

Netechnické zhrnutie projektu

- *AKTUALIZOVANÉ
spätne posúdenie*

Názov projektu: Funkčná architektúra mozgu hlodavcov pri Alzheimerovej chorobe

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: Ro-4274/14-221c

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): Alzheimerova choroba, hlodavce, in-vivo, elektrofyziológia, mikroskopia

Účel projektu: Základný výskum

Opísať ciele projektu

Alzheimerova choroba, rovnako ako veľa ďalších neurodegeneratívnych ochorení, sa spája s akumuláciou abnormálnej formy proteínov v centrálnej nervovej sústave, čo spôsobuje degeneráciu a následnú dysfunkciu neurónov, ktorá vedie k charakteristickým kognitívnym zmenám. Podľa súčasných štatistík trpí Alzheimerovou chorobou viac než 24 miliónov ľudí a každý rok sa toto číslo zväčší o 4,5 milióna nových prípadov.

Akým spôsobom molekulárne a morfológické zmeny ovplyvňujú neuronálnu aktivitu a spracovávanie informácií v mozgu a vedú ku kognitívnym zmenám pri Alzheimerovej chorobe je neznáme.

Rozpoznanie a presná charakterizácia zmien aktivity a funkcie neurónov a neuronálnych sietí je však mimoriadne dôležitá pre poznanie patogenézy neurodegenerácie a prípadnú identifikáciu nových diagnostických a liečebných postupov.

Predložený projekt si kladie za svoj cieľ zmapovať funkčnú architektúru mozgových štruktúr postihnutých neurodegeneráciou pomocou kombinácie elektrofyziologických, zobrazovacích, optogenetických a behaviorálnych techník.

Prínos z vykonaného projektu

Podrobná charakterizácia funkčnej architektúry mozgovej kôry umožní porozumieť transformácii molekulárnej patológie do kognitívnych zmien. Výsledky navrhnutých experimentov môžu viesť k presnej charakterizácii patogenézy neurodegeneratívnych ochorení a následnej identifikácii nových diagnostických postupov, príp. terapeutických cieľov.

V priebehu relatívne krátkej doby trvania pokusov (cca 1 rok) sa nám dosiaľ podarilo úspešne zaznamenať štruktúru mikroglií a aktivitu inhibičných interneurónov in-vivo u myší exprimujúcich skrátený proteín tau v kombinácii s červeným fluorescenčným proteínom. Takýto prístup nám umožňuje ďalej sledovať zmeny štruktúry a aktivity cieľových skupín buniek CNS v priebehu rozvoja Alzheimerovej choroby.

Behaviorálne štúdie vyžadujúce miernu vodnú depriváciu myší započali začiatkom roku 2018. Úspešne sa nám podarilo natrénovať experimentálnych zvieratá v tzv. 2AFC (two-alternative forced choice) senzorickom teste pomocou semi-automatického tréningového systému vyžadujúceho minimálny dohľad experimentátora. Aktuálne pokračujeme v tréningu experimentálnych zvierat, ktoré sú modelom pre Alzheimerovu chorobu.

Dosiaľ dosiahnuté výsledky—predovšetkým záznam neuronálnej aktivity in-vivo, pozorovanie morfológie mikroglií in-vivo a behaviorálne tréningovanie—potvrdzujú vedeckú validitu navrhnutých experimentálnych postupov pri posudzovaní vplyvu molekulárnej patológie na neuronálnu aktivitu a vyššie kognitívne funkcie.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V pokusoch používame bežné („wild-type“) a transgénne myši, ktoré exprimujú fluorescenčné proteíny vo vybraných cieľových skupinách buniek centrálnej nervovej sústavy.

Pôvodne schválený počet použitých zvierat na projekt/skutočné množstvo použitých zvierat:

myš laboratórna (transgénna samica)	300/70
myš laboratórna (transgénny samec)	300/70
myš laboratórna (C57Bl6 samica)	200/4 (behaviorálne testy)
myš laboratórna (C57Bl6 samec)	200/4 (behaviorálne testy)

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

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolest' žiadna. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia anestetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolest' slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Operačný zákrok	Štandardná metóda. Operácia vykonaná v celkovej inhalačnej anestézii. Bolest' žiadna, vzhľadom k tomu, že zviera sa počas operácie udržiava na chirurgickej hladine anestézie. Trvanie 20-60 minút. Bolest' slabá až stredná v priebehu zotavovania sa z operačného zákroku. Kontrolovaná analgetikami po dobu min. 5 dní. Zotavovanie sa zo zákroku je klasifikované ako stredná krutosť postupu.
Zaznamenávanie elektrofyziologickej aktivity neurónov in-vivo	Štandardná metóda. Zvieratá sú počas akútnych pokusov v celkovej inhalačnej anestézii. Bolest' žiadna. Trvanie 1-8 hod. denne. Chronické pokusy budú vykonávané štandardnými metódami určenými pre prácu s imobilizovanými hlodavcami. Bolest' žiadna až slabá. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a cca 20s imobilizáciou pri pripájaní aparatury. Trvanie 1-2 hod. Všetky zvieratá musia byť habituované na osobu experimentátora a experimentálnu aparaturu pre minimalizáciu stresu.
Behaviorálne tréningovanie a pokusy	Štandardná metóda. Krutosť stredná. Trvanie max. 1-2 hodiny denne. Behaviorálny tréning vyžaduje miernu vodnú depriváciu a tiež dôslednú habituáciu experimentálnych zvierat na aparaturu a experimentátora.
Zaznamenávanie neuronálnej aktivity počas behaviorálnych pokusov	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a cca 20s imobilizáciou pri pripájaní aparatury. Bolest' žiadna až slabá. Trvanie 1-2 hodiny. Všetky zvieratá musia byť habituované na osobu experimentátora a experimentálnu aparaturu pre minimalizáciu stresu.

