

**Názov projektu:** Hodnotenie antineoplastických účinkov rastlinných funkčných potravín v mamárnej karcinogéze

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 2548/18-221/3

**Kľúčové slová v projekte ( max 5 slov):** rakovina prsníka, laboratórny potkan, chemoprevenencia, rastlinné funkčné potraviny

**Účel projektu:** Základný výskum

**Opísať ciele projektu:** Cieľom projektu je hľadanie tzv. **superpotravín** s pleiotrofnými blahodárnymi účinkami na ľudský organizmus využiteľné v dlhodobej chemoprevencii rakoviny (ale aj iných civilizačných ochorení) a ktoré môžu zohrávať podstatnú úlohu v zlepšovaní celkového zdravotného stavu svetovej populácie. Plánované sú *in vivo* štúdie, v ktorých budeme analyzovať antineoplastický účinok prirodzených substancií v modeli rakoviny prsníka u samíc potkanov. Postupy budú tvoriť dlhodobé štúdie s chemicky indukovanou mamárnou karcinogézou u samíc potkanov. Postupne vyhodnotíme chemopreventívnu/tumorsupresívnu efektivitu šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*), vanilky pravej (*Vanilla planifolia*), sumak (*Rhus coriaria*), či otruby ciroku (*Sorghum bicolor*). Budeme analyzovať mechanizmus protinádorového pôsobenia týchto potravín v karcinogéze. Vyhodnotíme celkové vedľajšie účinky látok na organizmus zvierat pri dlhodobej aplikácii potravín v diéte, stanovíme parametre lipidového a sacharidového metabolizmu. Prínosné bude porovnanie *in vivo* a *in vitro* účinkov fytosubstancií. Pôjde o originálne výsledky, ktoré môžu priniesť veľmi dôležité poznatky do klinického výskumu s možnou transláciou do klinickej praxe.

**Prínos z vykonaného projektu:** Na základe protinádorových vlastností môžu fytochemikálie v prirodzených substanciách priniesť pre klinickú onkológiu nové terapeutické prístupy v či už v chemoprevencii alebo v liečbe nádorového ochorenia. Na našom pracovisku sa problematikou experimentálnej mamárnej karcinogézy zaoberáme vyše 20 rokov, pričom analýze protinádorového účinku fytofarmák/fytosubstancií sa venujeme posledných 7 rokov.

Výhody diéty bohatej na rastlinné zložky spočívajú v komplexnom pôsobení veľmi širokého spektra fytochemikálií. Práve aditívne a synergické pôsobenie fytochemikálií zodpovedá za ich antioxidantné a protinádorové účinky. Táto skutočnosť vysvetľuje fakt, prečo samostatne aplikovaný antioxidant nemôže nahradiť kombinované pôsobenie desiatok rôznych fytochemikálií prítomných v rastlinných produktoch a nemôže dosiahnuť s nimi porovnateľné účinky na zdravie človeka (Liu, 2013). Cieľovou skupinou pre dlhodobú konzumáciu tzv. superpotravín budú nielen vysokorizikovní jedinci pre rakovinu prsníka ale aj široké

populácia vzhľadom na výrazný vzostup incidencie civilizačných ochorení vrátane rakoviny. Treba pripomenúť aj ďalší prínos aj pre zvieratá, ktorým možno pripravovať potravinové doplnky aditívované práve superpotravinami, čím možno prispieť k zlepšeniu ich zdraviu a úžitkovej hodnoty.

V experimentálnej rakovine prsníka *in vivo* a *in vitro* doteraz neboli hodnotené antineoplastické účinky ani jednej z prirodzených substancií, ktoré plánujeme testovať. **Šalvia** sa vyznačuje vysokým zastúpením hlavne flavonoidov, zvlášť alfa-tujon, kamfor, borneol, gamma-murolen (Russo et al., 2013). Sekundárne metabolity fenolického charakteru (vanilín, kyselina vanilová, vanilyl alkohol, kumarová a ferulová kyselina) prítomné u **vanilky pravej** (*Vanilla planifolia*) môžu mať potenciálne významný antioxidačný a protinádorový účinok (Sinha et al., 2007; Naz et al., 2018). Na hodnotné fytochemikálie (viac ako 180 fytochemikálií, napr. taníny, izoflavonoidy, terpenoidy) s protinádorovým účinkom *in vitro* (Abu-Reidah et al., El Hasasna et al., 2016) je bohatý aj **sumak** (*Rhus coriaria*). Ďalším perspektívnym zdrojom protinádorových látok predstavujú otruby **ciroku** (*Sorghum bicolor*). Terapeuticky účinné látky v otrubách ciroku tvoria fenolické látky, zvlášť 3-deoxyantokyaniidíny a taníny (de Moraes Cardoso et al., 2017). Smolensky et al. (2018) v štúdií *in vitro* poukázali na protinádorovú aktivitu ciroku u viacerých nádorových línii (oxidačný stres, apoptóza, inhibícia bunkového cyklu).

### Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V projekte použijeme panenské samice laboratórnych potkanov špecifického kmeňa Sprague-Dawley v celkovom počte 300 kusov (uskutočníme 4 experimenty, pričom v každom použijeme max. 75 zvierat).

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

Predpokladaná ujma u zvierat je vyvolanie mamárnej karcinogenézy, s tým súvisiace zhoršovanie zdravotného stavu a bolesť. Za účelom sledovania zdravotného stavu, vedecký pracovník spolu s pracovníkom Centrálného zverinca uskutočňujú každodenné kontroly zdravotného stavu zvierat (viď nižšie uvedené parametre v časti 3R zjemňovanie). Kontrola zdravotného stavu sa uskutočňuje každé ráno. Pri výskyte závažne zhoršeného zdravotného stavu budú choré zvieratá po dohode s veterinárnym lekárom vyradené z postupu a humánne usmrtené.

Čo sa týka porovnania ujmy zvierat oproti prínosu pre spoločnosť je potrebné zdôrazniť, že riešením tohto projektu získame prvotné experimentálne výsledky, ktoré môžu byť veľmi prínosné pre klinickú prax. Hľadanie tzv. superpotravín, ktoré sú lacné a ľahko dostupné širokej populácii a vykazujú výraznú chemopreventívnu aktivitu voči rakovine je pre spoločnosť veľmi dôležité. Je potrebné uviesť, že dokazovanie chemopreventívnych účinkov funkčných potravín je v klinickom výskume realizovanom u ľudí je omnoho náročnejšie (nielen finančne). Žiaden takýto klinický výskum nedokáže nájsť ideálne experimentálne skupiny pacientov alebo vysokorizikových jedincov. Jedinci sa v rámci jednej skupiny sa líšia

vekom, genetikou, životným štýlom, prežívaným stresom, chorobami, ktoré prekonali, atď. čo značne sťažuje validitu získaných výsledkov. Efekt určitej látky sa najlepšie prejaví vtedy, ak sú jedinci v skupine dobre definovaní/uniformní, čo spĺňajú experimenty s laboratórnymi zvieratami (identické: vek, karcinogén, doba aplikácie, životné podmienky, strava, dĺžka deň/noc atď). Z tohto pohľadu sú experimenty na laboratórnych zvieratách nespochybniteľne mimoriadne prínosné pre spoločnosť a nenahraditeľné. Vďaka laboratórnym zvieratám môžeme dokazovať účinky, ktoré sú u ľudí veľmi ťažko pozorovateľné, ale vďaka zvieratám možno s vysokou pravdepodobnosťou tento účinok očakávať aj u ľudí.

