

Netechnické zhrnutie projektu — 594/18-221/3

Názov projektu:

Nanočastice zlata: vplyv fyzikálno-chemických vlastností na ich distribúciu, akumuláciu a biologické účinky *in vivo*

Kľúčové slová:

Nanočastice zlata, nanomedicína, orgánová toxicita, cielená terapia

Účel projektu:

Základný biomedicínsky výskum

Cieľ projektu:

Predkladaný projekt je z oblasti základného výskumu fyziológie a patofyziológie s aspektom klinického využitia potenciálne novej formy liečiva - nanočastíc. Cieľom experimentálnej práce navrhovaného projektu je objasniť doteraz neznáme zákonitosti distribúcie nanočastíc zlata a ich (pato)fyziologický účinok v cieľových orgánoch, ako obličky, pečeň, slezina a pľúca a možnosti ich eliminácie z organizmu po intravenózne aplikácii.

Prínos projektu:

Predkladaný projekt sa venuje problematike zákonitostí distribúcie nanočastíc zlata v živom organizme v závislosti od ich fyzikálno-chemických parametrov a ich biologických účinkov, ktoré môžu byť následne využité na prípravu nanoliečiv v klinickej praxi. Zámerom je pochopenie vzťahu medzi fyzikálno-chemickými vlastnosťami a biologickou aktivitou študovaných nanočastíc a identifikácia parametrov nanočastíc zlata (AuNPs), ktoré ovplyvňujú distribúciu a akumuláciu nanočastíc v organizme. Posúdenie distribúcie skúmaných nanočastíc *in vivo* v krátkodobom i dlhodobom horizonte s ohľadom na ich fyzikálno-chemické vlastnosti a špecifickosť jednotlivých tkanív/orgánov, ktoré prispievajú k prednostnej akumulácii nanomateriálov poskytne základ k účelovej optimalizácii vlastností AuNPs smerom k výslednej terapeutickej aplikácii. Získanie tejto novej dôležitej línie previazaných poznatkov bude veľkým prínosom pre výskum v oblasti nanomedicíny a prinesie nový pohľad na špecifické interakcie AuNPs s biologickým materiálom (nano:bio interakcie), čo prispeje k optimalizácii dizajnu doteraz navrhovaných terapeutických nanočastíc. Predkladaný projekt veľkou mierou prispeje k zodpovedaniu pálčivých a do dnešného dňa nezodpovedaných otázok, ktoré limitujú širšie klinické využitie nanoliečiv.

Počet a druh použitých zvierat:

Myš laboratórna 8-10 týždňov, samce

- Kmeň C57BL/6 (navrhovaný počet 384 na 42 mesiacov riešenia projektu)

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

Pri aplikácii vybraných nanočastíc zlata sa neočakáva nepriaznivý vplyv na zdravotný stav zvierat. Z výsledkov doterajších *in vitro* experimentov ako aj *in vivo* štúdií s iným druhom nanočastíc zlata v danej koncentrácii sa nepreukázal toxický vplyv týchto nanočastíc ani na bunkové kultúry ani na myši, preto ani u zvierat plánovaných v tomto projekte nepredpokladáme nežiadúce účinky. Zvieratám budú jednorázovo intravenózne podané nanočastice zlata v 5% roztoku glukózy. Aplikácia do

retroorbitálneho sínusu je pre zvieratá stresujúca, preto bude prebiehať v krátkodobej anestézii (izofluran).

Predpokladaná úroveň krutosti:

Stredná. K utrpeniu zvierat nedochádza, keďže i.v. aplikácia roztoku nanočastíc, prípadne roztoku glukózy s použitím inzulinových striekačiek s najtenšími ihlami nie je bolestivá a zvieratá ju podstupia v krátkej narkóze. Predchádzajúce *in vivo* štúdie ukázali, že nanočastice zlata, aplikované systémovo, nespôsobili zvieratám žiadne utrpenie. Podobne ako slabé utrpenie sa dá charakterizovať pobyt myši v metabolickej klietke (3 hodiny raz týždenne) z dôvodu zvyknutia si na nové prostredie a mriežkované dno. Keďže sa úplne nedá vylúčiť, hoci je nepravdepodobná, reakcia organizmu myši na nanočastice pri dlhodobom prežívaní, predpokladanú úroveň krutosti stanovujeme ako strednú.

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie:

Napriek tomu, že je snaha minimalizovať experimenty na laboratónych zvieratách (3 R zásady), v prípade nanomateriálov, pôsobení ktorých je človek bezprostredne vystavený (farmaceutický a potravinársky priemysel, nanomedicína), sú nevyhnutné toxikologické štúdie zamerané na biologickú bezpečnosť nanomateriálov na úrovni experimentálnych zvierat. Alternatívne metódy nedokážu zachytiť zložitú skúmanú problematiku, a preto sa nimi nedajú nahradiť navrhované postupy. Testovaním *in vitro* nie je možné sledovať komplexné interakcie prebiehajúce v organizme, napríklad reakciu imunitného systému a tkanivovú distribúciu látok, ani nie je možné vyhodnotiť celkovú terapeutickú účinnosť preparátov. Pritom k hlavným orgánom a tkanivám, ktoré môžu byť zasiahnuté vplyvom nanočastíc patria práve pečeň (hepatotoxicita), obličky (nefrotoxicita) a imunitný systém (imunogenicitu/imunotoxicita a hematologická toxicita).

Obmedzenie:

Na základe dostupných údajov z literatúry a našich vlastných skúseností je počet zvierat navrhnutý tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Celkové množstvo zvierat neprekročí počet 384. Projekt je naplánovaný na 42 mesiacov, a keďže sa jedná o charakterizáciu neznámych biologických účinkov nanočastíc na orgány a tkanivá a to z krátkodobého aj dlhodobého hľadiska, je tento počet myši na celé trvanie projektu adekvátny. Ak získame štatisticky relevantné údaje z menšieho počtu zvierat, nepoužijeme celkový plánovaný počet.

Zjemnenie:

Myši budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody, čo sa týka aj použitia metabolických klietok. Prostredie chovných klietok bude obohatené o materiál umožňujúci úkryt a stavbu hniezd. Použitie inzulinových striekačiek s najtenšími ihlami minimalizuje utrpenie zvierat pri aplikácii roztoku nanočastíc. Podobne sa minimalizuje utrpenie zvierat pri pobyte v metabolickej klietke, ktoré je zredukované z 24 hodín na 3 hodiny. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Spätné posúdenie projektu:

Projekt nepodlieha spätnému posúdeniu.

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: *"Vplyv prídavku produktu naftového priemyslu (xylénu), extraktu liečivej rastliny (yuka) a ich kombinácií na reprodukčné, hormonálne a metabolické ukazovatele samíc myši",*

v rámci schválenej grantovej úlohy VEGA 1/0392/17: *"Vplyv kontaminantov - produktov naftového priemyslu na funkcie vaječníkov rôznych druhov zvierat. Využitie liečivých rastlín na znižovanie účinku týchto kontaminantov"*

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 598/18-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): benzén, xylén, toluén, vaječník, liečivé rastliny

Účel projektu*: Základný výskum

Ciele projektu: Bol dokázaný nepriaznivý vplyv produktov naftového priemyslu na morfológiu reprodukčného traktu, dĺžku menštruačného cyklu, vývin embryí a plodnosť, no mechanizmy týchto vplyvov a vplyv na metabolizmus zvierat, ako ani ich ovplyvnenie alebo zabránenie prírodnými rastlinnými prípravkami doposiaľ preskúmané nie sú. Hlavným cieľom projektu bude identifikovať vplyv týchto látok na folikulogenézu samíc, priebeh estrálneho cyklu, fertilitu, proliferáciu, apoptózu, sekrečnú aktivitu alebo odozvu folikulových buniek ovárií exponovaných zvierat na účinok nadradeného hormonálneho regulátora.

Prínos z vykonaného projektu: Výsledky *in vivo* postupov prinesú nové poznatky o vplyve kontaminantov naftového priemyslu, liečivých rastlín a ich kombinácie na organizmus zvierat, folikulogenézu, endokrinný stav a reprodukčnú výkonnosť a pomôžu identifikovať možné mechanizmy účinku kontaminantov a rastlinných látok. Rovnako tak naznačia možné spôsoby prevencie a zabráňovania negatívneho vplyvu týchto kontaminantov prostredia prírodnými rastlinnými prípravkami.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: Modelovým zvieratám pre všetky experimenty bude myš laboratórna (kmeň CD-1 IGS). Pri zohľadnení všetkých potrieb vedeckého výskumu i predpisov stanovených v nariadení vlády 377/2012 Z.z. maximálny počet použitých myší za celé obdobie trvania projektu (09/2018-12/2020) neprekročí 240 myší.

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu: Ujma spôsobená zvieratám z hľadiska utrpenia, bolesti a strachu bude minimálna. Po aplikácii samotného xylénu v pitnej vode môžeme predpokladať tieto komplikácie a zmeny v zdravotnom stave zvierat: znižovanie životaschopnosti dospelých myší, ale hlavne ich mláďat, nechutenstvo, vracanie, poruchy estrálneho cyklu, vývinu a implantácie embryí, poruchy bunkového cyklu, štruktúry DNA a chromozómov, zvýšený výskyt rakoviny rôznych tkanív (Sirotkin, Harrath, Reprod Toxicol, 2017, 71:142-145). Tieto údaje sú však efektmi xylénu hlavne pri inhalačnej expozícii a neodzrkadľujú jeho účinky po orálnej expozícii. Podľa NTP 1986, nami zvolená dĺžka expozície (17-23 dní) myší xylénu spadá do

strednodobej, pri ktorej neboli zistené žiadne zmeny v zdravotnom stave zvierat alebo ich správaní pri nami určenej dennej dávke 500 mg/kg. Pri vyšších denných dávkach podávaných po dobu 14 dní (teda akútna expozícia), 2000 mg/kg (LOAEL) došlo k: splytčeniu dýchania a zníženiu denných hmotnostných prírastkov, hyperaktivite, avšak pri 1000 mg/kg (NOAEL) neboli zistené žiadne systémové poruchy ani poruchy vývinové. Neočakávame preto viditeľné zmeny zdravotného stavu zvierat spôsobené podávaním xylénu, môžeme očakávať iba prechodný diskomfort spôsobený zmenou zápachu a chuti pitnej vody.

Okrem perorálnej aplikácie xylénu a dietetickej zmeny u zvierat, váženia telesnej hmotnosti ($1 \times / \text{týždeň}$) a dennej manipulácie spojenej s čistením kliebok samíc, nebude pokusným ani kontrolným zvieratám spôsobovaný žiaden ďalší diskomfort. Všetky invazívne zásahy (odber krvi a orgánov) budú vykonané až po ich usmrtení.

Presná dĺžka prežívania zvierat po per os aplikácii xylénu pri dávkach, ktoré chceme v projekte použiť nie sú z literatúry známe. LD₅₀ popisovaná pri akútnej orálnej expozícii je uvádzaná u myši 5251 mg/kg živej hmotnosti (NTP 1986). Pre dlhodobú expozíciu xylénom LD₅₀ pre myši určená nie je, avšak popisuje sa, že denná dávka xylénu podávaného v kukuričnom oleji 4000 mg/kg po 14 dňoch spôsobila smrť všetkých testovaných myši (NTP 1986), avšak dávka 2000 mg/kg za 14 dní nezapríčinila smrť myši (NTP 1986). Predpokladáme preto, že ani nami zvolená denná dávka xylénu, ktorej budú zvieratá vystavené (500 mg/kg) nie je dávkou, ktorá by ohrozovala život zvierat za čas, ktorý sme zvolili pre projekt (17-23 dní aplikácie xylénu).

Predpokladaná úroveň krutosti: Postup vykonávaný v rámci pokusov (dlhodobá denná perorálna aplikácia nízkych dávok xylénu) spadá do kategórie krutosti „stredné“, tzn., je pravdepodobné, že zvieratá v jeho dôsledku budú pociťovať krátkodobú strednú bolesť, utrpenie alebo strach, alebo dlhotrvajúcu slabú bolesť, utrpenie alebo strach a je pravdepodobné, že stredne narušia pohodu alebo celkový stav zvierat. Ďalšie postupy (pozitívna úprava diéty, neinvazívne vyšetřovanie klinického stavu a váženie zvierat) spadajú do kategórie krutosti „slabé“, tzn. zvieratá v ich dôsledku nebudú pociťovať žiadnu alebo iba krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

V rámci projektu bolo vykonané *in vitro* testovanie aditív na ováriách získaných z bitúnkov (priamy vplyv). Avšak toto testovanie neumožňuje simulovať podmienky organizmu po skonzumovaní aditív a v priebehu estrálneho cyklu, teda podmienky, ktoré závisia od mnohých endogénnych a exogénnych faktorov. Plánované postupy nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom bez použitia živých zvierat.

2. Redukcia počtu zvierat:

Plánovaný postup je zostavený tak, aby pre dosiahnutie očakávaných výsledkov bolo použitých čo najmenej zvierat a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého použitého pokusného zvieratá. Počet použitých zvierat (240 ks) bol stanovený tak,

aby bola zachovaná reprodukovateľnosť a validita pokusov pri minimálnom objeme vstupného materiálu. Usmrcovanie zvierat s následným odberom biologického materiálu je v postupe nastavené tak, aby mohlo byť vo vzorkách vyšetrených paralelne toľko parametrov, koľko bude technicky možné. Navrhovaný počet zvierat však zohľadňuje aj potreby riešenia nepredvídaných vedeckých problémov, preto očakávame, že reálne počty použitých zvierat budú nižšie.

3. Zjemnenie:

Hlavným dôvodom výberu myši laboratórnej je vysoká reprodukčná schopnosť druhu (početnosť vo vrhu, krátkotrvajúci celoročne sa opakujúci pohlavný cyklus myši), ktorá umožní získanie potrebného objemu interpretovateľných vedeckých výsledkov v relatívne krátkom čase. Plánovaný postup je zostavený tak, aby bola minimalizovaná bolesť alebo stres použitých pokusných zvierat, a aby bol zabezpečený primeraný welfare od ich dovozu až po smrť. Všetci pracovníci, ktorí prichádzajú do styku so zvieratami sú príslušne poučení a budú dbať na humánny prístup k zvieratám a starať sa o to, aby neboli v žiadnej fáze pokusov vystavované zbytočnému stresu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Keďže v projekte nie sú použité primáty ani postupy klasifikované ako „kruté“ a ani tak nestanovuje vyjadrenie etickej komisie, spätné posúdenie projektu nie je podľa § 37 NV 377/2012 Z.z. nutné.

Netechnické zhrnutie projektu 746/18-221/3

Názov projektu:

„Štúdium mechanizmov, ktoré eliminujú tumorigenitu nádorových buniek vplyvom nadexpresie ľudského faktoru nádorovej nekrózy“

Kľúčové slová: tumorigenita, tumor nekrotizujúci faktor alfa (TNF α), génová terapia

Účel projektu: Základný výskum

Cieľ projektu: Podľa najnovších výsledkov geneticky modifikované bunky melanómu a karcinómu hrubého čreva nadexprimujúce exogénny faktor nádorovej nekrózy TNF α úplne strácajú schopnosť tvoriť experimentálne subkutánne nádory *in vivo*. Tieto výsledky vedú k snahe študovať mechanizmus, ktorý blokuje tumorigenézu a môže mať vplyv na heterogenitu nádoru. Cieľom projektu bude sledovať, či je efekt straty tumorigenity nádorových buniek nadexprimujúcich TNF α univerzálny a platí aj v prípade buniek odvodených od iných typov nádorov.

Prínos projektu: Štúdia poskytne informácie o biológii experimentálnych nádorov v súvislosti so stratou, resp. oslabenou tumorigenitou nádorovej bunky vplyvom nadexpresie TNF α . Poskytne bližšiu informáciu o vývoji 1/ subkutánných xenograftov nádorových buniek kolorektálneho karcinómu, melanómu, glioblastómu a ovarálneho karcinómu a 2/ rozseve experimentálnych peritoneálnych a pľúcnych metastáz indukovaných nádorovými bunkami ovarálneho karcinómu a bunkami melanómu na experimentálnom modeli *in vivo*. Cieľom je sledovať, či na modeloch agresívnych malignít bude vplyvom nadexpresie proteínu TNF α redukovaný rozsev metastáz, prípadne blokovanie ich rastu. Získané výsledky experimentov *in vivo* pomôžu v štúdiu fenoménu straty tumorigenity nádorovej bunky.

Počet a druh použitých zvierat: myš laboratórna SCID/bg (64 zvierat) a BALB/c Nu/nu (96 zvierat). Počet zvierat pre účely projektu je adekvátny, vzhľadom na 6 sledovaných skupín, spolu 160 ks myši na obdobie 5 rokov. Počty v skupinách sú minimalizované tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené.