Všetky operačné zákroky na experimentálnych zvieratách boli a sú vykonávané v celkovej izofluránovej inhalačnej anestézii. Všetky zobrazovacie experimenty boli vykonané na experimentálnych zvieratách v celkovej anestézii (taktiež izofluránová inhalačná anestézia). Všetky zvieratá boli neustále monitorované vyškolenými pracovníkmi počas zotavovania sa z operačného zákroku, ako aj v priebehu samotných experimentov. Operačné rany sa zahojili u všetkých pokusných zvierat už v priebehu 2-3 dní po operácii a zvieratá boli zároveň plne mobilné.

Osem experimentálnych zvierat (myši) bolo dosiaľ použitých v navrhovaných behaviorálnych experimentoch. Štyria samci a štyri samičky mali (a majú) v priebehu vodnej deprivácie zabezpečený prístup k tekutinám *každý deň*. V priebehu tréningu zvieratá neutrpeli žiadnu ujmu, čo sa odzrkadlilo aj na ich rýchlom naučení sa a „porozumení“ behaviorálnemu testu, ktorý vyžaduje zapojenie senzorických a vyšších kognitívnych funkcií (pamäť, rozhodovanie, pozornosť).

Predpokladaná úroveň krutosti:

Celková klasifikácia krutosti projektu bola určená ako *stredná* vzhľadom k navrhovanému tréningu na behaviorálne experimenty, ako aj pooperačnej starostlivosti a nasledujúcim testom v celkovej anestézii. Experimentálne zvieratá podrobené miernej vodnej deprivácii sú neustále monitorované vyškolenými pracovníkmi a majú prístup k vode v priebehu behaviorálneho tréningu a testovania (vo forme odmeny, t.j. pozitívneho podmieňovania), ako aj jedenkrát za 24 hodín ad libitum. Dôležitou súčasťou behaviorálnych experimentov je niekoľkodňová habituácia myši na experimentálnu aparatúru a osobu experimentátora.

Ostatné používané postupy, akými sú o.i. váženie zvierat, operačný zákrok v celkovej anestézii, injekčná aplikácia látok, behaviorálne testovanie a zaznamenávanie aktivity neurónov v anestézii a počas behaviorálnych pokusov, sú klasifikované ako *slabá* krutosť postupu. Všetky experimentálne zvieratá sú monitorované v priebehu operačného zákroku, ako aj počas zotavovania sa. Všetkým experimentálnym zvieratám sú po zákrokoch podávané antibiotiká (prevencia infekcie), analgetiká (potlačenie príp. bolesti) a dexametazón (prevencia edému mozgu).

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v ľudskom mozgu, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané zo živého mozgového tkaniva animálnych modelov poznatkami získanými z in-vitro experimentov. Detailný výskum mechanizmov spracovania a šírenia informácií v neurónoch a neurónových sieťach mozgu, predovšetkým s využitím moderných postupov elektrofyziológie, molekulárnej biológie a genetiky, ktoré vyžadujú priamu manipuláciu s aktivitou alebo genetickou výbavou neurónov, je tak možné uskutočňovať iba na pokusných zvieratách.

2. Redukcia počtu zvierat:

V navrhovaných experimentoch sa využívajú zvieratá z vlastného chovu tak, aby sa minimalizoval počet pokusných zvierat. Transgénne a bežné myši a potkany sú krížené v počtoch nevyhnutných pre získanie potrebného množstva údajov. Navrhované a použité počty zvierat sú nevyhnutné pre spoľahlivé štatistické vyhodnotenie výsledkov.

3. Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa striktne dodržiavajú interné ŠPP. So zvieratami sa zaobchádza humánne a nie sú vystavované stresovým podmienkam. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich ich fyziologickým a sociologickým potrebám. Všetky operačné zákroky sa vykonávajú v celkovej anestézii. Pooperačná starostlivosť o zvieratá zahŕňa podávanie analgetík, antibiotík, dexametazónu a kontinuálne monitorovanie zdravotného stavu zvierat vyškoleným personálom. Zobrazovacie experimenty sa vykonávajú tiež v celkovej anestézii.

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

Netechnické zhrnutie projektu – *Spitné posúdenie*

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

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

Kľúčové slová: oxid dusnatý, sociálna izolácia, prepulzná inhibícia

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu:

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

Prínosu projektu:

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

Počet a druh zvierat

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

Úroveň krutosti

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

2. Redukcia počtu zvierat:

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

3. Zjemnenie:

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

Príloha č. 2 4598/14-ZZ1A – Späitné posúdenie

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

Názov projektu: Testovanie látky 1-(9,9-Dibutyl-9H-fluoren-2yl)-2-methyl-2-morpholin-4-yl-propan-1-one (synonymum NPI-20400) pre regulačné účely: Opakovaná 28 dňová štúdia toxicity na potkanoch (OECD 407)

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

Kľúčové slová: potkan, opakovaná 28 dňová štúdia toxicity

Cieľ projektu: Cieľom projektu je poskytnúť podklady pre posúdenie bezpečnosti chemickej látky 1-(9,9-Dibutyl-9H-fluoren-2yl)-2-methyl-2-morpholin-4-yl-propan-1-one (NPI-20400) z hľadiska schopnosti vyvolať toxickú reakciu organizmu po opakovanom podaní. Prínosom tejto štúdie je včasné rozpoznanie toxicity skúšanej látky a zabránenie negatívnych vplyvov na organizmus. Štúdia bude použitá na stanovenie miery toxicity po opakovanej perorálnej aplikácii v rámci registrácie podľa legislatívy REACH.

Postup projektu:

Počet zvierat / skupiny:

Zvieratá boli rozdelené do štyroch skupín; jednej kontrolnej a troch dávkových (7 zvierat /skupina/ pohlavie). Ku kontrolnej a 3. dávkovej skupine boli zaradené satelitné skupiny, alebo tzv. zvieratá prežívajúce za účelom zistenia reverzibility účinku.

