

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Farmakologická modulácia exprese génov regulujúcich metabolizmus glukózy a lipidov pri metabolickom syndróme – porovnanie vplyvu dobrovoľného cvičenia, farmakoterapie a probiotika

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 106/18 - 221/3

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom projektu je ovplyvniť rozvoj nutrične podmieneného metabolického syndrómu (dlhodobé podávanie sladeného kolového nápoja od mladého veku potkanov – 4.-5.týždeň) a následných kardiovaskulárnych a metabolických prejavov 4 spôsobmi (dobrovoľná fyzická aktivita, farmakologicky reguláciou glukózy - metformín, farmakologicky moduláciou hladu v CNS - naltrexón/bupropión, probiotickou kultúrou - *Lactobacillus reuteri* E). Zámerom je porovnať ich efektívnosť v redukcii klinických prejavov MetS (hmotnosť tela, glykémia, triglyceridy, cholesterol), ale aj v redukcii biomarkerov, ako sú hladiny inzulínu, grelínu, obestatínu, leptínu, či adiponektínu, resp. sledovať zmeny mikrobiómu a jeho vplyv na 3-mesačný, resp. 6-mesačný rozvoj MetS.

Prínos z vykonaného projektu:

Metabolický syndróm je ochorenie spojené s rizikom vzniku kardiovaskulárnych a metabolických komplikácií. Jeho hlavným komponentom je obezita, pre ktorú v súčasnosti neexistuje dostatočná farmakoterapia, preto sa hľadajú nové farmakologické ciele. Prínosom projektu je ich identifikácia pomocou priameho porovnania štyroch rôznych potenciálnych metabolický syndróm modulujúcich prístupov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty : Potkany, samce rodu Wistar 400

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

Ide o experimenty, kde sa hodnotí vplyv dlhodobého (subchronicky – 3 mesiace, chronicky – 6 mesiacov) podávania kolového sladeného nápoja potkanom od mladého veku (4.-5. týždeň) na klinické parametre charakterizujúce metabolický syndróm. V experimente sa plánuje dobrovoľná fyzická aktivita a perorálna aplikácia liečiv. Zvieratá môžu pri aplikácii látok pociťovať krátkodobé nepohodlie, ktoré nebude významne narušovať celkovú pohodu, ani celkový stav zvierat. Celkovo sa očakáva priberanie hmotnosti, ale neočakáva sa žiadne fyzické ani psychické utrpenie, ani náhle zhoršenie zdravotného stavu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

váženie zvierat – slabá
aplikácia nápoja Coca Cola bez možnosti výberu - stredná
spontánna fyzická aktivita v behacom koliesku - slabá

opakovaná perorálna aplikácia liečiv sondou - stredná
farmakologický účinok liečiv - slabá
odoberanie kapilárnej krvi z chvosta – slabá
orálny glukózový tolerančný test – stredná
meranie saturácie krvi kyslíkom pomocou pulznej oximetrie – slabá
zníženie fyzickej výkonnosti po náraste hmotnosti tela (nadváha) – slabá
neinvasívne meranie arteriálneho tlaku krvi na chvoste – slabá
zber 24-h moču v metabolických klietkach – slabá
sociálna izolácia potkanov v klietkach s behacím kolieskom – stredná

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie:

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa bude hodnotiť systémový vplyv výživy na rozvoj systémového metabolického a kardiovaskulárneho ochorenia, nie je možné pokus vykonať bez použitia zvierat a použiť alternatívnu metódu. Počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako in vitro pokusy, keďže na bunkových kultúrach nie je možné relevantne súčasne posúdiť funkciu rôznych orgánových systémov. Rovnako nemožno hodnotiť komplexné deje, akými je rozvoj metabolického a kardiovaskulárneho poškodenia, 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. V predchádzajúcich experimentoch na potkanoch, ktoré vykonávali dobrovoľnú fyzickú aktivitu, sme zistili vysokú interindividuálnu variabilitu aktivity, ktorá vyplývala z absolútnej dobrovoľnosti na vykonávanie pohybovej aktivity. Množstvo dovedna nabehaných kilometrov v koliesku počas 8 týždňov bol vo veľmi širokom rozpätí medzi 26 km až 714 km (medián 118 km), čo naznačuje, že výsledky budú ovplyvnené týmto faktorom. V predchádzajúcich postupoch na potkanoch, ktoré pili nápoj *Coca Cola* sme zaznamenali vysokú interindividuálnu variabilitu v pití nápoja, ktorá vyplývala z voľného prísunu tekutiny *ad libitum*. Zvieratá mali denný príjem nápoja *Coca Cola* v širokom rozpätí 77,5 – 120 ml. Najvyššiu variabilitu predpokladáme v kombinovanej skupine CC+AKT, kde predpokladáme vo variabilite aditívny efekt dvoch vysoko variabilných postupov, t.j. dobrovoľnej fyzickej aktivity a pitia nápoja nezávislého od pocitu smädu.

3. Zjemnenie:

Výsledky jednotlivých častí štúdie budú priebežne vyhodnocované a v prípade zistenia nevhodných neočakávaných udalostí bude experiment ukončený a následne predložený nový projekt tak, aby sa znížil počet používaných zvierat. Zvieratá budú na záver pokusu humánne utratené oxidom uhličitým. Nie je možné použiť anestetikum, ktoré by mohlo ovplyvniť expresiu sledovaných génov na mRNA úrovni.

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

Spätné posúdenie – september 2019!

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Experimentálne posúdenie možnosti využitia glykokonjugátov zo sladkovodných rias na primárnu a sekundárnu prevenciu alergického zápalu dýchacích ciest.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: EK 2026/2017 - 185/18-221/3

Kľúčové slová: glykokonjugáty, riasy, primárna a sekundárna prevencia, alergický zápal dýchacích ciest

Účel projektu: Základný výskum

Cieľ projektu pokusu:

Hľadanie nových zdrojov látok v liečbe alergickej astmy je opodstatnené zvyšujúcou sa prevalenciou uvedeného ochorenia v populácii. Súčasná farmakoterapia je založená na podávaní látok s bronchodilatačným účinkom tzv. uvoľňovačov a látok s protizápalovým pôsobením tzv. kontrolórov astmy. Napriek nárastu poznatkov o príčinách a patogenéze ochorenia, a širokej škále dostupných symptomatických liečiv neustále rastie počet pacientov, ktorí na liečbu odpovedajú nedostatočne. Vďaka pribúdajúcim vedomostiam o vzniku bronchiálnej astmy sa kladie dôraz na prevenciu ochorenia. Preto v súčasnosti rastie dopyt aj po rôznych doplnkoch stravy, u ktorých boli potvrdené preventívne účinky na rozličné ochorenia spojené s rozvojom chronického alergického zápalu. Trendom súčasnej farmakoterapie astmy je hľadanie nových alternatívnych terapeutických postupov a prírodných látok, ktoré súčasne ovplyvňujú zápal, citlivosť obranných mechanizmov, remodeláciu dýchacích ciest a zároveň sú schopné ovplyvniť aktivitu epitelu pokrývajúceho povrch dýchacích ciest. Látky prírodného pôvodu polyfenoly, rastlinné polysacharidy alebo ich glykokonjugáty sú potenciálnym zdrojom liečiv ako v terapii tak aj v rámci prevencie alergickej astmy alebo jej exacerbácie. V našich postupoch budú sledované glykokonjugáty, ktoré vykazujú štrukturálnu podobnosť s látkami, u ktorých boli v predchádzajúcich experimentálnych prácach prezentované pozitívne účinky na aktivitu imunitných buniek počas alergického zápalu.