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu: Pri subkutánných xenograftoch sa neočakáva ujma, nádory do 1cm³ bez znakov nekrózy alebo ulcerácie nemajú negatívny vplyv na pohodu zvierat, Prekročenie veľkosti, nekróza alebo ulcerácia subkutánneho xenograftu budú dôvodom na vykonanie humánneho ukončenia postupu. Pri modeloch intraperitoneálnych a pľúcnych metastáz možno predpokladať zhoršenie zdravotného stavu, ktorý sa prejaví hlavne stratou hmotnosti, sťaženým dýchaním. Ďalšie iné zásahy na zvieratí už nie sú plánované.

Predpokladaná úroveň krutosti: krutá

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie

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

Obmedzenie:

Na základe skúseností z predchádzajúcich projektov, údajov z vedeckej literatúry a *in vitro* štúdií sú počty zvierat v skupinách je minimalizované tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené.

Zjemnenie:

Počas 1-3 mesačného prežívania zvierat, budú mať myši čo najlepšiu starostlivosť, budú umiestnené v skupinách, čo im umožní realizáciu sociálneho správania. Budú mať neobmedzený prístup k potrave a pitnej vode. Počet zvierat v kletke bude v súlade s prílohou 5 nariadenia vlády SR č 377/2012. Prostredie bude obohatené plastovými domčekmi, papierovou vatou alebo špeciálnou podstielkou na stavanie hniezd. Existujú vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizáciu zvierat počas injekčných aplikácií. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. Pri manipulácii so zvieratami sa bude pracovať jemne, pokojne, aby bola minimalizovaná ich traumatizácia a stres.

2-3x týždenne, v prípade potreby denne, bude dôkladne monitorovaný zdravotný stav zvierat. V prípade výrazne zhoršeného zdravotného stavu, ktorý sa prejaví viacerými nasledujúcimi znakmi: výraznou stratou hmotnosti rovnej alebo vyššej ako 20%, pri fyzických prejavoch (napr. naježená srst', zhrbený postoj), pri pozorovaní faciálnej expresie bolesti (orbitálne zúženie očí, zmenené držanie ušnic a fúzikov, vyčnievajúce líce výbežky; skóre vyššie ako 4 podľa publikácie Langford DJ et al., Nature Methods, 2010, doi:10.1038/nmeth.1455) pristúpime k humánnemu ukončeniu postupu. Postup bude ukončený eutanáziou, dislokáciou krčných stavcov, ktorá je charakterizovaná slabou krutosťou.

Spätné posúdenie projektu:

Áno/do štyroch mesiacov od ukončenia projektu

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie k projektu podľa §40 nariadenia vlády SR č. 377/2012

Z.z.

803/18-221/3

Názov projektu: Testovanie tumorigénneho potenciálu Vero buniek na dospelých nu/nu athymických myšiach

Typ výskum: Ide o aplikovaný výskum, ktoré cieľom je zabrániť poškodeniu zdravia ľudskej populácie.

Kľúčové slová: tumorigénny potenciál, Vero bunky, nude myši

Cieľ projektu: Cieľom pokusu je určenie tumorigénneho potenciálu pätnástich bunkových línií (pätnástich klonov) – Vero buniek, a overenie optimálnej hranice pasáže, t.j. maximálne číslo pasáže, kde nedochádza k formovaniu novotvarov. Pokus sa bude opakovať trikrát, v priebehu 2 rokov. V každom z týchto troch pokusov sa bude testovať niekoľko pasáží z iného zdroja Vero buniek. Tieto bunkové línie budú následne použité pri výrobe biologických produktov (vakcín, proti chrípke).

Jedným zo súčasných kritérií pri hodnotení a používaní bunkových línií v produkcii vakcín je neprítomnosť alebo nízky výskyt tumorigénneho potenciálu. Vero bunky patria do triedy buniek, ktoré sú známe ako pokračujúce bunkové línie (kontinuálne bunkové línie). Ich rastové vlastnosti a charakteristiky kultúry majú mnoho výhod, v porovnaní s inými bunkovými líniami používanými pri výrobe vakcín. No so stúpajúcim počtom pasáží sa zvyšuje ich tumorigénny potenciál. Z toho dôvodu je nutné otestovať vyššie pasáže Vero buniek, predtým ako sa použijú k príprave vakcín. V našom prípade budú testované pasáže Vero buniek do pasáže čísla 170.

Postup projektu:

Počet zvierat / skupiny:

Zvieratá budú rozdelené do 7 dávkových skupín po 10 zvierat v skupine (5 samcov + 5 samíc). Plus ku každej skupine sa pridá jedno náhradné zviera (1 samec alebo 1 samica).

Tabuľka 1: rozdelenie zvierat v skupinách (prvá šarža)

SKUPINA	NÁZOV SKUPINY	BUNKY	POČET BUNIEK (IN 0.2 ML)	PITVA	POČET ZVIERAT
1	Negatívna kontrola	Cell carrier-medium or PBS	0	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samec)
2	Pozitívna kontrola	HT 1080 human fibrosarcoma	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samica)
3	Testovaná bunková línia Klon 1	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samica)

4	Testovaná bunková línia Klon 2	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samec)
5	Testovaná bunková línia Klon 3	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samica)
6	Testovaná bunková línia Klon 4	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samec)
7	Testovaná bunková línia Klon 5	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samica)

Tabuľka 2: rozdelenie zvierat v skupinách (druhá šarža)

SKUPINA	NÁZOV SKUPINY	BUNKY	POČET BUNIEK (IN 0.2 mL)	PITVA	POČET ZVIERAT
1	Negatívna kontrola	Cell carrier-medium or PBS	0	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samec)
2	Pozitívna kontrola	HT 1080 human fibrosarcoma	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samica)
3	Testovaná bunková línia Klon 1	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samica)
4	Testovaná bunková línia Klon 2	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samec)
5	Testovaná bunková línia Klon 3	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samica)
6	Testovaná bunková línia Klon 4	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samec)
7	Testovaná bunková línia Klon 5	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samica)

Tabuľka 3: rozdelenie zvierat v skupinách (tretia šarža)

SKUPINA	NÁZOV SKUPINY	BUNKY	POČET BUNIEK (IN 0.2 mL)	PITVA	POČET ZVIERAT
1	Negatívna kontrola	Cell carrier-medium or PBS	0	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samec)
2	Pozitívna kontrola	HT 1080 human fibrosarcoma	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samica)
3	Testovaná bunková línia Klon 1	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samica)
4	Testovaná bunková línia Klon 2	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samec)
5	Testovaná bunková línia Klon 3	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samica)
6	Testovaná bunková línia Klon 4	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samec)

7	Testovaná bunková línia Klon 5	End-of-production passage Vero cells	1×10^7	16 weeks	5 samce, 5 samice, plus 1 náhradné zviera (samica)
---	--------------------------------	--------------------------------------	-----------------	----------	--

Pokus sa bude opakovať 3 krát s inými produkčnými klonmi Vero buniek v rozdelených pasážach, ale s rovnakým počtom aj usporiadaním zvierat v pokuse. Celkový počet zvierat za celé obdobie bude 231 (105 samcov + 9 náhradných samcov, 105 samíc + 12 náhradných samíc).

Vlastný pokus:

Na začiatku pokusu bude každému zvieraťu jednorázovo subkutánne (do skapulárnej oblasti) podané 0,2 mL objemu bunkovej suspenzie obsahujúcej požadovaný typ a počet buniek. Zvieratá sa nechajú prežívať 16 týždňov.

Palpácia a meranie novotvarov:

Po siedmych dňoch od subkutánnej aplikácie látky bude miesto vpichu pozorované adspekčne a palpačne vyšetrené. Zvieratá následne budú raz za týždeň adspekčne a palpačne vyšetrené, veľkosť prípadne vzniknutých novotvarov bude zaznamenaná. Veľkosť novotvarov bude meraná kalibrovaným meradlom (kaliper).

Hmotnosť zvierat a prístup k potrave:

Zvieratá budú vážené raz za týždeň. Krmivo a voda bude podávaná *ad libitum*. Krmivo aj voda budú sterilizované (autokláv).

Ustajnenie:

Zvieratá budú v typizovaných chovných klietkach pre myši, po 5 myší v jednej klietke. Podstielka bude sterilizovaná a vymieňaná minimálne raz za dva týždne.

Klinické pozorovanie:

Zvieratá v súvislosti s morbiditou a mortalitou budú pozorované denne, 5 krát za týždeň. Bude pozorovaná reakcia zvierat na podanú látku, všetky známky tumorigenicity, zmeny správania sa, iné abnormálne príznaky budú zaznamenané. Moribundné zvieratá budú humanne utratené podľa human end points a bude vykonaná pitva.

Pitva a patológia:

Zvieratá ktoré uhynú počas pokusu budú pitvané a budú zaznamenané všetky zmeny na koži a vnútorných orgánoch. Po 16 týždňoch od aplikácie testovanej látky budú zvieratá humanne utratené, pred pitvou sa zvieratá zvažia. Pitva bude zameraná na stanovenie prítomnosti novotvarov, dôkladne bude vyšetrené miesto vpichu testovanej látky, lymfatické uzliny, pľúca, pečeň, srdce, obličky, slezina a mozog. Všetky vzniknuté lézie, novotvary budú prehmatané, odmerané (kaliper) zaznamenané a fixované pre histologické spracovanie.

Druh použitých zvierat a ich predpokladaný počet:

Druh: Myš, nude nu/nu athymic, samce a samice.

Samce: 105 myší + 9 náhradné

Samice: 105 myší + 12 náhradné

Spolu: 231 myší

Predpokladaný prínos projektu:

Projekt je orientovaný na oblasť ľudského zdravia, konkrétne na profylaxiu organizmu proti infekciám. Testované bunkové línie sa následne použijú ako substancia k výrobe vakcín pre humánne použitie.

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

V rámci vykonania pokusu budú na zvieratách vykonané nasledovné postupy:

- *Neinvazívny postup* – váženie zvierat (raz za týždeň) – kategória krutosti „slabá“ **krutosť**
- *Invazívny postup* – subkutánna aplikácia testovanej látky (jednorazová) – kategória krutosti „slabá“ **krutosť**
- *Neinvazívny postup* – palpačné vyšetrenie miesta vpichu po 7dňoch od aplikácie a následné palpačné vyšetrenia prípadne vzniknutých novotvarov – kategória krutosti „slabá“ **krutosť**
- *Neinvazívny postup* – meranie veľkosti (kaliper) prípadných novotvarov – kategória krutosti „slabá“ **krutosť**
- *Neinvazívny postup* – inhalačná anestézia pred usmrtením dekapitáciou (slabá inhalačná anestézia halotanom) – kategória krutosti „slabá“ **krutosť**
- *Invazívny postup* – prežívanie zvierat po aplikácii fibroblastómov (pozitívna kontrola) – kategória krutosti – „stredná“

Spomenutým invazívnym a neinvazívnym postupom sa pre úspešné splnenie cieľov navrhovanej štúdie nedá vyhnúť, ale sú minimalizované na najnižšiu možnú mieru tak, aby zvieratá neutrpeli žiadnu zdravotnú, fyzickú ani psychickú ujmu. Testované bunkové línie budú pasážované do čísla pasáže 170, nepredpokladá sa teda výskyt novotvarov.

Po aplikácii Vero buniek je možné očakávať edém v mieste vpichu.

V prípade pozitívnej kontroly sa po niekoľkých týždňoch od aplikácie očakáva, že sa v mieste vpichu vytvorí novotvar. Novotvar môže znížiť kvalitu života u zvierat. V prípade, že novotvar presiahne 20 mm v jednom rozmere, pristúpi sa k humánnemu utrateniu zvierat. V prípade, že novotvar nepresiahne 20 mm v jednom rozmere, ale zviera má výrazne zhoršený zdravotný stav, pociťuje bolesť a strach, pristúpi sa k humánnemu utrateniu, podľa human end point.

Uplatnenie zásad 3R:

- **Refinement** – v pokuse nebudú vykonané bolestivé zákroky pri ktorých je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť. Slabá - stredná bolesť môže byť spôsobená systémovou reakciou na podanú látku. Po podaní testovanej látky bude zvieratám venovaná pozornosť. Pre hodnotenie zdravotného stavu zvierat máme vypracovaný

„*human end point*“. V prípade naplnenia skóre sa pristúpi k humánnemu utrateniu zvierat'a. Ak by bolo utrpenie zvierat neprijateľné pristúpime k „*human end point*“.

- Reduction – počty zvierat v pokuse sú primerané, redukované v maximálnej miere tak, aby sa nemohla ovplyvniť validita pokusu.
- Replacement – Možnosť náhrady testami *in vitro*. Test na zvieratách sa nedá nahradiť alternatívnymi metódami *in vitro* z dôvodu potreby reakcie živého organizmu na podanie látky a jeho systémové pôsobenie.

Postupy v projekte nepresahujú „stredný“ stupeň krutosti, preto nie je potrebné spätné posúdenie projektu.

NÁZOV PROJEKTU

Plazmatická DNA pri chorobách pečene.

377/2012 Z.z. NARIADENIE VLÁDY Slovenskej republiky

§ 40 Netechnické zhrnutie projektu

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 847/18-221/1

Kľúčové slová: zlyhanie pečene, tioacetamid, tetrachlórmetán, ligácia žľčovodov, extracelulárna DNA

Účel projektu: Základný výskum

CIEĽ PROJEKTU

Projekt vychádza z aktuálnych poznatkov o rôznych typoch extracelulárnej DNA a patogenéze zlyhaní pečene. Vychádzame z predpokladu, že rôzne typy extracelulárnej DNA, či už bakteriálna, mitochondriálna alebo jadrová sú pri hepatopatiách vyššie ako u zdravých jedincov a spolupôsobia pri multifaktoriálnej etiológii poškodenia pečene. V predkladanom projekte plánujeme postupne experimentálne overiť extracelulárne koncentrácie jednotlivých typov DNA v plazme a slinách experimentálnych zvierat, u ktorých bude vyvolaný model zlyhania pečene. Predpokladáme, že každý z typov extracelulárnej DNA by mohol prispievať k patogenéze hepatopatií. Keďže pečeň ovplyvňuje metabolizmus viacerých orgánov, jej zlyhanie spôsobuje napríklad zvýšenú permeabilitu čreva. Baktérie žijúce v čreve sa translokujú do pečene a stimulujú imunitnú reakciu. Predpokladáme teda, že DNA, ktorá je uvoľňovaná z baktérií vyvoláva zápalové reakcie a negatívne prispieva k patogenéze hepatopatií. Pri takýchto ochoreniach dochádza taktiež k sterilnému zápalu. Keďže dôsledkom zlyhania pečene je nekróza hepatocytov a DNA je z nich uvoľňovaná do prostredia, predpokladáme, že subtypy tejto DNA (jadrová a mitochondriálna) môžu byť potenciálnymi príčinami vzniku sterilného zápalu. Použitím špecifických metód molekulárnej biológie budeme schopní odlíšiť a porovnať jednotlivé typy ecDNA a tým sledovať funkciu všetkých spomínaných typov.

SÚLAD ZÁSAD 3R

Dizajn pokusov, ako aj počet jedincov v skupinách bude vychádzať z dostupnej literatúry, ktorá je zameraná na podobné problémy (a tam je bežný počet $n=15$ na skupinu). Toto je dôležité pre porovnateľnosť výsledkov s inými dátami, ale aj z hľadiska dodržania pravidla 3R pre experimenty so zvieratami. Analýza predbežných dát napr. z behaviorálnych testov poukazuje na to, že veľkosť skupiny by pri sile testu 90% a sledovanej variabilite, resp. rozdieloch mala dosahovať až $n=100$ pri hladine významnosti 5%. Tento prístup, žiaľ, nie je možné aplikovať, preto sa budeme musieť držať zaužívaných postupov a veľkostí skupín. Problém možnej falošnej negativity výsledkov sa budeme snažiť vyriešiť analýzou rovnakých veličín rôznymi testami, resp. metódami.

OČAKÁVANÁ UJMA A PRÍNOS

Tento projekt si kladie za úlohu objasnenie korelácie extracelulárnej DNA s chorobami pečene a teda jeho prínos spočíva v príspevku k objasneniu patogenézy pečenných poškodení. Následne budú tieto poznatky využité k hľadaniu ďalších modalít terapie hepatopatií, ktoré su potrebné.

Zvieratá budú podstupovať úkony, patriace do kategórie stredné. Pri týchto postupoch budú zvieratá pociťovať krátkodobú strednú bolesť, utrpenie alebo strach, avšak tieto úkony vo významnej miere nenarušujú pohodu ani celkový stav zvierat. Navyše, počas všetkých invazívnych výkonov budú zvieratá uspaté a bude podaná aj analgézia na zabránenie vzniku bolesti a následne utrpenia.

Celkový stav zvierat po vyvolaní zlyhania pečene nie je významne zmenený, keďže ide o krátkodobé modely zlyhania (chemické modely trvajú 1 deň a chirurgický model trvá 3 dni), pri ktorých dominujú zmeny na bunkovej a molekulárnej úrovni pečene. Pokusy budú ukončené predtým, ako zvieratá začnú pociťovať výrazný diskomfort súvisiaci so zlyhaním pečene. V prípade chirurgického modelu môžu zvieratá po prebudení sa z anestézy pociťovať krátkodobú bolesť alebo stres, ktoré súvisia so samotným operačným zákrokom a hojením rany. Na zmiernenie akéhokoľvek utrpenia budú však zvieratám podané analgetiká. Stres a bolesť zvierat pri chemických modeloch nebudú prítomné, keďže tieto látky budú zvieratám podané intraperitoneálne počas celkovej anestézy.