Klinické pozorovania

- Mortalita/Morbidita: dvakrát denne
- Klinické pozorovania – denne
- Detailné klinické hodnotenie – pred prvou dávkou a potom v týždňových intervaloch
- Telesná hmotnosť – 2 krát za týždeň
- Spotreba krmiva – týždenne

Po podaní testovanej látky boli zvieratá pozorované, sledovala sa možná reakcia zvierat na podávanú látku (zmeny správania, srst', oči, dýchanie, atď.). K žiadnej reakcii na podávanú látku nedošlo, zvieratá aplikáciu látky aj látku samotnú znášali dobre. Počas trvania štúdie sa nevyskytli zmeny v zdravotnom stave zvierat, neboli zaznamenané zmeny správania sa zvierat, zmeny na srsti, očiach, slizniciach ani zmeny v dýchaní. Nebolo teda nutné predčasne humanne utrátiť žiadne zviera. Nebol zaznamenaný žiadny úhyn počas trvania štúdie.

Funkčná pozorovacia batéria

Funkčná pozorovacia batéria pozostávala z nasledovných testov:

- Motorická aktivita
- Test sily stisku

Testy boli vykonané 2 dni pred ukončením podávania látky.

Vlastný pokus:

Dávkové skupiny zvierat dostávali testovanú látku v odstupňovaných koncentráciách. Kontrolná skupina dostávala rovnakým spôsobom vehikulum. Testovaná látka bola podávaná prostredníctvom sondy, objem tekutiny podanej naraz nepresiahol 1 ml/100 g telesnej hmotnosti zvieraťa. Zvieratám bola *per os* podávaná látka každý deň v rovnakom čase. Následné boli zvieratá sledované z dôvodu výskytu nožnej reakcie na podávanú látku. Počas pokusu sa nevyskytla žiadna reakcia na podávanú látku. Zvieratá ju znášali dobre. Dva krát do týždňa sa zvieratá odvážili. Raz do týždňa sa zaznamenávala spotreba krmiva. Voda sa zvieratám vymieňala každý druhý deň. Raz za týždeň sa zvieratám vymieňala podstielka. Na konci štúdie bola zvieratám odobratá krv na hematologickú a biochemickú analýzu. Následne boli zvieratá usmrtené predávkovaním anestetika kombinácia Ketamidol inj. ad us. vet. - účinná látka; Ketaminum (Ketaminum chloridum) s narkotickým účinkom / Xylazinum inj. ad us. vet. - účinná látka Xylazinum hydrochloridum. Táto kombinácia Ket/Xyl má vyhovujúci sedatívny, analgetický, myorelaxačný a anestetický účinok. Bola vykonaná podrobná pitva. Orgány boli fixované v 10% neutrálnom formalíne a odoslané na histologické spracovanie.

Hmotnosť zvierat a prístup k potrave:

Zvieratá boli vážené dva krát za týždeň. Krmivo a voda bola podávaná *ad libitum*. Krmivo (peletové krmivo) – štandardná laboratórna diéta. Voda z verejného vodovodu.

Ustajnenie:

Zvieratá boli ustajnené v typizovaných chovných klietkach pre potkany, 2-3 potkany rovnakého pohlavia v jednej klietke. Podstielka bola vymieňaná raz za týždeň. Teplota vo zverinci $22 \pm 2^\circ \text{C}$, vlhkosť vzduchu $55 \pm 10\%$. Svetelný režim 6-18h svetlo, 18-6h tma.

Odber biologického materiálu

V priebehu štúdie bol urobený odber krvi (na konci štúdie) na hematologické a biochemické vyšetrenie. Satelitným skupinám 14 dní po poslednom podaní testovanej látky.

Pri odbere krvi do 500 mikrolitrov sa používa metóda podľa Waynfortha HB nevyžadujúca žiadnu anestéziu či znecitlivenie potkana. Krv sa odoberie z *vena caudalis* (chvostovej žily) potom, čo sa zviera umiestni do plexisklového valca (štandardné fixačné zariadenie). Po nahriatí a zároveň umytí chvosta teplou vodou (40°C) sa koniec chvosta dezinfikuje a cca 5.0

mm od konca chvosta sa urobí strih ostrými nožničkami. Odber krvi sa riadi štandardnými pracovnými postupmi pracoviska.

Patológia

V priebehu trvania štúdie nebol zaznamenaný úhyn zvierat. Rovnako nebolo nutné pristúpiť k predčasnému humánnemu usmrteniu zvierat.

Všetky zvieratá preto boli pitvané na konci pokusu v súlade s plánom štúdie a metodikou OECD 407.

Satelitné skupiny boli utratené rovnakým spôsobom 14 dní po poslednom podaní testovanej látky. Pitva a spracovanie orgánov prebiehalo v súlade so štandardnými postupmi pracoviska

Druh použitých zvierat a ich predpokladaný počet:

Celkový počet zvierat v štúdií: 38 samcov + 38 samíc

Náhradné zvieratá: 1 samce + 1 samice

Kontrolná skupina: 7 samcov / 7 samíc + satelitná skupina 5 samcov / 5 samíc

1.dávková skupina: 7 samcov / 7 samíc

2.dávková skupina: 7 samcov / 7 samíc

3.dávková skupina: 7 samcov / 7 samíc + satelitná skupina 5 samcov / 5 samíc

Satelitné skupiny sa použijú na pozorovanie reverzibility, alebo oneskorených účinkov testovanej látky. V priebehu štúdie s nimi bolo nakladané ako s ostatnými zvieratami. Po ukončení aplikácie tieto zvieratá boli sledované 14 dní a následné boli podrobené, rovnako ako zvieratá v dávkových skupinách pitve.

Predpokladaný prínos projektu:

Prínosom tejto štúdie je včasné rozpoznanie toxicity testovanej látky a zabránenie negatívnych vplyvov na organizmus. Výsledky štúdie umožnia označovanie látky z hľadiska toxicity podľa GHS (Globally Harmonised System) v súlade s European Regulation No 1272/2008 on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures (CLP Regulation) za účelom ochrany zdravia a bezpečnosti a sú potrebné na registračné účely v súlade s predpismi REACH.