Cieľom predkladaného projektu je posúdenie terapeutického využitia glykokonjugátov zo sladkovodných rias ako primárnej a sekundárnej prevencie alergického zápalu dýchacích ciest u morčiat senzitizedovaných ovalbumínom. Na overenie účinku bude u všetkých zvierat použitá široká paleta metodík. Z obranných mechanizmov dýchacích ciest bude hodnotený vplyv na bronchokonstrikciu metódou in vitro aj in vivo, citlivosť kašľového reflexu metódou in vivo u bdelého zvieraťa. Zaujímavou časťou projektu je sledovania kinematiky cilií riasinkového epitelu dýchacích ciest originálnou „brushing metódou“ a snímaním pohybu cilií vysokorýchlostnou kamerou. Protizápalový efekt liečby bude potvrdený pomocou stanovenia buniek imunitného systému a zápalových cytokínov typických pre alergický zápal.

Predpokladaný prínos z vykonaného projektu:

Predmetom projektu je sledovanie účinku liečiv prírodného pôvodu, ktorých podávanie sa spája skôr s prevenciou vzniku a progresie bronchiálnej astmy. Uvedený komplexný koncept riešenia projektu nám umožňuje predpokladať, že originálne výsledky môžu výrazne prispieť nielen k optimalizácii antiastmatickej liečby, ale navyše môžu poskytnúť cenné poznatky zamerané na prevenciu vzniku ochorenia alebo jeho progresie. Komplexy polyfenolických látok s rastlinnými polysacharidmi preukázali v našich predchádzajúcich experimentoch vynikajúce účinky na citlivosť obranných mechanizmov a alergický zápal dýchacích ciest. U vyselektovaného glykokonjugátu bude okrem terapeutického potenciálu posúdený aj benefit pri preventívnom podávaní.

Počet a druh zvierat

Na postupy použijeme outbredné morčatá kmeňa TRIK – samcov zbavené patogénov o hmotnosti 200 až 350 g v celkovom počte 80 jedincov.

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

70 zvierat bude senzitizedovaných, čo znamená opakovanú injekčnú a inhalačnú aplikáciu ovalbumínu. Injekčná aplikácia alergénu môže spôsobiť krátkodobú (30 s) strednú bolesť. Pri inhalačnom podaní budú denne krátkodobo (1 min) umiestnené v celotelovom bodypletyzmografe. Obmedzenie pohyblivosti môže pôsobiť ako stresogénny podnet. Pri vyšetrení reaktivity a kašľového reflexu budú zvieratá tiež umiestnené v bodypletyzmografe. Celková doba trvania vyšetrenia kašľa a reaktivity in vivo nepresiahne 10 min, pričom 80 zvierat (70 senzitizedovaných a 10 nesenzitizedovaných zvierat) v projekte je vystavených 2 takýmto vyšetreniam s odstupom 24 hodín. V procese senzibilizácie sa uskutoční subkutánne, peritoneálne a inhalačne podanie. Počas aplikácie látok budú krátkodobo fixované, čo predstavuje metódu vyvolávajúcu len mierny krátkodobý stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu zvierat (trvanie 1 minúta). Na konci experimentov budú zvieratá humánne usmrtené, dislokáciou krčných stavcov v anestéze. Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami ako aj medzinárodne zavedenými osvedčenými metódami v starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne a zodpovedné zaobchádzanie so zvieratami. Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované množstvom prác a prezentované na mnohých odborných fórach nielen doma ale aj v zahraničí. Z hľadiska dodržiavania zásad práce so zvieratami neboli voči nim vznesené žiadne námietky či už na odborných fórach v rámci diskusií alebo v oponentských posudkoch publikovaných článkov. Postupy sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov prispievajúcich k účelnej farmakoterapii.

Charakter postupov nedáva možnosť dosiahnuť požadovaný, reprodukovateľný a validný výsledok inou dostupnou metódou bez použitia zvierat.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Zaradenie podľa krutosti	Počet zvierat (kus)
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres	slabé	80
Opakovaná p.o. aplikácia glukokortikoidov	Krátkodobé obmedzenie, krátkodobý mierny stres, bolesť slabá	slabé	40
Opakovaná s.c. a i.p. aplikácia ovalbumínu	Krátkodobá fixácia, krátkodobý mierny stres	stredné	70
Usmrtenie dislokáciou krčných stavcov v anestéze	Krátkodobá fixácia, bolesť vyblokováná znecitlivením	Slabé bez možnosti zotavenia	80
Umiestnenie do prístroja bodypletyzmograf	Krátkodobá fixácia, bolesť slabá	slabé	80
Inhalácia bronchokonstrikčných látok v bodypletyzmografe	Krátkodobá fixácia, bolesť slabá	Slabé	80
Inhalácia terapeutických dávok liečiv v prístroji bodypletyzmograf	Krátkodobá fixácia, bolesť slabá	slabé	20
Opakovaná inhalácia ovalbumínu v bodypletyzmografe	Krátkodobá fixácia, bolesť slabá	slabé	70
Inhalácia vehikula v bodypletyzmografe	Krátkodobá fixácia, bolesť slabá	slabé	10

Predpokladaná celková úroveň krutosti: stredná.

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

Pri realizácii postupov sa budeme snažiť dodržiavať všeobecné zásady 3R: nahradenie, obmedzenie a zjemnenie (Replace, Reduce a Refine).

Nahradenie – v experimentoch použijeme na sledovanie zmien reaktivity dýchacích ciest a na sledovanie kinetiky cilií respiračného epitelu metódu in vitro. Na rozdiel od metódy in vivo sledujeme reaktivitu preparátov hladkých svalov dýchacích ciest a frekvenciu kmitania cilií na preparátoch pripravených zo zvierat usmrteného humánym spôsobom a nevystavujeme tak zviera priamemu pôsobeniu látok a bronchokonstrikčných mediátorov. Okrem toho nám táto metóda umožní pripraviť viac preparátov tak z trachey, čím bude možné použiť menej zvierat.

Obmedzenie - na získanie platných výsledkov použijeme len 10 zvierat v každej skupine, čo považujeme za optimálny počet tak z hľadiska reprodukovateľnosti ako aj získania nevyhnutných údajov a objektívne hodnotiteľných výsledkov. Menší počet zvierat by mohol spôsobiť výraznejšie pôsobenie interindividuálnych rozdielov s možnosťou spochybnenia objektívnosti výsledkov.

Zjemnenie (Refinement) – metódu in vitro považujeme pri tomto type postupu za vhodnú z toho dôvodu, že zviera nevystavujeme priamo pôsobeniu sledovaných látok a mediátorov, ktoré by mohli spôsobiť zvierat'u za určitých podmienok diskomfort.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: Áno Nie

Príloha č. 5

Netechnické zhrnutie projektu podľa § 35 ods. 2 písm. b) a § 40 nariadenia

Názov projektu: Úloha pľúcneho surfaktantu vo fyziológii hladkého svalu dýchacích ciest

a) Informácie o cieľoch projektu: 351/18-221/3

Cieľom projektu je zistiť, ako pôsobí endotoxín na hladký sval dýchacích ciest – či vedie k hypo- alebo hyperreaktivite. Hoci literárne údaje sa v tomto ohľade rozchádzajú, predpokladáme skôr, že LPS vyvoláva hyperreaktivitu. O surfaktante je známe, že má relaxačný vplyv na hladký sval dýchacích ciest a preto overíme hypotézu, že eventuálny hyperreaktívita bude zablokována surfaktantom. Budú nás zaujímať aj mechanizmy, ktorými surfaktant hladký sval relaxuje. Tento cieľ overíme *in vitro* na prúžku hladkého svalu trachey morčiat – zdravých, po inkubácii svalu s endotoxínom, ako aj u zvierat, ktorým bude endotoxín opakovane podaný i.p.