**Predpokladaná úroveň krutosti:** max. stredná

jednotlivé postupy:

aplikácia karcinogénu – slabá krutosť

váženie – slabá krutosť

palpácia – slabá krutosť

meranie nádoru posuvným meradlom – slabá krutosť

prežívanie zvierat posledných 4-5 týždňov experimentu – stredná krutosť

## Uplatňovanie zásad 3R

### 1. Nahradenie zvierat:

Najpoužívanejším **laboratórnym modelovým zvieratom** sú hlodavce, pretože majú mnohé jedinečné vlastnosti, ktoré ich predurčujú k získavaniu a hodnoteniu všeobecných princípov experimentálnej onkológie. Potkan je najnižším druhom živočíchov, ktorý vyhovuje danému typu experimentov, t.j. nie je nahraditeľný iným druhom. Hlavnou výhodou použitia potkanov je to, že ich nádory mliečnej žľazy sa veľmi podobajú ľudským, tak v etiológii ako aj v patológii (Medina et al., 1982). Veľmi dôležitým kritériom v experimentálnej onkológii na definovanie terapeutických možností alebo karcinogénnej aktivity farmaka je spontánny výskyt tumorov. Vďaka spontánnemu vzniku nádorov pri dlhodobých štúdiách sú potkany vhodným modelom pre imitáciu situácie u ľudí (Anderson, 1992). Napriek skutočnosti, že pri analýze niektorých genetických zmien sú myši neoceniteľným zvieratom, ich nevýhodou v porovnaní s potkanom sú ich slabšie možnosti v reprodukovateľnosti molekulárnych procesov iniciácie a promócie nádoru. Myš je nevhodná pre štúdium chemoprevencie pre vírusový pôvod väčšiny nádorov. Alternatívna metóda bez použitia zvierat nie je možná, bez hodnotenia efektu látky v celom organizme nie je možné získať hodnoverné výsledky. In vitro štúdie slúžia iba na analýzu mechanizmu účinku, celkový efekt testovanej látky sa v nich nedá vyhodnotiť.

### 2. Redukcia počtu zvierat:

V každom experimente používame **minimálny počet zvierat** (n=75; 3 experimentálne skupiny po 25 zvierat), ktorý je potrebný na získanie signifikantných výsledkov po štatistickom hodnotení a ktorý je ešte akceptovateľný vedeckou komunitou (zachovanie validity a reprodukovateľnosti experimentu).

Kľúčový parameter mamárnej karcinogenézy u laboratórnych potkanov – frekvencia nádorov na zviera, vykazuje u tohto typu experimentu vysokú variabilitu dát. V hodnotenej skupine (napr. neliečenej) sa v závere experimentu (pri pitve) vyskytujú zvieratá bez nádoru, ale zvieratá s 10-timi malými nádormi. Z tohto vyplýva vysoká stredná chyba priemeru s čím súvisí ťažšia dosiahnuteľnosť signifikantného rozdielu medzi porovnávanými skupinami. Pri nižšom počte hodnotených zvierat v skupine (napr.  $n=18$ ) aj relatívne vysoký rozdiel ukazovateľa medzi hodnotenými skupinami (napr. 50%-ný rozdiel vo frekvencii nádorov) neprináša signifikantný rozdiel. Problémom je potom uznanie takéhoto vedeckého výsledku vedeckou komunitou. Vyšší počet zvierat v skupine tento problém štatisticky významne rieši – tu vychádzam z mojich vyše 20 ročných skúseností s týmto modelom.

### 3. Zjemnenie:

Laboratórny potkan je jediným druhom zvieratá, ktorý sa využíva v experimentálnej mamárnej karcinogenéze. Použitie zvierat v experimente umožní vytvoriť uniformné skupiny jedincov, čo má podstatný význam pre získanie hodnoverných výsledkov. Počas experimentu vytvoríme zvieratám optimálne životné podmienky (vrátane hračiek), odstránime pre nich stresujúce momenty a vhodným správaním veľmi skúseného personálu im zabezpečíme celkovú pohodu. Čo sa týka zásady **zjemňovania postupu**, charakter postupu nevyžaduje použitie anestézy ani analgetík, iba v prípadoch veľkej bolesti. Počas celého priebehu postupu nebudú zvieratá vystavené bolestivým postupom. Zvieratám vyvolávame karcinóm mliečnej žľazy, pričom špecifickým prípadom, ktorý poukazuje na bolesť zvierat je nekrotický/otvorený nádor. Ďalším (aj keď veľmi zriedkavým) fenoménom je veľký nádor, ktorý bráni v pohybe. Taktiež zmeny vzhľadu (hlavne farba srsti a piloerekcia), zmena správania (izolovanosť, imobilita a depresia) a úbytok hmotnosti sú najčastejšie znaky zhoršenia zdravotného stavu a bolesti u potkanov. Zvieratám trpiacim bolesťou, (welfare skóre pod 15) bude podávané analgetikum Carprofen v dávke 5 mg/kg/deň. Aplikácia analgetika bude realizovaná v samostatnej kletke najšetrnejším a najefektívnejším spôsobom (t.j. kontinuálne) v pitnej vode. V prípade vysokého welfare skóre (15-20) nasleduje za každých okolností usmrtenie.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

## Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 2404/18-221/3 zo dňa 4.9.2018

### **Imunoterapia Alzheimerovej choroby: analýza mechanizmu účinku**

**Kľúčové slová v projekte ( max 5 slov):** Alzheimerova choroba, imunoterapia, gliové a neuronálne bunky

**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

### ***Podrobný účel postupu:***

V populácii stúpa každý rok počet pacientov s Alzheimerovou chorobou. Súčasná terapia je zameraná na symptomatické potlačenie ochorenia a podporné mechanizmy, ale nerieši kauzálny prístup. Aj preto sa v súčasnosti hľadajú nové prístupy a spôsoby terapie, ktoré by vedeli ovplyvniť molekulárne mechanizmy zodpovedné za prepuknutie a progres ochorenia. Jedným z možných terapeutických prístupov je pasívna a aktívna imunoterapia Alzheimerovej choroby. Pri vývoji vakcín je dôležité poznať mechanizmus účinku imunoterapie.