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

V rámci vykonania pokusu boli na zvieratách vykonané nasledovné postupy:

- **Invazívne postupy** - perorálna aplikácia testovanej látky patrí do kategórie „slabé“ krutosti postupov. (Podávanie testovanej látky cez sondu, v rámci limitov primeraných pre veľkosť a druh zvierťa.)
- **Invazívne postupy** - odbery biologického materiálu patria do kategórie „strednej“ krutosti postupov. Počet odberov bol minimalizovaný, nie sú robené na všetkých zvieratách. (Odber krvi z chvostovej vény.)

- **Invazívne postupy** – intraperitoneálna aplikácia anestetika za účelom usmrtenia zvieratá patrí do kategórie krutosti „slabá“. (Podávanie nadmernej dávky anestetika pri humánnom usmrtení).
- **Neinvazívne postupy** - váženie zvierat, patrí do kategórie krutosti „slabá“.
- **Možná systémová reakcia na podávanú látku** – nebola pozorovaná žiadna reakcia na podávanú látku, kategória krutosti „slabá“.
- **Prežívanie zvierat po 28dňovom podávaní testovanej látky (satelitné zvieratá)** – neboli pozorované žiadne zmeny zdravotného stavu zvierat ani reakcia na podávanú látku počas prežívania u satelitných zvierat, kategória krutosti „slabá“.
- **Neinvazívne postupy** – funkčný test: motorická aktivita, kategória krutosti „stredná“.
- **Neinvazívne postupy** – funkčný test: test sily stisku, kategória krutosti „stredná“.

Spomenutým invazívnym a neinvazívnym postupom sa pre úspešné splnenie cieľov navrhovanej štúdie nedalo vyhnúť, ale boli minimalizované na najnižšiu možnú mieru tak, aby zvieratá neutrpeli žiadnu zdravotnú, fyzickú ani psychickú ujmu.

Uplatnenie zásad 3R:

- **Refinement** – v pokuse neboli vykonané bolestivé zákroky, ktoré by vyžadovali použitie znecitlivejúcich látok. Nebola pozorovaná žiadna systémová reakcia na podávanú látku. Zvieratám po aplikácii testovanej látky bola venovaná zvýšená pozornosť. Po podaní látky zvieratá netrpeli, preto nebolo nutné pristupovať k humánnemu utrateniu, žiadne zo zvierat nevykazovalo skóre „*human end point*“, ktoré by indikovalo usmrtenie.
- **Reduction** – počty zvierat v pokuse boli primerané, redukované v maximálnej miere tak, aby nemohla ovplyvnená 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 (možná systémová reakcia na podávanú látku, prežívanie satelitných zvierat po 28dňovom podávaní látky) boli kategorizované ako „slabé až kruté“ postupy. Systémová a ani iná reakcia na podávanú látku sa u zvierat nevyskytla, preto po ukončení projektu možno kategorizovať systémovú reakciu na podávanú látku a prežívanie satelitných zvierat po 28dňovom podávaní látky ako postupy „slabé“.

Vzhľadom na výsledky, experiment je možno vyhodnotiť ako „stredne krutý“, keď stredne kruté boli hodnotené úkony ako odber krvi.

PRÍLOHA 2

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

Názov projektu: Charakterizácia nových 3D bunkových línií na úrovni in vitro a in vivo.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1297/18-221/3

Kľúčové slová: duktálny adenokarcinóm pankreasu, neuroendokrinný tumor, 3D bunkové línie, xenografty

Účel projektu: základný výskum

Ciele projektu: Cieľom štúdie bude overiť histologickú podobnosť pôvodného nádoru s nádorom indukovaným v atymických myšiach po transplantácii nových bunkových línií, izolovaných z ľudských nádorov. Takto overené 3D bunkové línie sa stanú unikátnym modelom pre výskum nádorov pankreasu.

Prínos z vykonaného projektu: Prínosom projektu budú vytvorené 3D nádorové línie, izolované z ľudských neuroendokrinných nádorov a duktálnych adenokarcinómov pankreasu. V súčasnej dobe je po podobných 3D modeloch veľký dopyt zo strany vedeckých inštitúcií a farmaceutických spoločností. Predkladateľ projektu má v tejto oblasti veľké skúsenosti a je tvorcom unikátnej 3D nádorovej línie, v súčasnosti testovanej v USA.

Druh použitých zvierat a ich predbežné počty: Atymická (tzv.nude) myš (Mus Musculus), samičky s hmotnosťou do 30 gramov, predpokladaný maximálny počet zvierat 12 jedincov/rok, počas trvania projektu (cca 5 rokov), celkový počet zvierat za obdobie trvania projektu max.60 jedincov

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu: Podľa našich doterajších skúseností a pozorovaní nemá transplantácia ľudských nádorových buniek formou podkožnej aplikácie do oblasti chrbta príp. stehien výrazne negatívny vplyv na pokusné zvieratá. Výnimočne sa môže objaviť začervenanie kože v mieste vpichu suspenzie buniek. Samotná aplikácia buniek je rýchla, niekedy takmer nepostrehnuteľná samotným zvierateľom. Zviera sa po aplikácii buniek pozoruje v pravidelných intervaloch (min.3x za týždeň). Po objavení sa rastúceho nádoru, ktorý je možné pozorovať ako pohyblivú hrčku pod kožou sa zviera nechá prežívať ešte niekoľko dní, maximálne však do času, keď nádor dosiahne približne 5-7 mm v priemere. Pri takejto veľkosti nádorov nehrozí ich prerastanie alebo diseminácia (metastázovanie) do vnútorných orgánov. Zviera sa humanne eutanázuje pomocou CO₂ a nádor sa vyextrahuje a zafixuje v 10% paraformaldehyde na histologické spracovanie. Nami vykonané behaviorálne pozorovania, realizované v zahraničí a zamerané na detekciu zmien v správaní, pohyblivosti, príjmu potravy, hravosti a interakcie s inými jedincami ukázali, že zviera využité na xenograftické štúdie, pri ktorých je indukovaný nádor veľmi malý, výrazným spôsobom netrpí. Riešiteľ projektu má viac ako 12 ročné skúsenosti s aplikáciou nádorových buniek (ľudských, myších a potkaních) do pokusných zvierat (atymický potkan a myš).

Predpokladaná úroveň krutosti: predpokladáme nízku prípadne strednú mieru krutosti, keďže pokus zastavíme v čase, keď je indukovaný nádor malý a riziko prerastania, či metastázovania do vnútorných orgánov je veľmi malé.

Klasifikácia krutosti jednotlivých experimentálnych postupov

Postup	krutosť
Váženie	slabá
Jednorázová podkožná aplikácia buniek	stredná
Palpačné vyšetrenie prítomnosti nádoru	slabá
Prežívanie zvierat s vytvoreným nádorom do veľkosti max. 7 mm.	stredná
celková klasifikácia	stredná

Slabé: Váženie zvierat a manipulácia za účelom palpácie novovytvorených nádorov spadá do tejto oblasti.

Stredné:

a)Jednorázová aplikácia (podkožná) suspenzie buniek (v rukách skúseného experimentátora ide o zákrok takmer nepostrehnuteľný samotným zvierat'om, ale nemožno úplne vylúčiť určitú mieru krutosti

b)Prežívanie zvierat s transplantovanými nádormi do max. veľkosti 7mm. Ako už bolo spomenuté, v minulosti sme nezaznamenali znaky nepriaznivého vplyvu tak malých nádorov na zvieratá , teoreticky ich však nemožno úplne vylúčiť ani pri takomto dizajne experimentu.

Bez možnosti zotavenia: Odber nádorov maximálnej veľkosti 7mm (a menšej) sa bude realizovať po humánnom usmrtení zvierat'a pomocou zvyšujúceho sa prietoku CO₂.

Pozn. Spoločný program využívania orgánov a tkanív v tomto prípade nie je, pretože to neumožňuje povaha experimentu (nedajú sa vylúčiť zmeny ostatných tkanív na rôznych úrovniach (fyziologickej, biochemickej) sekrečnými produktami transplantovaných nádorových buniek).

Human End Point skóre

V rámci riešenia projektu uvažujeme s metodikami so strednou mierou krutosti. Zvieratá budú po podstúpení takéhoto zákroku monitorované a o human end point bude rozhodnuté na základe skóre z údajov z tabuľky A.

Tabuľka A

Vzhľad	Normálny	0
	Absencia čistenia srsti	1
	Piloerekcia, chúlenie	2
príjem potravy a vody	Normálny	0
	Prijíma: telesná hmotnosť ↓ 10 %	1
	Neprijíma vodu andi potravu	2
prirodzené správanie	Normálne	0
	Menej pohyblivé a pozorné, izolované	1
	Vokalizácia, nepokojné, sebamrzačenie	2
provokované správanie	Normálne	0
	Zmeny v správaní	1
	Reaguje prudko, alebo naopak veľmi slabo	2
	SPOLU	0-8

Hodnotenie skóre:

0 - 2	norma
3 - 4	konzultácia s veterinárnym lekárom
5 a viac	eutanázia

Súlad s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

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

Nahradenie – Projekt izolácie nových nádorových bunkových línií, rastúcich v 3D podmienkach (3D kultivácie) je súčasťou celosvetovej iniciatívy v oblasti experimentálnej onkológie, ktorá si kladie za cieľ nahradiť rozšírené, ale nevyhovujúce 2D bunkové systémy novými, skutočnú *in vivo* situáciu lepšie modelujúcimi bunkovými systémami – 3D kultúrami. Nádorové bunky, rastúce v 3D podmienkach modelujú architektúru skutočného nádorového tkaniva a umožňujú lepšie skúmať skutočné podmienky prieniku testovaných látok do 3D mikronádorov. Predpokladá sa, že optimalizované 3D kultivačné systémy vyselektujú zdanlivo účinné testované látky už na začiatku a výrazne tým budú redukovať počet experimentálnych zvierat, nevyhnutných na overenie účinnosti liečiv, ktoré preukázali účinnosť na bunkách rastúcich v 2D podmienkach. Projekt tak – hoci nevyhnutne využíva malé množstvá experimentálnych zvierat - prispieje ku zníženiu počtu zvierat, použitých v budúcnosti pri testovaní nových kandidátnych látok.

V našom projekte plánujeme použiť len nevyhnutný počet zvierat na overenie histologickej podobnosti indukovaného nádoru a pôvodného nádoru. Toto je nevyhnutné na overenie možnosti, že izolovaný indukovaný nádor pochádza z jedného, veľmi agresívneho klonu

buniek, ktoré získali evolučnú výhodu pri *in vitro* kultivácii. Súčasné *in vitro* systémy neumožňujú v plnej miere nahradiť bioreaktorové vlastnosti organizmu pokusných zvierat pri indukcii nádorov.

Redukcia (zníženie) - na získanie experimentálnych výsledkov použijeme max.počet 12 jedincov za jeden rok riešenia projektu. Tento počet považujeme za dostatočný a zároveň maximálny, z hľadiska reprodukovateľnosti, ako aj získania nevyhnutných údajov. Menší počet zvierat môže spôsobiť výraznejšie pôsobenie interindividuálnych rozdielov medzi použitými jedincami.

Zjemnenie (Refinement) – V rámci nášho projektu časť experimentálnych údajov (napr. histologických dát) získame histologickým spracovaním 3D sféroidov (mikronádorov), rastúcich *in vitro*. Pri indukcii nádorov ukončíme experiment humánnym usmrtením zvierat'a v čase, keď veľkosť nádoru eliminuje riziko prerastania resp. diseminácie nádorových buniek do vnútorných orgánov. Použité experimentálne zvieratá budú mať chovné kliečky, obohatené o predmety, stimulujúce zvedavosť a hravosť zvierat.

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

Príloha č. 2 : 1841/18-221/3

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

Názov projektu:

Testovanie účinnosti, biokompatibility a biodegradácie antiadhezívneho filmu na modeli pooperačných zrástov u potkanov

Kľúčové slová v projekte: zvierací model adhézie, lauryol hyaluronanu

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

Cieľom projektu bude zistiť účinok, biokompatibilitu a biodegradáciu acylovaného derivátu hyaluronanu – lauroyl HA pri rôznom stupni substitúcie, hrúbky pre profylaktickú liečbu adhézie na štandardnom zvieracom modeli pooperačných zrástov potkanov. Efekt na antiadhéziu bude sledovaný a porovnávaný s prípravkom Seprafilm, ktorý je súčasťou profylaxe adhezie pri brušných operáciách.

Potkany sa podrobia operácii v celkovej i lokálnej anestézii. Pooperačný stav a doba pozorovania 14. resp. 28 dní sú optimálne pri eliminácii nepriaznivých vplyvov na zdravie zvierat denným podávaním analgetika.

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

Očakávaným prínosom projektu bude vývoj účinného zdravotníckeho prostriedku využiteľného v profylaxii vzniku adhezií u ľudí s poškodením vnútrobrušného tkaniva vplyvom operačných zásahov.

V projekte sa použije celkom 130 zvierat (dospelých laboratórnych potkanov, samcov, kmeňa Wistar). Experimentálnym jedincom pred usmrtením nebudú aplikované žiadne cudzorodé látky. Testované látky neprídu do kontaktu so živými zvieratami pred aplikáciou.

Experimentálny model u potkanov sa vyvolá operáciou. Po druhom, resp. štvrtom týždni sa budú sledovať symptómy adhezívnych zmien vplyvom rôznych foriem testovanej látky. Zvieratám bude počas celého experimentu (14, resp. 28 dní) podávané každý deň krmivo a pitná voda *ad libitum*.

Celkovo v postupe budú vykonávané práce na zvieratách pri strednej úrovni krutosti podľa klasifikácie krutosti postupov:

Váženie zvierat- slabá

Jednorázová aplikácia anestetika i.m. - slabá

Aplikácia analgetík, ATB i.m.- opakovane - stredná

Operačné zákroky sa vykonávajú v celkovej anestézii - stredná

Prežívanie zvierat po operácii - stredná

Pooperačný stav - stredná

Vyberanie stehov po zákroku vykonaný na zvieratách v anestézii - stredná

i.m aplikácia anestetík, s.c. aplikácia lokálneho anestetika, -slabá

individuálne umiestnenie po operácii a počas celého projektu za 14, resp. 28 dní
v priehľadných klietkach – stredná
Odber krvi z podchvostovej žily (1 kvapka) v čiastočnej anestézii - stredná.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

Animálny model adhézie sa štandardne používa pri sledovaní účinkov potenciálnych látok ovplyvňujúcich adhézie vnútrobrušného prostredia. V medzinárodných databázach (ECVAM, NC3R) sa zisťovali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatívna metóda testovania látok s antiadhezívnymi vlastnosťami prípravkov použiteľných v medicíne u živých organizmov. Potkan laboratórny je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre posúdenie účinkov zdravotníckeho produktu v mieste jeho podania.

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych potkanov tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť i validita postupu pre biochemické, hematologické, makroskopicko-morfologické, histologické analýzy, testovanie biodegradability, ako aj ich štatistické vyhodnotenie. Zvieratá budú samčieho pohlavia, rovnakého veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom. Z dôvodu šetrenia zvierat nebudú zaradené kontrolné zvieratá v 28-dňovom postupe, keďže výsledky budú známe zo 14 dňového sledovania a nie je potrebné ich zaraďovať do ďalšej štúdie.

Zásada zjemnenia (refinement)

Zvieratá budú po presune z chovného zariadenia v aklimatizácii. Po dobu 7 dní sa umiestnia po štyri v dostatočne veľkých vaniciach (rozmery 58x37x20cm) za stanoveného svetelného, tepelného a krmného režimu. Po operačnom zásahu sa ustajnia individuálne 14, resp. 28 dní, aby sa zamedzilo vytrhnutiu stehov, narušeniu hojaceho procesu i prijímania krmiva v prípade napádania slabších jedincov agresívnejšími. Na zabránenie vzniku pooperačných zápalových reakcií sa použije antibiotikové krytie počas prvých troch dní. Operačné zákroky budú vykonávané skúseným odborným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Potkany počas postupu prežijú výraznejší stres v operačnom a pooperačnom období, ktorý budeme minimalizovať podaním anestetík a analgetík. So zvieratami sa bude zaobchádzať šetrne a prostredie vanice sa obohatí predmetmi na hru a ohryzovanie. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu jedincov charakterizovaných v tabuľke human end points budú humánne usmrtené. Ošetrovatelia budú kontrolovať v prvých dvoch dňoch operované zvieratá 3-krát denne a v nasledujúcich dňoch 2-krát denne. O humánnom usmrtení bude rozhodovať veterinárny lekár na základe informácií od zodpovedných osôb za projekt. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokjej celkovej anestézii predávkovaním anestetík.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: **nie**

Názov projektu: Účinky kvercetínu na ischemicko-reperfúzne poškodenie srdca u potkanov s prítomnosťou komorbidít**a) Informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, počte a typoch zvierat.**

Cieľom štúdie je preskúmať potenciálny kardioprotektívny účinok prírodného polyfenolu kvercetínu voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu u potkanov s vybranými komorbiditami (hypertenzia, diabetes II. typu a hypertriglyceridémia), ktoré sme vybrali na základe ich klinickej relevantnosti približujúcej sa reálnemu výskytu ischemicko-reperfúzneho poškodenia u ľudí v kombinácii s najrozšírenejšími civilizačnými ochoreniami - komorbiditami.

Pre dosiahnutie stanovených cieľov budú vykonané dve paralelné štúdie pre každú komorbiditu (SHR/ZDF/HTG): akútna (akútne *ex vivo* podanie kvercetínu) a chronická (chronické *in vivo* podanie kvercetínu v dávke 20mg/kg/deň 6 týždňov, jedenkrát denne). Potkany z každej štúdie budú rozdelené do dvoch experimentálnych skupín: kontrolnej, a skupiny s aplikovaným kvercetínom. Každá skupina bude obsahovať 20 jedincov – 10 určených na meranie fyziologických parametrov srdca vystavených ischemicko-reperfúznemu infarktu s využitím metódy Langendorffovej perfúzie srdca, a 10 na odbery pre biochemické, morfológické a molekulárno-biologické analýzy. Zvieratá všetkých experimentálnych skupín budú humanne usmrtené uvedením do hlbkej anestézie intraperitoneálne podaným anestetikom Thiopentalom v dávke 50 mg/kg (spolu s heparínom i.p., 500 IU).

V priebehu kŕmenia a prebývania potkanov v chovnom prostredí nepredpokladáme žiadnu ujmu, či pôsobenie faktorov, ktoré by mohli potkanom spôsobovať stres. Počas všetkých úkonov spojených s manipuláciou s potkanmi, či s ich usmrcovaním sa bude eliminovať stres a utrpenie podaním celkovej anestézie. Z hľadiska užitočnosti predpokladaných výsledkov štúdie pre človeka prínos projektu výrazne prevyšuje ujmu u experimentálnych zvierat.

Očakávaným prínosom projektu bude odhalenie potenciálu kvercetínu pre prevenciu ischemicko-reperfúzneho poškodenia srdca u jedincov s prítomnosťou komorbidít. V rámci štúdie neočakávame zhoršenie zdravotného stavu potkanov po podaní kvercetínu ale naopak, jeho pozitívne účinky, a to nielen na očakávané zvýšenie tolerance voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu, ale aj v ďalších parametroch (napr. korekcia krvného tlaku). Sledovanie týchto parametrov však nie je hlavným cieľom tejto štúdie.

V projekte sa použije celkovo 480 potkanov (3 a 12 mesačné), s telesnou hmotnosťou zodpovedajúcou veku a kmeňu. Potkany budú odkúpené priamo od dodávateľa (vo veku 3 a 12 mesiacov) bez predošlých zásahov do ich života. Počet 480 jedincov postačuje pre stanovenie účinnosti kvercetínu voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu v kombinácii s hypertenziou, diabetom II. typu alebo hypertriglyceridémiou, a porovnanie jeho terapeutických vlastností s príslušnými kontrolami. Experimentálnym potkanom pred usmrtením nebudú aplikované žiadne cudzorodé látky. Testované substancie neprídu do kontaktu so živými zvieratami.

Zvolené experimentálne modely jednotlivých komorbidít u potkanov sú geneticky podmienené a ochorenia sa tak vyvíjajú v čase s pribúdajúcim vekom. Testovaná látka bude perorálne aplikovaná skupine potkanov s chronickým *in vivo* podávaním denne po dobu 6 týždňov jedenkrát denne pracovníkom s dlhodobou praxou.

Celkovo v postupe budú vykonávané práce na zvieratách pri nízkej úrovni krutosti podľa klasifikácie krutosti postupov. Váženie zvierat, meranie tlaku a aplikácia anestézie sa hodnotia ako slabo kruté.

a) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

Animálny model *ex vivo* ischemicko-reperfúzneho poškodenia pomocou Langendorffovej metódy perfúzie izolovaného srdca sa štandardne používa pri sledovaní účinkov potenciálnych kardioprotektívnych látok. V medzinárodných databázach (ECVAM, NC3R) sa zisťovali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatívna metóda testovania potenciálnych kardioprotektívnych látok voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu, ktorá by zistila účinky danej látky na funkciu srdca a rozsah infarktového ložiska, a zároveň by nezahŕňala využitie zvierat. Preto sa používa klasická metóda s využitím živých zvierat. Potkan laboratórny je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre posúdenie kardioprotektívnych účinkov testovanej látky.

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych zvierat tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť i validita postupu pre fyziologické, makroskopicko-morfologické a histologické analýzy, ako aj ich štatistické vyhodnotenie. Zvieratá budú samčieho pohlavia, a v rámci jednej experimentálnej skupiny rovnakého veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom. Desiat' zvierat v skupine je optimálny počet potrebný pre zistenie účinku testovanej látky, a preto nemôže byť redukovaný.

Zásada zjemnenia (refinement)

Zvieratá budú po presunutí z chovného zariadenia v aklimatizácii. Po dobu 5-15 dní budú umiestnené po 3-4 jedincoch v dostatočne veľkých klietkach (rozmery 60×70×45cm, plocha 4200 cm²) za stanoveného svetelného, tepelného a krmného režimu. Potkany počas postupu neprežijú výraznejší stres, so zvieratami sa bude zaobchádzať šetrne. Prostredie klietky sa obohatí predmetmi na hru a ohryzovanie. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu jedincov charakterizovaných v tabuľke human end points budú zvieratá humánne usmrtené. O humánnom usmrtení bude rozhodovať veterinárny lekár na základe informácií od zodpovedných osôb za projekt. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 2402/18-221/39

Testovanie biologickej aktivity a štrukturálnej integrity imunogénu v biologickom testovacom systéme

Podrobný účel postupu:

Alzheimerova choroba, rovnako ako veľa ďalších neurodegeneračných ochorení, sa spája s akumuláciou abnormálnej formy proteínov v centrálnej nervovej sústave, ktorá spôsobuje degeneráciu a následnú dysfunkciu neurónov. Podľa súčasných štatistík trpí Alzheimerovou chorobou 24 miliónov ľudí a každý rok sa toto číslo zväčší o 4,5 milióna nových prípadov. Podľa predpokladov počet pacientov do roku 2040 stúpne celosvetovo v priemere o 200 percent. Súčasné liečebné postupy spočívajú najmä v symptomatickej a podpornej terapii avšak terapia kauzálna zatiaľ neexistuje.

Projekt je pokračovaním predchádzajúceho projektu s rovnakým názvom. Jeho cieľom je testovať biologickú aktivitu a štrukturálnu integritu vakcíny určenej na klinické testy. Testovanie môže prebiehať len v biologickom testovacom systéme. Schopnosť produkovať imunitnú odpoveď je považovaná za jednu z najdôležitejších vlastností potrebných pre stanovenie stability imunogénu. Táto forma testovania je požadovaná regulačnými orgánmi EU (EU: Directive 75/318/EEC as amended, júl 1996; ICH: QUALITY OF BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS: STABILITY TESTING OF BIOTECHNOLOGICAL/BIOLOGICAL PRODUCTS (Q5C)). Imunogén je odvodený z proteínu tau, ktorý zohráva kľúčovú úlohu v patogenéze Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatií. Imunogén je netoxický a veľmi dobre ho experimentálne zvieratá zvládajú. Pri prezentácii projektu bol kladený dôraz na význam študovanej problematiky a dôležitosť použitia animálneho modelu (myš) pre získanie biologických vzoriek. Boli preštudované možné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili nahradiť zvieratá za bunkové systémy. Komplexnosť sledovaných molekulárnych procesov si však vyžaduje použiť cicavčí model. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Projekt prebehne v niekoľkých čiastkových experimentoch:

- 100 experimentov, po 11 ks v skupine. Celkom $100 \times 11 = 1100$ myší.

Celkom bude použitých 1100 myší C57BL/6NCrl (samice) vo veku približne 6 týždňov.

Po vstupnej karanténe a veterinárnom vyšetrení budú zvieratá priradené do príslušného experimentu.

- V deň 1, 8 a 15 sa každej myške v experimente aplikuje testovaný imunogén subkutánnou injekciou v dávke 300 μ l pro toto.
- V deň 22 sa zvieratám odoberie krv z retroorbitálneho plexu v objeme asi 100-150 μ l. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieratá neprekračuje stanovené normy.
- Myšky potom ostanú v experimente bez ďalšej terapie a krv sa podobným spôsobom odoberie ešte na konci mesiacov 3, 6, 9, 12 a 15.

Následne budú zvieratá z experimentu vyradené a humánne usmrtené v súlade so zákonom: anestézia a dislokácia krčných stavcov

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Testovanie schopnosti imunogénu navodiť imunitnú odpoveď je považované za štandardnú metódu testovania jeho biologickej aktivity. Vzhľadom na skutočnosť, že v súčasnosti nie je dovolené tieto

metódy skúmať na ľudských pacientoch, a na fakt, že daný experiment sa v súčasnosti nedá vykonať v podmienkach in vitro, je použitie animálnych modelov nevyhnutné.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolest' slabá. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia (3x v intervaloch 7 dní)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolest' stredná. Trvanie 1 minútu.
Stav zvierat po aplikácii	Zvieratá môžu byť mierne stresované v dôsledku aplikácie subkutánnej injekcie. Z doterajších skúseností počas experimentu zvieratá na podanie imunogénu reagovali dobre, neboli zaznamenané nepriaznivé vplyvy na zvieratá. Bolest' slabá.
Odber krvi (retroorbitálny plexus)	Štandardná metóda. Pred odberom sa zviera vloží na pár minút do indukčnej komory s isofluranovou anestéziou. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. V okamihu ako je zviera sedované sa sklenená kapilára jemne zasunie pod očnú guľu a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolest' stredná. Trvanie 1 minútu.
Stav zvierat počas obdobia prežívania	Nepredpokladáme nepriaznivé účinky, zvieratá reagujú na podanie imunogénu dobre. Odber z očného splavu sa vykonáva v sedácii a opakuje sa až v 3 mesačných intervaloch, čo by mala byť dostatočne dlhá doba na regeneráciu a zotavenie zvierat. Bolest' slabá až stredná.
Usmrtenie v anestéze dislokáciou krčných stavcov	Štandardná metóda. Zviera sa vloží do indukčného boxu s isofluranovou anestézou, po vybratí sa ihneď vykoná cervikálna dislokácia. Bolest' slabá. Trvanie 30 sekúnd

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie:

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

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

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov. V projekte bude testovaných viacero šarží vakcíny (min 12) v rôznych časových intervaloch od jej výroby.

Nahradenie:

Súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje sledovať biologickú účinnosť peptidového imunogénu v in vitro podmienkach. Pri imunizácii sa sleduje celkový titer protilátok, typ imunitnej odpovede, ako aj špecifickosť protilátok, ktoré vznikli po imunizácii. Z legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať na ľudských pacientoch.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

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

Utrpenie versus prínos

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

Príčina Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatií zostáva neznáma. Dôsledkom tohto stavu je absencia účinnej liečby. Imunologické postupy vo výskume Alzheimerovej choroby priniesli už niekoľko prevratných objavov, napr. identifikácia proteínu tau a beta amyloidu – dvoch kľúčových molekúl zodpovedných za patologické zmeny viazané na ochorenie. Imunizácia zvierat vedie k produkcii špecifických protilátok, ktoré sú dôležité na mapovanie chorobných zmien tau proteínu. Keďže tau proteín je prirodzene neusporiadaný proteín, ktorý nemá stabilnú štruktúru, neexistuje iná možnosť ako mapovať patologické zmeny tau proteínu, ako používať špecifické protilátky, ktoré vznikajú po imunizácii.

Predpokladaný prínos:

Testovanie biologickej aktivity vakcíny a jej životnosti

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.10.2018 a bude sa realizovať do 31.12.2020.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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