Predpokladaný prínos projektu:

Projekt prinesie ďalšie originálne poznatky týkajúce sa jednej z kľúčových úloh surfaktantu v obranných mechanizmoch pľúc v situácii bakteriálneho zápalu, imitovaného podaním lipopolysacharidu (LPS). Možnosť zablokovat' nežiaduci vplyv LPS na hladký sval dýchacích ciest sa potvrdí v modeli na prúžkoch hladkého svalu morčiat.

Ujma na zvieratách:

Z hľadiska posúdenia možného prínosu projektu je predpokladaná ujma na zvieratách primeraná, keďže zvieratám bude i.p. jedenkrát denne aplikovaná látka počas 4 dní a potom tieto zvieratá ako aj kontrolné zvieratá budú usmrtené humánnym spôsobom predávkovaním anestetikom v kombinácii Zoletilu v dávke 0,5 ml a Xylariemu 0,8 ml.

Klasifikácia krutosti postupov: slabá až stredná/bez možnosti zotavenia.

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

Predpokladaná doba riešenia projektu:

Predpokladaná doba riešenia projektu – jeden rok 10.4.2018-31.12.2018, počas ktorých použijeme 90 morčiat v maximálne 30 čiastkových postupoch.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Charakter pokusov nedáva možnosť dosiahnuť požadovaný, reprodukovateľný a validný výsledok inou dostupnou metódou bez použitia zvierat. Všetky aktivity súvisiace s pokusmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami ako aj medzinárodne zavedenými osvedčenými metódami v starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne a zodpovedné zaobchádzanie so zvieratami. Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované v mnohých prácach a prezentované na mnohých odborných fórach doma a v zahraničí. Z hľadiska dodržiavania zásad práce s pokusnými zvieratami neboli voči nim vznesené žiadne námietky či už na odborných fórach v rámci diskusií alebo v oponentských posudkoch publikovaných článkov. Pokusy 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. Riešitelia preto považujú navrhované metódy za vhodné aj pre realizáciu predkladaného projektu.

Pri realizácii postupov projektu sa budeme snažiť dodržiavať všeobecné **zásady 3R**:

- **zjemnenie** (Refinement), **zniženie** (Reduction) a **nahradenie** (Replacement).

Nahradenie – postupy projektu nie je možné vykonať bez použitia zvierat. Morča sa vďaka svojmu imunologickému a receptorovému profilu blíži vlastnostiam človeka, preto je v z tohto pohľadu najvhodnejším živočíšnym druhom pre zvolený typ experimentov. Metóda umožní pripraviť viac preparátov z trachey, čím bude možné použiť menej zvierat.

Zníženie - na získanie dát použijeme 10 ks zvierat v skupine s.i.p. podaním LPS. Očakávame väčšiu interindividuálnu variabilitu, nakoľko stupeň zápalovej reakcie môže variovať. V skupinách s podaním len fyziologického roztoku, resp. bez i.p. podania sa takéto rozdiely neočakávajú. Preto predpokladáme, že pre získanie potrebného počtu vzoriek postačia menšie počty zvierat ($n=5$). Tento počet považujeme za optimálny tak z hľadiska reprodukovateľnosti, ako aj získania objektívne hodnotiteľných výsledkov. Menší počet zvierat už nie je možné použiť pre výraznejšie inter-individuálne rozdiely a príp. spochybnenie objektívnosti výsledkov. Navrhované postupy sú zároveň usporiadané tak, aby sa z každého zvierat'a získalo maximálne množstvo vzoriek a údajov pre analýzy. Zvyšok vzoriek bude odložený v hlboko-mraziacich boxoch, aby sa mohli využiť aj pri prípadných dodatočných analýzach bez potreby použitia ďalších zvierat. Navrhované postupy sú zároveň usporiadané tak, aby sa z každého zvierat'a získalo maximálne množstvo vzoriek a údajov pre analýzy. Zvyšok vzoriek bude odložený v hlboko-mraziacich boxoch, aby sa mohli využiť aj pri prípadných dodatočných analýzach bez potreby použitia ďalších zvierat.

Zjemnenie – spôsob manipulácie so zvieratami a starostlivosť o zvieratá počas postupu bude v súlade s požiadavkami uvedenými v Nariadení vlády SR č. 377/2012 Z.z. a Vyhláske Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR č. 436/2012 Z.z. Vzhľadom na druh ujmy (4 dňové i.p. podanie LPS 1mg/kg hmot. raz denne) je možné predpokladať, že morčatá môžu reagovať zmenou správania (môžu byť izolované od

skupiny, menej pohyblivé, nemá záujem o okolie), môžu mať nižší príjem potravy a vody, môže sa objaviť zježenie srsti a pod. Zdravotný stav zvierat bude pravidelne monitorovaný vedúcim projektu alebo inou poverenou, odborne spôsobilou osobou. Pre účel 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 podaním letálnej dávky anestetika. Usmrtenie zvierat'a bude realizované exsanguináciou po navodení celkovej anestézie i.p. podaním letálnej dávky anestetika v kombinácii Zoletil 0,5 ml a Xylariem 0,8 ml.

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

Netechnické zhrnutie projektu 207/18-22 1/3

Názov projektu: Bunkové a molekulárne vlastnosti ľudských buniek iniciujúcich rast metastáz v rôznom štádiu metastatického procesu.

Kľúčové slová: metastázy, markery malígnych buniek

Účel projektu:
Základný výskum

Cieľ projektu:

Hlavným účelom projektu je prispieť k objasneniu molekulárnych mechanizmov vedúcich k prežívaniu diseminovaných nádorových buniek, ktoré prenikli do vzdialených tkanív, ich dormancii, k obnoveniu ich aktivity vo vhodnom prostredí a ich progresii ku vzniku metastáz.

Cieľom je vytvorenie spontánneho metastatického modelu *in vivo* injikovaním agresívnych, vysoko metastatických ľudských nádorových línií malígneho melanómu, prostatického karcinómu a kolorektálneho karcinómu ako aj nádorových buniek získaných priamo od pacientov s kolorektálnym karcinómom a malígnym melanómom. Na rozdiel od štúdia už narastených xenograftov by sme chceli odoberať tkanivá s vyvíjajúcimi sa metastázami v určitých časových intervaloch a založiť z nich nádorové bunky *in vitro*. Získanú nádorovú populáciu buniek obohatenú o metastázy iniciujúce bunky (MetIC) v rozličných štádiách metastatického procesu budeme ďalej študovať a identifikovať špecifické markery. Predpokladáme, že by sme mohli získať cenné informácie o faktoroch a mechanizmoch, ktoré vedú k metastázovaniu. Zistíme, či cieľená inhibícia nami vybranej tumorigénnej populácie môže inhibovať rast nádoru. Nakoniec nami vybraný metastatický marker otestujeme na patientskom tkanive kolorektálneho karcinómu, resp. melanómu. Do našich postupov chceme zahrnúť aj nádorové bunky odvodené z patientských nádorových tkanív (tkz. cancer-tissue originated PDX), ktoré slúžia ako model vytvorený transplantáciou ľudských nádorov do imunokompromitovaného hostiteľa - v našom prípade SCID/Beige myši. Tieto bunky majú histologickú a genetickú charakteristiku primárneho patientského nádoru. Bolo dokázané, že takýto model je prediktívny a hodnoverný a používajú sa na predklinické hodnotenie liekov, identifikáciu biomarkerov, biologické štúdie a stratégie personalizovanej medicíny. (Hidalgo M. et al., 2004). Bunky z patientských nádorových tkanív chceme pichať s.c. samostatné alebo v kombinácii s mesenchymálnymi stromálnymi bunkami, ktoré sú súčasťou extracelulárnej matrix a ktorými budeme imitovať reálne podmienky v nádore. Xenografty odvodené z patientských nádorových vzoriek najviac odrážajú funkčné, histologické a genetické charakteristiky nádorov.