Predložený projekt má za úlohu štúdium mechanizmu účinku pasívnej vakcíny (terapeutickej protilátky). Mechanizmus účinku budeme analyzovať v podmienkach *in vitro* na primárnych bunkových kultúrach. Na experimenty budeme používať primárne neuronálne bunkové kultúry izolované z 18-dňových plodov a primárne gliové bunkové kultúry izolované z 1-dňových mláďat myši.

V ďalšej časti projektu budeme analyzovať vplyv neurodegenerácie a stárnutia organizmu na aktivitu mikroglií a jej potenciálny dopad na účinnosť imunoterapie. Na experimenty budeme používať mikrogliové kultúry izolované z transgénnych a kontrolných zvierat rôzneho veku.

### ***Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse***

Preštudovali sme všetky dostupné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili v danom experimente nahradiť zvieratá za iný biologický testovací systém. Primárne neuronálne a gliové bunkové kultúry izolované zo zvierat sú nenahradiateľným systémom na modelovanie reálnych procesov prebiehajúcich v mozgu. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

### ***Druhy a počty použitých zvierat:***

Na prípravu bunkových kultúr z embryonálnych jedincov celkovo použijeme:

- 400 gravidných myší – C57BL/6NCrl, 100 samíc sa usmrtí v 18. dni gravidity a odoberú sa plody, 300 samíc sa nechá porodiť a odoberú sa 1- dňové mláďatá

Na bunkové kultúry z dospelých jedincov použijeme:

- 2-mes. transgénne myši R3m4- 50 zvierat
- 6-mes. transgénne myši R3m4 -50 zvierat
- 6-mes.kontrolné myši C57BL/6NCrl- 50 zvierat

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

Odber plodov sa bude vykonávať v celkovej anestézii, po ktorej sa zviera už neprebudí, taktiež sa dislokujú cervikálne stavce, aby sme sa utvrdili, že zviera je usmrtené – bez možnosti zotavenia.

1-dňové mláďatá sa ihneď po odobratí od samičky usmrtia dekapitáciou – stredná krutosť. Samička sa ihneď usmrtí cervikálnou dislokáciou.

Dospelé jedince budú usmrtené cervikálnou dislokáciou. Anestézu nemožno použiť z dôvodu ovplyvnenia prežívateľnosti kultúr – stredná krutosť.

***Manipulácia so zvieratami:***

| Charakteristika postupu    | Vplyv na zviera                                                                                                           | Krutosť                |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Odber plodov z maternice   | Gravidná samica (18 deň gravidity) sa uvedie do hlbokkej anestézie, otvorí sa brušná dutina a z maternice sa vyberú plody | Bez možnosti zotavenia |
| Odobratie 1 dňových mláďat | Matka pri odbere mláďat bude ihneď usmrtená, aby sme minimalizovali jej utrpenie                                          | slabá                  |
| 1-dňové mláďatá            | Mláďatá ihneď po odobratí od samičky budú usmrtené dekapitáciou.                                                          | stredná                |
| Dospelé jedince            | Dospelé jedince budú usmrtené cervikálnou dislokáciou                                                                     | stredná                |

**Zohľadnenie 3R**

**Nahradenie:**

Primárne neuronálne a gliové bunkové kultúry izolované zo zvierat sú nenahraditeľným systémom na modelovanie reálnych procesov prebiehajúcich v mozgu. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

**Zjemnenie:**

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné predpisy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Starostlivosť zabezpečuje jedna osoba, na ktorú si zvieratá zvykli. Zvieratá sú chované v počte 5 zvierat na chovnú nádobu, aby sme zabezpečili sociálne interakcie medzi zvieratami. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich ich fyziologickým a sociologickým potrebám. V rámci nášho zverinca je denne kontrolovaný a monitorovaný zdravotný stav a pohoda zvierat. Pri prejavoch zmien zdravotného stavu, veterinárny lekár upovedomí vedúceho experimentu o prípadnej potrebe vyradiť zviera z experimentu a pristúpiť k humánnemu usmrteniu zvieraťa.

**Redukcia:**

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov. Stanovený počet zvierat sa opiera o naše predchádzajúce experimenty. Jeden z faktorov, ktorý ovplyvňuje nami stanovený počet zvierat je

relatívne nízka výťažnosť mikrogliových a neuronálnych buniek z mozgového tkaniva. Z dôvodu rôznej metodiky izolácie mikrogliu a neurónov, nie je možné použiť to isté tkanivo na izolovanie aj neurónov aj mikrogliu. Z hľadiska redukovania počtu použitých zvierat v projekte, používame na pripúšťanie samičky, ktoré boli použité v chove.

### **Utrpenie versus prínos**

Po zlyhaní imunoterapie namierenej proti beta-amyloidu v Alzheimerovej chorobe sa dostáva do popredia imunoterapia namierená proti ďalšiemu kľúčovému znaku ochorenia – patologicky zmenenému tau proteínu. Tau imunoterapia v súčasnosti zaznamenáva obrovský rozkvet, avšak presný mechanizmus účinku optimálnej terapeutickú vakcíny nie je objasnený.

Cieľom projektu je prispieť k odhaleniu terapeutického mechanizmu anti-tau protilátky a popísať túto dráhu na bunkovej úrovni.

Analýza týchto mechanizmov nie je možná na immortalizovaných bunkových líniiach, vzhľadom na ich zmenený fenotyp oproti bunkám v skutočnom mozgovom tkanive, preto budeme na štúdium používať bunkové línie (neurónové a mikrogliové) izolované z laboratórnych zvierat.

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené neprimeranému utrpeniu.

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

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.10.2018 a bude sa realizovať v priebehu nasledovných dvoch rokov, do 31.12.2020.

9

## PRÍLOHA č. 2

Netechnické zhrnutie projektu  
k Žiadosti o schválenie projektu „Mechanizmy komunikácie a adaptácie preimplantačného  
embrya v narušenom prostredí“ (VEGA 2/0092/19).  
(podľa § 40 nariadenia č. 377/2012 Z. z.)

**Názov projektu:** Mechanizmy komunikácie a adaptácie preimplantačného embrya v  
narušenom prostredí“ (VEGA 2/0092/19).

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 2424/18-221/3

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** preimplantačné embryo, receptory, adaptácia

**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 projektu je študovať mechanizmy komunikácie skorého cicavčieho embrya s  
okolitým prostredím a reakcie umožňujúce adaptáciu embrya k zmenám v jeho prostredí.  
Skúmaná bude expresia špecifických typov bunkových receptorov, s dôrazom na receptory  
viažuce nízkomolekulové ligandy u preimplantačných embryí. Skúmaný bude účinok  
aktivácie týchto receptorov na skorý embryonálny vývin, najmä na prežívanie buniek a  
apoptózu. Študované budú aj doposiaľ neobjasnené mechanizmy eliminácie mŕtvych buniek v  
preimplantačnom embryu. Analyzovaný bude vplyv narušeného materského prostredia  
(zvýšený obsah telesného tuku, materský stres) na prenos signálu cez identifikované  
receptory.