Pri známkach stresu, bolesti alebo distresu, bude zvieratám podaný Meloxicam. Nie paušálne. Ak nezaberie analgetikum a stav zvierat sa bude zhoršovať, budú utratené. Utratené budú pri dosiahnutí viac ako 60% z maximálneho skóre, ktoré môžu dosiahnuť pri hodnotení podľa Sotocinala et al. 2011 (5 bodov z 8). Rovnako tak pri dosiahnutí iných bodov human-endpointov.

Human endpointy:

☐ dosiahnutie viac ako 4 bodov podľa skórovacieho systému Sotocinal SC et al: The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions, Mol Pain. 2011; 7: 55.

☐ strata telesnej hmotnosti o viac ako 20%

☐ strata schopnosti sa obslúžiť (neschopnosť napriek ad libitum prístupu k potrave a vode, tieto dosiahnuť).

☐ úsilné dýchanie, tvrdé brucho, so znakmi sepsy, resp. peritonitídy

Počet a typ zvierat

Druh použitých zvierat je *mus musculus* (myš domová), štandardný geneticky nemodifikovaný kmeň C57BL/6. Počet použitých zvierat na celú dobu riešenia je 330 samcov kmeňa C57BL/6 a 330míc kmeňa C57BL/6.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Nahradenie

Pretože v plánovaných experimentoch sa budú hodnotiť alterácie funkcie a štruktúry orgánov a následky terapeutických intervencií, je nevyhnutné, aby sa experiment vykonal „in vivo“ na celom zvierati. Využitie bunkových kultúr alebo počítačových simulácií neprichádzajú pri tomto type experimentu do úvahy ako alternatívny spôsob výskumného prístupu, navyše experimenty, ktoré by sa dali takto realizovať už realizované boli a nám uľahčili presnejší dizajn experimentu. V tomto štádiu ale pokusy musia byť realizované na myšiach.

Obmedzenie

V experimentoch bude použitý minimálny možný počet experimentálnych zvierat, ktorý je potrebný pre štatistické vyhodnotenie použitím dvojfaktorového ANOVA testu s posthoc analýzami a zachovaní dostatočnej štatistickej sily. Experimenty nebudú vykonávané naraz a bude v nich použitý minimálny 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 rovnaké skupiny zvierat.

Zjemnenie

Zvieratá budú počas pokusov sledované priebežne, so záznamom každé 4h počas pracovnej doby. Po postupoch, t.j. odberoch krvi, budú zvieratá na vyhrievanej podložke až do momentu zobudenia a sledované kontinuálne. Bolesť a utrpenie budú hodnotené podľa Sotocinala et. al 2011, hodnotenie aspoň 1x do dňa zapisované. Zvieratá v evidentnom distrese dostanú analgetikum Meloxicam 0,5mg/kg s.c. V prípade, že zvieratá budú vykazovať zvyšujúci sa distress, bolesť a/alebo utrpenie podľa nami navolených human end-pointov a napriek analgetickej liečbe, bude zviera vyradené z experimentu. So zvieratami sa bude manipulovať jemne, budú mať prístup k vode aj potrave *ad libitum*, v kliebkach sú dostupné hračky.

Spätné posúdenie

Vzhľadom na to, že ide o projekt, ktorý má predpokladanú ujmu strednú, projekt nebude podliehať spätnému posúdeniu.

Príloha č. 2
Netechnické zhrnutie projektu

908/18-221/3

Názov projektu: Úloha osi mozog-pečeň v stresových podmienkach a po ovplyvnení antidepresívami.

Kľúčové slová v projekte:

Mikrozosomálna oxidácia, cytochróm P450, čas spánku vyvolaný hexobarbitalom (HIS), os mozog-pečeň, *in vivo* elektrofyziológia, serotonín (5-HT), noradrenalín (NE), dopamín (DA), acetylcholine (ACH), somatostatín (SOM), hormón uvoľňujúci rastový hormón (GHRH).

Účel projektu:

Cieľom projektu bude základný výskum korelácií medzi mikrozosomálnou oxidáciou monoamínov v pečeni, anxiitou a aktivitou monoamíny secerňujúcich neurónov v mozgu a efekt antidepresív na tieto neuróny.

Opísať ciele projektu:

Špecifickými cieľmi projektu budú:

1. Identifikácia rozličných fenotypov potkana laboratórneho na základe odlišnej mikrozosomálnej oxidácie v pečeni meraním dĺžky spánku vyvolaného hexobarbitalom;
2. Stanovenie úrovne anxiety potkanov laboratórnych s rôznym fenotypom mikrozosomálnej oxidácie v pečeni využitím vyvýšeného bludiska v tvare plus (EMP);
3. Stanovenie miery excitability neurónov uvoľňujúcich 5-HT, NE, DA, SOM, a GHRH u potkanov s rôznym fenotypom mikrozosomálnej oxidácie v pečeni.

Prínos z vykonaného projektu:

Stres zohráva kľúčovú úlohu v spúšťaní mnohých psychických ochorení, akými je depresia, úzkosť, panika a posttraumatická stresová porucha (PTSD). Riziko vzniku stresu podobných porúch je determinované intenzitou a dĺžkou trvania stresových stimulov, ako aj vnútornými vlastnosťami organizmu, ako sú interakcie molekúl zodpovedných za stresovú odpoveď. Glukokortikoidy sú stresové hormóny ktoré zohrávajú významnú úlohu počas stresovej odpovede. Hladina glukokortikoidov je regulovaná ich syntézou v nadobličkách a ich metabolizmom v pečeni. Metabolizmus glukokortikoidov v pečeni cytochrómom P450 je regulovaný monoamínovým (serotonín: 5-HT, noradrenalín: NE a dopamín: DA) systémom mozgu prostredníctvom niekoľkých neurálnych (acetylcholínom sprostredkovaných) a endokrinných (GH a SOM sprostredkovaných) dráh. Interakcia medzi centrálnou neurotransmisiou monoamínov a mikrozosomálnou oxidáciou glukokortikoidov prostredníctvom CYP v pečeni zohráva významnú úlohu v patofyziológii stresom spôsobených ochorení a taktiež ovplyvňuje odpoveď organizmu na antidepresíva a náladu stabilizujúce liečivá. Avšak korelácia medzi mikrozosomálnou oxidáciou, excitabilitou neurónov secerňujúcich monoamíny, acetylcholín, SOM a/alebo GHRH a efektom antidepresív na tieto neuróny nebola nikdy priamo

skúmaná. Porozumenie vzťahu mozog-pečeň v odpovedi na stres a liečbu antidepresívami umožní vyvinúť nové efektívnejšie a individuálne dizajnované diagnostické a liečebné postupy pre ochorenia spôsobené stresom.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórny potkan – *Rattus norvegicus*, dospelé samce (120 ks počas troch rokov alebo 40 ks ročne), Sprague-Dawley, Velaz s.r.o., Únětice, ČR.

Zvieratá použité v projekte budú rozdelené do šiestich skupín na základe meraných skupín neurónov: (1) 5-HT neuróny dorzálneho *nucleus raphe* (FRN); (2) NE neuróny *locus coeruleus* (LC); (3) DA neuróny ventrálnej tegmentálnej oblasti (VTA); (4) ACH neuróny dorzálneho motorického jadra *nervus vagus*; (5) SOM neuróny paraventriculárneho jadra hypotalamu (PVN); (6) GHRH neuróny *nucleus arcuatus* hypotalamu (ARN). Každá skupina bude pozostávať z 20 jedincov, aby sme mohli získať štatisticky významné korelácie medzi excitabilitou neurónov, fenotypom mikrozomálnej oxidácie a anxiitou. Predpokladáme, že polovica zvierat (n=10) bude mať rýchly a polovica (n=10) pomalý fenotyp mikrozomálnej oxidácie.

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

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

Na základe merania dĺžky spánku vyvolanej hexobarbitalom (HST) rozdělíme zvieratá do dvoch skupín: zvieratá s rýchlym a pomalým fenotypom mikrozomálnej oxidácie v pečeni. Dvadsaťštyri hodín pred stanovením času spánku vyvolaného hexobarbitalom budú zvieratá deprivované od potravy, aby sme zamedzili ovplyvneniu CYP vyvolaného potravou.

Hexobarbital je derivát barbiturátu, ktorý ma hypnotický a sedatívny účinok. Je používaný v humánnej, ako aj veterinárnej medicíne ako anestetikum s rýchlym a krátko trvajúcim účinkom. Nemá toxické a averzívne účinky po podaní vo fyziologických dávkach. Diskomfort, ktorý zvieratá podstupujú pri jeho podávaní je podobný ako pri iných anestetikách s krátkodobým účinkom, akým je napríklad izoflurán, ktorého použitie bolo povolené v predchádzajúcom nami predkladanom projekte. Na základe týchto skutočností sme klasifikovali krutosť, ktorú zvieratá podstupia pri HST teste ako „strednú“.

Avšak zvieratá vystavené HST testu budú dôsledne sledované. Ak bude zaznamenaný významný pokles váhy, pokles príjmu vody a potravy, alebo bude zaznamenané nadmerné agresívne správanie zvierat, experiment bude prerušený a zvieratá budú humánne usmrtené.

Štrnásť dní od stanovenia fenotypu pomocou HST sa so zvieratami nebude manipulovať, čím vylúčime možný nepriaznivý efekt na anxiету a excitabilitu neurónov spôsobený potravovou reštrikciou alebo anestézou.

V jedenásty deň stanovíme úroveň anxiety zvierat použitím testom vyvýšeného bludiska (EPM). Bludisko v tvare kríža s dvoma otvorenými a dvoma uzavretými ramenami je z tmavého polyvinylplastu. Ramená bludiska sú 50 cm dlhé a 10 cm široké, umiestnené 50 cm nad zemou. Zvieratá sa vložia do centrálnej zóny (intersekcia) vyvýšeného bludiska (tvárou k otvorenému ramenu), ktorú tvoril štvorec o veľkosti 10x10 cm. Digitálna kamera bude zaznamenávať pohybovú aktivitu zvierat a v otvorených a uzavretých ramenách počas 10 min.

Počas dvanásteho dňa budú vykonané *in vivo* elektrofyziologické merania. Pred meraním budú zvieratá podrobené celkovej anestézii. Potkany podstúpia anestéziu uretánom alebo chloralhydrátom a budú vsadené do stereotaxického aparátu kvôli fixácii hlavy a ľahšie štandardizovanie polohy oproti snímacej elektróde. Po otvorení narezaného skalpu sa do lebky navrtá otvor veľkosti 3 mm určený na vsunutie elektród do dorzálneho nucleus raphe (DRN), locus coeruleus (LC), ventrálnej tegmentálnej oblasti (VTA), dorzálne motorické jadro nervus vagus (DMV), paraventrikulárne jadro (PVN), alebo nucleus arcuatus (ARN) za účelom zaznamenávania neuronálnej aktivity (generovanie akčných potenciálov) 5-HT, NE, DA, ACH, SOM alebo GHRH neurónov.

Počas záznamu z posledného 5-HT neurónu bude každému zvieratú podaný inhibítor spätného vychytávania 5-HT (SSRI) escitalopram v koncentrácii 0.1 mg/kg. Aplikácia prebehne intravenózne cez katéter umiestnený v laterálnej chvostovej véne. Na záver bude porovnaný efekt escitalopramu na excitabilitu 5-HT neurónov v zvierat s rýchlym a pomalým fenotypom mikrozomálnej oxidácie v pečeni.

Po ukončení elektrofyziologických experimentov, budú zvieratá humánne usmrtené podaním nadmerného množstva anestetika.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Manipulácia	Úroveň krutosti
Handlovanie potkanov	Slabá
Váženie potkanov	Slabá
Dvadsaťštyri hodinová deprivácia od vody a potravy	Stredná
Spánok navodený hexobarbitalom	Stredná
Test vyvýšeného bludiska	Slabá
Intraperitoneálna aplikácia anestetika	Stredná
Zavedenie katétra do laterálnej chvostovej vény	Slabá (vykonanie v anesteze)
Intravenózne podávanie escitalopramu	Slabá (vykonanie v anesteze)
Elektrofyziologické merania	Bez možnosti zotavenia

Celková krutosť projektu označená ako **stredná**.

Uplatňovanie zásad 3R

1. **Nahradenie zvierat:** Nakoľko sa v predkladanom projekte budeme zaoberať koreláciou medzi fenotypom mikrozomálnej oxidácie, úrovňou anxiety a excitabilitou 5-HT, NE, DA, ACH, SOM, a GHRH neurónov nie je možné zvieratá nahradiť iným modelom.
2. **Redukcia počtu zvierat:** Počty zvierat sú stanovené z hľadiska reprodukovateľnosti a validity projektu. Znižovanie počtov by ovplyvnilo validitu dosiahnutých výsledkov. Aby sme znížili použitý počet zvierat budeme na zaznamenávanie bazálnej aktivity 5-HT neurónov a efektu escitalopramu na excitabilitu 5-HT neurónov používať tie isté zvieratá.
3. **Zjemnenie:** pokiaľ je to možné experimentálne postupy budú vykonávané v celkovej anestézii, aby nedochádzalo k zbytočnému utrpeniu, spôsobovaniu bolesti alebo zbytočného stresu. Na zníženie diskomfortu zvierat, ktoré budú 24 hodín deprivované od potravy počas stanovania HST, a ktoré budú testované v EPM budú slúžiť obohatené domáce kliecky. Obohatenie bude spočívať v umiestnení plastových rúrok a domčekov do domácich klieck. Zvieratá, ktoré podstúpia HST alebo EPM budú čo najskôr umiestnené naspäť do domácich klieck. Zjemnenie spočíva aj v dodržiavaní starostlivosti o zvieratá podľa požiadaviek ustanovených v nariadení vlády. Zvieratá budú v prípade zistenia zhoršenia zdravotného stavu z projektu vyradené a humánne usmrtené.

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

Netechnické zhrnutie projektu

1030/18-221/3

Názov projektu: Tumorigénny a metastatický potenciál voči cisplatine rezistentných buniek odvodených od ľudských testikulárnych nádorov zo zárodočných buniek.

Kľúčové slová: chemorezistencia, cisplatina, metastázy

Účel projektu:

Základný výskum

Cieľ projektu:

Hlavným účelom projektu je prispieť k objasneniu molekulárnych mechanizmov vedúcich k chemorezistencii testikulárnych nádorov zo zárodočných buniek a ich metastázovaniu, čo môže viesť k progresii a relapsu nádorového ochorenia.

Cieľom projektu je štúdium rozdielov v tumorigenicite a metastatickom potenciáli parentálnych buniek a od nich odvodených voči cisplatine rezistentných buniek testikulárnych nádorov zo zárodočných buniek, otestovanie potenciálnych liečiv, resp. kombinácií liečiv a efekt knockout-u vybraných génov na chemorezistenciu daných nádorov. Uvedené vlastnosti budú sledované aj na PDX modeloch (z ang. patient derived xenograft) odvodených z testikulárnych nádorov pacientov. V prípade prítomnosti metastáz budú tieto metastázy odobraté a použité na izoláciu a následnú kultiváciu buniek. Takáto populácia buniek bude ďalej študovaná a použitá na identifikáciu markerov súvisiacich s metastatickým rozsevom u chemorezistentných buniek. Úlohu identifikovaných markerov v procese chemorezistencie a metastázovania overíme pomocou ich knockout-u, prípadne prostredníctvom cielenej farmakologickej inhibície. Do našich analýz budú zahrnuté aj PDX modely, ktoré sú vytvorené transplantáciou častí ľudských nádorov do imunokompromitovaného hostiteľa, v našom prípade SCID/Beige myší. Nádory získané z PDX modelov majú funkčné, histologické a genetické vlastnosti zhodné s primárnym patientskym nádorom, preto sú vhodné na predklinické testovanie liečiv, identifikáciu biomarkerov, biologické štúdie, či stratégie personalizovanej medicíny (Seol H. S. et al., 2014).

Prínos projektu:

Analýza chemorezistentných a metastatických buniek by nám mohla poskytnúť informácie o mechanizmoch a potenciálnych markeroch, ktoré vedú k zvýšenému metastatickému potenciálu chemorezistentných buniek. Pochopenie týchto mechanizmov môže predstavovať výrazný pokrok vo vývoji nových terapeutických modalít alebo zlepšenie súčasných možností terapie a tieto modely by taktiež mohli byť použité na predklinické testovanie potenciálnych liečiv.