Podrobné vedomosti o metastatických bunkách poskytnú cenné informácie a metastatický model by sa dal neskôr použiť ako predklinický systém na testovanie anti- metastatickej terapie. Jednou z liečebných modalít je podávaním kondiciovaného média z terapeutických mezenchýmových

kmeňových buniek a terapeutickými exozómami. Naše predchádzajúce práce dokazujú, že terapeutické kmeňové bunky exprimujúce enzým konvertujúci predliečivo na cytostatikum, inhibujú rast metastatického prostatického karcinómu (Cavarretta et al., Mol Ther. 2010). Ukazuje sa, že to iste robia exozómy v kondiciovanom médiu in vitro. Predstavuje to ďaleko bezpečnejšiu terapiu bez imunologických problémoch v zrovnaní s bunkami (Abrate A et al., Eur J Cancer. 2014). Myši nesúce nádorové xenografty budeme liečiť i.v. podávaním kondiciovaného média z terapeutických mezenchýmových kmeňových buniek a terapeutickými exozómami.

Prínos projektu:

Podrobné vedomosti o fenotype MetIC poskytnú cenné informácie a metastatický model by sa dal neskôr použiť ako predklinický systém na testovanie anti- metastatickej terapie.

Ďalším kritickým bodom v klinickej praxi je nedostatok dostatočne citlivých a špecifických biomarkerov, ktoré by spoľahlivo odhaľovali včasné štádia metastatického procesu. Preto budeme skúmať expresný profil založených MetIC a snažiť sa pochopiť signálnu sieť medzi metastatickou bunkou a okolím a zistiť, či sa dajú detekovať aj prvé štádia metastázovania a či sú tieto signálne dráhy vhodným terčom pre farmakologickú terapiu.

Počet a druh použitých zvierat: myš laboratórna SCID /bg, celkovo 1040 zvierat/5rokov a BALB/c Nu/nu 40 zvierat/5rokov. Počet zvierat pre účely projektu je adekvátny, vzhľadom na 14 sledovaných skupín. Počty v skupinách sú minimalizované tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Ak získame štatisticky významné dáta z menšieho počtu zvierat, nebude potrebné použiť celkový plánovaný počet.

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

Zvieratám budú injikované bunky, ktoré po niekoľkých mesiacoch vyvolajú rast metastáz hlavne v pľúcach, príp. v iných orgánoch. Predpokladáme zhoršenie zdravotného stavu, ktorý sa prejaví hlavne stratou hmotnosti a sťaženým dýchaním. Zvieratá nebudú držané do úhynu, nakoľko charakter projektu vyžaduje odber vzoriek zo živých zvierat. V prípade ortotopického podania kolorektálnych buniek do ceka a rozvinutia kolorektálneho karcinómu môže časť zvierat trpieť hnačkami.

Ku humánnemu utrateniu zvierat pristupujeme v prípade výrazne zhoršeného zdravotného stavu prejavujúcemu sa viacerými nasledujúcimi znakmi: pri pozitívnom náleze metastáz metódami In vivo imaging alebo zvýšením nádorových biomarkerov, pri fyzických prejavoch ako napr. naježená srst', zhrbený postoj, strata hmotnosti rovná alebo vyššia 20%, pozorovaním faciálnej expresie bolesti: orbitálnym zúžením očí, zmeneným držaním ušnic a fúzikov, vyčnievajúcich lícných výbežkov, pri dosiahnutí skóre 4 podľa publikácie Langford D.J. a kol., Nature Methods, 2010, doi:10.1038/nmeth.1455.

Predpokladaná úroveň krutosti celého projektu:

krutá

Súladi s požiadavkami „3R“

Nahradienie

Pri tomto projekte používame na štúdium nádorovej diseminácie a metastázovania predovšetkým *in vitro* modely: rast nádorových buniek *in vitro* v 2D a 3D kultiváciach, kokultivácie s mesenchymálnymi stromálnymi bunkami imitujúcimi nádorový strom, sledovanie migrácie a invazivity *in vitro*, sledovanie angiogenézy na experimentálnom modeli chorioallantoickej membrány. Až po použití všetkých týchto postupov *in vitro* prechádzame na *in vivo* postupy a počet použitých zvierat sa snažíme minimalizovať pri zachovaní štatisticky signifikantných výsledkov.

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

Obmedzenie:

Na základe našich skúseností z predchádzajúcich projektov, údajov z vedeckej literatúry a našich *in vitro* štúdií sme schopní odhadnúť základné množstvo nádorových buniek injikovaných s.c. alebo i.v. na vytvorenie metastáz v pľúcach. Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Ak získame štatisticky signifikantné dáta z menšieho počtu zvierat, nebude potrebné použiť celkový plánovaný počet.

Zjemnenie:

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Máme vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizáciu zvierat počas injekčných aplikácií. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Ku humánnemu utrateniu zvierat pristupujeme v prípade výrazne zhoršeného zdravotného stavu prejavujúcemu sa viacerými nasledujúcimi znakmi: pri pozitívnom náleze metastáz metódami *In vivo* imaging alebo zvýšením nádorových biomarkerov, pri fyzických prejavoch ako napr. naježená srst', zhrbený postoj, strata hmotnosti rovná alebo vyššia 20%, pozorovaním faciálnej expresie bolesti: orbitálnym zúžením očí, zmeneným držaním ušnic a fúzikov, výčnievajúcich lícných výbežkov, pri dosiahnutí skóre 4 podľa publikácie Langford D.J. a kol., Nature Methods, 2010, doi:10.1038/nmeth.1455.

Budeme používať anestéziu pri invazívnych zákrokoch a tlmenie bolesti v rámci pooperačnej starostlivosti.

Spätné posúdenie projektu:

Áno/do troch mesiacov od ukončenia projektu — do 01.08.2023

Príloha č.2: Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Molekulárne mechanizmy neurodegeneratívnych zmien spúšťaných diabetes mellitus.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 493/18-221/3

Kľúčové slová v projekte (max. 5 slov): diabetes mellitus, mozog, demencia, metabolizmus, degeneratívne zmeny

Účel projektu:

Ide o základný výskum s cieľom zabránenia, prevencie chorôb a poškodenia zdravia alebo iných nepriaznivých stavov človeka; posúdenia, zistenia, regulácie alebo zmeny fyziologického stavu človeka alebo zvierat.

Ciele projektu:

Cieľom projektu je štúdium molekulárnych mechanizmov neurodegeneratívnych zmien v diabetickom mozgu. Diabetom indukované zmeny v metabolizme budú študované v mozgových regiónoch kortexu, hipokampu a hypotalamu na celobunkovej a subcelulárnej úrovni z pohľadu bioenergetiky, mitochondriálnej funkcie, prítomnosti oxidačného stresu, spúšťaných signálnych dráh, zmien v bunkovom proteóme a aktivácie apoptózy. Pozorované zmeny budú korelované s výsledkami behaviorálnych testov zameraných na kognitívne charakteristiky, s cieľom získať informácie o poškodení mozgových štruktúr.