### Prínos z vykonaného projektu:

Poruchy v preimplantačnom vývinovom období môžu mať dohodobé následky,  
vrátane neúspešnej gravidity, alebo zhoršeného zdravia potomstva, takže výsledky projektu  
môžu byť významným príspevkom k poznaniu okolností zvyšujúcich riziko prenatálnych  
strát, zhoršeného zdravia potomstva následkom ovplyvnenia skorej embryogenézy a môžu  
byť užitočné aj pri zlepšovaní techník asistovanej reprodukcie.

### Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch bude použitá laboratórna myš, pričom bude použitých približne 2295  
jedincov.

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

Vo väčšine experimentov projektu budú samičky myši použité výlučne ako darkyne oocytov a preimplantačných embryí (ktoré budú izolované post mortem), pričom okrem hormonálnej stimulácie (superovulácie) nebudú žiadnym spôsobom ovplyvnené. V niektorých experimentoch bude pomocou neinvazívnych metód meraný obsah telesného tuku (pomocou EchoMRI) a krvný tlak (manžetovou metódou na chvostovej artérii), pričom myši budú dočasne obmedzené na pohybe uzavretím v meracej komôrke. V niektorých experimentoch projektu bude použitý model stresu vyvolaného núteným obmedzením pohybu („restraint stress“), pričom technika s umiestnením zvieratá v imobilizačnom boxe, ktorá bude použitá v predloženom projekte, je šetrnejšia ako alternatívne používané techniky.

### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

Všetky postupy navrhujeme klasifikovať do kategórie krutosti „slabé“, alebo „stredné“. Zvieratá by v ich dôsledku nemali pociťovať nadmernú bolesť, utrpenie alebo strach.

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

**1. Nahradenie zvierat:** Plánované experimenty nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom bez použitia živých zvierat. Databázy medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód ECVAM, NC3Rs a AnimAlt-ZEBET neobsahujú takéto alternatívne metódy. Doterajšie poznatky o problematike neumožňujú vytvorenie adekvátneho modelu in silico, ktorý by dokázal predvídať expresiu konkrétnych receptorových komplexov, alebo simulovať zložitý vzťah medzi fyziologickým stavom matky, prenosom signálu cez skúmané receptory a vplyvom aktivácie týchto receptorov na preimplantačný vývin. Väčšina plánovaných postupov je založená na prístupe, v ktorom laboratórne zvieratá slúžia výhradne ako donor materiálu, čím sa minimalizuje ich diskomfort. Hoci sú výstupy postupov zamerané na prevenciu zdravia domácich zvierat a človeka, ako modelové zvieratá boli do pokusov vybrané nižšie stavovce s podobnou fyziológiou reprodukčného procesu v preimplantačnom období vývinu.

**2. Redukcia počtu zvierat:** Plánované experimenty sú zostavené tak, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov použitých čo najmenej zvierat a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého použitého pokusného zvieratá. Postupy budú vykonávať iba dostatočne vyškolené a zacvičené osoby, čím sa významne zníži možná chybovosť výsledkov a nutnosť opakovania postupu. Pre výcvik technických zručností budú použité neoplodnené myši vyradené z reprodukčného cyklu. Počet použitých zvierat bol stanovený tak, aby bola zachovaná reprodukovateľnosť a validita pokusov. Usmrčovanie zvierat s následným zberom biologického materiálu je v postupe nastavené tak, aby mohlo byť vo vzorkách vyšetrených paralelne toľko parametrov, koľko bude technicky možné. Získavanie biologického materiálu sa ukončí v okamihu, kedy bude zabezpečená adekvátna kvantita vzoriek poskytujúca interpretovateľné a štatisticky preukazné výsledky.

**3. Zjemnenie:** Plánované experimenty sú zostavené tak, aby bola minimalizovaná bolesť alebo stres použitých pokusných zvierat a aby bol zabezpečený primeraný welfare od ich narodenia až po smrť. Pri voľbe reprodukčného cyklu samíc bude v prípadoch, kde to experimentálny dizajn umožňuje, uprednostnená spontánna ovulácia pre hormonálnou synchronizáciu. V experimentoch v ktorých bude skúmaný vplyv materského stresu bude použitý model imobilizačného stresu, ktorý je k zvieratám šetrnejší ako alternatívne techniky

(napríklad technika s fixáciou labiek zvieratá o podložku, alebo dlhodobý pobyt zvieratá v imobilizačnom boxe). Pri analýze fyziologických parametrov budú, tam kde je to možné, uprednostnené neinvazívne techniky (napríklad meranie telesného tuku pomocou EchoMRI). Zvieratá budú chované za štandardných podmienok a ich usmrtenie bude vykonávané humánnym spôsobom spôsobilými osobami.

**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**

k Žiadosti o schválenie projekt

„Kontrola integrity DNA v preimplantačnom embryu“ (VEGA 2/0072/19)

(podľa § 40 nariadenia č. 377/2012 Z. z.)

**Názov projektu:** Kontrola integrity DNA v preimplantačnom embryu

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 2731/18-221/3

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** bunkový cyklus, preimplantačné embryo, poškodenie DNA, reparácia DNA

**Účel projektu:** Základný výskum

### **Ciele projektu:**

Cieľom projektu je získanie komplexnejšej predstavy o efektívite reparačných mechanizmov DNA poškodenia počas vývoja raného embrya. Obsahovým zámerom projektu je poskytnúť nové poznatky s vysokou pridanou vedeckou hodnotou k pochopeniu súvislostí medzi aktivitou bunkových mechanizmov kontrolujúcich integritu DNA a možnými zmenami fenotypu v embryonálnych bunkách počas preimplantačného vývoja cicavčieho embrya. Východiskovým zámerom projektu je detekcia aktivity relevantných senzorických a efektorových proteínov zúčastňujúcich sa reparácie poškodenej DNA v embryonálnej bunke. Následne bude študovaná celková efektivita reparačných procesov po poškodení molekuly DNA v rôznych štádiách embryogenézy a tiež v súvislosti s vyšším vekom samíc. Aj napriek extenzívnemu výskumu v tejto oblasti na somatických bunkách tento predložený projekt predstavuje špecifický experimentálny prístup, pretože ako experimentálny model je zvolená embryonálna bunka raného cicavčieho embrya. Očakávané základné poznatky o fungovaní reparačných mechanizmov pri oprave poškodenej DNA v embryonálnej bunke tak prispievajú k formulácii návrhov pre praktickú reprodukčnú medicínu a tiež pre monitorovanie prekancerózných stavov v rámci prenatalnej diagnostiky dedičných ochorení vyplývajúcich zo zmien fenotypu raných embryonálnych buniek ako následku nekorektných reparácií poškodenia DNA.