Počet a druh použitých zvierat: myš laboratórna SCID /bg, celkovo 360 zvierat/5 rokov a BALB/c nu/nu 213 zvierat/5 rokov. Počet zvierat pre účely projektu je adekvátny, vzhľadom na 19 sledovaných skupín. Počty v skupinách sú minimalizované tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Ak získame štatisticky signifikantné 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. Predpokladáme zhoršenie zdravotného stavu, ktorý sa prejaví hlavne stratou hmotnosti, sťaženým dýchaním. V prípade výrazného zhoršenia zdravotného stavu a pri pozorovaní príznakov výrazného diskomfortu pristúpime k eutanázii pomocou anestetika tiopentalu i.p. alebo izofluranovou anestézou a/alebo dislokáciou krčných stavcov.

Predpokladaná úroveň krutosti:

krutá

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie

Pri tomto projekte používame na štúdium chemorezistencie, tumorigenicity a metastázovania predovšetkým *in vitro* modely: rast nádorových buniek *in vitro* v 2D a 3D kultiváciach, 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 xenograftov a metastáz. 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. Zvieratá s vážne zhoršeným zdravotným stavom budú eutanazované.

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

Spätné posúdenie projektu:

Áno - do štyroch mesiacov od ukončenia projektu.

Netechnické zhrnutie projektu

1097/18-221/3

Názov projektu: Tehotenstvo, imunita a vírusy

Úloha cytokínov/chemokínov v imunitnej odpovedi na infekciu vírusom chrípky typu A

Kľúčové slová: vírusy, imunitná odpoveď, šírenie vírusu, tehotenstvo, metaloproteázy, inhibítory

Účel projektu:

Základný výskum/Aplikovaný výskum

Cieľ projektu: Hlavným cieľom projektu je definovať patogénny dopad cytokínovej búrky spôsobenej infekciou vírusom chrípky typu A počas tehotenstva, otestovať akým spôsobom NS1 proteín manipuluje dráhy imunitnej odpovede a pochopiť mechanizmus akým indukované enzýmy a cytokíny ovplyvňujú multiorgánové rozšírenie vírusu. Navyše budeme testovať inhibítory metaloproteínáz a NF- κ B s rôznymi vírusmi a predpokladáme, že dosiahnuté výsledky nájdu uplatnenie v terapii vírusov.

Špecifický cieľ 1: Určiť moduláciu imunitnej odpovede na infekciu vírusom chrípky počas tehotenstva

Špecifický cieľ 2: Študovať úlohu metaloproteínáz (MMP) na šírenie vírusu chrípky do iných orgánov

Špecifický cieľ 3: Analyzovať zmenu imunitnej odpovede a šírenia RNA a DNA respiračných vírusov v organizme počas tehotenstva

Prínos projektu: ako vyplýva zo stanovených cieľov, prínosom by malo byť, že rozpoznáme indukciu a reguláciu jednotlivých cytokínov a ostatných molekúl, ktoré majú vplyv na imunitný systém, zvlášť počas tehotenstva. Je dôležité, aby sme vedeli rozdiel medzi RNA a DNA vírusmi pri spúšťaní imunitných dráh a pri šírení vírusu do iných orgánov ako je mozog a srdce. Veríme, že sa nám podarí nájsť faktory/molekuly, ktoré sú indukované po infekcii a sú pre daný vírus špecifické a jedinečné ako aj faktory/molekuly, ktoré sú spoločné pre všetky vírusy. Nadobudnuté poznatky umožnia zlepšiť a spresniť predikciu patogenity, môžu prispieť pri vývoji nových anti-virotik a môžu byť použité v terapii.

Počet a druh použitých zvierat:

Myš laboratórna Balb/c, inbred, samice	2252 ks
Myš laboratórna Balb/c, inbred, samce	54ks
Myš laboratórna, C57BL/6, inbred, samice	1368 ks
Myš laboratórna, C57BL/6, inbred, samce	30ks
Morča domáce	10 ks

V údajoch o plánovaných počtoch zvierat je zahrnutý aj počet potrebný pre opakovanie niektorých pokusov. Zdanlivo veľký počet myší je plánovaný na 5 rokov a zahŕňa 2 nezávislé projekty. Opakovania pokusov sa však obmedzia na nevyhnutné minimum a budú slúžiť výlučne pre overenie sporných výsledkov a objektívne štatistické vyhodnotenia experimentov.

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

Experimentálne schémy myšiam nespôsobujú diskomfort, injekčné podanie testovaných látok spôsobí krátkodobý mierny stres.

Pri infekcii vírusom budeme u myší sledovať úbytok hmotnosti, apatickosť, zježenie srsti. Ak dôjde k viac ako 20% úbytku hmotnosti – myši budú eutanazované. Experimenty nebudú robené letálnou dávkou vírusu. Pri stanovovaní LD₅₀ sa nepriaznivý účinok prejaví úbytkom váhy, zježenou srstou. Ak dôjde k viac ako 20% úbytku hmotnosti – myši budú eutanazované, aby sa predišlo k úhynu myši.

Na odber krvi z morského prasiatka použijeme Mesokain gél na znecitlivenie pri doberaní krvi zo srdca.

Predpokladaná úroveň krutosti: krutý

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie

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

Odozva organizmu na imunizáciu a infekciu vírusmi, najmä ak sa sleduje imunitná odpoveď a šírenie vírusu v organizme z pľúc do srdca a mozgu je komplexný proces, na ktorom sa podieľa veľa faktorov a práve preto sa v tomto prípade nedá *in vivo* nahradiť bunkovými kultúrami. Morča domáce potrebujeme ako zdroj erytrocytov, pomocou ktorých sa stanovuje hemaglutinačný titer vírusu chrípky ako aj prítomnosť vírusu chrípky vo vzorke. Na hemaglutinačné titre je možné použiť kohútie erytrocyty, ale v súčasnosti nemáme na našom ústave podmienky pre chov kohúta. Vzhľadom na nevyhnutnosť použitia laboratórnych zvierat sa v projekte sleduje a uplatňuje najnovšia legislatíva v súvislosti so smernicami o použití zvierat na vedecké účely 2010/63, Zbierka zákonov č. 377/2012 a Vyhláška 436.

Obmedzenie:

Na základe našich skúseností z predchádzajúcich projektov, údajov z vedeckej literatúry a našich *in vitro* štúdií sme schopní odhadnúť základné dávkovanie. Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Ak získame štatisticky významné dáta z menšieho počtu zvierat, nebude potrebné použiť celkový plánovaný počet. Použitie dvoch kmeňov myši je zdôvodnený tým, že budeme používať novozavedený model sledovania imunitnej odpovede na alogénne asyngénne tehotných myšiach a preto potrebujeme C57BL/6 a Balb/c myši. C57BL/6 sú vzhľadom na svoj MHC haplotyp vhodnejším modelom ako Balb/c myši.

V údajoch o plánovaných počtoch zvierat je zahrnutý aj počet potrebný pre opakovanie niektorých pokusov. Zdanlivo veľký počet myši je plánovaný na 5 rokov. Opakovania pokusov sa však obmedzia na nevyhnutné minimum a budú slúžiť výlučne pre overenie sporných výsledkov a objektívne štatistické vyhodnotenia experimentov.

Zjemnenie:

Počas sledovaného obdobia nebude bránené zvieratám v prirodzenom správaní. Budú dodržané štandardy chovu, umiestnenia a starostlivosti. Zvieratám bude poskytovaná všeobecná veterinárna starostlivosť. Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy, pitnej vody a budú mať väčšie množstvo podstielky a iného materiálu na stavbu úkrytov. Máme vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizáciu zvierat počas injekčných aplikácií. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. Zvieratá s vážne

zhoršeným zdravotným stavom (ak strata hmotnosti bude viac ako 20%, prípadne dôjde k strate pohyblivosti) budú eutanazované.

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

Počas infikovania a podávania MMP alebo TIMP budú myši narkotizované, aby sa im znížil stres a bolesť.

Tabuľka krutosti

Postup	Stav	Krutosť
Adaptácia-vírusu (2 dni)	Infekcia robená v anestézii, infekcia sa za 2 dni neprejaví symptomaticky	slabá
Stanovenie LD₅₀ (8 dní)	Infekcia robená v anestézii, účinky infekcii sa začnú prejavovať po 3 dňoch po infekcii, čím viac vírusu sa použije, tým budú symptómy- zježená sršť, triaška, letargia a úbytok hmotnosti viac ako 20%,	slabá-krutá (v závislosti od dávky vírusu)
Intranazálna infekcia v anestézii	Bude robené v anestézii, nebude to mať vplyv na zviera	slabá
Štúdie na alogénne a syngénne párených myšiach	Infikovanie bude robené v anestézii, nepoužije sa letálne dávka, slabšie až stredne silné symptómy infekcie – zježená sršť, letargia a úbytok hmotnosti menej ako 20%, sa prejaví za 3 dni po infekcii a po 6 dni zmiznú	slabá – stredná (v závislosti od dávky vírusu, nebude sa používať letálna dávka vírusu)
Testovanie inhibítorov anti-oxidácie	Infikovanie a podávanie inhibítorov bude robené v anestézii, nepoužije sa letálne dávka vírusu, slabšie až stredne silné symptómy infekcie – zježená sršť, letargia a úbytok hmotnosti menej ako 20%, sa prejaví za 3 dni po infekcii a po 6 dni zmiznú	stredná
Testovanie účinku metaloproteináz na šírenie vírusu do mozgu	Infikovanie a podávanie MMP bude robené v anestézii, nepoužije sa letálne dávka, slabšie až stredne silné symptómy infekcie – zježená sršť, letargia a úbytok hmotnosti menej ako 20%, sa prejaví za 3 dni po infekcii a po 6 dni zmiznú	stredná
Testovanie inhibítorov metaloproteináz (TIMP)	Infikovanie a podávanie TIMP bude robené v anestézii, nepoužije sa letálna dávka, slabšie až stredne silné symptómy infekcie - zježená sršť, letargia a úbytok hmotnosti	stredná

	menej ako 20% sa prejavia za 3 dni po infekcii a po 6 dni zmiznú	
Váženie zvierat	Nemá vplyv na zvieratá	slabá
Opakovaná intraperitoneálna aplikácia látok	Bude robená v anestézii, takže nebude mať vplyv na zvieratá	stredná
Odber krvi z morčiat	Použije sa Mezokain na lokálne znecitlivenie, zviera neprežíva stres a nedochádza k zmene stavu zvieratá	slabá
Celková klasifikácia		krutá

Spätné posúdenie projektu:

Áno do troch mesiacov od ukončenia projektu *do 11.09.2023*

Netechnické zhrnutie projektu - 1289/18-221

Názov projektu:

Vplyv zmien v expresii transportných systémov pre vápnik, najmä IP3 receptorov typu 1 a 3, na fyziológiu a patofyziológiu solidných nádorov.

Kľúčové slová:

inozitol 1,4,5-trisfosfátový receptor, IP3R, tumorigenéza,

Účel projektu:

Základný výskum

Cieľ projektu:

Protinádorová terapia je v centre záujmu vedcov a klinikov neustále, pretože nedostatočná odpoveď niektorých typov nádorov na súčasnú liečbu je pretrvávajúcim problémom. Hľadanie nových liečebných modalít je preto nevyhnutnosťou. Cieľom plánovaného projektu je vyhodnotiť, aký vplyv majú zmeny v expresii transportných systémov pre vápnik, najmä IP3 receptorov typu 1 a 3 (IP3R1 a IP3R3), na fyziológiu a patofyziológiu solidných nádorov.

Prínos projektu:

Potvrdenie vplyvu funkčnej delécie IP3R1 alebo IP3R3 na inhibíciu rastu nádorov.

Počet a druh použitých zvierat:

72 ks myší kmeňa Balb/c nu/nu.

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

Použité zvieratá neutrpia ujmu okrem krátkodobého mierneho stresu spôsobeného neinvazívnymi zákrokmi, ako sú: subkutánne podanie nádorových buniek, meranie rastu nádorov, humane usmrtenie zvierat.

Zdravotný stav zvierat sa bude denne kontrolovať. U zvierat, ktoré vyvinú nádor budeme sledovať ich správanie, či majú zhrbený postoj, zmenu výrazu tváre alebo naježenú srst'. Za human end point budeme považovať zmenu výrazu tváre podľa publikácie (DJ Langford et al., 2010: Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse, NATURE METHODS, VOL.7 NO. 6 JUNE 2010; doi:10.1038/nmeth.1455), pri získaní minimálne 4 bodov v zmene výrazu tváre bude zviera utratené. Zvieratá sa usmrtia cervikálnou dislokáciou alebo podaním letálnej dávky thiopentalu s následným kardiálnym preplachom fyziologickým roztokom potrebným pre následné spracovanie tkanív. Usmrtenie zvierat na konci pokusu je nevyhnutné pre získanie nádorového tkaniva.

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

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie:

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov. Experimentom na zvieratách predchádzali štúdie v *in vitro* podmienkach, kde sa vplyv funkčnej delécie v IP3R1 alebo IP3R3 receptoroch na rast nádorových buniek potvrdil. Výsledok *in vitro* je však nutné overiť na *in vivo* modeli.

Obmedzenie:

Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené.

Zjemnenie:

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Budú mať obohatené prostredie materiálom na stavbu hniezd a úkrytov. Podľa našich skúseností a údajov z literatúry, subkutánne nádory tohto typu nespôsobujú myšiam významnú zdravotnú ujmu, nakoľko nádory neprerastajú tkanivá a nemetastazujú. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. Zvieratá s vážne zhoršeným zdravotným stavom budú eutanazované.

Spätné posúdenie projektu:

Projekt nevyžaduje spätné posúdenie.

Príloha č. 4

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

Názov projektu: Charakteristika pohlavného dimorfizmu kašľovej odpovede morčiat - vytvorenie a validácia modelu na výskum kašľa zohľadňujúceho obe pohlavia experimentálnych zvierat

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1294/18-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): pohlavie, dimorfizmus, kašeľ, žena, samica

Účel projektu: Základný výskum, translačný

Opísať ciele projektu:

Zo všetkých laboratórnych zvierat využívaných vo výskume kašľa je najvhodnejším modelovým zvieratom morča domáce. Tento model umožňuje podľa doterajších poznatkov a skúseností, najlepšiu transláciu získaných výsledkov do klinickej praxe, pretože neurofyziológia a neurofarmakológia blúdivého nervu morčiat je najviac podobná ľudskému (Belvisi & Bolser, 2002).

V experimentálnom výskume kašľa sa využívajú samce morčiat kmeňa Dunkin-Hartley, avšak syndróm hypersenzitívneho kašľa postihuje najmä ženy a jeho patomechanizmy sú nedostatočne objasnené (Morice, 2013) – teda model využívajúci exkluzívne samce neposkytuje dostatočnú transláciu výsledkov zo základného výskumu na "pacientov", ktoré sú predovšetkým ženy.

Cieľom predloženého projektu je detailne charakterizovať kašľovú odpoveď samíc morčiat na najčastejšie využívané tucigény, odpovede na senzibilizáciu a štandardne používané antitusiká. Naším zámerom je na základe týchto experimentov sa vyjadriť k možnosti využívania samíc morčiat v základnom výskume kašľa, či už v podobe samostatných skupín, ak sa zistia významné rozdiely medzi odpoveďou samíc a samcov, alebo v podobe zmiešaných skupín, ak sa bude kašľová odpoveď samíc svojou intenzitou, latenciou, citlivosťou a charakterom podobat' kašľovej odpovedi samcov.

Naším cieľom je pripraviť nový model zohľadňujúci pohlavný dimorfizmus kašľovej odpovede experimentálnych zvierat, ktorý by umožňoval presnejšiu transláciu výsledkov základného výskumu na populáciu pacientov trpiacich dystúsiou, kašľovou hypersenzitivitou na periférnej a centrálnej úrovni.

Ďalším cieľom je bližšie identifikovať hormonálne mechanizmy, ktoré sa podieľajú na pohlavnom dimorfizme kašľovej odpovede popisovanom v literatúre, ktorý sa aj prakticky odzrkadľuje na zložení populácie pacientov navštevujúcich kašľové kliniky – ide v dvoch tretinách prípadov o ženy v peri- a postmenopauzálnom veku.

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

Experimentálne postupy vykonávané len na jedincoch mužského pohlavia poskytujú výsledky, ktoré sú následne aplikované na celú populáciu pacientov, ktorými sú v našom prípade hlavne ženy. Tento prístup vedie k niektorým javom, ktoré sú pozorované nielen v základnom výskume kašľa, ale v biomedicínskom výskume vo všeobecnosti. Napríklad liečivá testované len na samcoch nedosahujú požadované terapeutické účinky u žien v klinických štúdiách a takisto zvýšený výskyt nežiaducich účinkov u žien je vyšší ako u mužov (Mogil a Chanda, 2005).

Absencia samíc morčiat v základnom výskume kašľa je jeden z hlavných dôvodov prečo nemáme dostatok poznatkov o kašľovej odpovedi samíc morčiat. Vytvorenie a validácia takehoto modelu môže prekonať medzery medzi základným výskumom a situáciou pozorovanou v klinických štúdiách.

Experimentálne postupy vykonávané exkluzívne na jednom pohlaví jednoznačne preferujú samce. Pomer vedeckých publikácií s postupmi, ktoré boli vykonané na samcoch verzus na samiciach je najvýraznejšie posunutý v prospech samcov v oblasti neurovied (5,5:1), farmakológie (5:1) a fyziológie (3,7:1) (Beery a Zucker, 2011) – všetky tieto oblasti sa priamo dotýkajú štúdií zosilneného kašľového reflexu.

Analýza literatúry týkajúcej sa experimentov v základnom výskume kašľa ukázala len niekoľko málo výsledkov. Toto je ďalší dôkaz, ako predpojatosť a nesprávne predpoklady ovplyvnili experimentálne postupy v základnom výskume kašľového reflexu. Štúdia Forsberga a kolegov z roku 1988, ako jedna z prvých kašľových štúdií s bdelými morčiatami, využívala jedince oboch pohlaví, avšak pohlavie nebolo zohľadnené pri analýze výsledkov (Forsberg et al., 1988). Samice morčiat boli využité v štúdií navrhnutých Ebiharom a kol. (Ebihara et al., 1996), ktorí študovali mechanizmy kašľa indukované inhibítormi angiotenzín konvertujúceho enzýmu (ACE-i) vo štyroch skupinách zvierat – predliečených danazolom, cilazaprilom, ich kombináciou a bez predliečby. Táto štúdia ukázala vzostup citlivosti kašľového reflexu v prítomnosti ACE-i pri nízkej plazmatickej koncentrácii estrogénu.

Predpokladá sa, že u samíc sa vyskytuje prirodzene zvýšená variabilita a heterogenita fyziologických procesov a cyklické zmeny spôsobené periodickými zmenami ich hormonálneho stavu predstavujú prekážku v ich zahrnutí do základného biomedicínskeho výskumu. Množstvo nedávno publikovaných štúdií dokazuje, že štúdium samcov a samíc poskytuje reprodukovateľné výsledky aj bez sledovania hormonálnych cyklov (Goy et al., 1980). Predpokladáme, že v základnom výskume kašľa je nevyhnutné v experimentálnych postupoch využívať obe pohlavia laboratórnych zvierat na získanie dát s omnoho lepším translačným potenciálom.

V súčasnosti sa grantové agentúry orientujú na podporu tých výskumných projektov, ktoré berú do úvahy pohlavie laboratórnych zvierat a experimenty zahŕňajú tak samce ako aj samice. Takéto podmienky majú v sebe veľký potenciál redukovať „pohlavný bias“ v biomedicínskom výskume (Beery a Zucker, 2011). Pohlavné rozdiely v kašľovej odpovedi u morčiat neboli nikdy systematicky študované. Pilotná štúdia ich odpovedí na aerosól kyseliny citrónovej (KC) odhalila, že kašľová latencia – čas od začiatku expozície tusigénu do objavenia prvého kašľa je významne kratší u samíc ako samcov morčiat. Celkový počet kašľov u samíc počas expozície aerosólu KC je takisto vyšší u samíc ako u samcov. Tieto predbežné dáta ukazujú, že dráždivosť dýchacích ciest u samíc morčiat je vyššia ako u samcov (Plevkova et al., 2016).

Hoci sa postupne zvyšuje množstvo poznatkov o pohlavných rozdieloch kašľového reflexu, výskum kašľa, ako aj testovanie antitusických terapeutických stratégií sa vykonáva na modeloch využívajúcich predovšetkým samce. Validácia modelu, v ktorom by boli aj samce aj samice by predstavovala prelom vo výskume kašľa, nakoľko kašľová odpoveď samíc morčiat nebola nikdy detailne a systematicky študovaná. Vytvorenie modelu, ktorý kopíruje demografické zloženie kohortu pacientov trpiacich chronickým kašľom je prioritnou otázkou všetkých laboratórií, ktoré sa venujú nielen výskumu kašľa, ale výskumu fyziológie a patofyziológie respiračného systému všeobecne.

Predpokladáme, že vytvoríme model zahŕňajúci obe pohlavia pre základný výskum kašľa a dáta získané pomocou tohto modelu budú mať oveľa lepší translačný potenciál.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Morča domáce (*Cavia porcellus*), Dunkin-Hartley, samce a samice, celkový počet: 158 (47 samcov, 111 samíc) /4roky

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

Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Tieto metódy zahŕňajú: senzitivizácia ovalbumínom (intraperitoneálna injekcia ovalbumínu), zvierací model hyperreaktivity dýchacích ciest (opakovaná i.n. expozícia ovalbumínu), vyšetrenie kašľovej reaktivity v bdelom stave. Uvedené experimenty sú z našej skúsenosti dobre tolerované, sú úplne čulé so záujmom o krmivo a vodu.

V prípade experimentov bez možnosti zotavenia zvierat (vyšetrenie kašľovej reaktivity v celkovej anestézii) bude usmrtenie vykonané humánnym spôsobom – tu sa postup ukončí pridaním dodatočnej dávky anestetika. Dávka na uspatie morčat do hlbokéj anestézie je pri 50% uretane približne 0,5 ml/200 g jedinca. Dávka na usmrtenie je 2 ml 50% uretanu na 200 g jedinca.

Experimenty sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov. Veľká pozornosť bude zameraná na adaptáciu s personálom a laboratórnym prostredím.

Keďže v rámci projektu uvažujeme s metodikami, ktoré spadajú pod strednú mieru krutosti, zvieratá budú po podstúpení takéhoto zákroku monitorované a o human end point bude rozhodnuté na základe skóre popísaného v prílohe 1.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

slabé:

- váženie, jednorazová aplikácia látok; predpokladáme, že zvieratá nebudú pociťovať bolesť
- kožný alergický test

stredné:

- senzitivizácia ovalbumínom (intraperitoneálna injekcia ovalbumínu);
- zvierací model alergickej rinitídy (opakovaná i.n. expozícia ovalbumínu)
- opakovaná inhalácia aerosólov, ktorá nie je bolestivá, avšak vyvoláva kašeľ (priemerne 10 kašľov za 10 minút) predpokladáme, že zvieratá budú pociťovať strach a dyskomfort spojený s pobytom v komore pletyzmografu, hoci sa na tento stav vopred adaptujú (v prípravnej fáze postupov). Predpokladáme, že zvieratá nebudú mať závažne narušenú pohodu ani celkový zdravotný stav.
- odber krvi z ušnej vény

bez možnosti zotavenia:

- ide o postupy, ktoré sa celé vykonávajú v celkovej anestézii, po ktorej už zvieratá nenadobudnú vedomie; ide o vyšetrenie kašľovej reaktivity v celkovej anestézii

Uplatňovanie zásad 3R

Nahradenie:

Pokus nie je možné vykonať bez použitia laboratórnych zvierat. Morča domáce je jeden z najrelevantnejších modelov aferentnej inervácie dýchacích ciest a pľúc vo vzťahu ku kašľu. Neurofyziológické a neurofarmakologické parametre u morčiat sú ideálne pre vykonanie translačných štúdií s validáciou dát priamo u človeka. Pri tomto plánovanom pokuse neexistujú alternatívne metódy, pretože na pokus nie je možné použiť nižší druh laboratórnych zvierat (myš, potkan, pretože nemajú vyvinutý kašľový reflex (prehľadne spracované v Cough sensors, I. HandbExpPharmacol, 2009, (187):23-47. Prieskum databáz ukázal, že vzhľadom na komplexnosť centrálnej nervovej regulácie kašľa nie je možné použiť modelovanie ani jednoduchšie systémy (bunkové kultúry a pod. Existencia medzidruhových rozdielov môže významne zhoršovať transláciu výsledkov získaných v experimentoch na zvieratách.

Redukcia:

Jednotlivé pokusy budú vykonané na najnižšom počte jedincov tak, aby bol výsledok pokusu štatisticky hodnotiteľný a dáta získané z pokusu relevantné. Maximálny počet zvierat použitých v celom pokuse bude 158 jedincov (na 4 roky). Tieto budú rozdelené do čiastkových pokusov tak aby každá skupina samcov obsahovala počet 8 jedincov, skupina samíc, kde sa očakáva vyššia interindividuálna variabilita bude obsahovať 10 jedincov. Nami navrhované použitie počtu jedincov vychádza z dlhoročných skúseností vo výskume kašľa u bdelych zvierat, ako aj údajov z literatúry, ktoré predpokladajú vyššiu variabilitu samíc v porovnaní so samcami z dôvodu hormonálnych cyklov a ich vplyvu na biologické parametre.

Zjemnenie:

Pokus je minimálne traumatizujúci pre zvieratá. Pri vyšetrení kašľa v bdelom stave sú zvieratá (morčatá) umiestnené v dvojkomorovom pletyzmografe, kde inhalujú aerosól kyseliny citrónovej, prípadne ďalších aerosólov, ktoré majú potenciál vyvolať kašeľ ako kapsaicín, cinnamon aldehyd, hypo, či hyperosmolárne roztoky a bradykinín. Tento postup zvieratá znášajú pokojne, hlavne po predchádzajúcej adaptácii na túto situáciu (na začiatku postupu sa zvieratá minimálne 2 krát exponujú aerosólu fyziologického roztoku, aby si zvykli na pobyt v pletyzmografe. Inhalácia tusigénov a pobyt v celotelovom pletyzmografe nespôsobujú zvieratám bolesť. Zvieratá netrpia neustálym kašľom alebo príznakmi alergickej rinitídy – tieto prejavy, resp. kašeľ sa prejavia iba v laboratórnych podmienkach (t.j. raz do týždňa).

Vyšetrenie kašľa u morčiat

Bdelé zvieratá sú umiestnené v dvojkomorovom pletyzmografe, kde je privádzaný aerosól tusigénnej látky v nadprahovej koncentrácii (0.4M). Na hornú časť zariadenia je napojená pneumotachografická hlavica a mikrofón, ktoré sa využívajú na identifikáciu kašľa. Aerosól s priemerom častíc 1,2 µm je generovaný v tryskovom nebulizéri a privádzaný do prednej komory prietokom 5 l/min, rovnakou rýchlosťou je z komory aj odsávaný.

Kašeľ sa sleduje počas definovaného časového intervalu na základe zmien prietoku vzduchu a precíznej analýzy zvuku kašľa.

Kašeľ sa vyšetrí aj u zvierat v anestézii (uretan 1,5g/kg). V supinačnej polohe sa sprístupní larynx a trachea. Do dolnej časti trachei sa zavedie kanyla, zabezpečujúca dýchanie, na bočný port kanyly je napojený tlakový prevodník. Horná časť trachei sa otvorí pozdĺžne a sliznica sa premýva Krebsovým roztokom, ten sa odsáva cez tenkú kanylu vyvedenú nosom von. Kašeľ sa vyvoláva priamo kvapkaním kyseliny citrónovej (0,001-2 M) do premývanej trachei. Počítač konštruuje krivky kašľovej odpovede v závislosti od dávky, vždy v 1 min intervale.

Kašeľ sa hodnotí vizuálne na základe prítomnosti „kašľového“ úsilia a zo zvýšenia tracheálneho tlaku pri min. 500% zvýšení expiračného prietoku predchádzaného hlbokým inšpiriom.

Alergický zápal nosovej sliznice

Zvieratá sú senzibilizované intraperitoneálnym podaním ovalbumínu (OVA) 0,01mg v suspenzii s Al(OH)₃ v 1 ml fyziologického roztoku. Po 21 dňoch je senzibilizácia potvrdená prick testom. Pre vyvolanie rinitídy podáme senzibilizovaným zvieratám i.n. 0,075mg OVA v 0,015 ml fyziologického roztoku. Príznaky rinitídy sa rozvinú v priebehu 5 min a kulminujú v priebehu jednej hodiny od podania OVA.

Vyvolanie alergickej rinitídy je krátkodobý, kontrolovaný proces, ktorý od podania alergénu intranazálne po vymiznutie symptómov trvá maximálne jednu hodinu. Podľa našich predchádzajúcich skúseností je to v priemere 30 minút. Zvieratá kýchajú, otierajú si nos prednou labkou, slzia im oči a majú výtok z nosa. Počas tohto časového okna sa vyšetruje kašľová odpoveď. Mimo laboratória zvieratá neprichádzajú do styku s alergénom, t.j. nemajú žiadne prejavy alergickej reakcie.

Senzibilizované morčatá budú umiestnené v centrálnom zverinci so štandardnou starostlivosťou v súlade s platnou legislatívou. Stav morčiat bude v Centrálnom zverinci denne monitorovaný a bude sa hodnotiť skóre pre humane end-point.

Sledovanie hormonálnych hladín

Hormonálne hladiny budú sledované z venóznej krvi samíc, odobraté z v. saphena postupom odporúčaným podľa autorov Birck a spol., 2014, ktorý publikovali odborný materiál doplnený o videoukážky jednotlivých postupov (Non-terminal blood sampling in guinea pigs). Hladiny hormónov budú hodnotené pomocou imunoanalýzy (Immulite Progesterone and Immulite, Estradiol; Diagnostic Products Corporation, US).

Experimenty bez možnosti zotavenia zvierat:

V prípade experimentov bez možnosti zotavenia zvierat (vyšetrenie kašľovej reaktivity v celkovej anestézii) bude usmrtenie vykonané humánnym spôsobom – tu sa postup ukončí pridaním dodatočnej dávky anestetika. Dávka na uspatie morčat do hlbokej anestézie je pri 50% uretane približne 0,5 ml/200 g jedinca. Dávka na usmrtenie je 2 ml 50% uretanu na 200 g jedinca.

Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne zaobchádzanie so zvieratami, v záujme odbúravania stresu zvieratá budú adaptované na personál a laboratórne podmienky ešte pred samotným vykonávaním postupov. Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a osvedčili sa v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované množstvom prác a prezentované na mnohých odborných fórach nielen doma ale aj v zahraničí. Postupy sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie pokusných zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

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

Názov projektu: Analýza časovej závislosti patogenézy Parkinsonovej choroby v periférnom a centrálnom nervovom systéme.

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): Parkinsonova choroba, α -synukleín, periférny nervový systém, rotenón, zvierací model

Účel projektu*: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

Parkinsonova choroba (PD) je progresívne neurodegeneratívne ochorenie manifestované motorickými symptómami ako sú tremor, svalová stuhnutosť, či poruchy postoja. Klinickými nemotorickými prejavmi sú napr. zápcha, dysosmia, dysfágia, či ortostatická hypotenzia, ktoré signalizujú prítomnosť ochorenia ešte pred samotným zhoršením motorických funkcií. Viaceré štúdie animálnych modelov identifikovali zmeny periférneho nervového systému (PNS) až niekoľko rokov pred začiatkom degenerácie CNS. Nejasným stále ostáva presný mechanizmus progresie ako aj časový priebeh rozvoja patologických znakov v jednotlivých periférnych anatomických štruktúrach. Analýza molekulárnych zmien súvisiacich s PD v čase a na rôznych úrovniach nervového systému po navodení patogenézy PD u myši by mohla pomôcť k získaniu chýbajúcich poznatkov o etiopatogenéze ochorenia. Výrazným spôsobom môžu byť definované prvotné zmeny v jednotlivých periférnych orgánových sústavách zapojených do rozvoja závažného neurodegeneratívneho ochorenia, akým je PD.

Hlavným cieľom predkladaného projektu je získanie doplňujúcich, avšak kľúčových informácií o priebehu patogenézy PD z časového a anatomického pohľadu u rotenónom indukovanom myšacom modeli ochorenia. Sústredenie sa na nižšie stupne nervového systému, ktorého poškodenie síce nehrá dominantnú úlohu z hľadiska závažnosti patologických zmien spôsobených parkinsonizmom na zdravie jedinca, avšak umožňuje pozorovať prvotné štádiá ochorenia s lepšou prognózou jeho ovplyvnenia ako aj možnosťou včasnej diagnostiky.

1A) Vývoj/vytvorenie myšacieho modelu patogenézy PD v PNS založenom na orálnej a subkutánnej aplikácii rotenónu.

- Stanovenie času nástupu motorických symptómov prislúchajúcich rozvoju PD .

- Imunohistochemická analýza prítomnosti patologických znakov PD vo forme cytoplazmatických inklúzií (agregovaný α -synukleín (α S), Lewyho telieska (LB)) v periférnych orgánoch a CNS po chronickom podávaní rotenónu.
- Identifikácia prípadných rozdielnych ohnísk patologických zmien pri dvojakom type podávania rotenónu, a to pod kožu alebo gastrickou sondou.

1B) Stanovenie časovej závislosti rozšírenia patologických zmien súvisiacich s rozvojom PD v jednotlivých morfológicko-anatomických štruktúrach PNS a CNS asociovaného s jednotlivými periférnymi orgánmi.

- Stanovenie jednotlivých fáz patogenézy PD prislúchajúcich postupnej progresii patologických znakov PD v bunkách PNS a CNS pomocou komplexnej imunohistochemickej analýzy v priebehu podávania rotenónu.

2) Analýza molekulárnych zmien v asymptomatickom štádiu PD pred vznikom cytoplazmatických inklúzií a po ich vzniku.