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

Diabetes mellitus (DM) ako chronické metabolické ochorenie je spojené s rozvojom sekundárneho poškodenia rôznych orgánov. Kým periférne komplikácie DM sú intenzívne študované, dopad DM na mozog a jeho činnosť nie je jasný a začal byť študovaný len nedávno. Pritom neuropsychologické štúdie takmer jednoznačne poukazujú na niekoľkonásobné vyššie riziko demencie, Alzheimerovej choroby alebo kognitívneho poklesu v diabetickej populácii. Je zaujímavé, že v štúdii uskutočnenej na Mayo klinike pre Alzheimerovu chorobu (USA) až 80 % pacientov s Alzheimerovou chorobou malo DM a abnormálne hladiny glukózy. Nepriaznivý trend v incidencii DM a predlžovanie priemernej dĺžky života tak vytvárajú reálne riziko rastu neurodegeneratívnych ochorení v blízkej budúcnosti. Nakoľko kauzálna terapia tohto ochorenia zatiaľ neexistuje a ochorenie má chronický charakter, nárast diabetom indukovaných neurodegeneratívnych ochorení bude mať za následok nielen zhoršenie kvality života postihnutých jedincov a ich najbližších príbuzných, zároveň bude vytvárať aj značný tlak na zabezpečenie zdravotnej a sociálnej starostlivosti. Predkladaný projekt má ambíciu prispieť k pochopeniu a identifikácii základných bunkových mechanizmov v diabetickom mozgu, ich príspevku v indukcii degeneratívnych a kognitívnych zmien a budúcemu efektívnemu terapeutickému prístupu. V dôsledku odlišností v anatomicko-morfologickej štruktúre, metabolizme a funkciách majú jednotlivé mozgové regióny rozdielnú senzitivitu na patologické podnety. Preto ďalším prínosom projektu je snaha pokúsiť sa identifikovať senzitivitu študovaných mozgových regiónov na glyoxidačné poškodenie a na integrálnej úrovni organizmu korelovať mieru poškodenia s funkčnou charakterizáciou tohto poškodenia.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Predpokladá sa použitie týchto zvierat:

potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*), samec, kmeň:

- Wistar potkany: 15 ks
- ZDF obézne potkany: 15 ks
- ZDF neobézne potkany: 15 ks

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

V projekte budú použité laboratórne potkany, samce kmeňa Wistar a ZDF (obézne a neobézne). Samce kmeňa Wistar a neobézne ZDF potkany budú slúžiť ako kontrolné skupiny k diabetickej skupine obéznych ZDF potkanov. U kontrolných skupín nepredpokladáme ujmu na zdravotnom stave v dôsledku vzniku ochorenia, chovnej diéty a experimentálnych postupov počas priebehu projektu. ZDF obézne zvieratá sú monogénnym animálnym modelom diabetu 2 typu, u ktorých sa v priebehu života spontánne vyvíja diabetes. Aby sa zabezpečil konzistentný vývin diabetu a diabetických komplikácií, zvieratá budú 6 mesiacov udržiavané na urýchl'ovacej diéte, ktorej energetický obsah je len mierne zvýšený v porovnaní so štandardným laboratórnym krmivom pre hlodavce (3,23 kcal/g vs. 2,89 kcal/g). V dôsledku genetickej mutácie ZDF obézne zvieratá sú hyperfagické, čo vedie k obezite, hyperinzulinémii a hyperlipidémii. Zvýšená hmotnosť môže spôsobovať pohybové problémy, dýchavičnosť, nechť k pohybu až slabú letargiu. V období obezity (prediabetický stav) by zvieratá mali byť normoglykemické v dôsledku kompenzačného efektu hyperinzulinémie. V období cca 10 týždňov veku by malo dôjsť k otvorenej manifestácii diabetu, čo bude viesť k hyperglykémii, zastaveniu rastu telesnej hmotnosti, chudnutiu, zvýšeniu príjmu vody a polydipsii. Následne progresia ochorenia bude viesť k vzniku a rozvoju diabetických komplikácií, zhoršovaniu zdravotného stavu zvierat, čo môže spôsobiť nefrotické problémy, kardiovaskulárne problémy, hypertenziu a zrýchlený tep, očné problémy, kožné problémy, parestéziu a periférnu neuropatiu vedúcu k zníženej citlivosti končatín, zhoršené hojenie prípadných poranení a ďalšie klinické symptómy diabetických komplikácií.

Plánované experimentálne postupy nebudú mať výrazný nepriaznivý dopad na zdravotný stav zvierat. Zhoršený zdravotný stav bude podmienený existenciou a progresiou skúmaného ochorenia. So zvieratmi sa bude zaobchádzať šetrne a na plánované experimentálne procedúry budú privykané postupným tréningom (handling) tak, aby bol v čo najväčšej miere eliminovaný ich prípadný stres a utrpenie. Na zmiernenie utrpenia zvieratám sa zvýši množstvo stielky, príp. budú použité dva druhy stielky, k dispozícii budú vhodné úkryty a materiál na stavanie hniezd, v prípade potreby bude k dispozícii nasiaknutá potrava, ktorá bude umiestnená na podlahe, kocky s tekutinou a pod. Zodpovednosť za sledovanie zdravotného stavu zvierat bude mať ošetrovateľ a zástupca zodpovedného riešiteľa projektu. Pri uskutočňovaní plánovaných experimentálnych postupov budú zvieratá znášať len krátkodobý mierny diskomfort, a to najmä pri odbere krvi z chvosta a pri realizácii behaviorálnych testov. Projekt nepredpokladá výrazný nepriaznivý vplyv týchto postupov na zvieratá. Nepriaznivý zdravotný stav zvierat a ujma na zdraví bude v podstatnej miere spôsobená existenciou a progresiou ochorenia.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Pre plánované experimentálne postupy a stav zvierat je zaradenie do kategórií krutosti nasledovné:

<i>Úkon</i>	<i>opakovanie</i>	<i>kategória krutosti</i>
váženie	áno	slabá
odber krvi z chvosta	áno, 2-týždňový interval (od ~10 týždňa veku)	stredná
behaviorálne testy		stredná
1. test otvoreného poľa	nie	slabá
2. test rozpoznávania objektov	nie	slabá
3. Morrisovo vodné bludisko	áno	stredná
stav zvierat		stredná
- Wistar potkany		slabá
- ZDF neobézne potkany		slabá
- ZDF obézne potkany		stredná

<i>Bodové skóre</i>	<i>Charakter zdravotného stavu</i>	<i>Opatrenie</i>
0	fyziológický zdravotný stav	
1	dobrý zdravotný stav	
2	mierne zhoršený zdravotný stav	zváženie doplnkovej starostlivosti, častejšia kontrola zvierat'a
3	zhoršený zdravotný stav	častejšia kontrola zvierat'a, doplnková starostlivosť (analgetiká, pridanie tekutín, zvýšenie tepla)
4	zlý zdravotný stav	porada s veterinárom
5	nepriaznivý zdravotný stav	vyradenie zvierat'a humane endpoint

Humane endpoints: nechutenstvo - neprijímanie potravy a vody, náhla strata váhy >20 %, namáhavé dýchanie, zovreté brucho, dehydratácia > 48 hod, hnačka

Sledované parametre v hodnotiacom procese:

- celkový *vzhľad* zvierat'a:

- telesný stav (prírastok/úbytok hmotnosti)
- stav srsti/kože (čistenie, piloerекcia, kožné lézie, hydratácia kože)
- prítomnosť výtoku (oči, uši, nos, urogenitálny systém)
- *vzhľad* očí (zatvorené, polozavreté, zakalenie)
- spôsob pohybu a stav pohybového aparátu (pokrivkavanie, nakláňanie, krúženie, stereotypné držanie tela)

- *telesné funkcie* zvierat'a:

- príjem potravy a vody
- respiračný systém (zrýchlené, ťažké dýchanie, sipľavosť a iné zvuky)
- hladina glukózy
- vyprázdňovanie a močenie

- *sociálne interakcie* zvierat'a:

- hypo/hyperaktivita, bojazlivé/agresívne interakcie, zreteľné únikové reakcie, skrývanie sa

- *chovné prostredie*:

- znečistenie podstielky, stolica a jej hustota, prítomnosť vývratkov, krvi, používanie pomôcok na obohatenie prostredia
- *voľné pozorovania*:
 - iné neobvyklé pozorovania, znaky bolesti a utrpenia - výraz tváre (nos, uši, fúzy)

Uplatňovanie zásad 3R:

1. Nahradenie zvierat (replacement)

Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v ľudskom mozgu, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané z tkanív animálnych modelov za tie, ktoré pochádzajú z in vitro experimentov alebo z počítačových modelov.