### **Prínos z vykonaného projektu:**

Komplexnejšie údaje o priebehu reparačných procesoch po poškodení DNA počas mitózy poskytujú početné štúdie na somatických bunkách (Lukas et al., 2011; Aparacio et al., 2014). Poznatky o týchto mechanizmoch v zárodočných bunkách sú však obmedzené len na štúdie s indukovaným poškodením DNA samčích pohlavných buniek a následným oplodnením

(Grenier et al., 2012; Gawecka et al., 2013; Wang et al., 2013). Prakticky tu absentujú poznatky týkajúce sa reparačnej aktivity DNA v priebehu oogenézy resp. meiózy a tiež v priebehu ranej embryogenézy. Vecná hodnota navrhovaného projektu preto spočíva v získaní primárnych výsledkov s vysokou mierou originality o priebehu reparácie molekuly DNA po jej poškodení počas preimplantačného vývoja embrya a tiež o efektívite tohto procesu vzhľadom na vyšší vek samíc - matiek. Plánované štúdie poskytnú predstavu o súvislostiach medzi aktivitou mechanizmov kontrolujúcich genomickú integritu raného embrya a vznikom aneuploidie, ktorá sa považuje za potenciálne riziko vrodených ochorení resp. vzniku karcinogenézy po narodení. Riešením projektu tiež bude možné determinovať možný súvis fyziologickej aktivity reparačných mechanizmov poškodenej DNA (v ranom štádiu vývoja embrya) a výskytom fenotypických zmien embrya pochádzajúcich z rôznych vekových skupín samíc. Navyše nové informácie o podiele jednotlivých kľúčových proteínov (Mre11, NBS1, MDC1, Rad51...) na procese reparácie poškodenej DNA v ranom embryu poskytnú optimálnu orientáciu v kauzálnej diagnostike dedičných ochorení ale potenciálne aj v ďalšom výskume protinádorovej farmakoterapie. Vysokú a podstatnú pridanú hodnotu výsledkov prinesie morfometrická analýza obrazu po aplikácii sekvenčného snímania embryonálnych buniek v reálnom čase (time lapse imaging technology). Týmto metodickým nástrojom bude možné analyzovať dynamiku morfometrických parametrov (fenotypických zmien) embryonálnych buniek. V konečnom dôsledku budú nové výsledky potenciálne využité vo vývoji biotechnologických metód pri ktorých je používaná technológia in vitro oplodnenia a embryotransferu alebo cielená kultivácia in vitro v rámci diferenciácie embryonálnych kmeňových buniek pre potreby bunkovej terapie. Nové poznatky základného výskumu budú môcť byť použité v oblasti výskumu nádorovej farmakoterapie.

#### **Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

V experimentoch je plánované použiť laboratórne myši línie ICR (CD1) - samice v počte 1950 a samcov tej istej genetickej línie v počte 390 jedincov na celú dobu riešenia.

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

Samice myši budú fertilizované in vivo a použité výlučne ako donorky preimplantačných embryí, ktoré budú izolované post mortem. Okrem hormonálnej stimulácie (superovulácie) nebudú žiadnym spôsobom ovplyvnené. Hormonálna stimulácia intra-peritoneálnou injekciou hormonálnych prekurzorov nespôsobuje experimentálnym zvieratám žiadnu ujmu a nemá žiaden nepriaznivý vplyv na ich komfort v chovnom zariadení. Následné usmrtenie cervikálnou disrupciou je zákrok extrémne rýchly a tento spôsob eutanázie nespôsobuje žiadne časovo dlhšie utrpenie, pretože trvá približne 1-2 sekundy.

#### **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:**

Experimentálna časť projektu použitie metód predpokladá použitie metód molekulárnej biológie a cytológie na jednotlivých bunkách raných embryí a preto nie je možné uskutočniť tieto experimenty alternatívnym spôsobom, teda bez použitia donorových zvierat. Databázy medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód ECVAM, NC3Rs a AnimAlt-ZEBET neobsahujú takéto alternatívne metódy. Okrem toho, experiment nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom – napr. matematickými modelmi z oblasti modelovania proteínov, pretože tieto by predpokladali dostatočnú sumu údajov pre matematické modelovanie procesov. Náš projekt je práve zameraný na získanie takýchto údajov o funkčných súvislostiach sub-bunkových procesov po poškodení molekuly DNA v ranom embryu.

### **2. Redukcia počtu zvierat:**

Počet 1560 samíc a 390 samcov bol stanovený na základe analýzy efektivity in vivo oplodnenia a našich dlhodobých skúseností v tejto oblasti. Tiež boli brané do úvahy variability jednotlivých experimentov (pilotné a overovacie fázy apotreby štatistických analýz, ktoré si vyžadujú matematicky definovanú početnosť hodnotiteľných prvkov). Pre získanie technických zručností nového doktoranda budú použité neoplodnené myši vyradené z reprodukčného cyklu. Počet použitých zvierat bol stanovený tak, aby bola zachovaná reprodukovateľnosť a validita pokusov. Logistika experimentov - usmrcovanie a následný zber biologického materiálu je upravená v programe projektu tak, aby bolo v získaných vzorkách – embryonálnych bunkách analyzovaných viacero parametrov súčasne. Zaraďovanie ďalších zvierat do experimentov a tým aj kolekcia embryí sa ukončí v okamihu, keď bude zabezpečená adekvátne kvantita embryí (vzoriek) poskytujúca interpretovateľné a štatisticky preukazné výsledky.

### **3. Zjemnenie:**

Plánované experimenty sú zostavené tak, aby bola minimalizovaná bolesť alebo stres použitých pokusných zvierat a aby bol zabezpečený primeraný welfare od ich narodenia až po smrť. Vzhľadom na to, že použitie i.p. injekčného podania hormonálnych prípravkov a následná eutanázia cervikálnou disrupciou predstavujú najšetrnejší a jediný spôsob pre vykonanie potrebných úkonov, nie je tu alternatíva pre zjemnenie požadovaného postupu.

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.

Príloha č. 2 :

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

**Názov projektu:** 2779/18-221/3

**Vplyv aplikácie hydrogélou na báze hyaluronanu na biologickú bezpečnosť, biokompatibilitu a biodegradáciu do kolenného kĺbu pri osteoartritíde králikov**

**Kľúčové slová v projekte:** osteoartritída králikov, tyramínovaný a natívny hyaluronan, chondroitín sulfát

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

Cieľom projektu bude zistiť biologickú bezpečnosť, biokompatibilitu a biodegradáciu zmesi hyaluronanu, zosieťovaného tyramínovaného derivátu (HA-TA), chondroitín sulfátu a natívneho hyaluronanu pre profylaktickú i terapeutickú liečbu na štandardnom zvieracom modeli osteoartritídy králikov. Efekt na osteoartritídu bude sledovaný a porovnávaný s prípravkom Bonharen, ktorý je súčasťou profylaxie a liečby osteoartritídy.