- Analýza mechanizmu prenosu/transportu cytoplazmatických inklúzií pomocou mikroskopickej identifikácie nervových vlákien inervujúcich vybrané typy orgánov u rotenónom ovplyvnených zvierat.
- Identifikácia zmien/faktorov súvisiacich s poruchami vezikulárneho transportu (VAMP, komplexín, synapsín, synaptobrevín, amfifyzín) na úrovni génovej a proteínovej expresie v nervových vláknach inervujúcich vybrané typy orgánov pomocou kolokalizácie s markermi označujúcimi typ nervového vlákna v orgánových štruktúrach počas rozvoja PD.

3) Sledovanie i/reverzibility patologických zmien spôsobených rotenónom v jednotlivých časových intervaloch.

- Sledovanie pretrvania/vymiznutia molekulárnych zmien po ukončení podávania rotenónu v zvieratách a primárnych neuronálnych kultúrach.

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

Testovaním našich hypotéz očakávame že získané výsledky poskytnú komplexný pohľad na priebeh PD naprieč orgánmi hlavne GITu a pridruženej inervácie, pričom budeme schopní identifikovať prvotné ohnisko (resp. náhodný charakter) zahájenia patogenézy PD. Výsledky poskytnú zázemie pre nastavenie smerovania ďalšieho výskumu súvisiaceho s riešením problematiky začiatočných fáz PD (Cieľ č.1).

Výsledky získané experimentálnym usporiadaním výskumu v druhom ciele (**Ciel č. 2**) tohto projektu môžu identifikovať presný sled a typ zmien, ktoré idú ruka v ruku so začiatočnými štádiami PD. Získané znalosti o vzniku patologických anomálií súvisiacich s rozvojom PD môžu byť zásadné pre odhalenie presného mechanizmu rozširovania poškodenia buniek príp. prispieť k identifikovaniu stále úplne nepotvrdeného anatomického prenosu cytoplazmatických inklúzií synaptickými štrbinami. Podobne je nutné vyzdvihnúť potenciál projektu pri identifikácii diagnostického postupu pre včasné zachytenie progresie ochorenia prostredníctvom zmien expresie špecifických faktorov.

Informácie o reverzibilitě zmien jednotlivých štádií PD (génová expresia → proteínová expresia → cytoplazmatické inklúzie α S → LB) doplnia hodnotu výsledkov získaných v druhom ciele projektu v rámci prvej diagnostiky, či prevencie ochorenia (**Ciel č. 3**). Identifikácia závažnosti typu patologických zmien z hľadiska ich reverzibility povedie ku podpore a včasnému nasadeniu liečebných postupov ako aj profylaxie PD.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Myš domáca, C57BL/6J , 312/3roky

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

Plánovaný pokus je minimálne traumatizujúci v zmysle orálnej alebo subkutánnej aplikácie rotenónu a taktiež aj pri retrográdnom značení aferentných neurónov inervujúcich žalúdok a črevá. Pri subkutánnej aplikácii rotenónu, bude zvieratám počas krátkodobej anestézie implantovaná minipumpa pod kožu na chrbte do oblasti medzi lopatkami. Minipumpy budú každé tri týždne vymieňané za nové z dôvodu udržania stanovenej dennej dávky po celú dobu trvania experimentu. Rana bude štandardne ošetrená a zvieratá budú udržiavané vo zverinci s najväčšou starostlivosťou po celú dobu trvania experimentu. Dlhodobý vplyv rotenónu na experimentálne zvieratá je z hľadiska charakteru využívaného animálneho modelu nevyhnutnou súčasťou metodického postupu. V súvislosti s použitím tejto látky očakávame pokles motorickej aktivity zvierat, ktorá je však nevyhnutnou súčasťou modelu PD, s ktorým plánujeme pracovať. Vznik určitého pocitu dyskomfortu môže byť spojený s účinkom rotenónu GIT experimentálnych zvierat. Neexistujú informácie o významnom poškodení trávenia, avšak pozorovaná bola znížená frekvencia vyprázdňovania zvierat využitých v animálnom modeli PD založenom na podávaní rotenónu. Všeobecné informácie o účinkoch tejto látky na zvieratá sa zhodujú z prijateľnou toleranciou použitých dávok bez prítomnosti iných nežiadúcich účinkov aj počas niekoľko mesačných experimentov. Prípadný úhyn experimentálnych zvierat v súvislosti s použitými dávkami rotenónu je preto nepravdepodobný, avšak nemožno ho vylúčiť u jedincov so zvýšenou citlivosťou zapríčineného napr. individuálne zhoršeným zdravotným stavom. Zvieratám zaradeným do skupín vystavených rotenónu bude

venovaná zvýšená miera starostlivosti a v prípade neočakávaného správania súvisiaceho so zvýšením humane end point skóre bude ihneď zvažovaný charakter ďalšieho priebehu experimentu. Podľa protokolu a časového harmonogramu budú zvieratá usmrtené inhaláciou CO₂ a v pokuse sa bude ďalej pracovať už len s tkanivami spracovanými pre potreby plánovaných in vitro experimentov.

Pri retrográdnom značení aferentných neurónov inervujúcich žalúdok a črevá, sa zvieratám v krátkodobej anestézii vykoná veľmi šetrný minimálny chirurgický zákrok v oblasti brušnej dutiny /príslušného neuronálneho ganglia, pričom do stien oboch orgánov/ganglii bude injikované Dil/GFP farbivo označujúce aferentný nervový systém. rana bude štandardne ošetrená a zvieratá budú udržiavané vo zverinci s najväčšou starostlivosťou po dobu dvoch týždňov. Počas experimentu je zabezpečený komfort zvierat, minimálna manipulácia, kožný rez je minimálny čomu zodpovedá aj rýchle hojenie. Zvieratá sú zväčša už hodinu po odoznení anestézy čulé s obvyklým záujmom o potravu, takže nie sú traumatizované a prípadná bolesť je len minimálna. Zvieratá podrobené chirurgickému zákroku (značenie neurónov, zavádzanie minipumpy) sú sledované vo zvýšenej miere pre kontrolu hojenia rany a proti zamedzeniu vzniku prípadných komplikácií ako napr. zápal. V rámci postupov vyžadujúcich použitie anestézy a podávanie rotenónu gastrickými sondami existuje určité riziko úhynu experimentálnych zvierat. Riziko však bude minimalizované na najnižšiu možnú úroveň skúsenosťami a odbornou spôsobilosťou personálu vykonávajúceho tieto postupy na zvieratách.

Podľa protokolu a časového harmonogramu budú zvieratá usmrtené inhaláciou CO₂ a v pokuse sa bude ďalej pracovať už len s tkanivom.

Väčšina metodických postupov, ktoré použijeme pri realizácii projektu boli na našom pracovisku využívané dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh, zvieratá sa veľmi dobre zotavujú po krátkodobej zoletil 50 anestézii, po prebudení rýchlo nastupuje motorická aktivita a po hodine sú úplne čulé so záujmom o krmivo a vodu. Zhoršený zdravotný stav očakávame výnimočne u senzitívnych – precitlivých zvierat, alebo u zvierat s primárne zhoršeným zdravotným stavom. 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, ktoré môžu pozitívne obohatiť farmakoterapiu. Veľká pozornosť bude zameraná na adaptáciu s personálom a laboratórnym prostredím.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Postup	krutosť
Váženie	slabá
Orálne podávanie rotenónu	stredná
Podávanie rotenínu minipumpami	stredná

(opakovanie chirurgického zákroku)	
Dlhodobé prežívanie zvierat s minipumpami	stredná
Samostatné umiestnenie zvierat s minipumpami	stredná
Dlhodobé vystavenie účinkom rotenónu	stredná
Test lokomočnej aktivity (open field)	slabá
Retro/anterogádne značenie neurónov (drobný jednorázový chir. Zárok)	stredná
celková klasifikácia	stredná

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Pokus nie je možné vykonať bez použitia týchto špecifických zvierat. Myš je jeden z najrelevantnejších modelov na štúdium vzniku a rozvoja PD na centrálnej alebo periférnej úrovni. Alternatívne metódy na štúdium PD patológie v periférnych tkanivách neexistujú (prehľad databáz nižšie). Nie je možné použiť nižší laboratórny živočíšny druh, pretože nižšie laboratórne druhy (*C.elegans*, *Drosophila melanogaster*, kvasinkové modely) majú odlišnú biológiu kľúčových orgánov a buniek, ktoré budú študované a sú rozhodujúce pre šírenie PD patológie v periférnych tkanivách. Prieskum databáz takisto ukázal, že vzhľadom na komplexnosť centrálného a periférneho systému, jednotlivých orgánov podieľajúcich sa na vzniku a rozvoji PD, nie je možné použiť modelovanie ani jednoduchšie systémy (bunkové kultúry a pod.)

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Použitím validovaných štatistických metód pri analýze rozsiahlych súborov a z našich vlastných pokusov sme zistili, že počty pokusov tak ako sú špecifikované v protokole sú nevyhnutné (minimálne) na hodnoverné (štatisticky signifikantné) zachytenie predpokladaných efektov. Ďalšie znižovanie počtu pokusov je spojené s rizikom falošne negatívnych alebo falošne pozitívnych výsledkov, ktoré by potenciálne viedli k neopodstatneným pokusom na ďalších zvieratách. Inými slovami, počty zvierat pri jednotlivých pokusoch sú vybrané tak, aby minimalizovali celkový počet pokusov nevyhnutných na dosiahnutie cieľov projektu. Hlavným dôvodom pre nevyhnutné minimálne počty zvierat je biologická variabilita odpovedí na periférnu aplikáciu toxických látok –

rotenónu, či už z hľadiska lokalizácie patológie, expresie študovaných génov a protínov. Počet zvierat je tiež maximálne redukovaný logistikou pokusov, t.j. použitím minimálne možnej (jednej) kontrolnej skupiny pre všetky skupiny s testovanými látkami. S ohľadom na kvalitu života zvierat, ale aj limitované financovanie a časovú náročnosť experimentov a ich analýzy je v našom najlepšom záujme vykonať čo najmenej experimentov na získanie interpretovateľných výsledkov a použiť čo najmenej zvierat na získanie validovaných dôležitých poznatkov nevyhnutných pre pochopenie mechanizmov PD a vývoja nových liečiv pre prevalentné ochorenia študované v týchto pokusoch.

3. Zjemnenie:

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

Metodiky na orálnu a subkutánnu aplikáciu rotenónu ako aj metodiky retrográdneho a anterográdného značenia neurónov a správanie počas dyskomfortu u zvieracích modelov sa vyvíjali a vylepšovali (refinement) v období posledných viac ako 15 rokov na základe a v súlade s najnovšími poznatkami o fyziológii, aferentnej neurofyziológii a najmodernejšími metódami. Tieto metódy sa rutinne používajú na najprestížnejších svetových výskumných pracoviskách (Okayama University Graduate School of Medicine, Okayama, Japonsko; Ludwig-Maximilians-Universität Mníchov, Nemecko; Columbia University, New York, USA; University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, USA; priamy prístup k informáciám zo skupiny Prof. Undema na Johns Hopkins University, USA).

Všetky plánované pokusy sú minimálne traumatizujúce. Pri retrográdnom a anterográdnom značení neurónov sa v krátkodobej anestézii zvieratám vykoná veľmi šetrný minimálny chirurgický zákrok, rana bude štandardne ošetrovaná a zvieratá budú udržiavané vo zverinci s najväčšou starostlivosťou. Po 14 dňoch budú zvieratá humanne usmrtené inhaláciou CO₂ a v pokuse sa bude ďalej pracovať už len s tkanivom.

Aplikácia Rotenónu (ROT)

Pre modelovanie PD symptómov využijeme validovaný model podávania ROT myšiam pomocou gastrickej sondy (A) a osmotických minipúmp (B). V oboch prípadoch použijeme zvieratá vo veku 6 týždňov a doba aplikácie ROT bude 1 až 11 týždňov.

- Orálna aplikácia ROT pomocou gastrickej sondy

ROT bude podávaný 5 dní v týždni 1 krát denne pomocou ohybanej gumovej sondy (1,2 x 60mm) v 0,01ml/g váhy vo výslednej dávke 5mg/kg (Pan-Montojo a kol. 2010). Kontrolným zvieratám bude

podávaný roztok 4% karboxymetylcelulózy a 1,25% chloroformu, rozpúšťací roztok pre ROT. Po poslednej dávke budú zvieratá humane usmrtené (inhalácia CO₂) a budú im odobraté tkanivá na ďalšie analýzy resp. pre kultiváciu primárnych kultúr. Počas experimentu je zabezpečený komfort zvieratá.

- *Aplikácia ROT pomocou osmotických minipúmp*

ROT rozpustený v DMSO a následne zmiešaný 1:1 s polyetylén glykolom. Výsledná koncentrácia, v ktorej bude roztok napustený do osmotických minipúmp musí byť prepočítaná na základe prietoku pumpy (0,25µl/hod) a telesnej hmotnosti zvieratá tak, aby bola dosiahnutá dávka 50mg/kg/deň (Muramaki a kol., 2015). Minipumpa bude zvieratám implantovaná počas celkovej anestézy (zoletil 50) pod kožu na chrbte do oblasti medzi lopatkami. Kontrolná skupina bude vystavená pôsobeniu rozpúšťadiel ROT. Minipumpy budú každé tri týždne vymieňané za nové z dôvodu udržania stanovenej dennej dávky po celú dobu trvania experimentu. Zvieratá s implantovanou minipumpou budú umiestnené v klietkach samostatne. Počas experimentu je zabezpečený komfort zvieratá, minimálna manipulácia, kožný rez je minimálny, rýchle hojenie, takže zvieratá nie sú traumatizované a prípadná bolesť je len minimálna.

Test lokomočnej aktivity (Open field)

Spontánna pohybová aktivita zvierat bude hodnotená raz do týždňa u všetkých zvierat zaradených do experimentov, a to v otvorenom štvorcovom priestore s rozmermi š49 x h49 x v37 cm. Zvieratám bude umožnené aklimatizovať sa na podmienky v miestnosti, kde prebieha test po dobu 30 minút pred samotným testovaním. Myš bude vložená do prázdnej arény, kde bude voľne explorať. Pre hodnotenie lokomočnej aktivity bude použitý počet prestupu naprieč stanovenými zónami po uložení zvieratá do stredu priestoru. Lokomócia bude sledovaná počas 3 minút 1 krát týždenne počas celého experimentu v rovnakom čase počas svetelnej fázy dňa (15-17:00). Okrem lokomotorickej aktivity budú hodnotené aj ďalšie etiologické parametre ako prejavy úzkostného správania, ktorého znakmi je kratší čas strávený v centrálnej zóne otvoreného poľa.

Retrográdne/ anterográdne značenie neurónov

V krátkodobej celkovej anestézii sa za sterilných podmienok malým kožným rezom (cca 1cm) exponuje pažerák a retrográdna farbička Dil (0.1%, 2 x 10µl) sa pomocou mikropipety injikuje do svalovej vrstvy pažeráka. Podobnú procedúru si vyžaduje anterográdne značenie inervácie pomocou GFP AAV vektora (10¹² PFU), ktorý bude injikovaný priamo do príslušného neuronálneho ganglia. Rana bude štandardne ošetrená, zviera sa sleduje a po odznení anestézie sa premiestni do Centrálného zverinca JLF UK a bude udržiavané vo zverinci s najväčšou starostlivosťou do dvoch týždňov.

Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne zaobchádzanie so zvieratami, v záujme odbúravania stresu zvieratá budú adaptované na personál a laboratórne podmienky ešte pred samotným vykonávaním postupov. Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované množstvom prác a prezentované na mnohých odborných fórach nielen doma ale aj v zahraničí. Postupy sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie pokusných zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov prispievajúcich k objasneniu patológie PD.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

V Martine, 31.5.2018

Príloha č. 2
Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Neuroprotektia v procese získania ischemickej tolerancie z pohľadu sledovania reakčných dráh v mozgu potkana (proteomická MALDI-TOF/TOF štúdia).

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1302/18-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): ischémia, neuroprotektia, kondicioning, proteomika

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

Ciele projektu:

Cieľom výskumu v projekte je detailné štúdium proteínového profilu vybraných mozgových štruktúr u potkana laboratórneho po navodení celkovej ischémie a na druhej strane po indukciu ischemickej tolerancie v rovnakých regiónoch mozgu. Identifikované látky proteínového charakteru po ich zatriedení do príslušných metabolických bunkových dráh a procesov budú hodnotené z hľadiska ich účasti v neuroprotekcii. Plánujeme identifikovať jednotlivé komponenty indukcie ochrany neurónov pred bunkovou smrťou, ktoré sa podieľajú na úspešnom prežívaní buniek po ischemickom poškodení. Porovnanie rozdielov v expresii proteínov (ischemické vs. tolerantné tkanivo) nám umožní detekciu neuroprotektívnych látok, zúčastňujúcich sa aktivácie ischemickej tolerancie. Predpokladáme, že táto stratégia nám umožní vyprofilovať látky, ktoré sú pravdepodobne zodpovedné, alebo sa vo vzájomnej súčinnosti podieľajú na získaní ischemickej tolerancie a takto prispieť k získaniu podrobnejších poznatkov o mechanizmoch účinku kondicionovania.