2. Redukcia počtu zvierat (reduction)

V plánovanom experimente je uvažované s minimálnym počtom zvierat. Počet zvierat bol posudzovaný z hľadiska zabezpečenia cieľov projektu, patológie ochorenia, množstva potrebného biologického materiálu pre plánovaný objem analýz, štatistického vyhodnotenia, validity a reprodukovateľnosti výsledkov. V rámci experimentu bude sledovaný program spoločného vyžívania orgánov a tkanív usmrtených zvierat v ďalších projektoch organizácie a v schválenom projekte cezhraničnej spolupráce SK-AT, čím sa obmedzí ďalšia potreba laboratórnych zvierat. Informácie o ukončení projektu budú poskytované počas pravidelných stretnutí riešiteľov projektov.

3. Zjemnenie (refinement)

Zvieratám budú zabezpečené dobré životné podmienky, budú ošetrované zaškolenými pracovníkmi a budú pod dohľadom veterinárneho lekára. Zvieratá budú mať neobmedzený prístup k potrave a vode. Pri manipulácii sa bude so zvieratmi zaobchádzať šetrne a ohľaduplne, aby si zvykli na manipuláciu a minimalizoval sa stres. Pri odbere krvi z chvosta sa stres zmierni sedáciou zvieratá, používaním tenkých jednorazových ihlí a ohľaduplným zaobchádzaním počas tohto výkonu. V prípade behaviorálnych testov zvieratá budú postupne trénované na danú testovaciu situáciu a testy budú vykonávané v limitovanom časovom intervale, aby nedošlo k vyčerpaniu zvieratá. V danom testovacom dni zvieratá absolvujú iba jeden typ behaviorálneho testu. Životné prostredie zvierat bude obohatené pomocou dostupných zjemňovacích techník, materiálom na stavanie hniezd, hru a zvieratá budú žiť v sociálne známych skupinách. V prípade zhoršeného zdravotného stavu sa podľa potreby zvýši teplota prostredia, príp. sa použijú vyhrievacie podložky, pridá sa stelivo, zvieratám môže byť poskytnutá nasiaknutá potrava, ktorá bude umiestnená na podlahe chovnej klieťky, kocky s tekutinou a podobne. V prípade dlhotrvajúcej strednej bolesti alebo krutej bolesti zviera bude vyradené z projektu a usmrtené na podklade hodnotiaceho skóre a humane end-points (nechutenstvo - neprijímanie potravy a vody, náhla strata váhy >20 %, namáhavé dýchanie, zovreté brucho, dehydratácia > 48 hod, hnačka). Usmrtenie zvierat bude vykonané za straty vedomia po použití celkovej inhalačnej anestézie. Po skončení projektu budú získané skúsenosti a poznatky použité na zjemnenie utrpenia zvierat v prípadných ďalších animálnych experimentoch.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu 494/18-221/3

Názov projektu:

Využitie exozómov vylučovaných ľudskými mezenchýmovými stromálnymi bunkami na cieleňú génovú terapiu glioblastómov

Kľúčové slová:

Glioblastóm, génová terapia, exozómy, kmeňové bunky

Účel projektu:

a) Základný výskum

b) translačný alebo aplikovaný výskum s cieľom

1. liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka, alebo ich účinkov na ľudí,

Cieľ projektu:

Cieľom pokusu je využitie exozómov z ľudských mezenchýmových stromálnych buniek na cieleňú génovou terapiu gliómov (na princípe použitia samovražedného enzýmu cytozín deaminázy a predliečiva 5-fluorocytosínu). Predkladaný projekt je súčasťou nášho dlhodobého výskumu, v ktorom sledujeme možnosť využitia schopnosti dospelých kmeňových buniek vyhľadávať nádory v organizme a viazať sa na nádorové bunky ako nosičov terapeutických génov na neinvazívnu a cieleňú terapiu nádorového ochorenia bez systémovej toxicity.

Prínos projektu:

Možnosti liečby gliómov, najčastejšie sa vyskytujúcich primárnych mozgových nádorov sú veľmi limitované predovšetkým kvôli invazívnej a agresívnej povahe týchto nádorov a tiež ich schopnosti odolať chemoterapii či rádioterapii. Glioblastóm je spomedzi gliómov najagresívnejší a nesie najvyšší stupeň malignity (stupeň IV podľa WHO). Štandardný postup liečby začína maximálnym možným chirurgickým odstránením nádoru, po ktorom nasleduje rádioterapia spolu s konkomitantnou a adjuvantnou chemoterapiou. Napriek nemalým pokrokom vo všetkých troch oblastiach liečby, prognóza pre pacientov ostáva naďalej nepriaznivá a skoro vždy dochádza k relapsu ochorenia. Medián prežívania sa pohybuje okolo 14 mesiacov. Na Slovensku sa ročne diagnostikuje okolo 200 nových prípadov glioblastómu.

Projekt, ktorého súčasťou je práca so zvieratami je orientovaný na výskum rakoviny a liečbu nádorového ochorenia. Riešenie projektu priblíži tento inovatívny terapeutický prístup k pacientom.

Počet a druh použitých zvierat:

Potkan laboratórny kmeň Sprague Dawley, 80 jedincov, samičky aj samce

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

Počas všetkých chirurgických zákrokov budú zvieratá v celkovej anestézii, po zákroku môžu pociťovať krátkodobú strednú bolesť. Na základe skúseností z predchádzajúcich projektov predpokladáme, že priebeh ochorenia bude rýchly, zvieratá s náhlým zhoršením stavu budú eutanazované, aby sme zabránili utrpeniu, potkany s progredujúcim ochorením nebudú ponechané

na dožitie. Progredujúce ochorenie sa v prvom rade prejaví útlmom zvierat'a, malátnosťou, spavosťou, môže dôjsť k úbytku hmotnosti, menej často k paréze zadných končatín. Indikáciou na vykonanie humánneho ukončenia postupu budú nasledovné príznaky: strata hmotnosti $\geq 20\%$, neschopnosť prijímať potravu a vodu, výrazná letargia trvajúca viac ako 24 hodín, neschopnosť udržať sa na končatinách, paréza.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Stredná

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov, projektu predchádzali štúdie *in vitro* a publikované experimenty *in vivo* s terapeutickými bunkami.

Obmedzenie:

Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Projekt nadväzuje na predchádzajúce schválené projekty, sme schopní predvídať terapeutickú účinnosť na základe experimentov s mezenchýmovými kmeňovými bunkami izolovanými z tukového tkaniva ako aj priebeh ochorenia u kontrolných skupín, čo nám umožňuje počet zvierat v určitých experimentálnych skupinách redukovať. V prípade nízkeho rozptylu hodnotených kritérií (klinických príznakov, prežívania) v jednotlivých skupinách bude na štatisticky významné vyhodnotenie výsledkov postačujúci nižší počet zvierat.

Zjemnenie:

Pokiaľ to zdravotný stav zvierat umožní, budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. Zvieratá s vážne zhoršeným zdravotným stavom nebudú ponechané na dožitie, ale budú eutanazované ako je uvedené vyššie každý príznak bude hodnotený samostatne a bude indikáciou na humánne ukončenie postupu. Pri zníženej pohyblivosti zvierat bude potrava a voda umiestnená priamo do kletky.