Králiky sa podrobia aplikácii kolagenázy do kolenného kĺbu v celkovej i lokálnej anestézii. Doba pozorovania 1 mesiac. resp. 3 mesiace sú optimálne pri eliminácii nepriaznivých vplyvov na zdravie zvierat denným podávaním analgetika.

Predpokladáme, že ujma na použitých zvieratách bude v prvých troch dňoch po podaní kolagenázy, kedy sa uskutoční proces hojenia chrupky kĺbu. Počas všetkých úkonov sa bude eliminovať stres a utrpenie podaním celkovej anestézie 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 vyšších štádií osteoartritídy u ľudí s poškodením chrupkového tkaniva.

V projekte sa použije celkom 120 zvierat (dospelých jedincov, samcov, HIL). Experimentálny model u králikov sa vyvolá podaním kolagenázy. Po štvrtom, resp. dvanástom týždni sa budú sledovať symptómy osteoartritických zmien vplyvom rôznych foriem testovanej látky. Zvieratám bude počas celého experimentu (1 mesiac. resp. 3 mesiace) 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, aplikácia lokálneho anestetika s.c. - slabá

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

Indukcia modelu a aplikácia látok sa vykonajú v celkovej anestézii - stredná

Prežívanie zvierat po indukcii a aplikácii - stredná

Poaplikačný stav - stredná

Individuálne umiestnenie po indukcii a počas celého projektu za 1 mesiac, resp. 3 mesiace v štandardných klietkach pre králikov – slabá

Zvieratá s neliečenou osteoartritídou počas 30, resp. 120 dní - stredná.

## **b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia**

### *Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)*

Animálny model osteoartritídy sa štandardne používa pri sledovaní účinkov potenciálnych látok ovplyvňujúcich osteoartritídu kĺbov. 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 antiosteoartritickými vlastnosťami prípravkov použiteľných v medicíne u živých organizmov. Králik domáci je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre posúdenie účinkov zdravotníckeho produktu v mieste jeho podania.

### *Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)*

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych králikov tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť i validita postupu pre 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 králiky v 3 mesačnom postupe, ak sa zistí neefektivita liečby po 1 mesiaci, resp. sa nepoužijú už ďalšie v prípade, že sa prejaví negatívny vplyv podaných látok u prvých jedincov. Štúdie sa vykonajú postupne, t.j. nebudú všetky zvieratá naraz v jednom termíne indukované a použité.

### *Zásada zjemnenia (refinement)*

Zvieratá budú po presune z chovného zariadenia v aklimatizácii. Po dobu 7 dní sa umiestnia v dostatočne veľkých klietkach pre chov králikov v počte 1 na plochu 4200 cm<sup>2</sup> za stanoveného svetelného, tepelného a krmného režimu. Po podaní kolagenázy sa ustajnia individuálne, aby sa zamedzilo narušeniu prijímania krmiva v prípade napádania slabších jedincov agresívnejšími. Aplikácie kolagenázy a látok budú vykonávané skúseným odborným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Králiky počas postupu prežijú výraznejší stres v období po indukcii, ktorý budeme minimalizovať podaním analgetík. So zvieratami sa bude zaobchádzať šetrne a prostredie klietky 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 zvieratá 2-krát denne. O humánnom usmrtení bude rozhodovať veterinárny lekár na základe informácií od zodpovedných osôb za projekt. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii predávkovaním anestetík.

**Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:           nie**

Príloha č. 2 (počet strán 2)

Netechnické zhrnutie projektu

2738/18-221/3

**Názov projektu:** Úloha erytropoetínového receptora v odpovedi buniek adenokarcinómu mliečnej žľazy na paklitaxel v podmienkach *in vitro* a *in vivo*.

**Kľúčové slová:** anémia, erytropoetín, mamárny adenokarcinóm, paklitaxel, potkan, rakovina

**Účel projektu:** základný výskum

**Ciele projektu:**

1. V *in vivo* podmienkach za použitia samíc potkanov kmeňa Wistar Furth porovnať citlivosť nádorov získaných inokuláciou ako potkaních mamárnych adenokarcinómových buniek RAMA 37 (koncentrácia buniek bude vybratá na základe výsledkov predpokusu), tak aj nádorov získaných inokuláciou buniek RAMA 37-28 (koncentrácia buniek bude vybratá na základe výsledkov predpokusu) s overexpresiou erytropoetínového receptora (EPOR) na chemoterapiu paklitaxelom (PTX) a kombináciou PTX a erytropoetínu (EPO). Po skončení terapie v nádorovom tkanive zvierať uskutočniť imunohistochemickú analýzu markerov proliferácie (Ki-67) a apoptózy (BCL-2, BCL-XL, BAD, BAX) a v sére pomocou ELISA testu aj stanovenie markerov angiogenézy (VEGF, PDGF, FGF).
2. V *in vivo* podmienkach za použitia potkanov kmeňa Wistar Furth overiť úlohu EPO-EPOR signalizácie v rezistencii nádorov získaných inokuláciou potkaních mamárnych adenokarcinómových buniek RAMA 37-28 s overexpresiou EPOR v podmienkach s aplikovanou terapiou PTX. Po skončení terapie uskutočniť rovnaké imunohistochemické analýzy nádorov a analýzu séra ako je popísané v celi č. 1. Celkový počet použitých zvierať bude 94 ks.

**Prínos z vykonaného projektu:**

Na základe publikovaných prác preukazujúcich ochranný účinok EPO na nádorové bunky ovariálnych adenokarcinómov v prostredí PTX ako aj zmeny citlivosti buniek adenokarcinómu mliečnej žľazy indukovanej overexpresiou EPOR v podmienkach *in vitro*, sme sa rozhodli detailnejšie testovať úlohu EPO-EPOR aj v odpovedi buniek adenokarcinómu mliečnej žľazy na PTX a to ako v podmienkach *in vitro*, tak aj *in vivo*. Predpokladáme, že pochopenie súvislosti medzi EPO a PTX indukovanou signalizáciou a následne zmenenou citlivosťou nádorovej bunky, prispeje k zvýšeniu účinnosti terapie PTX.

Navyše, v nadväznosti na naše *in vitro* experimenty predpokladáme, že získame plánovanými experimentami dôležité informácie o tom ako ovplyvňuje EPO, používaný v prípade nádorových pacientov na úpravu anémie, rast inokulovaných nádorových buniek u potkana v podmienkach bez alebo s podanou chemoterapiou. Prínosom projektu môže byť odhalenie presných mechanizmov pôsobenia EPO na nádorový rast a v prípade jeho negatívneho vplyvu dokonca vyslanie dôležitého signálu, ktorý by znamenal STOP aplikácie EPO pacientom, ktorým bude potvrdená prítomnosť EPO receptora na povrchu ich nádorových buniek.

**Ujma spôsobená experimentálnym zvieratám:** indukcia nádora inokuláciou benígnej línie buniek, možné zhoršenie zdravotného stavu aplikáciou chemoterapeutika.

**Porovnanie ujmy a prínosu:** vzhľadom na charakter použitej línie nepredpokladáme vyvinutie stavu, kedy by zviera pociťovalo diskomfort/výraznú bolesť. Uvedený stav by mohol nastať u skupín s podávaným chemoterapeutikom, v tomto prípade budeme postupovať spôsobom uvedeným nižšie (zásada zjemnenia). Ujma spôsobená zvieratám bude nižšia ako prínos z uvedených experimentov, získané výsledky napomôžu upraviť terapiu v prípade onkologických pacientov za účelom dosiahnutia jej maximálnej účinnosti.

**Druh a počet použitých zvierat:** potkan (*Rattus norvegicus*), kmeň Wistar-Furth, samice, 94 ks

**Predpokladaná úroveň krutosti:** stredná.

Inokulácia nádorových buniek a podávaných látok je minimálne bolestivá (budú použité injekčné striekačky s najtenšími ihlami). V prípade vyvinutia príznakov naznačujúcich utrpenie zvierat budeme postupovať spôsobom uvedeným nižšie (zásada zjemnenia).

**Uplatňovanie zásad 3R (Replacement, Reduction, Refinement):**

**Zásada nahraditeľnosti:**

Vzhľadom k charakteru pokusu (hodnotenie účinnosti chemoterapeutika na štandardnú a modifikovanú líniu mamárneho adenokarcinómu) je nutné, aby bolo chemoterapeutikum (PTX) podávané *in vivo*. Proces malígnej transformácie ovplyvňuje celý rad dejov, ktoré nie je možné simulovať *in vitro*. Chemoterapeutiká môžu modifikovať

promóciu a progresiu tumorov nielen priamym ovplyvnením rastu a proliferácie buniek ale aj nepriamo cez aktiváciu imunitného systému. Testovanie účinnosti chemoterapeutika na rast buniek štandardnej a modifikovanej (s overexpresiou EPOR) mamárnej nádorovej línie vyžaduje, aby bola odpoveď na jeho pôsobenie výsledkom komplexu dejov prebiehajúcich v celom organizme. V štúdiu rakoviny mliečnej žľazy sa najviac využívajú hlodavce, predovšetkým potkany, ktoré sú fylogeneticky najnižším druhom vhodným pre takýto typ experimentov. V navrhovanom type experimentov je nutné použiť potkany, keďže u iných hlodavcov (myši) nie je dostupná línia s overexpresiou EPOR.

#### **Zásada zníženia:**

Pre objektívne vyhodnotenie *in vivo* experimentov je potrebný dostatočný počet zvierat v experimentálnych skupinách. V predpokuse bude použitých 12 zvierat (3 rôzne koncentrácie buniek testované na štvorici zvierat) pre otestovanie tumorigenicity RAMA 37 buniek a rovnaký počet zvierat pre testovanie tumorigenicity RAMA 37-28 buniek. Pre naše experimenty použijeme 10 zvierat na každú experimentálnu skupinu. Tento počet je dostatočný pre štatistické vyhodnotenie výsledkov, validitu a reprodukovateľnosť pokusu. Ďalšie zníženie počtu zvierat by znemožnilo hodnoverné vyhodnotenie experimentu.

#### **Zásada zjemnenia:**

Počas pokusu zvieratá nebudú vystavené dlhotrvajúcim bolestivým zákrokom. Zvýšením frekvencie kontroly zdravotného stavu zvierat po inokulácii nádorových buniek, sledovaním veľkosti nádorov a zmien v správaní zvierat zminimalizujeme možnosť pociťovania diskomfortu resp. výraznej bolesti spojenej so zhoršením zdravotného stavu zvierat. V prípade uvedených príznakov, ktoré budú pretrvávajúť dlhšie ako 3 dni, budú zvieratá usmrtené nadmernou dávkou anestetika (Zoletil inj.). Vzhľadom na charakter použitej nádorovej línie (benígna) je rozšírenie nádora do iných tkanív a s tým spojené zhoršenie zdravotného stavu, veľmi nepravdepodobné, neexistujú literárne údaje, ktoré by to potvrdzovali. Možné zhoršenie zdravotného stavu nemožno vylúčiť u skupín s podávaným chemoterapeutikom (paklitaxel), v tomto prípade uplatníme vyššie uvedený postup. Po ukončení experimentu budú zvieratá usmrtené podaním nadmernej dávky anestetika (Zoletil inj.). Odber materiálu na vyšetrenie sledovaných parametrov bude uskutočnený u všetkých zvierat, aj u tých, ktoré budú prípadne usmrtené v priebehu pokusu. Zvieratá budú držané v kliebkach s obohatením prostredia, s dodržaním požiadaviek definovaných v prílohe č. 5 k nariadeniu vlády SR č. 377/2012 Z. z.

**Spätné posúdenie projektu:** V projekte nebudú použité primáty a ani postupy klasifikované ako „kruté“, čo potvrdzuje aj vyjadrenie etickej komisie, projekt preto podľa § 37 NV 377/2012 Z.z. nepodlieha spätnému posúdeniu.

Spätné posúdenie na základe rozhodnutia  
2738/18-221/3 bude vykonané dňa 30.03.2023.

10  
Príloha č. 2 :

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

Názov projektu: 2800/18-221/3

Sledovanie účinku vysokoindukčnej elektromagnetickej stimulácie a laserového vysokovýkonného žiarenia na modeli degeneratívneho osteoartritického ochorenia kolenného kĺbu kráľika

**Kľúčové slová v projekte:** osteoartritída králikov, elektroliečba, nízkofrekvenčné elektromagnetické pole, laserové žiarenie

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

Cieľom projektu bude zistiť bezpečnosť, sledovať účinok aplikácie fyzikálnych liečebných podnetov indukovaných elektrickým prúdom pomocou prístroja na elektroliečbu produkujúcim nízkofrekvenčné časovo premenné elektromagnetické pole a laserového vysokovýkonného žiarenia na vývoj osteoartritídy kolenného kĺbu králikov v modeli indukovanom enzymaticky. pre profylaktickú i terapeutickú liečbu na štandardnom zvieracom modeli osteoartritídy králikov. Efekt na osteoartritídu bude sledovaný a porovnávaný s neliečenou kontrolou a zdravými SHAM zveratami.

Králiky sa podrobia aplikácii kolagenázy do kolenného kĺbu v celkovej i lokálnej anestézii. Doba pozorovania 56 dní je optimálna pri eliminácii nepriaznivých vplyvov na zdravie zvierat denným podávaním analgetika.

Predpokladáme, že ujma na použitých zvieratách bude v prvých troch dňoch po podaní kolagenázy, kedy sa uskutoční proces hojenia chrupky kĺbu. Počas všetkých úkonov sa bude eliminovať stres a utrpenie podaním celkovej anestézie 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 účinnej liečebnej procedúry pomocou zdravotníckeho prostriedku využiteľného v profylaxii vzniku vyšších štádií osteoartritídy u ľudí s poškodením chrupkového tkaniva.

