expresného profilu proteínov v mozgu experimentálnych zvierat indukovaných vysokým príjmom tukov; Biochemická a imunohistochemická analýza proteomických zmien v synaptických a zápalových proteínoch indukovaných vysokým príjmom tukov v mozgu zvierat

Druhá fáza projektu:

Vplyv vysokého príjmu tukov na vývoj neurofibrilárnej patológie tau

- Analýza expresného profilu proteínov indukovaných vysokým príjmom tukov v mozgoch transgénnych zvierat modelu neurofibrilárnej patológie
- Analýza posttranslačných modifikácií proteínov mikrotubulárneho aparátu a iných cytoskeletárnych proteínov v neurónoch CNS indukovaných vysokým príjmom tukov v mozgu transgénnych zvierat
- Charakterizácia zmien vo vývoji neurofibrilárnej patológie v modelových zvieratách spôsobených vysokým príjmom tukov
- Zmeny v zápalových signálnych dráhach v CNS (mikroglie, astroglie) a zmeny na úrovni cytokínov indukované zvýšeným príjmom tukov v experimentálnom modeli neurofibrilárnej patológie

Prínos z vykonaného projektu:

Zatiaľ je len málo známe o molekulárnych mechanizmoch akými tzv. „western diet“, strava bohatá na tuky (nasýtené mastné kyseliny), ovplyvňuje synaptickú aktivitu mozgu a výskyt neurodegeneračných ochorení. V tomto projekte zostavíme model na sledovanie a charakterizovanie týchto zmien na molekulárnej úrovni a ocharakterizujeme tieto zmeny na molekulárnej úrovni.

Na to, aby sme mohli charakterizovať mechanizmus akým zvýšený príjem tukov vedie k zmenám synapsií a tau patológie musíme najskôr zostaviť molekulárny vzorec špecifický pre zvýšený obsah a metabolizmus tukov, akými sú cholesterol, lipidy a ApoE. Potom identifikujeme zmeny spôsobené zvýšeným príjmom tukov na synaptickej úrovni a cytoskeletárnych proteínoch. Očakávame, že náš výskum povedie k zostaveniu génového profilu zmien v mozgu indukovaných vysokým príjmom tukov. Biochemické, imunohistochemické a proteomické analýzy budú detailne charakterizovať tieto zmeny. Štúdia poskytne detailnú molekulárnu analýzu signálnych dráh a molekulárnych zmien indukovaných vysokým príjmom tukov. Zmeny expresie génov neurozápalu, synaptickej aktivity, oxidačného stresu, apoptózy, adhézie buniek (mozgovomiechová bariéra), povrchových receptorov a ich signálnych dráh budú analyzované RT-PCR a ďalej charakterizované použitím špecifických protilátok.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V postupe budú použité 4 týždňové myši a potkany samčieho a samičieho pohlavia (spolu max 200 zvierat), rozdelených do 8 skupín (8x25).

Transgénna myš, samička	25
Transgénna myš, samec	25
Myš laboratórna, samička	25
Myš laboratórna, samec	25
Transgénny potkan, samička	25
Transgénny potkan, samec	25
Potkan laboratórny, samička	25
Potkan laboratórny, samec	25

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

Doba (3-4m) počas ktorej budú zvieratá kŕmené vysoko tukovou stravou nie je dostatočne dlhá na to aby sa u zvierat dostavila závažná hypertenzia či iná komorbidita nezlúčiteľná so životom ako dôsledok obezity.

Avšak vzhľadom na to, že dlhodobý príjem (1 rok) vysoko tukovej diéty a s ňou spojená obezita predsatvuje riziko vzniku kardiovaskulárneho ochorenia, bude pravidelné monitorovanie zvierat zamerané medzi iným aj na klinické príznaky spojené s poruchou srdcovo-cievneho aparátu aby sa tak minimalizoval stres a maximalizoval „welfare“ zvierat použitých v postupe.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Uplatňovanie zásad 3R:

1. Nahradenie zvierat:

Vzhľadom na skutočnosť, že projekt má za úlohu analyzovať synaptické zmeny vyvolané prijímaním vysoko tukovej stravy, *in vitro* experimenty nedokážu odzrkadliť komplexnosť dejov prebiehajúcich v organizme a tak je použitie animálneho modelu nevyhnutné.

2. Redukcia počtu zvierat:

V navrhovaných experimentoch budeme využívať zvieratá z vlastného chovu tak, aby sa minimalizoval počet pokusných zvierat. Transgénne myši a potkany budú krížené iba v počtoch nevyhnutných pre získanie potrebného množstva údajov nevyhnutných pre relevantné štatistické spracovanie výsledkov. Stanovený počet zvierat sa opiera o naše predchádzajúce experimenty na myšiach a potkanoch. Ukázalo sa, že počet zvierat v skupine menší ako 20 nie je dostatočne štatisticky relevantný, keďže aj u transgénnych zvierat sa vyskytuje variabilita daná mierou expresie transgénneho proteínu. Predpokladané percentuálne straty sú okolo 10-15%

3. Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné predpisy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. 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.

Zdravotný stav a prejavy bolesti budú denne monitorované. Ak sa vyskytnú prejavy ťažkého zdravotného stavu spojené s bolesťou, napr. hypertenzia, kardiovaskulárne poškodenie, výrazné zníženie lokomócie, mimické známky bolesti a pod., bude po veterinárnom vyšetrení takéto zviera z postupu vyradené a humánne usmrtené. Vzhľadom na skutočnosť, že dlhodobý príjem vysoko kalorickú diéty s následnou obezitou predstavuje možné riziko vzniku hypertenzie, pravidelné monitorovanie bude obzvlášť zamerané na včasnú identifikáciu vznikajúceho kardiovaskulárneho ochorenia, pričom budú sledované klinické príznaky ako zvýšená unaviteľnosť, poruchy spánku, apatia, znížený apetít až anorexia, slabosť zadných končatín (ktorá nie je na neurologickom podklade), suchý kašeľ, bronchiálny stridor, sťažené dýchanie (zdvíhanie hlavy v snahe zlepšiť respiráciu), ascites, opuchy končatín, cyanóza (scrotum, jazyk, články prstov, špička chvosta) dôsledkom zníženej cirkulácie.

Výskyt každého z vyššie uvedených príznakov u aspoň troch zvierat v skupine bude pokladané za „humane endpoint“ postupu vedúc k jeho ukončeniu. Aby sme v najvyššej možnej miere minimalizovali riziko hypertenzie, v postupe budú použité transgénne línie potkanov na genetickom podklade kmeňa Wistar Kyoto a nie SHR (spontaneously hypertensive rat). Týmto spôsobom zamedzíme potenciálnemu úhynu zvierat dôsledkom podávania vysokotukovej diéty s navodením obezity.

Projekt bude podliehať opätovnému schvalovaniu:

áno

nie

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Vplyv látok ovplyvňujúcich expresiu endotelínu-1 na molekulárne, histologické a funkčné parametre v modeli pľúcnej hypertenzie u potkana

Kľúčové slová: pľúcna hypertenzia, potkan, monokrotalín

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 108/18-221/3

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom projektu je zistiť vplyv troch látok na expresiu endotelínu-1 v pľúcnej artérii, aorte, pravej a ľavej komore srdca, ako aj v plazme počas rozvoja pľúcnej hypertenzie navodenej monokrotalínom a zhodnotiť vplyv terapie na funkčné parametre pravej komory.

Prínos z vykonaného projektu:

Pľúcna artériová hypertenzia je nevyliciteľné ochorenie s nízkou kvalitou života a infaustnou prognózou s vysokou a skorou mortalitou. Nové farmakoterapeutické postupy cielené na expresiu endotelínu-1 by sa mohli líšiť od zásahov do účinkov endotelínu-1 a mohli by prispieť k zlepšeniu kvality života i prežívania pacientov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty : Potkany, samce rodu Wistar 332

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

Ide o experimenty, kde sa hodnotí vplyv monokrotalínom-indukovanej PAH na funkciu pravej komory, preto je potrebné vykonať experiment in vivo, teda na celom zvierati. V experimente sa plánuje intraperitoneálna aplikácia anestetika (Avertin). Zvieratá môžu pri intraperitoneálnej aplikácii anestetika pociťovať krátkodobú bolesť, ktorá nebude významne narúšať pohodu, ani celkový stav zvierat. Samotné experimenty zamerané na zistenie funkcie srdca budú vykonávané v hlbokoj celkovej anestézii, po ktorej zvieratá nenadobudnú vedomie a budú humánne utratené. Celkovo sa očakáva výrazné poškodenie funkcie srdca, v zmysle zlyhania pravej komory a jeho prejavov ako dýchavičnosť, zníženie telesnej hmotnosti a úmrtnosť na úrovni 20-30%. Použitý experimentálny model rozvíja zlyhanie pravej komory postupne v priebehu 4 týždňov. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu budú zvieratá humánne utratené. Z tohto dôvodu budú zvieratá denne sledované a pokiaľ začnú prejavovať klinické symptómy poškodenia srdca (dýchavičnosť, zníženie telesnej hmotnosti) budú okamžite uvedené do anestézie, použité v experimente (bez ohľadu na dobu trvania experimentu) a utratené tak, aby bolo ich prípadné utrpenie čo najviac eliminované.

Predpokladaná úroveň krutosti:

váženie zvierat – slabá

s.c. aplikácia monokrotalínu – slabá

p.o. aplikácia liečiv – slabá

meranie saturácie krvi kyslíkom pomocou pulznej oximetrie - slabá

i.p. aplikácia anestetika avertínu – slabá

hemodynamické merania v anestéze – bez možnosti zotavenia

dušnosť a zníženie fyzickej výkonnosti po dlhodobom pôsobení monokrotalínu – stredná

prípadná mortalita 4 týždne po monokrotalíne – krutá

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie:

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa bude hodnotiť vplyv monokrotalínu (a pľúcnej hypertenzie) na histologické zmeny, molekulárno-biologické parametre, EKG, bazálnu a beta adrenergicky stimulovanú funkciu pravej komory in situ, nie je možné pokus vykonať bez použitia zvierat. Počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako in vitro pokusy, keďže na bunkových kultúrach nie je možné relevantne posúdiť funkciu kardiomyocytov, najmä v rámci pravej komory ako celku. Rovnako nemožno hodnotiť komplexné deje, akými je rozvoj pľúcnej hypertenzie, so sprievodnými etiopatologickými a kompenzačnými funkčnými a molekulárnymi zmenami vo viacerých orgánoch súčasne, a pod vplyvom farmakoterapie.

2. Obmedzenie:

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie a zachovanie relevantnosti pokusu. Počet v skupinách, ktorým je podávaný monokrotalín je určený na základe predchádzajúcich výsledkov, ako aj iných autorov, ktorí poukázali na 40-50% úmrtnosť po podávaní monokrotalínu, ako aj prípadnú perioperačnú mortalitu, spojenú s invazívnym zákrokom pri meraní pravokomorovej funkcie. Zvieratá, ktoré budú použité na meranie pravokomorovej funkcie nie je možné použiť na molekulárne analýzy a histológiu, vzhľadom na pôsobenie anestézy a dobutamínu, ktorý môže dramaticky ovplyvniť génovú expresiu. Preto je nutné mať rovnako ovplyvnené skupiny zvierat v prvej i druhej fáze.

3. Zjemnenie:

Hemodynamické merania a EKG budú vykonávané v celkovej anestéze, zvieratá budú humánne utratené oxidom uhličitým. Cieľom nie je štúdium mortality, ale je nutné navodiť poškodenie pravej komory, ktoré sa bude analyzovať. Preto sa najmä v poslednom týždni očakáva dušnosť, zníženie fyzickej výkonnosti, ktoré nemusí zviera obmedzovať, avšak zvieratá budú humánne utratené ešte pred skončením postupov, ak budú vykazovať akútne zhoršenie stavu – zanedbaná srst, apatia, miznutie sociálnych foriem správania, neschopnosť prijímať potravu, náhly úbytok hmotnosti o 15-20% počas 24 hodín (zvieratá budú vážené každý deň), zúženie ocníc, zavreté oči.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

späť na priradení do 30.3. 2023