Spätné posúdenie projektu:

Postupy klasifikujeme ako „stredné“, preto nie je potrebné vykonať spätné posúdenie projektu.

NÁZOV PROJEKTU

ÚLOHA EXTRACELULÁRNEJ DNA A JEJ ODSTRAŇOVANIA V MYŠACOM MODELI SEPSY

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 536/18 - 221/3

Kľúčové slová v projekte: sepsa, extracelulárna DNA, deoxyribonukleáza

Účel projektu*: Základný výskum

377/2012 Z.z. NARIADENIE VLÁDY Slovenskej republiky

§ 40 Netechnické zhrnutie projektu

Ciele projektu:

Klinické štúdie preukázali, že u pacientov so sepsou sú vysoké koncentrácie extracelulárnej DNA spojené s vysokým rizikom následného úmrtia u pacientov. To nakoľko je extracelulárna DNA zodpovedná za zhoršené prežívanie doposiaľ nie je jasné, no viaceré zvieracie experimenty naznačujú, že jej odstraňovanie by mohlo mať potenciálny terapeutický efekt. Cieľom projektu je identifikácia vplyvu extracelulárnej DNA a jej enzymatického odstraňovania pomocou DNázy. Okrem toho je cieľom projektu podrobne popísať dynamiku extracelulárnej DNA počas sepsy. Projekt má význam pre možné odhalenie nových terapeutických možností u pacientov so sepsou, ale aj pri iných zápalových ochoreniach, pri ktorých je popísaná vysoká koncentrácia extracelulárnej DNA v plazme. Projekt bude realizovaný výhradne na experimentálnych zvieratách, pričom je nutné zahrnúť do experimentov aj samce aj samice, nakoľko boli popísané možné medzipohlavné rozdiely v odpovedi na zápal.

Prínos z vykonaného projektu:

Význam extracelulárnej DNA ako možného spúšťača zápalovej reakcie je v súčasnosti intenzívne študovaný. Jednou z možností ako tento negatívny efekt uvoľňovanej DNA do extracelulárneho priestoru znížiť je jej enzymatické odstraňovanie pomocou DNázy. Tento projekt si kladie za úlohu zodpovedať otázku do akej miery je odstraňovanie extracelulárnej

DNA pri sepe efektívnym terapeutickým prístupom, a teda zároveň bližšie popísať mechanizmus účinku DNÁzy a zistiť jej prípadné negatívne efekty.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Súhrn použitých zvierat:

Skupina	Kmeň	Počet samcov	Počet samíc	Celkový počet
Kontrola	CD1	25	25	50
Sepsa	CD1	50	50	100
Sepsa + DNÁza	CD1	50	50	100
Sepsa +inDNÁza	CD1	50	50	100

Celková krutosť experimentu: **kruté**

Zoznam aplikovaných látok:

Myšiam z kontrolnej skupiny bude jednorázovo intraperitonálne podaný fyziologický roztok, zatiaľ čo zvyšným trom skupinám bude sepsa vyvolaná jednorazovým intraperitoneálnym podaním baktérií *E. coli* ATCC 25922 v dávke 2×10^8 KTJ/ zviera. Pol hodinu po podaní baktérií budú myšiam intraperitoneálne podaný fyziologický roztok, DNÁza (10mg/kg) alebo inhibovaná DNÁza (inDNÁza) (10mg/kg) podľa experimentálnej skupiny.

Rozhodli sme sa, že experimentálne zvieratá nebudeme značiť na uchu, ale len na chvoste prostredníctvom permanentnej fixky. Vzhľadom na krátke trvanie experimentu je tento spôsob značenia menej stresujúci ale pri tom dostatočne trváci. Značenie je jedinečné a nezameniteľné pre každé zviera v danej kletke.

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

Predpokladáme, že po podaní baktérií s cieľom vyvolať sepsu bude u experimentálnych zvierat zo skupín Sepsa, Sepsa+DNÁza a Sepsa+inDNÁza vyvolaná zápalová imunitná reakcia a teda ich stav sa postupom času bude zhoršovať. Septické skóre sa bude hodnotiť v priebehu 24 hodín a v prípade dosiahnutia skóre 5 (zježená srst', privreté oči, sťažené dýchanie, ospalé, neaktívne), budú humánne utratené.

Predpokladaná mortalita zvierat: V tomto type projektu sa predpokladá celková mortalita maximálne 50%, pričom myši budú humánne usmrtená po dosiahnutí septického skóre 5 (zježená srst', privreté oči, sťažené dýchanie, ospalé, neaktívne).

Pred samotnou realizáciou experimentu bude dávka baktérií (2×10^8 KTJ) presne stanovená v predbežnom experimente, bude dávka baktérií podaná zvieratám (max 5), ktoré budú z tej istej firmy a budú rovnakého veku ako zvieratá, ktoré použijeme v samotnom experimente. V prípade, že by táto dávka ukázala ako príliš vysoká a zvieratá by sme boli nútení do 24 h utratiť, bude dávka baktérií znížená tak, aby sme v samotnom experimente zabránili neočakávane vysokej mortalite.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Zvieratá z kontrolnej skupiny budú podstupovať úkony, patriace do kategórie slabé. Pri týchto postupoch budú zvieratá pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach, avšak tieto úkony vo významnej miere nenarušujú pohodu ani celkový stav zvierat.

Zvieratá zo septických skupín budú postupovať rovnaké úkony, avšak po podávaní baktérií očakávame, že budú vplyvom zápalovej reakcie pociťovať vyššiu bolesť a utrpenie patriace do kategórie stredné až kruté.

Uplatňovanie zásad 3R:

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

REPLACEMENT

Pretože v plánovaných experimentoch sa budú hodnotiť zmeny koncentrácie extracelulárnej DNA a zápalových markerov v krvi, je nevyhnutné, aby sa experiment vykonal „in vivo“ na celom zvierati. Využitie bunkových kultúr alebo počítačových simulácií neprichádza pri tomto type experimentu do úvahy ako alternatívny spôsob výskumného prístupu, nakoľko indukcia zápalu a sepsy je komplexný proces, na ktorom sa podieľa celý imunitný systém.

REDUCTION

Plánovaný experiment je zostavený tak, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov použitých čo najmenej zvierat a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z

každého použitého pokusného zvieraťa. Postupy budú vykonávať iba dostatočne vyškolené a zacvičené osoby, čím sa výrazne zníži možná chybovosť výsledkov a nutnosť opakovania postupu. Počet použitých zvierat bol stanovený tak, aby bola zachovaná reprodukovateľnosť a validita pokusov. Jedná sa o počet jedincov, ktorý je akceptovateľný pre publikovanie výsledkov za predpokladu ideálneho odberu a analýz (ANOVA, a Študentovho t-test) zameraných na vyhodnotenie terapeutického účinku DNázy pri bakteriálne indukovanej sepe u myši. Podobne bude v experimente použitý rovnaký počet kontrolných zvierat. Zvieratá budú objednávané v jednotnom časovom intervale, aby sa predišlo sezónnym zmenám a potrebe experiment opakovať. V experimentoch sa použijú geneticky homogénne skupiny zvierat.