V projekte sa použije celkom 40 zvierat (dospelých jedincov, samcov, HIL). Experimentálny model u králikov sa vyvolá podaním kolagenázy. Po ôsmich týždňoch sa budú sledovať symptómy osteoartritických zmien vplyvom rôznych foriem fyzikálnych liečebných podnetov. Zvieratám bude počas celého experimentu (56 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:

Vázenie zvierat- slabá

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

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

Indukcia modelu a aplikácia látok sa vykonávajú v celkovej anestézii - stredná

Prežívanie zvierat po indukcii a aplikácii - stredná

Poaplikačný stav – stredná

Fixácia počas procedúry - 1 hodina - stredná

Individuálne umiestnenie po indukcii a počas celého projektu za 56 dní v štandardných kliebkach pre králikov – stredná.

## **b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia**

### *Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)*

Animálny model osteoartritídy sa štandardne používa pri sledovaní účinkov potenciálnych látok ovplyvňujúcich osteoartritídu kĺbov. 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 antiosteoartritickými vlastnosťami prípravkov použiteľných v medicíne u živých organizmov. Králik domáci je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre posúdenie účinkov zdravotníckeho produktu v mieste jeho podania.

### *Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)*

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych králikov tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť i validita postupu pre makroskopicko-morfologické, denzitometrické a histomorfometrické vyšetrenia, 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. V projekte sa budú liečené jedince zaradiť do liečebného procesu postupne, preto z dôvodu šetrenia zvierat nebude použitý plný počet zvierat, ak sa ukáže neúčinnosť liečby u prvých jedincov a nebude potrebné použiť ďalšie v štúdiu.

### *Zásada zjemnenia (refinement)*

Zvieratá budú po presune z chovného zariadenia v aklimatizácii. Po dobu 7 dní sa umiestnia po štyri v dostatočne veľkých kliebkach (plochu 4200 cm<sup>2</sup>) pre chov králikov za stanoveného svetelného, tepelného a kŕmneho režimu. Po podaní kolagenázy sa ustajnia individuálne, aby sa zamedzilo narušeniu prijímania krmiva v prípade napádania slabších jedincov agresívnejšími. Aplikácie kolagenázy a látok budú vykonávané skúseným odborným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Králiky počas postupu prežijú výraznejší stres v období po indukciu, ktorý budeme minimalizovať podaním analgetík. So zvieratami sa bude zaobchádzať šetrne a prostredie kliebky 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 zvieratá 2-krát denne. O humánnom usmrtení bude rozhodovať veterinárny lekár na základe informácií od zodpovedných osôb za projekt. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii predávkovaním anestetík.

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

Príloha č. 2 :

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

**Názov projektu:** 2791/18-221/3

**Ovplyvnenie hojenia excizionálnych mechanických rán u zdravých i diabetických potkanov komplexným krytím a elektromagnetickými impulzami**

**Kľúčové slová v projekte:** hojenie rán, diabetes mellitus, hyaluronan, kolagén, polykaprolaktónové nanočastice, mezenchymálne stromálne bunky, elektromagnetické pole

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

Cieľom projektu bude zistiť účinok sumárneho vplyvu pôsobenia krytu na báze hydrogélů z hyaluronanu sodného, kolagénu, polykaprolaktónových nanočastíc, živých mezenchymálnych stromálnych buniek (MSC) a impulzného elektromagnetického poľa, resp. podaných látok a fyzikálneho podnetu samostatne pre liečbu rán na štandardnom zvieracom modeli u zdravých a diabetických potkanov. Efekt na hojenie bude sledovaný a porovnávaný s prípravkom Akutol hydrogel, ktorý sa komerčne používa v hojacom procese vulnusov.

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

Predpokladáme, že ujma na použitých jedincov bude v prvých dňoch po odstránení časti kožného tkaniva, kedy sa začne proces hojenia excizionálnej 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 indukcii vulnusu a dennej aplikácii analgetík. Z hľadiska bezpečnosti i účinnosti budúceho zdravotného prostriedku vo forme komplexného skefoldu a elektromagnetickej liečby pre človeka prínos projektu výrazne prevyšuje ujmu u experimentálnych zvierat.

Očakávaným prínosom projektu bude vývoj účinného zdravotníckeho prostriedku a liečebného postupu využiteľného v terapii rán u ľudí s poškodením kožného tkaniva v plnom profile.

V projekte sa použije celkom 160 zvierat (dospelých laboratórnych potkanov, samcov, inbredného kmeňa ZDF). Experimentálne jedince sa zaradia do postupov podľa hmotnosti.

Experimentálny model u potkanov sa vyvolá odstránením časti kožného tkaniva medzi lopatkami chrbtovej oblasti. Po treťom, siedmom, resp. štrnástom dni sa budú sledovať jednotlivé štádiá hojenia vplyvom rôznych foriem testovaných látok a liečebných procedúr. Zvieratám bude počas celého experimentu (14 dní) podávané každý deň krmivo a pitná voda *ad libitum*.

Celkovo v projekte budú vykonávané práce na potkanoch pri strednej úrovni krutosti podľa klasifikácie krutosti postupov:

Váženie zvierat- slabá

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

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

Indukčné zákroky v celkovej anestézii - stredná

Prežívanie zvierat po indukcii - stredná  
Pozákový stav – stredná  
Preväzovanie rán v celkovej anestézii - stredná  
Individuálne umiestnenie po operácii a počas celého projektu za 14 dní v priehľadných klietkach – stredná.

## **b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia**

### *Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)*

Animálny model hojenia rán sa štandardne používa pri sledovaní účinkov potenciálnych látok ovplyvňujúcich hojaci proces. 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 hojacimi vlastnosťami prípravkov použiteľných v medicíne u živých organizmov. Potkan laboratórny je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre posúdenie účinkov zdravotníckeho produktu a liečebného postupu 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, makroskopicko-morfologické, histologické analýzy, ako aj ich štatistické vyhodnotenie. Zvieratá budú samčieho pohlavia, rovnakého veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom. Z dôvodu šetrenia potkanov nebudú zaradené liečené diabetické jedince, ak sa zistí neefektivita použitých látok, resp. liečebnej procedúry u zdravých zvierat.

### *Zásada zjemnenia (refinement)*

Potkany 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 indukcii rán sa ustajnia individuálne počas 14 dní, aby sa zamedzilo strhávaníu obväzov, narušeniu hojaceho procesu i prijímania krmiva v prípade napádania slabších jedincov agresívnejšími. Na zabránenie vzniku zápalových reakcií sa použije antibiotikové krytie počas prvých troch dní. Indukčné zákroky budú vykonávané skúseným odborným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Potkany počas postupu prežijú výraznejší stres pri indukcii vulnusov, ktorý sa bude 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 prvom dni zvieratá s indukovanými ranami 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 hlbkej celkovej anestézii predávkovaním anestetík.

**Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:           nie**