Prínos z vykonaného projektu:

Ischémia mozgu spolu s poruchami jeho krvného zásobovania sú na tretej pozícii v príčinách smrti alebo trvalej indispozície a výskum v oblasti mechanizmov neuroprotektie rieši spoločensky aktuálnu problematiku z medicínskeho aj socio-ekonomického hľadiska. Z tohto dôvodu je urgentná potreba nájsť nový potenciálny cieľ pre inovatívnu terapeutickú stratégiu schopnú ochrániť ischemicky poškodený mozog. Ochrana najcitlivejších buniek mozgu voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu prostredníctvom získania ischemickej tolerancie predstavuje v súčasnosti najsilnejšiu známu procedúru pre prevenciu alebo reverzibilizáciu neurodegenerácie. Mozgové bunky disponujú prirodzenou schopnosťou tolerovať poškodenie spôsobené ischemickou epizódou a naštartovanie tohto procesu pomocou kondicionovania, či už vzdialeného alebo aplikáciou druhého stresu počas ischémie alebo v reperfúznom intervale do dvoch dní po ukončení ischémie sa ukazuje sľubným

postupom, ktorý je do značnej miery schopný zabrániť výskytu oneskorenej smrti neurónov. Takto splnenie vytýčených cieľov projektu môže významným spôsobom prispieť k rozvoju poznatkov o mechanizme neuroprotektie a o ochrannom ovplyvnení ischemickej príhody.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch je plánované použiť dospelé potkany laboratórne (*Rattus norvegicus*), Wistar, samce v počte 330 jedincov na celú dobu riešenia.

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

Navodenie ischemického poškodenia mozgu podľa štandardného modelu 4-cievneho podväzu sa uskutočňuje chirurgickým zákrokom v celkovej anestézii v prvej fáze na dorzálnnej strane prvého krčného stavca, kde sa cez foramina alares kauterizujú obidve vertebrálne artérie, čo však nespôsobí úplné zastavenie prívodu krvi do mozgu a zvieratá spravidla bez problémov prežívajú. V druhej fáze navodenia ischémie sa v celkovej inhalačnej anestézii pripraví na atraumatickú oklúziu obidve krčnice a následne sa uzavrujú na prechodný čas, zviera upadne do ischemickej kómy. Po uvoľnení sa obe krčnice opäť spriechodnia a zviera sa po čase zotaví bez vonkajších viditeľných známkov poškodenia. Model spôsobí neurodegeneratívne zmeny v najcitlivejších bunkových populáciách v neokortexe, striate a hipokampe, ktoré sa navonok odrazia v správaní zvierat a prejavujú sa ako znížená schopnosť učenia sa ako aj zhoršenie priestorovej pamäti. Injekčná aplikácia tzv. postkondicionérov, čo sú vlastne biologicky aktívne látky prirodzene sa vyskytujúce v organizme avšak v nižších koncentráciách, spôsobí krátkodobý stres počas podávania a počas prvých hodín po podaní môžu zvieratá prejavovať apatiu resp. zvýšenú citlivosť. Turniketový model postkondicionovania je neinvazívny, zvieratám nespôsobuje bolesť ani poranenie a na zamedzenie stresu sa vykonáva v celkovej inhalačnej anestézii.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia - uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Ischemické poškodenie mozgu s následnou reperfúziou a fenomén ischemickej tolerancie sú procesy dynamické, ťažko predvídateľné a závisiace na mnohých faktoroch. Z týchto dôvodov nie je možné uskutočniť dané experimenty alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat. Okrem toho, experiment nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov.

2. Redukcia počtu zvierat:

Počet 330 ks zvierat bol stanovený vzhľadom k tomu, že predpokladáme veľkú individuálnu variabilitu výsledkov, z tohto dôvodu plánovaný počet 8 kusov zvierat v experimentálnych skupinách je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný počet pre získanie štatisticky významných výsledkov s prihliadnutím na úspešnosť modelu, ktorú jeho autori odhadujú ako 50-75%-nú. Skupiny zvierat v postupoch, uvedených v prílohe č. 1 sú nevyhnutné na získanie relevantných výsledkov ako stavu poškodenia, tak aj neuroprotektívnych účinkov podávania postkondicioningu a vývoja ischemickej tolerancie v komplexnom pohľade na mechanizmus účinku. Ischemicky poškodený mozog nemôže

byť použitý na biochemicko-proteomické analýzy a zároveň aj na histologické a imunohistochemické analýzy.

3. Zjemnenie:

Všetky invazívne zákroky na zvieratách (model celkovej ischémie mozgu, indukcia vzdialeného kondicionovania oklúziou turniketom alebo parenterálne) budú vykonávané v celkovej anestézii, t. j. nebudú pre zvieratá bolestivé, s ohľadom na patologické prejavy krátkodobého prežívania po ischémii. Prežívanie v tejto fáze reperfúzie uľahčuje umiestnenie zvieratá na vyhrievanú podložku, ako aj podanie fyziologického roztoku subkutánne. V každom prípade sú ihneď po ukončení ischémie podávané analgetiká (metamizol) na zmiernenie bolesti, na zabránenie nežiaducich patologických prejavov a na celkové zjemnenie postupu. V pooperačnom období budú jedince denne sledované a analgetikum (metamizol) im bude podané opätovne pri akejkoľvek ďalšej nezvyklej manifestácii patologických pooperačných prejavov, ako je napr. bolestivosť prejavujúca sa stabilnou polohou zvieratá so zježenou srstou, vydávanie neprirodzených zvukov a pod.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Príloha č. 2

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu: Úloha nervového systému v etiopatogenéze experimentálneho melanómu

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1314/18-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

- melanóm, laboratórne myši, nervový systém, neurobiológia nádorov

Účel projektu: základný výskum

Opísať ciele projektu:

Cieľom predloženého projektu je použitím viacerých experimentálnych prístupov objasniť úlohu nervového systému v etiopatogenéze experimentálneho melanómu. Chceme sledovať reakciu mozgu na vyvíjajúci sa melanóm a študovať vplyv modifikovanej neurotransmisie v samotnom nádorovom tkanive a jeho mikroprostredí na jeho progresiu u laboratórnych myší.

Pre dosiahnutie stanoveného cieľa plánujeme:

- 1/ zistiť, ktoré oblasti mozgu odpovedajú zmenenou aktivitou neurónov na rast a progresiu melanómu (detekcia markerov akútnej, resp. chronickej aktivity neurónov);
- 2/ zistiť, či je progresia melanómu sprevádzaná periférnym zápalom (stanovenie plazmatických, sérových a tkanivových hladín rôznych zápalových markerov);
- 3/ sledovať zmeny v génovej expresii markerov zápalu v samotnom mozgu zvierat s indukovaným melanómom;
- 4/ zistiť, či sa v tkanive experimentálneho melanómu nachádzajú sympatikové a senzitivné nervové zakončenia (stanovením markerov sympatikovej inervácie a markerov senzitivných nervov);
- 5/ sledovať účinok ovplyvnenia lokálnej neurotransmisie aplikáciou vybraných látok (nervový rastový faktor (NGF), protilátka proti NGF (anti-NGF)) priamo do tkaniva nádoru na rast a progresiu melanómu.

Prínos z vykonaného projektu:

Uvedené sledovania majú za cieľ vytvoriť podklad pre potenciálnu moduláciu prenosu signálov z nervového systému k nádorovým bunkám s cieľom obmedziť prípadný stimulačný vplyv nervového systému na nádorový rast.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Laboratórne myši kmeňa C57Black/6J, 158 dospelých jedincov. V plánovaných experimentoch budeme využívať iba samce.

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

Vzhľadom nato, že laboratórnym myšiam sa budú subkutánne inokulovať melanómové B16-F10 nádorové bunky, ktoré vyvolávajú rast experimentálneho melanómu, budú zvieratá vystavené nepriaznivému účinku vyvíjajúceho sa nádoru, čo bude mať za následok istý diskomfort a nepohodlie. Avšak, z našich predošlých skúseností, ako aj z prác iných autorov využívajúcich daný nádorový model (Overwijk a Restifo, 2001; Ya a spol., 2015) vieme, že tento typ nádorov indukovaný po s.c. aplikácii nádorových buniek, nevyvoláva tvorbu metastáz a pokiaľ sa nenechá prerásť do veľkých rozmerov (teda nezačne byť nekrotický,

ulcerovať a krváčať) nespôsobuje zvieratám komplikácie. Vzniknuté nádory je možné u zvierat palpačne detegovať cca na 5 – 10 deň a do veľkosti 1 × 1 × 1 cm nádor narastie v priebehu 14 až 21 dní. V tomto čase nezvykne nádor spôsobovať zvieratám väčší diskomfort. Preto je vhodné usmrtiť zvieratá pred týmto stavom. V predkladanom projekte plánujeme zvieratá humánne usmrcovať do 20. dňa po podaní nádorových buniek.

Ďalšie možné následky môžu byť prítomné u zvierat, ktoré podstúpia chirurgický zákrok, a to podanie vybraných látok do tkaniva nádoru, ktoré tiež môžu ovplyvniť ich zdravotný stav. Hoci budú tieto zákroky u zvierat vykonané pod anestéziou, predpokladáme ich krátkodobý nepriaznivý vplyv na zdravotný stav zvierat (predovšetkým pooperačná bolesť). Všetkým predvídateľným zdravotným komplikáciám sa budeme snažiť zabrániť, prípadne ich zmierniť.

Predpokladaná úroveň krutosti:

- celková miera krutosti projektu: **stredná**

Uplatňovanie zásad 3R:

1. Nahradenie zvierat

Úlohu nervového systému v procesoch súvisiacich so vznikom a progresiou nádorov je možné študovať len na animálnom modeli s dostatočne vyvinutým nervovým systémom. Preto nie je možné navrhovaný experiment realizovať na systematicky nižšom druhu živočíchov a ani za využitia počítačovej simulácie. Je nevyhnutné využiť laboratórne myši kmeňa C57Black/6J, keďže predstavujú ideálny model pre indukciu melanómov subkutánnou aplikáciou B16-F10 melanómových nádorových buniek. Tento prístup taktiež výrazne skráti dobu potrebnú pre vznik nádorového tkaniva vhodného z hľadiska štúdia interakcií melanómu s nervovým systémom.

2. Redukcia počtu zvierat

Na základe našich skúseností z predchádzajúcich experimentov vieme, že incidencia experimentálneho melanómu indukovaného u samcov laboratórnych myší kmeňa C57Black/6J je po s.c. aplikácii melanómových buniek B16-F10 v počte 3000 buniek/zviera, ktoré boli podané v objeme 100 µl RPMI 1640 média, veľmi vysoká (viac ako 90%). Keďže rovnaký protokol budeme využívať na indukciu nádorov aj v predkladaných postupoch, počet experimentálnych zvierat bude redukovaný na minimum nevyhnutné z hľadiska štatistických analýz pre získanie vedecky hodnoverných a validných výsledkov. Avšak, pre získanie biologického materiálu vhodného pre imunohistochemické spracovanie a spracovanie biochemickými metódami ako sú PCR, western blot a ELISA, bude potrebné navýšenie počtu zvierat, keďže zvieratá budú musieť byť na konci experimentov usmrtené dvomi rôznymi spôsobmi, konkrétne dekapitáciou bez použitia anestézie a letálnou dávkou anestetika (pentobarbital, 100 mg/kg hmotnosti zvieratá, i.p.) s následnou transkardiálnou perfúziou. Skupina Absolútna kontrola (zvieratá bez akéhokoľvek zásahu) je do experimentu zahrnutá pre potreby poznania bazálnych hodnôt pri stanovovaní parametrov z krvi, resp. plazmy, ako aj pre poznanie vývoja normálnych hodnôt hmotnosti zvierat a príjmu potravy a vody.

Kontrolná skupina (zvieratá, ktorým bude namiesto nádorových buniek aplikované len RPMI 1640 médium bez nádorových buniek) je do experimentu zahrnutá z dôvodu našich predchádzajúcich pozorovaní, kedy podanie samotného média bez nádorových buniek ovplyvnilo mozgovú aktivitu viacerých oblastí, predovšetkým tých, ktoré sa podieľajú na regulácii imunitných procesov (najmä *nucleus parabrachialis*, či *area postrema*).

Počty zvierat s indukovanými nádorovými bunkami, ktorým budú priamo do tkaniva nádoru podané vybrané látky, sú navýšené. Je to z dôvodu invazívneho postupu, ktorý bude u nich

vykonaný. To bude vyžadovať rezervu v počte zvierat, keďže podanie nemusí byť u všetkých zvierat 100% úspešné.

V prípade, že bude možné experimenty uskutočniť priebežne (personálne a priestorové zabezpečenie), budeme minimalizovať počet zvierat redukciou kontrolných skupín. Taktiež, ak bude možné využiť vzorky získané z jedného experimentu aj v druhom experimente, počet experimentálnych zvierat adekvátne znížime.

3. Zjemnenie

Utrpenie zvierat bude minimalizované dodržiavaním každej z piatich zásad uvádzaných pri definícii welfare zvierat. Zvieratá budú držané v klietkach v skupinách za prísunu peletovanej stravy a vody *ad libitum*, čo im umožní plne realizovať prirodzené formy správania, vrátane sociálneho. U zvierat bude po aplikácii nádorových buniek denne sledovaný ich zdravotný stav a pohmatom v oblasti miesta podania nádorových buniek sa budú vyšetrovať na prítomnosť nádoru. Zistené nádory sa budú každý druhý deň merať posuvným meradlom a okrem veľkosti nádoru budeme monitorovať aj jeho stav. Z našich predošlých skúseností, ako aj z prác iných autorov využívajúcich daný nádorový model (Overwijk a Restifo, 2001; Ya a spol., 2015) vieme, že tento typ nádorov po s.c. aplikácii nádorových buniek je možné palpačne detegovať cca na 5 – 10 deň a do veľkosti 1 × 1 × 1 cm nádor narastie v priebehu 14 až 21 dní. V tomto čase nezvykne nádor spôsobovať zvieratám väčší diskomfort. Avšak pokiaľ sa nenechá prerásť do veľkých rozmerov, nádor začne byť nekrotický, ulcerovať a krváčať. Preto je vhodné usmrtiť zvieratá pred týmto stavom. V predkladanom projekte plánujeme zvieratá humánne usmrcovať do 20. dňa po podaní nádorových buniek. Ak sa stane, že nádor bude ulcerovať skôr alebo akýmkoľvek spôsobom ovplyvní normálne správanie, držanie tela alebo pohyb, alebo ak sa jeho priemer výrazne zväčší (nad 1 cm3, zvieratá budú humánne usmrtené letálnou dávkou anestetika (pentobarbital, 100 mg/kg hmotnosti zvieratá). Po aplikácii nádorových buniek budeme v priebehu experimentov pravidelne zaznamenávať telesnú hmotnosť zvierat, množstvo prijatej potravy a vody. Systém monitorovania bude zahŕňať aj dôkladné sledovanie držania tela a chôdze. Ak sa po podaní injekcie s nádorovými bunkami resp. s médiom spozoruje u zvieratá väčší ako mierny strach alebo nepohodlie bez rýchleho zotavenia, zvieratá sa humánne usmrtia. Taktiež, pri výraznej strate hmotnosti zvierat, ktoré však pri tomto nádorovom modeli neočakávame, bude zviera podrobené dôslednejšej kontrole a častejšiemu (každodennému) sledovaniu hmotnosti a pokiaľ dôjde k strate ≥20% hmotnosti pristúpime k humánnemu usmrteniu zvieratá (letálna dávka anestetika pentobarbitalu, 100 mg/kg hmotnosti, i.p.).

Počas chirurgických zásahov (aplikácia látok do tkaniva nádoru) budú zvieratá v celkovej anestézii, čím sa zminimalizuje ich utrpenie na najmenšiu možnú mieru. Zdravotný stav zvierat bude denne monitorovaný. Po operačných zásahoch budú zvieratá ponechané na vyhrievacích podložkách do doznenia účinkov anestézie. Následne budú preložené do chovných klietok, kde budú pravidelne monitorované. V pooperačnom období podľa potreby podáme analgetikum Carprofen 5 mg/kg/deň v pitnej vode.

Všetky postupy budú uskutočňované tak, aby zvieratá čo najmenej strádali. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno nie

Príloha č. 2
Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Regenerácia nervových vlákien v biosyntetických vodičoch.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1360/18-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): periférny nerv, regenerácia, poškodenie, morfometria

Účel projektu*: Základný výskum
Translačný alebo aplikovaný výskum
Regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z.z.)
Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat
Ochrana druhov
Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie
Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu: (napr. nie sú ešte výsledky z takéhoto výskumu, nutnosť jeho vykonania z hľadiska vedy, z klinického hľadiska)

Cieľom projektu je pripraviť biosyntetický vodič (polymérová trubička osadená živou populáciou podporných buniek v médiu) podporujúci regeneráciu nervových vlákien na dlhé vzdialenosti. Testovanie vodičov pre určenie ich optimálneho zloženia bude prebiehať s využitím modelového systému in vivo.

Cieľ 1. in vivo model mikrotubulácie periférneho nervu – charakteristika regenerácie.

Cieľom experimentu je definovať limitné vzdialenosti prerastania regenerujúcich axónov pri použití semipermeabilného TMC-CL vodiča vyplneného fyziologickým roztokom. V rôznych vzdialenostiach od preťatia bude stanovená celková plocha rastúceho nervu a celkový počet myelinizovaných resp. nemyelinizovaných axónov. Výsledkom tejto štúdie bude graf v ktorom predpokladáme klesajúci počet axónov v závislosti na vzdialenosti od miesta poškodenia.

Cieľ 2. sledovanie vplyvu médií na regeneráciu axónov.

2a, lumen vodiča bude vyplnený modifikovaným médiom. Budeme vyhodnocovať vplyv rôznych médií na rast axónov. Porovnáme charakteristiku regenerácie vo vodiči obsahujúcom fyziologický roztok, LW alginát, a Matrigel.

2b, Testovanie vplyvu prítomnosti rastových faktorov v matrixe vodiča. Alginátové hydrogély je možné konjugovať s rastovými faktormi, ktoré sú kontrolovateľne dlhodobo uvoľňované do okolia. V experimente plánujeme vyhodnocovať účinok prítomnosti bFGF, a NT3.

Cieľ 3. sledovanie vplyvu prítomnosti podporných buniek vo vodiči na regeneráciu axónov.

Lumen vodiča bude vyplnený bunkami, odobratými z experimentálneho zvieraťa a proliferačnými *in vitro*. Podľa výsledkov získaných v 2. etape budeme testovať médiá s najlepšimi výsledkami. V experimentoch budú použité Schwannove bunky.

Predpokladáme, že kombináciou stratégie a) použitia mikrovodiča schopného zabezpečiť výmenu metabolitov s okolím a b) optimalizáciou jeho vnútorného prostredia pre regenerujúce axóny bude možné dosiahnuť regeneráciu na dlhé vzdialenosti. Cieľom projektu je definovať aké sú limity takejto regenerácie.

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

Hlavným prínosom plánovaných experimentov je možnosť stupňovať vzdialenosť medzi kýptami tubulizovaných nervov a exaktne kvantifikovať počet regenerujúcich axónov. Na základe výsledkov budeme vedieť porovnávať úspešnosť jednotlivých postupov, a odporúčať optimálne postupy pre klinickú prax.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch je plánované použiť dospelé potkany laboratórne (*Rattus norvegicus*), Wistar, v počte 155 jedincov na celú dobu riešenia.

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

Model transektie chvostového nervu minimalizuje nepriaznivé účinky na zviera. Zásah samotný nevyvoláva žiadne zjavné zmeny v správaní zvierat ani úbytok hmotnosti. Zárok je vykonávaný sterilne, v pooperačnom období je hlavným cieľom zabezpečiť nerušené zhojenie kožnej rany. Po transekcii motorického nervu nie je pozorovaná autofágia, vzájomné okusovanie rán je vylúčené individuálnym ustajnením po dobu úplného zhojenia kožnej rany.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia - uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Neexistuje plnohodnotný *in vitro* model na regeneráciu axónov na dlhé vzdialenosti. Preto sme zvolili experimenty *in vivo*. Významným prínosom k minimalizácii utrpenia zvierat je využitie modelu transektie chvostového nervu, na rozdiel od bežne používaných transekcií ischiadického nervu v podobných experimentoch.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet 155 ks zvierat bol stanovený vzhľadom k predpokladanej individuálnej variabilite, z tohto dôvodu plánovaný počet 5 kusov zvierat v experimentálnych skupinách je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný počet pre získanie štatisticky významných výsledkov.

Skupiny zvierat v postupoch, uvedených v prílohe č. 1 sú nevyhnutné na získanie relevantných výsledkov.

3. Zjemnenie:

Všetky zákroky, ktoré budú na zvieratách uskutočnené, budú vykonávané pod celkovou anestéziou, t. j. nebudú pre zvieratá bolestivé.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Príloha č. 4

Netechnické zhrnutie projektu:

1455/18 - 221/3

Názov projektu: Analýza potenciálu a úlohy výstelky centrálného kanála pri regenerácii miechy

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: APVV-15-0239, VEGA 1/0820/17

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): kmeňové bunky, ependýmové bunky, centrálny kanál, poranenie miechy, regenerácia, vývin miechy

Účel projektu*: Základný výskum

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

(napr. nie sú ešte výsledky z takéhoto výskumu, nutnosť jeho vykonania z hľadiska vedy, z klinického hľadiska)

Projekt je zameraný na charakterizáciu vývinových procesov, ktoré sa odohrávajú vo výstelke centrálného kanála (CK) miechy potkana s cieľom vyšetriť kontinuitu populácií kmeňových a progenitorových buniek prítomných v tejto oblasti a získať tak dôležité poznatky o identite, fenotype, biológii, vlastnostiach a pôvode kmeňových buniek nervového systému v dospelosti. Pre lepšie pochopenie dynamiky populácií kmeňových a progenitorových buniek budú preskúmané zatiaľ neobjasnené procesy produkcie astrocytov a ependýmových buniek, ktoré predstavujú priamych pokračovateľov buniek radiálnej glie a taktiež kandidátov na pokojovú formu kmeňových buniek v postnatálnej fáze života. Preskúmanie procesov prebiehajúcich vo výstelke CK v reakcii na minimálne poranenie miechy, ktoré sa odohralo počas postnatálneho vývinu alebo v dospelosti, pomôže lepšie odhadnúť regeneračný potenciál výstelky CK v závislosti na prítomnosti populácií týchto progenitorov.

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

Záver z nespočetného množstva štúdií skúmajúcich endogénny regeneračný potenciál miechy hlodavcov v dospelosti poukazuje na výrazne obmedzenú schopnosť obnovy poškodeného nervového tkaniva. Tieto závery nie sú prekvapivé vzhľadom na skúsenosti z klinickej praxe v humánnej medicíne. Preto sa domnievame, že pozornosť neurobiológov by sa mala presunúť na výskum regeneračnej kapacity miechy a ependýmovej výstelky počas vývinu a v adolescentom období, teda v čase, keď je ešte zachovaná architektúra výstelky CK, o ktorej sa predpokladá, že predstavuje zdroj kmeňových/progenitorových buniek a existuje reálny predpoklad vyššej plasticity a regeneračnej kapacity nervového systému. V neposlednom rade tiež netreba zabúdať na relatívne vysokú incidenciu úrazov chrbtice a miechy v adolescentnom období v ľudskej populácii, pričom práve v tomto období by mohli byť vyhliadky priaznivejšie kvôli dosiaľ nezmapovanej regeneračnej kapacite vyvíjajúceho sa nervového systému. Na vyšetrenie regeneračného potenciálu výstelky CK použijeme nami navrhnutý model minimálneho poškodenia miechy (unilaterálna incízia hrotom injekčnej ihly do oblasti zadných rohov miechy), nakoľko v súčasnosti neexistuje vhodný experimentálny

model poranenia miechy u hlodavcov počas vývinu. Unikátnosť nami navrhnutého modelu spočíva v jeho reprodukovateľnosti medzi rôznymi fázami ontogenetického vývinu, poprípade medzi rôznymi druhmi experimentálnych zvierat (nepublikované výsledky). Realizáciou navrhovaných experimentov by sme získali vôbec prvé, vzájomne porovnateľné údaje o endogénnej regeneračnej kapacite nervového systému počas rôznych fáz ontogenetického vývinu. Získané údaje by tak mohli mať zásadný vplyv na kompetentné posúdenie potenciálu a možných obmedzení terapeutických stratégií založených na stimulácii endogénnej regeneračnej kapacity miechy. Na základe získaných výsledkov potom bude možné rozhodnúť, či má zmysel pokračovať vo výskume endogénnej regeneračnej kapacity nervového systému, alebo či je nutné uvažovať o iných terapeutických stratégiách.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

laboratórne potkany, kmeň Wistar, 104 dospelých samcov, 30 dospelých samičiek, 248 mláďat v rôznom veku a 56 embryí v rôznom veku (počet embryí je odhadovaný, nedá sa presne určiť)

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

Operovaným zvieratám bude v narkóze urobená laminektómia v Th13 a poranenie bude urobené formou unilaterálnej incízie injekčnou ihlou (20G) do oblasti vstupu zadných koreňov miechy do hĺbky 0,85 (P7), 1,15 (P29) a 1,25 (P120) mm. Zvieratám bude ošetrovaná operačná rana a podané analgetikum a antibiotikum. Po takomto zásahu sa zvieratá zotavia do jedného dňa a prežívajú bez komplikácií.

Zvieratá budú priebežne sledované a v prípade zhoršenia zdravotného stavu (zápalová reakcia) im bude poskytnutá primeraná liečba.

Predpokladaná úroveň krutosti:

1. skupina zvierat – vývinový experiment, stupeň krutosti: slabý
2. skupina zvierat – minimálne poškodenie miechy, stupeň krutosti: stredný

úkon	stupeň krutosti
manipulácia so zvieratami, váženie, označovanie chvosta nezmývateľnou fixkou	slabý
intraperitoneálna injekcia tiopentalu sodného	slabý (vpich) resp. bez možnosti zotavenia
vyoperovanie embryí gravidným samiciam	bez možnosti zotavenia - matky aj embryá
celotelový transkardiálny preplach	bez možnosti zotavenia
chirurgický zákrok v celkovej anestézii s primeranou analgéziou - minimálne poškodenie miechy	stredný
prežívanie zvierat s minimálnym poškodením miechy	slabý
subkutánna injekcia Buprenorfinu	slabý
intraperitoneálna injekcia Apaurinu	slabý
intraperitoneálna injekcia BrdU	slabý
intraperitoneálna injekcia Gentamycínu	slabý

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Nahradenie experimentálnych zvierat nie je možné vzhľadom na charakter experimentu. Vývinové procesy je nutné sledovať v súvislostiach, t.j. in situ, lebo inak je nie možné popísať skutočné udalosti odohrávajúce sa počas embryonálneho a včasného postnatálneho vývinu cicavcov (v našom prípade potkanov). Reakciu poškodeného tkaniva miechy je nutné sledovať in vivo, vzhľadom na to, že takéto poškodenie sa nedá nijak inak simulovať, na reakcie poškodenej oblasti tkaniva má veľký vplyv okolité niche aj celkové procesy v organizme (napr. imunitný systém). Experimenty sa nedajú robiť na bunkových kultúrach ani na nejakých nižších živočíchoch, lebo je nutné brať do úvahy nielen ontogézu ale aj fylogenetické rozdielnosti.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet zvierat sme zvolili z ohľadom na nutnosť získať poznatky vyhodnotiť použitím vhodných štatistických metód. Aby mohli byť výsledky objektívne a hodnoverné je nutné použiť outbredný kmeň zvierat a embryá musia byť odobraté od rôznych matiek a rôznych otcov, aby neboli výsledky ovplyvnené nejakým znakom vyskytujúcim sa u súrodencov, resp. príbuzných zvierat.

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)

V chovných zariadeniach **EMBL** a **EMBL-SA** majú experimentálne zvieratá komfortné podmienky ustajnenia, ktoré nevyvolávajú zvieratám zbytočný stres. Veľkosť kliebok, počet zvierat v klietke, svetelný a kŕmny režim je optimálne prispôbený potrebám našich experimentálnych zvierat, potkanov. Zvieratá majú zabezpečený zdravotný dohľad veterinárnym lekárom. Pravidelne sú kliebky čistené, pracovníkom, ktorý so zvieratami zaobchádza šetrne.

V našom experimente nebude na 1. skupine zvierat vykonávaný žiadny zásah. Zisťovanie brezivosti sme zjednodušili na váženie samíc po uplynutí troch dní od pripustenia, odstránili sme doteraz používané sledovanie výterov z pošvy na prítomnosť spermií. V experimente s minimálnym poškodením budú zvieratá po zákroku ošetrené podaním protizápalových liečiv

a liečiv tlmiacich bolesť. Zárok je volený tak, aby vyvolal čo najmenšie nutné poškodenie a zvieratá sa po takomto zásahu veľmi rýchlo zotavujú. Počas celej doby experimentu budú pod dohľadom veterinárneho lekára.

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

Príloha č. 2.

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Stanovenie glutatiónperoxidáz (GPX) v reprodukčných orgánoch samcov a samíc potkana

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1554/18 - 221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): GPX, antioxidačný enzým, reprodukcia

Účel projektu: Základný výskum
Translačný alebo aplikovaný výskum
Regulačné metódy s rutinným využívaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005Z. 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 ak

Opísať ciele projektu: Cieľom projektu bude stanovenie enzýmov rodiny glutatiónperoxidáza (GPX) v reprodukčných orgánoch samcov aj samíc. Ako modelové zviera budú použité jedince laboratórneho potkana kmeňa Sprague Dawley. Za jednu z hlavných príčin vzostupu neplodnosti v ekonomicky rozvinutých krajinách sa považuje vzostup voľných kyslíkových radikálov (ROS) v organizme, ktoré poškadzujú DNA, bielkoviny i lipidy. Medzi ROS patrí aj peroxid vodíka, ktorý je degradovaný aj antioxidačnými enzýmami GPX. Sledované enzýmy budeme detegovať v reprodukčných orgánoch pohlavne dospelých samcov, ako aj v reprodukčných orgánoch samíc na 1., 3. a 5. deň gravidity.

Prínos z vykonaného projektu: Výsledky získané v laboratóriu pomôžu definovať zapojenie sledovaných enzýmov do reprodukčného procesu u oboch pohlaví, u samíc navyše pomôžu odhaliť ich možnú účasť v skorých štádiách gravidity. Opisované enzýmy majú antioxidačné vlastnosti a pritom oxidačný stres sa považuje za jednu z hlavných príčin mužskej neplodnosti a výskytu porúch reprodukcie u žien, ako PCOS, endometrióza alebo neplodnosť bez zjavných príčin. Získané informácie by tak mohli napomôcť pri uchovaní reprodukčného zdravia u ľudí.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: Dospelé potkany (*Rattus norvegicus*), kmeň Sprague Dawley, 15 samcov a 45 samíc, spolu 60 ks zvierat.

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

Vo všetkých experimentoch budú zvieratá slúžiť výhradne ako donor experimentálneho materiálu za fyziologických pomerov. Zvieratám nebude vykonaný žiadny chirurgický zákrok, ani im nebudú podávané žiadne látky enterálnou alebo parenterálnou cestou. Izolácia pohlavných orgánov, a u samíc aj izolácia preimplantačných embryí, bude vykonaná až po humánnom usmrtení zvierat. Preto nemožno v tomto pokuse predpokladať akýkoľvek nepriaznivý vplyv na experimentálne zvieratá.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Všetky postupy navrhujeme klasifikovať do kategórie krutosti **slabá**. Zvieratá by v ich dôsledku nemali pociťovať žiadnu alebo iba krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach.

Váženie - slabá

Ustajnenie – slabá

Manipulácia so zvieratami pri čistení vaníc – slabá

Usmrtenie podaním letálnej dávky anestetika– slabá

Uplatnenie zásad 3R

- **zjemnenie** – experiment je postavený tak, aby bol minimalizovaný stres alebo bolesť použitých pokusných zvierat. Zvieratám bude zabezpečená dobrá výživa, adekvátne zaobchádzanie školenými pracovníkmi a vyhovujúci životný priestor, s dennou kontrolou životných podmienok. Usmrtenie zvierat bude vykonané humánnym postupom spôsobilými osobami. V tomto experimente slúžia laboratórne zvieratá výhradne ako donor materiálu za fyziologických podmienok, bez akéhokoľvek chirurgického zákroku alebo aplikácie látok, čím sa minimalizuje ich pocit nepohodlia.
- **zníženie počtu zvierat** – bude použitý iba taký počet zvierat, ktorý zabezpečí možnosť štatistického vyhodnotenia experimentu z hľadiska validity pokusu a jeho reprodukovateľnosti. Rovnako dĺžka pokusu je optimalizovaná na iba na nevyhnutne dlhú dobu. Pre štatistické výpočty sa v CC časopisoch odporúča minimálny počet 5 jedincov, preto sa rovnaký počet zvierat použije v každom čiastkovom pokuse.
- **nahradenie zvierat** – tento pokus sa vykoná na potkanoch, pretože je to modelové zviera v humánnej medicíne. Plánovaný experiment nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom bez použitia živých zvierat, pretože doterajšie poznatky o problematike neumožňujú vytvorenie adekvátneho modelu *in vitro*, ktorý by dokázal simulovať kvantitatívne a kvalitatívne parametre enzýmu v reprodukčných orgánoch samcov alebo samíc zvierat. Databázy medzinárodne uznaných

a overených alternatívnych metód, ako je napr. ECVAM, neobsahujú takéto alternatívne metódy.

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