REFINEMENT

Zvieratá budú počas pokusov kontinuálne sledované a výsledky priebežne vyhodnocované a v prípade zistenia nevhodných prípadne neočakávaných udalostí bude experiment ukončený. Denným sledovaním zdravotného stavu zvierat dochádza k jemnej manipulácii so zvieratami a kontaktu s tými istými osobami, čím sa maximálne eliminuje stres zvierat. Súčasťou procesu zjemnenia bude aj minimalizácia možného strádania a utrpenia zvierat, a to dodržiavaním piatich slobôd (sloboda od smädu, hladu a podvýživy – nerušeným prístupom k vode a krmivu zaručujúcemu plné zdravie a telesnú zdatnosť; sloboda od nepohodlia – poskytnutím zodpovedajúceho prostredia vrátane úkrytu a pohodlného miesta k odpočinku; sloboda od bolesti, zranenia a chorôb – prevencia alebo rýchla diagnóza a liečenie; sloboda od strachu a úzkosti – poskytnutím vhodného prostredia a spoločnosti zvierat rovnakého druhu; sloboda realizovať normálne správanie – zaistením takého prostredia a zachádzania, pri ktorom bude vylúčené mentálne strádanie).

Navyše za cieľom zjemnenia utrpenia budú myši, ktoré pri sledovaní septického skóre budú mať zježenú srst, privreté oči, sťažené dýchanie, budú ospalé a neaktívne (tzn. septické skóre 5), humánne usmrtené.

Spätné posúdenie:

Vzhľadom na to, že ide o projekt, ktorý je v kategórii kruté a u zvierat budeme sledovať prežívanie, projekt bude podliehať spätnému posúdeniu.

*Do 01.08.2020 budú
zaslana výsledky z projektu na spätné posúdenie*

Príloha č. 2 : - 469/18 - 221/3

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

Názov projektu:

Efekt vaječných blán a ich kombinácie s uhličitanom vápenatým, pevnou liekovou formou Biomin H (Calcii carbonas ex testae ovi), vitamínom D₃ a vitamínom K₂ na osteoporotický proces u ovariektomovaných potkaníc.

Kľúčové slová v projekte: zvierací model osteoporózy, minerálny metabolizmus

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

Cieľom projektu bude zistiť účinok vaječných blán a ich kombinácií s prídavkom pevnej liekovej formy (tbl, cps.) z prášku získaného ekologickým spracovaním vaječnej škrupiny inovatívnymi technologickými postupmi, resp. komerčného uhličitanu vápenatého a ďalších vitamínových aditív pre liečbu osteoporózy na štandardnom zvieracom modeli ovariektomovaných potkaníc. Efekt na minerálny metabolizmus kostí bude sledovaný a porovnávaný po aplikácii látok: sušené vaječné blany, prírodný vápnik vyrobený z vaječných škrupín, resp. komerčne predávaný vápnik vo forme chemicky pripraveného uhličitanu vápenatého, vitamín D₃ a vitamín K₂, ktoré sú súčasťou liečebných postupov pri osteoporóze.

Potkany sa podrobia operácii v celkovej i lokálnej anestézii. Pooperačný stav a doba pozorovania 56 dní sú optimálne pri eliminácii nepriaznivých vplyvov na zdravie zvierat denným podávaním analgetika. Testované látky budú zamiešané do krmnej zmesi a vylúči sa individuálna aplikácia sondou zvieratám.

Predpokladáme, že ujma na použitých zvieratách bude v prvých troch dňoch po operácii, kedy sa uskutoční proces hojenia vnútorného poranenia a incíznej rany na koži. Počas všetkých úkonov sa bude eliminovať stres a utrpenie podaním celkovej anestézie a dennej aplikácii analgetík. Z hľadiska bezpečnosti účinnosti budúceho zdravotného prostriedku pre človeka prínos projektu výrazne prevyšuje ujmu u experimentálnych zvierat.

Očakávaným prínosom projektu bude vývoj účinných látok farmakologicky využiteľných v prevencii a liečbe ľudí s ochorením kostného tkaniva spojeného s osteoporotickými zmenami vplyvom narušenia hormonálnej homeostázy, resp. znížiť riziko zlomenín kostí v rizikových skupinách ľudí.

V projekte sa použije celkom 110 zvierat (dospelých laboratórnych potkanov, samíc, kmeňa Sprague Dawley). Experimentálnym jedincom pred usmrtením nebudú aplikované žiadne cudzorodé látky. Testované látky neprídu do kontaktu so živými zvieratami.

Experimentálny model u potkaníc sa vyvolá bilaterálnou ovariektómiou. Po druhom mesiaci sa budú sledovať symptómy osteoporotických zmien. SHAM kontrolným a ovariektomovaným neliečeným potkaniciam sa bude aplikovať kompletná krmná zmes bez minerálnej prísady. Zvieratám v liečených OVX skupinách bude počas celého experimentu (56 dní) podávané každý deň upravené krmivo s prídavkom testovaných zlúčenín pracovníkom s dlhodobou praxou.

Celkovo v postupe budú vykonávané práce na zvieratách pri strednej úrovni krutosti podľa klasifikácie krutosti postupov. Váženie zvierat, aplikácia anestézie intramuskulárne sa hodnotia ako slabo kruté. Operácia, pooperačný stav, podávanie analgetika, antibiotika, vyberanie stehov po zákroku, odber krvi z retroorbitálneho sínusu v celkovej anestézii a odber moču v metabolickej klietke budú na strednej úrovni krutosti.

Stupne krutosti v projekte:

Váženie zvierat	slabá krutosť
Aplikácia anestézie intramuskulárne	slabá krutosť
Aplikácia analgetika, antibiotika, i.m.	stredná krutosť
Operácia v celkovej anestézii	stredná krutosť
Pooperačný stav	stredná krutosť
Vyberanie stehov po zákroku v ľahkej anestézii	stredná krutosť
Odber krvi z retroorbitálneho sinusu v celkovej anestézii	stredná krutosť
Odber moču v metabolickej klietke	stredná krutosť

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

Animálny model osteoporózy sa štandardne používa pri sledovaní účinkom potenciálnych látok ovplyvňujúcich minerálny metabolizmus kostí. V medzinárodných databázach (ECVAM, NC3R) sa zisťovali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatívna metóda testovania látok s antiosteoporotickými vlastnosťami prípravkov použiteľných v medicíne u živých organizmov. Potkan laboratórny 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 potkanov tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť i validita postupu pre biochemické, hematologické, makroskopicko-morfologické, histologické analýzy, ako aj ich štatistické vyhodnotenie. Zvieratá budú samičieho pohlavia, rovnakého veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom. Z dôvodu šetrenia zvierat nebudú zaradené zvieratá z predchádzajúcich sledovaní, pretože údaje o osteoporotických zmenách sú už známe a nie sú nutné pre hodnotiaci proces v tomto projekte.

Zásada zjemnenia (refinement)

Zvieratá budú po privezení z chovného zariadenia v karanténe. Po dobu 7 dní sa umiestnia po štyri v dostatočne veľkých vaniciach (rozmery 58x37x20cm) za stanoveného svetelného, tepelného a krmného režimu. Po operačnom zásahu sa ustajnia individuálne, aby sa zamedzilo vytrhnutiu stehov, narušeniu hojaceho procesu i prijímania krmiva v prípade napádania slabších jedincov agresívnejšími. Na zabránenie vzniku pooperačných zápalových reakcií sa použije antibiotikové krytie počas prvých troch dní. Operačné zákroky budú vykonávané skúseným odborným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Potkanice počas postupu prežijú výraznejší stres v operačnom a pooperačnom období, ktorý budeme minimalizovať podaním anestetík a analgetík. So zvieratami sa bude zaobchádzať šetrne a prostredie vanice sa obohatí predmetmi na hru a ohryzovanie. Pri odbere moču v metabolických klietkach sa stres zmierni minimálne nutným pobytom v zariadení (max. 12 hodín) s prístupom ku krmivu a vode bez obmedzenia, šetrným i ohľaduplným zaobchádzaním so zvieratami. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbkej celkovej anestézii.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie